

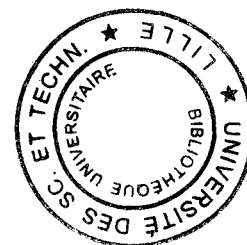
UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE I

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de
Docteur d'Université en Sciences de la vie et de la Santé

Par

Sandrine CHOPIN-DELANNOY



**FONCTION ET LOCALISATION SUBCELLULAIRE
DU RÉCEPTEUR NUCLÉAIRE ORPHELIN Rev-erb α**

Soutenue le 21 septembre 1999 devant la commission d'examen

Président : Pr Xavier DESBIENS
Rapporteurs : Pr Anne GUIOCHON-MANTEL
Dr Hinrich GRONEMEYER
Examineurs Pr Bart STAELS
Pr Vincent LAUDET

A mes parents

A vincent

REMERCIEMENT

Je remercie les membres du jury d'avoir bien voulu accorder de leur temps à la lecture de ce travail.

Je tiens à remercier le Professeur Dominique Stéhelin pour m'avoir permis de travailler dans son laboratoire ainsi que Vincent Laudet pour m'avoir accepté dans son équipe.

Je remercie Martine Duterque de m'avoir recueilli dans son équipe, Alexis et sa passion de la 3D, Virginie avec qui je peut parler des récepteurs nucléaires, Anne (Claire) et Nathalie (la-petite-dernière) pour leur dynamisme et leur soutien moral.

Ce travail sur les récepteurs nucléaires m'a permis de collaborer avec l'équipe de Bart Staels que je tiens à remercier, et plus particulièrement Philippe pour m'avoir initié au métabolisme lipidique.

Un grand merci à Agnès pour avoir été la compagne de tous les coups durs des clonages.

Je n'oublie pas Jean-Luc pour m'avoir initié à la phosphorylation, Christian et sa connaissance des cellules, Sophana l'artiste du « scan », Frédéric (non je ne suis pas une handicapée du clavier!).

Je n'oublie pas ceux de mon ancien groupe qui sont maintenant à Lyon, Jean-Marc (félicitations!), Oriane, Rachid, Franck, Hector, Catherine, Thomas et Carole.

Je remercie aussi nos secrétaires de choc, et les dames de la laverie avec qui la journée à toujours commencé dans la bonne humeur.

PUBLICATIONS

N. VU-DAC*, **S. CHOPIN-DELANNOY***, P. GERVOIS, E. BONNELYE, G. MARTIN, J-C. FRUCHART, V. LAUDET and B. STAELS

« The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor α and Rev-erb α mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates »

The Journal of Biological Chemistry (1998) 273 : 25713-25720

* copremiers auteurs

P. GERVOIS*, **S. CHOPIN-DELANNOY***, A. FADEL, G. DUBOIS, V. KOSYKH, J-C. FRUCHART, J. NAJIB, V. LAUDET and B. STAELS

« Fibrates increase human Rev-erb α expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element »

Molecular Endocrinology (1999) 13 : 400-409

* copremiers auteurs

S. CHOPIN-DELANNOY, F. DELAUNAY, A. BEGUE and V. LAUDET

« Identification of the nuclear localization signal within the DNA binding domain of the Rev-erb α orphan nuclear receptor »

en préparation

J.M VANACKER, E. BONNELYE, **S. CHOPIN-DELANNOY**, C. DELMARRE, V. CAVAILLES and V. LAUDET

« Transcriptional activities of the orphan nuclear receptor ERR α (Estrogen Receptor-Related Receptor- α) »

Molecular Endocrinology (1999) 13 : 764-773

V. LAUDET ET **S. DELANNOY**

« Comment mettre en route un récepteur nucléaire? Apport des données structurales »

Medecine Sciences (1996) 12 : 528-532

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	5
PRESENTATION DU MEMOIRE.....	6
I - INTRODUCTION.....	9
A- LA SUPERFAMILLE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES.....	10
I- Présentation.....	10
1-1- Les membres de la superfamille.....	11
1-2- Les différents domaines d'un récepteur nucléaire.....	13
II- Fixation à l'ADN.....	14
2-1- Les éléments de réponse	14
2-1-1- Le motif de reconnaissance	14
2-1-2- Deux modes de fixation	15
2-2- Le domaine C.....	16
2-2-1- Structure du domaine C : du doigt de zinc à l'hélice-boucle-hélice	16
2-2-2- Les boîtes P et D	17
2-2-3- La fonction de dimérisation du domaine C.....	19
2-2-4- Les boîtes T et A	20
2-3- Spécificité de fixation des récepteurs sur leur élément de réponse.....	21
III- Fixation du ligand.....	22
3-1- Structure du domaine de fixation du ligand.....	22
3-1-1- Structure sans ligand	22
3-1-2- Structure avec ligand	23
3-1-3- Agonistes et antagonistes	24
3-2- La fonction de dimérisation du domaine E.....	25
IV- Activité transcriptionnelle	26
4-1- La fonction d'activation de la transcription dépendante du ligand : AF2.....	27
4-2- Le cas de l'hétérodimère RXR-RAR.....	29
4-3- Les coactivateurs	31
4-3-1- Les différents domaines des coactivateurs TIF2/SRC1/RAC3	32
4-3-2- Une signature des coactivateurs.....	33
4-4- CBP/P300, le co-intégrateur.....	35

4-5- Les corépresseurs	36
4-5-1- Les domaine d'interaction récepteur-corépresseur	37
4-5-2- Rôle des corépresseurs sur l'activité des ligands antagonistes.....	38
4-5-3- Mode d'action des corépresseurs.....	39
4-6- Passage du complexe corépresseur au complexe coactivateur	40
V- Localisation intracellulaire.....	41
5-1- Le pore nucléaire	41
5-2- Mécanisme d'importation nucléaire	41
5-2-1- Les signaux de localisation nucléaire	41
5-2-2- Ran et les différentes importines	42
5-2-3- Le mécanisme.....	43
5-3- Le transport nucléaire des récepteurs nucléaires	44
5-3-1- Les protéines de choc thermique, HSP.....	45
5-3-2- Les signaux de localisation nucléaire	45
5-3-3- Le complexe récepteur-importine.....	47
B- LES RECEPTEURS NUCLEAIRES ORPHELINS.....	47
I- La recherche de ligand.....	48
1-1- Les ligands	48
1-2- Quelques méthodes de recherche de ligand.....	48
1-3- Les ligands répresseurs de la transcription	49
II- Les récepteurs nucléaires orphelins atypiques.....	50
2-1- Les récepteurs Knirps et Odr7 sont de vrais orphelins.....	50
2-2- Les récepteurs DAX-1 et SHP.....	51
III- La phosphorylation, un mode de régulation des récepteurs.....	52
3-1- Modulation de l'activité transcriptionnelle.....	53
3-2- Modulation de la fixation à l'ADN	54
3-3- Modulation de la dimérisation.....	54
IV- Rôle biologique des récepteurs orphelins	55
4-1- les récepteurs nucléaires ont des fonctions importantes.....	55
4-2- Intervention dans les voies de signalisation des récepteurs classiques.....	55

C- LES RECEPTEURS REV-ERB ET PPAR.....	57
I- Les récepteurs orphelins Rev-erbα et Rev-erbβ.....	57
1-1- Fixation à l'ADN.....	57
1-1-1- L'élément de réponse.....	57
1-1-2- Structure du domaine de fixation à l'ADN des récepteurs Rev-erb.....	58
1-2- Activité transcriptionnelle de Rev-erb.....	59
1-2-1- Les Rev-erb sont des répresseurs de la transcription.....	59
1-2-2- Interaction avec les corépresseurs.....	60
1-3- Rôle biologique de Rev-erb.....	62
1-3-1- La régulation de l'expression des gènes <i>Rev-erb</i>	62
1-3-2- Rôle dans la différenciation adipocytaire.....	63
1-3-3- Action antagoniste de Rev-erb et ROR.....	63
II- Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosome : PPAR...64	64
2-1- La famille des PPAR.....	64
2-2- Fixation à l'ADN et activité transcriptionnelle.....	65
2-3- Les ligands.....	65
2-4- Rôle biologique de PPAR α	67
2-4-1- Effet de l'inactivation du gène PPAR α	67
2-4-2- Rôle de PPAR α dans le métabolisme lipidique.....	67
2-5- Rôle biologique de PPAR γ	69
2-5-1- La différenciation adipocytaire.....	69
2-5-2- Le cancer du colon.....	71
2-6- Les récepteurs PPAR et la plaque d'athérome.....	72
2-6-1- Les macrophages.....	72
2-6-2- La réaction inflammatoire induite par les macrophages.....	74
2-6-3- La réaction inflammatoire induite par les cellules musculaires lisses.....	74
2-7- Conclusion.....	75
II - RESULTAT.....	76
I-Articles 1 : The nuclear receptor perosisome proliferator-activated receptor α and Rev-erbα mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates.....	77
A- Introduction.....	77
B- Résultats.....	78
C- Discussion.....	79
1- Régulation de l'expression du gène de l'apoAI chez l'homme et le rat.....	79

2- Chez le rat, l'apoAI est un gène cible de Rev-erb α	80
3- Rev-erb α est-il responsable de tous les effets répresseurs des fibrates?.....	81
II-Articles 2 : Fibrates increase human Rev-erbα expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element.....	83
A- Introduction	83
B- Résultats.....	83
C- Discussion.....	84
1- Rev-erb α est un gène cible de PPAR α	84
2- Interférence entre les voies de signalisation de Rev-erb α et PPAR α	84
3- Mécanismes d'action de l'effet négatif des fibrates	85
4- La différenciation adipocytaire.....	86
5- La différenciation musculaire	87
III-Articles 3 : Identification d'un signal de localisation nucléaire dans le domaine de fixation à l'ADN du récepteur nucléaire orphelin Rev-erbα.....	88
A- Introduction	88
B- Résultats.....	89
C- Discussion	94
1- Les protéines Rev-erb sont nucléaires	95
2- Rev-erb α n'a pas de NLS dans son domaine E	95
3- Rev-erb α n'a pas de NLS dans la jonction entre les domaines C et D	96
4- Le NLS de Rev-erb α est dans le domaine de fixation à l'ADN.....	96
D- Matériels et méthodes	98
III- REFERENCES	103

ABREVIATIONS

AF	: Fonction d'activation
AMPC	: Adénosine monophosphate cyclique
apo	: apolipoprotéines
CBP	: protéine fixant CREB(« CREB Binding protein »)
Domaine A/B:	domaine amino-terminal
Domaine C:	domaine de liaison à l'ADN
Domaine D:	domaine charnière
Domaine E:	domaine de liaison du ligand
DR	: Répétitions directes (« Direct Repeat »)
GFP	: Protéine à fluorescence verte (« Green Fluorescent Protein »)
HDL	: Lipoprotéines de haute densité (« Hight Density Lipoprotein »)
HSP	: Protéine de choc thermique (« Heat schoc Protein »)
kDa	: kiloDalton
LDL	: Lipoprotéines de faible densité (« Low Density Lipoprotein »)
MR	: Récepteur des minéralocorticoïdes
N-CoR	: Co-répresseur de récepteurs nucléaires
NLS	: Signal de localisation nucléaire (« Nuclear Localization Signal »)
Odr	: “ odorant response gene ”
PAL	: Palindrome
PPRE	: Elément de réponse du récepteur PPAR
RevDR2	: Elément de réponse dimérique du récepteur Rev-erb
RevRE	: Elément de réponse monomérique du récepteur Rev-erb
SMRT	: “ Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors ”)

Le nom des récepteurs et leurs abréviations correspondantes sont indiqués dans la figure 1.

PRESENTATION DU MEMOIRE

La famille des récepteurs nucléaires est un ensemble de gènes codant des facteurs de transcription dont l'activité est modulée par un ligand ce qui est le cas au moins pour la moitié des membres de cette famille. Ainsi ces récepteurs sont capables de réguler directement l'expression de gènes cibles en se fixant sur des séquences d'ADN précises situées dans les régions régulatrices de ces gènes. L'intérêt de lier un côté fondamental (comment les cellules eucaryotes régulent-elles l'expression de leur génome) à un aspect plus appliqué (comment relier des pathologies à des altérations des récepteurs nucléaires ou de leur ligands) a conduit de nombreux chercheurs à se pencher sur cette famille. Nous savons que les récepteurs nucléaires sont codés par une vaste famille de gènes. Cependant, la fonction de la grande majorité des membres de cette superfamille reste un mystère. En effet de nombreux récepteurs sont dits « orphelins » car leur ligand, s'il existe, n'a pas encore été identifié.

De nombreux travaux ont été entrepris sur les récepteurs nucléaires, la plupart du temps en disséquant soigneusement l'un d'entre eux. C'est ce que nous avons fait ici en étudiant le rôle biologique et le mécanisme de régulation de Rev-erb α ainsi que la caractérisation de son signal de localisation nucléaire majeur.

Avant de présenter une étude fonctionnelle de ce récepteur orphelin, il nous fallait présenter de manière assez précise ce qui est connu des récepteurs nucléaires ainsi que des possibles mécanismes de régulation de l'activité des récepteurs orphelins: c'est ce que nous avons essayé de faire dans l'introduction de ce mémoire. Nous avons décidé de présenter le côté fonctionnel des récepteurs nucléaires plutôt que leur rôle physiologique, celui-ci nous paraissant trop spécifique de chaque récepteur. Nous avons donc préféré présenter les résultats que les analyses structure/fonction des récepteurs classiques ont permis d'obtenir. Nous avons ainsi pu nous appuyer sur ces données pour émettre des hypothèses sur les mécanismes fonctionnels concernant Rev-erb α .

Dans une première partie de l'introduction, après avoir brièvement présenté la superfamille des récepteurs nucléaires, nous avons présenté les éléments de réponse sur lesquels ils interagissent sur l'ADN. Ceci, nous a alors permis de discuter plus en détail la

structure et les rôles des différents domaines qui ont été caractérisés dans les récepteurs nucléaires et d'associer à ces domaines une ou plusieurs fonctions (fixation à l'ADN, dimérisation, fixation du ligand, régulation transcriptionnelle, localisation nucléaire...). Il devenait alors intéressant de discuter quelques mécanismes de mise en route des récepteurs nucléaires et plus particulièrement leur interaction avec les co-activateurs et les co-répresseurs.

Pour la deuxième partie, nous nous sommes plus spécifiquement intéressés aux récepteurs orphelins. La question centrale que posent ses molécules est de savoir comment leur activité peut elle être régulée: plusieurs mécanismes sont envisageables: (i) l'existence de ligands. Nous avons donc présenté les différentes stratégies de recherche de ligands en insistant sur la différence entre « vrais » ligands et molécules activatrices. (ii) la régulation de leur activité par d'autres voies ne nécessitant pas l'existence d'un ligand comme la phosphorylation. (iii) les capacités de certains récepteurs orphelins à réguler l'activité de récepteurs dont le ligand est connu.

Finalement, dans une troisième partie, nous avons présenté plus en détail les données concernant le récepteur orphelin étudiés dans ce travail Rev-erb α , ainsi que le récepteur nucléaire PPAR α qui module l'expression du gène de *Rev-erb α* .

Nous avons choisi de présenter nos résultats sous forme d'articles directement insérés dans la thèse. Chaque article est précédé d'une introduction permettant de replacer dans son contexte les résultats obtenus. Il est suivi d'une discussion afin de mieux mettre en évidence les conclusions auxquelles nous sommes parvenus ainsi que les perspectives qu'elles nous inspirent.

Ce travail a permis pour la première fois de décrire précisément le rôle biologique de Rev-erb α . En effet, nous avons identifié l'un de ses gènes cibles (l'apolipoprotéine AI), ainsi qu'un activateur de sa transcription (le récepteur nucléaire PPAR) lors du métabolisme lipidique. Ces travaux nous ont permis d'émettre l'hypothèse d'un modèle de régulation de *Rev-erb α* par les molécules hypolipémiantes. Par ailleurs, ces résultats suggèrent une régulation complexe de l'expression du gène *Rev-erb α* .

Une autre approche de ce travail consiste à caractériser le signal de localisation nucléaire majeur des protéines Rev-erb afin de savoir comment un récepteur nucléaire orphelin est transloqué dans le noyau, lieu d'action de cette protéine.

INTRODUCTION

A- LA SUPERFAMILLE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES

I- Présentation

La complexité croissante des organismes multicellulaires au cours de l'évolution s'est accompagnée de l'apparition de systèmes de communication hormonale. Dans le règne animal plusieurs modes de communication coexistent, coopèrent ou éventuellement interfèrent. A chacun de ces systèmes correspondent des molécules signal particulières telles que les facteurs de croissances, les neurotransmetteurs mais aussi les hormones et les vitamines. Ces molécules agissent grâce à des récepteurs spécifiques qui sont classés en deux catégories. La première, regroupe les récepteurs membranaires qui, après la fixation de molécules hydrosolubles, comme les facteurs de croissances, déclenchent des cascades de transduction du signal pour enfin réguler la transcription de gènes cibles. La deuxième catégorie comprend des protéines principalement localisées dans le noyau qui ont pour ligands spécifiques des molécules lipophiles diffusant à travers la membrane cytoplasmique, ce sont des facteurs de transcription dépendant du ligand. C'est cette famille des récepteurs nucléaires d'hormone qui fait l'objet de ce travail.

Parmi ces molécules liposolubles, les hormones telles que les stéroïdes, les rétinoïdes, les hormones thyroïdiennes et la vitamine D3 ont été isolées au début du siècle en se basant sur leur capacité à réguler des fonctions physiologiques majeures comme la reproduction ou le développement, et la métamorphose. La plupart d'entre elles sont également associées à des maladies humaines connues comme l'hyperthyroïdie, l'ostéoporose, le cancer du sein et le rachitisme par exemples (Berkow *et al.*, 1988). Les médiateurs de l'action de ces hormones sont longtemps restés élusifs, et c'est le développement de ligands radiomarqués qui a permis l'identification de protéines liantes, capables d'être transloquées du cytoplasme vers le noyau suggérant qu'elles pourraient faire un lien direct entre le contrôle de la transcription et les signaux hormonaux (Jensen *et al.*, 1967). Au milieu des années 1970, l'action des stéroïdes sur leurs tissus cibles a été montrée possible grâce à la présence de protéines récepteurs à haute affinité spécifique (revue de Yamamoto et Alberts, 1976). En effet, ces hormones liposolubles sont capables de passer à travers la double couche lipidique des membranes cellulaires et interagir avec leurs propres récepteurs. Par la suite, l'identification de gènes cibles répondant

aux hormones a permis la caractérisation d'une voie de signalisation des hormones stéroïdiennes (Beato, 1989). Le modèle classique d'action des hormones stéroïdiennes/thyroïdiennes propose que la fixation du ligand sur le récepteur induise un changement allostérique de celui-ci, ce qui permet l'obtention d'un complexe hormone-récepteur capable de se fixer sur un élément de réponse spécifique dans la région du promoteur d'un gène cible, cette fixation permettant la modulation de l'expression des gènes. Ainsi les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription dépendants du ligand.

Les premiers récepteurs nucléaires clonés ont été les récepteurs aux oestrogènes (ER) et aux glucocorticoïdes (GR) (Walter *et al.*, 1985; Weinberger *et al.*, 1985, Hollenberg *et al.*, 1985). La stratégie utilisée a consisté à extraire et fractionner sur gradient de sucrose les ARN de lignées cellulaires connues pour fortement exprimer le récepteur : la lignée de cellules de cancer du sein humain MCF7 pour ER, et la lignée de cellules lymphoïdes humaine IM-9 pour GR. Chaque fraction d'ARN a été traduite *in vitro* en protéines qui sont immunoprécipitées afin d'identifier les fractions codant le récepteur recherché. Ces fractions d'ARN ont ensuite été transcrites en ADN complémentaire et clonées dans des phages d'expression. L'analyse de ces phages positifs a permis le clonage de l'ADN complémentaire des récepteurs aux oestrogènes et aux glucocorticoïdes. La comparaison de ces séquences entre ER et GR montre qu'ils ont une forte identité entre eux mais aussi avec l'oncogène *v-erbA*. C'est ainsi qu'est apparu la notion de famille.

1-1- Les membres de la superfamille

La superfamille des récepteurs nucléaires contient de nombreux récepteurs à des hormones dont les premiers membres identifiés furent les récepteurs aux hormones stéroïdiennes à cause de leur importance en santé humaine: citons les stéroïdes sexuels comme les oestrogènes, les androgènes ou la progestérone mais aussi d'autres stéroïdes qui jouent un rôle important dans l'homéostasie comme les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes (revue de Gronemeyer et Laudet; fig 1). Les récepteurs de ces hormones forment un groupe homogène.

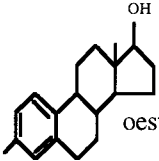
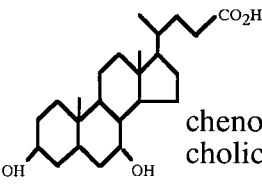
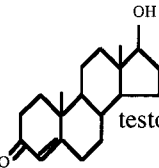
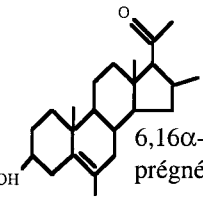
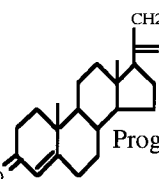
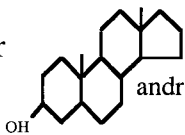
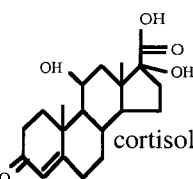
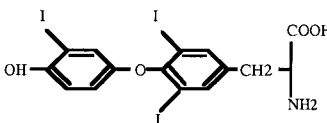
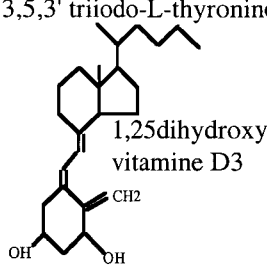
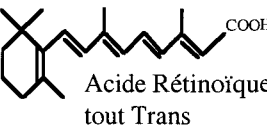
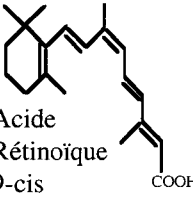
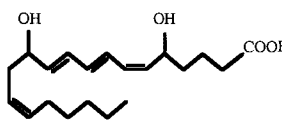
RÉCEPTEUR	LIGAND	RÉCEPTEUR	LIGAND
oestrogène ER α , β (NR3A1, NR3A2)	 oestrogène	farnesoid FXR (NR1H4)	 chenodeoxy cholic acid
androgène AR (NR3C4)	 testostérone	pregnane PXR (NR1I2)	 6,16 α -diméthyl prégnénolone
progestérone PR (NR3C3)	 Progesterone	constitutive androstan receptor CAR α , β (NR1I3, NR1I4)	 androstanol
glucocorticoïde GR (NR3C1)	 cortisol	COUP-TF I, II Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (NR2F1, NR2F2) ERR α , β estrogen related receptor (NR3B1, NR3B2)	? ? ?
hormones thyroïdiennes TR α 1, β (NR1A1, NR1A2)	 3,5,3' triiodo-L-thyronine	HNF4 hepatocyte nuclear factor4 (NR2A1) NGF1B nuclear growth factor1B (NR4A1)	? ? ?
vitamine D (VDR)	 1,25dihydroxy vitamine D3	Rev-erb α , β reverse erbA (NR1D1, NR1D2) ROR α , β , γ RAR related orphan receptor NR1F1, NR1F2, NR1F3)	? ? ?
acide rétinoïque RAR α , β , γ (NR1B1, NR1B2, NR1B3)	 Acide Rétinoïque tout Trans	SF-1 steroidogenic factor 1 (NR5A1) DAX-1 (NR0B1) SHP small heterodimer partner (NR0B2)	? ? ? ?
acide rétinoïque X RXR α , β , γ (NR2B1, NR2B2, NR2B3)	 Acide Rétinoïque 9-cis	Kni (NR0A1) EGON embryonic gonad (NR0A3)	? ?
activé par les proliférateur de péroxyse PPAR α , β , γ (NR1C1, NR1C2 NR1C3)	 Leucotriène B4		

Figure 1 : Différents membres de la superfamille des récepteurs nucléaires avec leur ligand respectif et entre parenthèse leur nom dans la nouvelle nomenclature (Laudet, 1999).

Mais la famille des récepteurs nucléaires ne contient pas uniquement des récepteurs à des stéroïdes. En effet, on s'est très rapidement aperçu que d'autres petites molécules hydrophobes pouvaient être des ligands de récepteurs nucléaires. C'est le cas des acides rétinoïques qu'ils soient sous la conformation tout-*trans* (reconnus par le groupe des trois récepteurs RAR α , β , γ) ou 9-*cis* (reconnus à la fois par les récepteurs RAR et RXR) (Petkovitch *et al.*, 1987; Giguère *et al.*, 1987; Levin *et al.*, 1992). Comme pour les stéroïdes, d'autres rétinoïdes, précurseurs ou dérivés du tout-*trans* et du 9-*cis*, sont peut-être des ligands de récepteurs nucléaires.

Les hormones thyroïdiennes forment aussi un groupe de ligands des récepteurs nucléaires (Sap *et al.*, 1986; Weinberger *et al.*, 1986). Elles sont reconnues par deux récepteurs TR α et TR β . La recherche effrénée de ligand pour les récepteurs nucléaires clonés récemment, a permis de découvrir de nouvelles catégories de ligands non soupçonnées jusqu'à présent. Parmi eux certaines prostaglandines et certains leucotriènes sont des ligands des récepteurs de type PPAR, les acides biliaires sont les ligands du récepteur aux farnesoïdes FXR, les produits de dégradation du cholestérol tel que l'oxystérol qui lie le récepteur LXR. Les benzoates mais aussi d'autres stéroïdes comme la prégnénolone et des métabolites des androgènes sont de nouveaux ligands pour les récepteurs nucléaires (revue de Blumber et Evans, 1998, Parks *et al.*, 1999)

Depuis sont apparus de nombreux autres récepteurs dont le ligand est inconnu, et que l'on nomme récepteurs orphelins. Ces récepteurs orphelins ont été découverts dans différentes espèces et l'on peut s'attendre à ce qu'une partie d'entre eux interagissent avec des ligands qu'il reste à identifier, alors que d'autres pourraient être des activateurs/répresseurs constitutifs ou des facteurs dont l'activité est modulée par modification post-transcriptionnelle. Ces récepteurs ne forment pas une classe homogène et sont au contraire extrêmement divers. Citons par exemple, outre les récepteurs Rev-erb objets de notre travail, les récepteurs de type COUP-TF importants pour la différenciation des neurones, les membres du groupe HNF4, exprimés fortement dans le foie ou les récepteurs du groupe NGFIB qui sont tous des gènes inductibles par des facteurs de croissance (Mangelsdorf *et al.*, 1995; Kastner *et al.*, 1995; Thummel, 1995; revue dans Enmark et Gustafsson, 1996).

1-2- Les différents domaines d'un récepteur nucléaire

La comparaison des séquences de ces récepteurs et leur étude fonctionnelle a permis d'obtenir l'image d'une structure commune aux membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. Cette structure est organisée en plusieurs domaines qui sont, en allant de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale (Krust *et al.*, 1986; fig 2) :

- **le domaine A/B**, de taille et de séquence hautement variable entre les différents membres de la famille, est important pour l'activité transactivatrice de certains récepteurs. Dans la majorité des cas, la fonction de transactivation présente dans ce domaine, appelée AF-1 pour "activation function", est indépendante du ligand.
- **le domaine C**, caractérisé par une région riche en cystéines, correspond à la région d'interaction avec l'ADN, aussi nommé DBD pour "DNA binding domain". Cette région contient aussi une fonction de dimérisation. Ce domaine C est très fortement conservé et caractéristique de la famille.
- **le domaine D** est une charnière flexible, possédant pour certains récepteurs des éléments structuraux indispensables à l'interaction stable avec l'ADN, appelés boîtes T et A, ainsi que des signaux de localisation nucléaire. Il permet probablement aux domaines C et E de prendre dans l'espace des orientations différentes.
- **le domaine E**, bien conservé à travers la famille, comprend plusieurs fonctions importantes : il permet la fixation de l'hormone, la régulation de la transcription, et il intervient également dans la dimérisation. Il est aussi nommé LBD pour "ligand binding domain".
- enfin, **le domaine F**, de séquence peu conservée, n'est pas toujours présent.

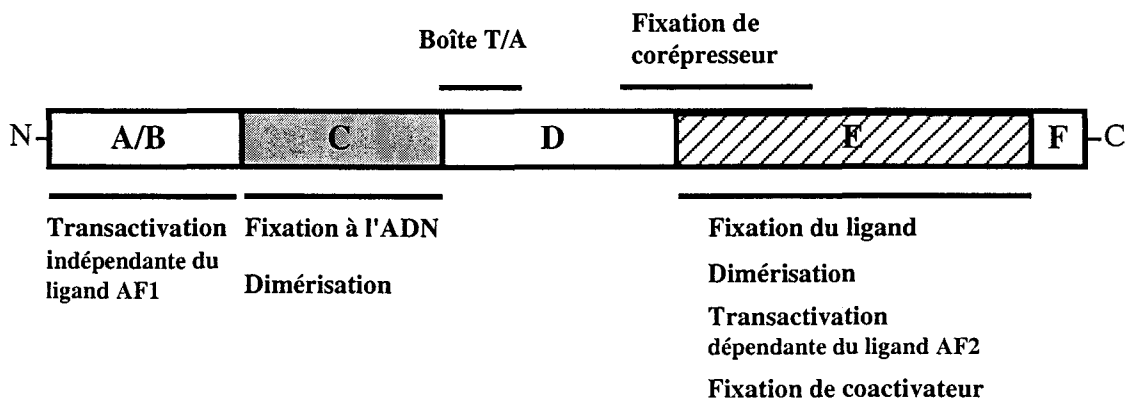


Figure 2 : Représentation schématique de la structure en domaines des récepteurs nucléaires.

II- Fixation à l'ADN

Les récepteurs nucléaires régulent la transcription des gènes en se fixant sur des séquences d'ADN spécifiques situées le plus souvent dans la région promotrice de ces gènes cibles. Cette fixation se fait principalement *via* le domaine C sur des séquences d'ADN appelées élément de réponse. La grande majorité des récepteurs nucléaires se fixent à l'ADN sous forme de dimère.

2-1- Les éléments de réponse

2-1-1- Le motif de reconnaissance

L'analyse d'un grand nombre d'éléments de réponse et de la structure des récepteurs aux glucocorticoïdes et aux oestrogènes fixés sur l'ADN, indique que la séquence minimale d'ADN reconnue par le domaine C des récepteurs nucléaires est composée de 6 paires de bases que l'on nomme motif de reconnaissance (Evans, 1988; Mader *et al.*, 1989; fig 3). Deux classes de motif de reconnaissance apparaissent : la séquence AGAACA qui est préférentiellement reconnue par les récepteurs aux glucocorticoïdes, aux minéralocorticoïdes, à la progestérone et aux androgènes, et la séquence AG(G/T)TCA qui est plutôt reconnue par tous les autres récepteurs nucléaires, dont les récepteurs aux oestrogènes, aux hormones thyroïdiennes, aux acides rétinoïques et à la vitamine D3 (revue de Glass, 1994).

Motif de reconnaissance	contact mineur	contact majeur
	-2-1	1 2 3 4 5 6
Sous famille GR	n n	A G A A C A
Sous famille ER	n n	A G G T C A
NGFIB	A A	A G G T C A

Figure 3 : Les différents motifs de reconnaissance des récepteurs nucléaires. Le premier "doigt" de zinc du domaine C interagit spécifiquement avec un motif de reconnaissance de 6 paires de bases. Les paires de bases en position 3 et 4 jouent un rôle critique dans la distinction de l'élément de réponse aux oestrogènes de celui des glucocorticoïdes (d'après Glass, 1994).

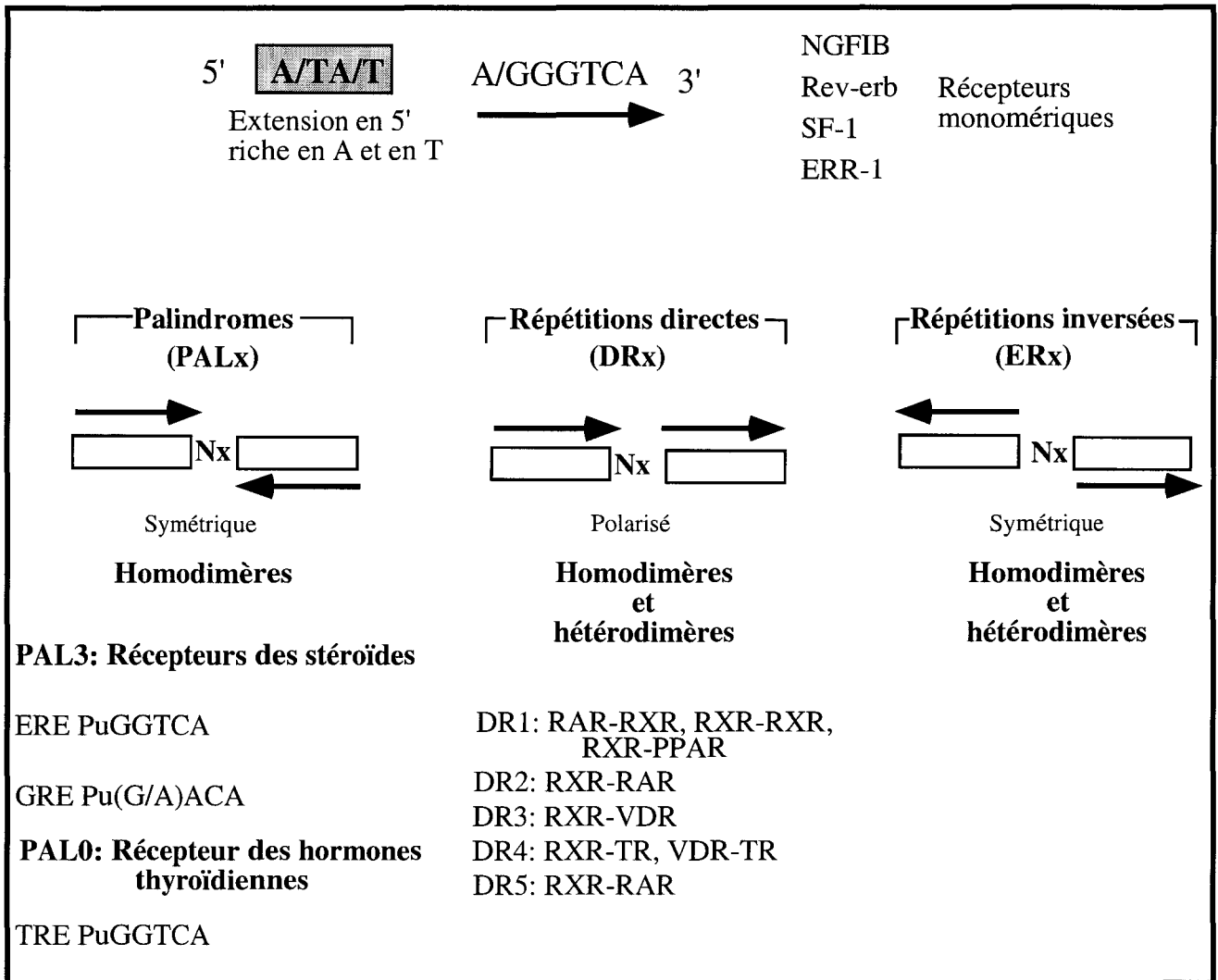


Figure 4 : Les différents éléments de réponse des récepteurs nucléaires. Les répétitions du motif A/GGGTCA sont représentées par des flèches. Certains des récepteurs capables de se fixer sur ces éléments sont indiqués. Nx indique un nombre de nucléotides variables (de 1 à 5 pour les répétitions directes DR1 à DR5) (d'après Gronemeyer et Laudet, 1995).

2-1-2- Deux modes de fixation

La caractérisation des éléments de réponse a conduit à l'identification de deux modes distincts de la fixation à l'ADN des récepteurs : sous forme de dimère ou de monomère.

L'élément de réponse qui est reconnu par un dimère est constitué de deux motifs de reconnaissance qui sont organisés de façon à optimiser les interactions protéine-ADN et protéine-protéine. Ces motifs peuvent s'orienter l'un par rapport à l'autre de trois façons possibles : (i) tête à tête, c'est un palindrome, (ii) l'un derrière l'autre, c'est une répétition directe, (iii) en opposition, c'est un palindrome inversé (revue de Gronemeyer et Laudet, 1995; fig 4). L'espacement de ces deux motifs est variable : de zéro à une dizaine de bases. Cette fixation coopérative de deux récepteurs est facilitée par la fonction de dimérisation présente à la fois dans les domaines C et E. Un dimère peut être constitué soit de deux récepteurs identiques, c'est un homodimère, soit de deux récepteurs différents, c'est un hétérodimère. Cependant, dans la majorité des cas d'hétérodimère, l'un des partenaires est le récepteur à l'acide rétinoïque *9-cis* RXR. Nous pouvons constater de façon générale que les récepteurs aux stéroïdes fixent préférentiellement l'ADN sous forme d'homodimère, et que les hétérodimères ayant pour partenaire RXR semblent préférer se fixer sur des répétitions directes.

L'élément de réponse reconnu par un récepteur monomérique tel que NGFIB contient un seul motif de reconnaissance ayant obligatoirement une extension supplémentaire en 5' (Wilson *et al.*, 1992; fig 4). Cette séquence en 5' est riche en adénine et thymidine, elle peut être composée de 2 bases, comme pour NGFIB, à 5 bases, comme pour Rev-erb. La fixation en monomère pour les récepteurs nucléaires n'est pas une généralité. Quelques récepteurs comme Rev-erb sont capables de se fixer à la fois sous forme d'homodimère et de monomère, mais rares sont les récepteurs comme ROR qui n'utilisent que le mode de fixation monomérique (Harding et Lazar, 1993; Forman *et al.*, 1994; Harding et Lazar, 1995; Adelmant *et al.*, 1996; Retnakaran *et al.*, 1994; Moraitis et Giguère, 1999).

2-2- Le domaine C

La région responsable de l'interaction récepteur-ADN est appelée domaine C ou domaine de fixation à l'ADN. Sa structure tridimensionnelle et l'étude des zones d'interaction avec l'ADN permettent de comprendre comment un récepteur peut se fixer spécifiquement sur son élément de réponse.

2-2-1- Structure du domaine C : du doigt de zinc à l'hélice-boucle-hélice

Le domaine C contient deux séquences ressemblant au motif du doigt de zinc observé pour le facteur de transcription III A (TFIIIA). Le motif en doigt de zinc, constitué de 30 acides aminés, est défini par 4 acides aminés (cystéine ou histidine) coordonnant un métal, et de 3 résidus conservés hydrophobes. Chaque doigt de zinc constitue un domaine indépendant contenant un seul ion zinc coordonné de façon tétraédrique (revue de Schwabe et Rhodes, 1991; fig 5). Chez les récepteurs nucléaires les acides aminés liant le zinc sont exclusivement des cystéines, le domaine C contient 2 ions de zinc chacun coordonné avec 4 cystéines (Vallee *et al.*, 1991; fig 5). La comparaison des structures entre les récepteurs aux glucocorticoïdes ou aux oestrogènes et un doigt de zinc « classique » (comme celui du facteur de transcription III A) montre, qu'en dépit de similarité au niveau de la structure primaire, les structures secondaire et tertiaire sont nettement différentes (Härd *et al.*, 1990; Schwabe *et al.*, 1990; Luisi *et al.*, 1991; Schawbe *et al.*, 1993). En effet, un doigt de zinc « classique » est constitué d'un feuillet β anti parallèle suivi d'une hélice α , alors que chez les récepteurs nucléaires il n'y a pas de feuillet β et l'hélice α commence entre la troisième et la quatrième cystéine du doigt de zinc. De plus le repliement d'un doigt de zinc forme un module indépendant sans interaction structurale directe avec un autre doigt de zinc alors que chez les récepteurs nucléaires les deux modules, chacun liant un ion de zinc, sont reliés ensemble pour ne former qu'un seul et même domaine. Ce domaine, constitué de deux hélices α perpendiculaires entre elles, dont les résidus hydrophobes forment le corps central et dont les ions zinc maintiennent l'intégrité structurale, a donc une structure rappelant les structures en hélice-boucle-hélice (fig 5).

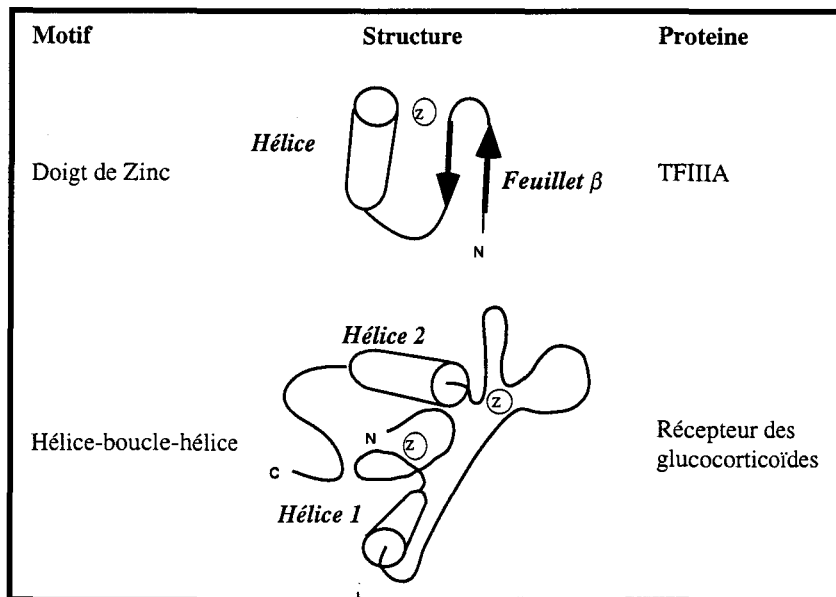
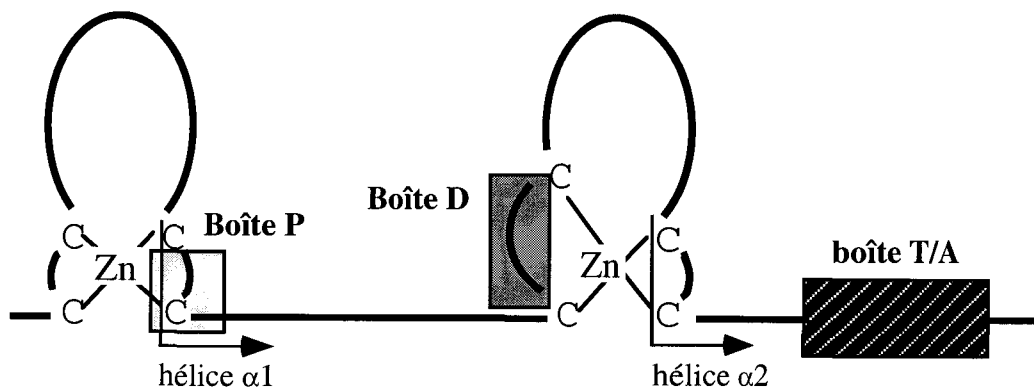


Figure 5 : Caractéristique de la structure du domaine de fixation à l'ADN de deux facteurs de transcription. TFIIIA, un facteur à doigt de zinc "classique" et le récepteur des glucocorticoïdes qui comporte une structure différente appelée "hélice-boucle-hélice".

2-2-2- Les boîtes P et D

Une chimère du récepteur aux oestrogènes, dans lequel le premier "doigt" de zinc est remplacé par celui du récepteur aux glucocorticoïdes, active la transcription d'un gène rapporteur contenant l'élément de réponse aux glucocorticoïdes et ne peut pas activer celui qui contient l'élément de réponse aux oestrogènes (Mader *et al.*, 1989). Par conséquent le premier "doigt" de zinc est responsable à la fois de la fixation à l'ADN et de la spécificité de reconnaissance d'un élément de réponse. Plus précisément, trois acides aminés situés à la fin du premier "doigt", proche de la 3^{ème} et 4^{ème} cystéine sont responsables de cette reconnaissance. C'est ce que l'on nomme la boîte P qui se situe dans l'hélice 1 (fig 6). En effet, la simple substitution de ces trois acides aminés chez le récepteur aux oestrogènes (ER) par ceux du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) fait que la chimère ER ne reconnaît que l'élément de réponse aux glucocorticoïdes et non plus le sien. La seule différence entre ces deux éléments de réponse est la séquence nucléotidique du motif de reconnaissance. Par conséquent, la boîte P est capable de faire cette distinction, elle permet l'identification du motif de reconnaissance (Umesomo et Evans, 1989; Mader *et al.*, 1989). Les récepteurs nucléaires reconnaissent principalement leurs éléments de réponse sous forme de dimères, et lorsque le nombre de paire de bases entre deux motifs de reconnaissance est modifié, le dimère ne se fixe plus (Mader *et*

(A)**(B)**

		Boîte P			
GR	419	•	•	•	•
PR	565	•	•	•	•
AR	555	•	•	•	•
MR	601	•	•	•	•
ER	183	•	•	•	•
RAR α	56	•	•	•	•
TR β	100	•	•	•	•
VDR	22	•	•	•	•
RXR	133	•	•	•	•
NGFI-B	264	•	•	•	•
		Boîte D		Boîte T/A	
GR	457	•	•	•	•
PR	603	•	•	•	•
AR	593	•	•	•	•
MR	639	•	•	•	•
ER	221	•	•	•	•
RAR α	94	•	•	•	•
TR β	140	•	•	•	•
VDR	60	•	•	•	•
RXR	171	•	•	•	•
NGFI-B	302	•	•	•	•

GR	419	KLCLVCSDEASGCHYGVLTCGSSCKVFFKRAVEGQHNYL	
PR	565	KICLICGDEASGCHYGVLTCGSSCKVFFKRAMEGQHNYL	
AR	555	KTCLICGDEASGCHYGALTCGSSCKVFFKRAAEGKQKYL	
MR	601	KICLVCGDEASGCHYGVLTCGSSCKVFFKRAVEGQHNYL	
ER	183	KYCAVCNEYASGYHYGVWSCEGCKAFFKR.SIQGHNDYM	
RAR α	56	KPCFVCQDKSSGYHYGVSACEGCKGFFRR.SIQKMMVYT	
TR β	100	ELCVVCGDKATGYHYRCITCEGCKGFFRR.TIQKMLHPSYS	
VDR	22	RICGVCGRATGFHFNAMTCEGCKGFFRR.SMKRKALFT	
RXR	133	HICAICGDRSSGKHYGVYSCGCKGFFKR.TVRRKDLTYT	
NGFI-B	264	GRCVAVCGDNASCQHYGVRTCEGCKGFFKR.TVQKSAKYI	

GR	457	CAGRNDCIIDKIRRKNCPCACRYRKLQAGMNLKARKTKKKIKGIIQQATTGV	507
PR	603	CAGRNDCIIVDKIRRKNCPCACRLRKCQAGMVLGGRKFKKFNKVRVVRALDA	653
AR	593	CASRNDCTIDKFRRKNCPCACRLRKCQAGMNLGARKLKKLGNLKLQEEGEA	643
MR	639	CAGRNDCIIDKIRRKNCPCACRLQKCLQAGMNLGARKSKKLGKLGKIHQQP	689
ER	221	CPATNQCITIDKNRRKSCQACRLRKCQAGMNLGARKSKKLGKLGKIHQQP	271
RAR α	94	CHRDKNCIINKVTRNRQCQYRQLQKCFEVMGMSKESVVRNDRNKKKKEVPKPEC	144
TR β	140	CKYEGKCVIDKVTNRNQCQYRQLQKCFEVMGMSKESVVRNDRNKKKKEVPKPEC	190
VDR	60	CPFNGDCRITKDNRRHCQACRLRKCQAGMNLGARKSKKLGKLGKIHQQP	110
RXR	171	CRDNKDCIIDKIRRKNCPCACRYRKLQAGMNLKARKTKKKIKGIIQQATTGV	221
NGFI-B	302	CLANKDCPVDKRRNRNQCQYRQLQKCFEVMGMSKESVVRNDRNKKKKEVPKPEC	352

Figure 6 : Représentation du domaine de fixation à l'ADN qui comprend le domaine C et la boîte T/A du domaine D. **(A)** Schéma du domaine de fixation à l'ADN des récepteurs nucléaires. Les deux atomes de zinc (Zn) sont maintenus par une structure tétraédrique de 4 cysteines (C). Les hélices α , présentes dans le domaine C, sont indiquées. **(B)** La séquence protéique du domaine de fixation à l'ADN de plusieurs récepteurs nucléaires est alignée. Les 8 résidus cysteines qui coordonnent avec un ion zinc sont indiqués par un rond noir, et la neuvième cystéine, conservée dans le domaine C, par un rond blanc. Les trois résidus de la boîte P intervenant dans la spécificité de reconnaissance de la cible ADN sont encadrés. La boîte P déterminant la spécificité du motif de reconnaissance, la boîte D permettant la dimérisation, et la boîte T/A, sont nécessaires à la fixation à l'ADN (d'après Zilliacus *et al.*, 1995).

al., 1993). La reconnaissance de l'élément de réponse par la boîte P n'est pas suffisante pour que le dimère se fixe, une interaction protéine-protéine est indispensable.

La boîte D, située au début du second " doigt " de zinc entre la 1^{ère} et 2^{ème} cystéine, est importante pour déterminer l'espacement entre les deux motifs de reconnaissance organisés en palindrome (Umesomo et Evans, 1989; fig 6). Lorsque la boîte P du GR est remplacée par celle du récepteur aux hormones thyroïdiennes (TR), celui-ci ne fixe plus son propre élément de réponse mais ne fixe pas pour autant celui de TR. Par contre lorsque les boîtes P et D de GR sont remplacées par celles de TR, ce GR chimérique ne reconnaît plus que l'élément de réponse de TR. Ces deux éléments de réponse diffèrent non seulement par leur séquence nucléotidique mais aussi par l'espacement des motifs de reconnaissance : celui de GR à trois bases d'espacement alors que celui de TR n'en a aucune. En fait, la boîte D reconnaît l'espacement entre les deux motifs de reconnaissance *via* une interaction protéine-protéine et non pas une interaction ADN-protéine. Ceci indique la présence dans la boîte D d'une interface de dimérisation qui sera plus amplement décrite dans le paragraphe suivant sur la dimérisation au niveau du domaine C.

La discrimination des éléments de réponse se fait donc par les boîtes P et D et non pas par les boucles des " doigts " de zinc situées entre la 2^{ème} et 3^{ème} cystéines (Gronemeyer and Moras, 1995). En effet, ces boucles peuvent être interchangeables entre les récepteurs sans en altérer leur spécificité (Umesomo et Evans, 1989). Les données de structure indiquent que le domaine C des récepteurs nucléaires engage l'hélice $\alpha 1$ contenant la boîte P de façon à ce qu'elle se fixe dans le grand sillon de la double hélice d'ADN dans lequel se trouve justement le motif de reconnaissance (Luisi *et al.*, 1991; Schawbe *et al.*, 1993; Rastinejad *et al.*, 1995; fig 7). Cet alignement est facilité grâce à trois acides aminés de la boîte P, qui sont pour le récepteur aux hormones thyroïdiennes les acides aminés soulignés suivant CEGCKG. Ces acides aminés font des contacts directs avec les groupements phosphates de l'ADN permettant ainsi l'orientation et le positionnement de l'hélice $\alpha 1$. Le début du second " doigt " de zinc possède la boîte D qui crée une surface interagissant avec l'autre protéine du dimère créant ainsi une interface de dimérisation forte et spécifique.

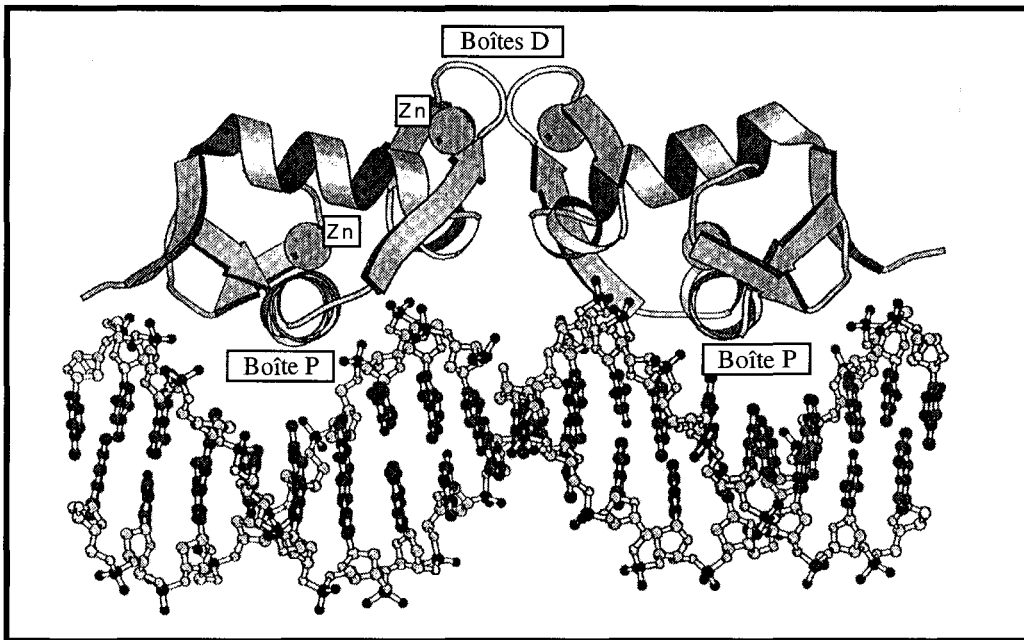


Figure 7 : Structure tridimensionnelle du récepteur des glucocorticoïdes (GR) fixé à l'ADN sous forme de dimère sur un GRE. Les ronds gris représentent les atomes de zinc (Zn). La boîte P interagit directement avec le grand sillon de l'ADN. Certains résidus de la boîte D interviennent dans la formation d'une interface de dimérisation (d'après Zilliacus *et al.*, 1995).

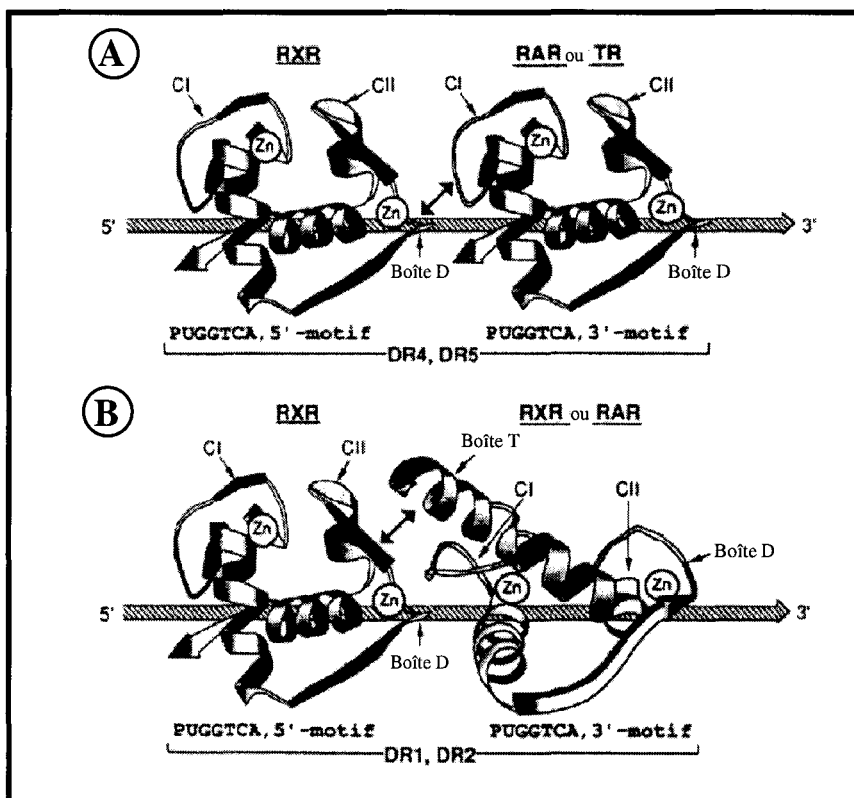


Figure 8 : En fonction de la nature du partenaire de RXR et de l'élément de réponse, les domaines intervenant dans l'interface de dimérisation vont varier. (A) Sur un DR4, l'interface de dimérisation comprend la boîte D de RXR et le premier "doigt de zinc" de TR. (B) Sur un DR1, l'interface de dimérisation comprend le deuxième "doigt de zinc" de RXR et la boîte T de RAR (D'après Zechel *et al.*, 1994b)

2-2-3- La fonction de dimérisation du domaine C

Selon le type de dimérisation effectué sur un élément de réponse organisé en palindrome ou en répétition directe, l'interface de dimérisation n'est pas la même. La fixation d'un dimère sur un palindrome a notamment été étudiée pour les récepteurs aux glucocorticoïdes et aux oestrogènes (Luisi *et al.*, 1991; Schawbe *et al.* 1993). Les domaines C se retrouvent “ tête à tête ” et ils sont dans une configuration de symétrie axiale. Ceci signifie que chaque récepteur possède la même interface de dimérisation (fig 7). Les résidus de la boîte D de chacun des récepteurs forment une boucle et les groupements hydrophobes à l'extrémité de cette boucle contactent les groupements hydrophobes de l'autre boucle. Sur un palindrome l'interface de dimérisation est donc constituée de chacune des boîtes D.

Sur un élément de réponse organisé en répétition directe les deux domaines C se positionnent l'un derrière l'autre dans une configuration asymétrique. De ce fait, l'interface de dimérisation du domaine C fixé en 5' n'est pas la même que celle du partenaire fixé en 3' (fig 8). Selon l'interface de dimérisation que possède un domaine C, il se fixera en hétérodimère préférentiellement sur l'un des deux motifs de reconnaissance. Les études *in vitro* montrent qu'il y a deux modes de dimérisation selon le type de fixation sur un DR4, DR5 ou sur un DR1, DR2 (Zechel *et al.*, 1994a et b). Entre un DR2 et un DR5, la distance entre les deux motifs de reconnaissance n'est pas la même, mais surtout l'angle entre les deux domaines C fixés sur l'ADN change. Sur un DR4 ou DR5, la boîte D de RXR fixé en 5', forme l'interface de dimérisation avec pour le partenaire fixé en 3' deux cas possibles : (i) la région en N-terminale du premier “ doigt ” de zinc pour TR, ou (ii) le sommet du premier “ doigt ” de zinc pour RAR. Sur un DR1 ou DR2, l'interface de dimérisation comprend le second “ doigt ” de zinc de RXR, à l'exclusion de la boîte D, et la boîte T de RAR ou RXR fixé en 3'.

L'existence de multiples surfaces de dimérisation pour les domaines C de RXR et RAR donne une grande flexibilité au système en permettant aux récepteurs de se fixer sur différents éléments de réponse, et permet à RXR d'augmenter ses possibilités de partenaires.

2-2-4- Les boîtes T et A

Ces deux boîtes sont en fait localisées au niveau du domaine D si l'on considère la définition des domaines en fonction des identités de séquences entre les différents récepteurs (fig 2). Cependant elles participent elles aussi à l'interaction récepteur-ADN.

La délétion complète de la boîte T dans le cas de l'homodimère RXR sur un DR1 ne permet plus au récepteur de se fixer à l'ADN, ni sous forme de dimère, ni sous forme de monomère (Lee *et al.*, 1993). Par contre la délétion de la moitié C-terminale de la boîte T permet une fixation uniquement monomérique. Cette boîte T, qui d'après les données de RMN, forme une hélice α intervient donc non seulement dans l'interaction protéine-ADN mais aussi dans des interactions protéine-protéine, elle permet de stabiliser le dimère sur son élément de réponse (Lee *et al.*, 1993).

L'étude de la boîte A a principalement été réalisée pour NGFIB. En effet, le récepteur NGFIB se fixe sous forme de monomère sur un seul motif de reconnaissance ayant une extension dans la région 5'. Des expériences de délétion et l'utilisation de récepteurs chimériques composés d'une partie de NGFIB et RXR β (qui est incapable de se fixer sur l'élément de réponse de NGFIB) montrent qu'une séquence juste après le domaine C est indispensable pour la fixation de NGFIB sur son élément de réponse (Wilson *et al.*, 1992). Cette séquence est appelée boîte A (fig 6). Le domaine C de NGFIB contacte son motif de reconnaissance de la même façon que les autres récepteurs nucléaires, c'est-à-dire au niveau de la boîte P de l'hélice $\alpha 1$. Mais en plus les acides aminés juste après le domaine C, dans ce qui est défini comme la boîte A, contactent les nucléotides en 5' du motif (Meinke et Sigler, 1999). Ce contact supplémentaire se fait au niveau du petit sillon de l'ADN, et il permet de stabiliser l'autre contact qui s'effectue dans le grand sillon d'ADN (Wilson *et al.*, 1993). Cette boîte A est donc indispensable pour la reconnaissance de l'élément de réponse des monomères mais elle est aussi nécessaire pour la fixation sous forme de dimère de certains récepteurs comme Rev-erb (Zhao *et al.*, 1998).

2-3- Spécificité de fixation des récepteurs sur leur élément de réponse

Les récepteurs à la vitamine D3 (VDR), à l'acide rétinoïque tout-*trans* (RAR) et à l'hormone thyroïdienne (TR) fixent un élément de réponse organisé en répétition directe sous forme d'hétérodimère avec RXR comme partenaire. L'espacement entre les 2 motifs de reconnaissance détermine la préférence de fixation : un espacement de 3 paires de base pour RXR-VDR (DR 3), 4 paires de bases pour RXR-TR (DR 4) et 5 paires de bases pour RXR-RAR (DR 5) (Umesomo *et al.*, 1991; Kurokawa *et al.*, 1993; Rastinejad *et al.*, 1995). Les éléments de réponse pour VDR, TR et RAR dans lesquels l'espacement joue un rôle critique permettent une réponse hormonale sélective. Cette règle du 3-4-5 a été étendue pour y inclure le DR2 qui permet la transduction de RXR-RAR et le DR1 qui est l'élément de réponse de RXR-PPAR, devenant la règle du 1 à 5 (Kliwer *et al.*, 1992; Kurokawa *et al.*, 1993). Par conséquent l'espacement, l'orientation et la séquence du motif de reconnaissance à l'intérieur d'un élément de réponse peuvent fonctionner comme un code de sélectivité. Cependant la réalité est plus complexe car sur un même élément de réponse peuvent se fixer différents récepteurs, et un récepteur donné peut se fixer sur différents éléments de réponse créant ainsi un réseau entre les récepteurs et les éléments de réponse (Durand *et al.*, 1992; revue de Green, 1993).

Il y a des interférences dans les voies de signalisation des récepteurs nucléaires qui se situent à différents niveaux : les éléments de réponse et le partenaire de l'hétérodimérisation. Ainsi on connaît plusieurs cas d'interférences entre les récepteurs nucléaires, par exemple, sur l'élément de réponse DR1, se fixent non seulement l'homodimère RXR et RXR-PPAR mais aussi RXR-TR et l'homodimère COUP-TFI. Ainsi le gène de l'acyl-CoA oxydase, activé par RXR-PPAR peut être négativement contrôlé par RXR-TR, et le gène de l'alpha-fétoprotéine peut être activé par l'homodimère RXR, et réprimé par l'homodimère COUP-TF, ceci sur le même élément de réponse DR1 (Miyamoto *et al.*, 1997; Liu et Chiu, 1994). Sur un même élément de réponse peuvent donc se fixer différents récepteurs nucléaires ayant une activité transcriptionnelle différente.

D'autre part, le récepteur à l'acide rétinoïque 9-*cis*, RXR, est présent dans de nombreux hétérodimères. L'interaction hétérodimérique avec RXR résulte généralement en une augmentation significative de la fixation et de l'affinité pour les éléments de réponse naturels de

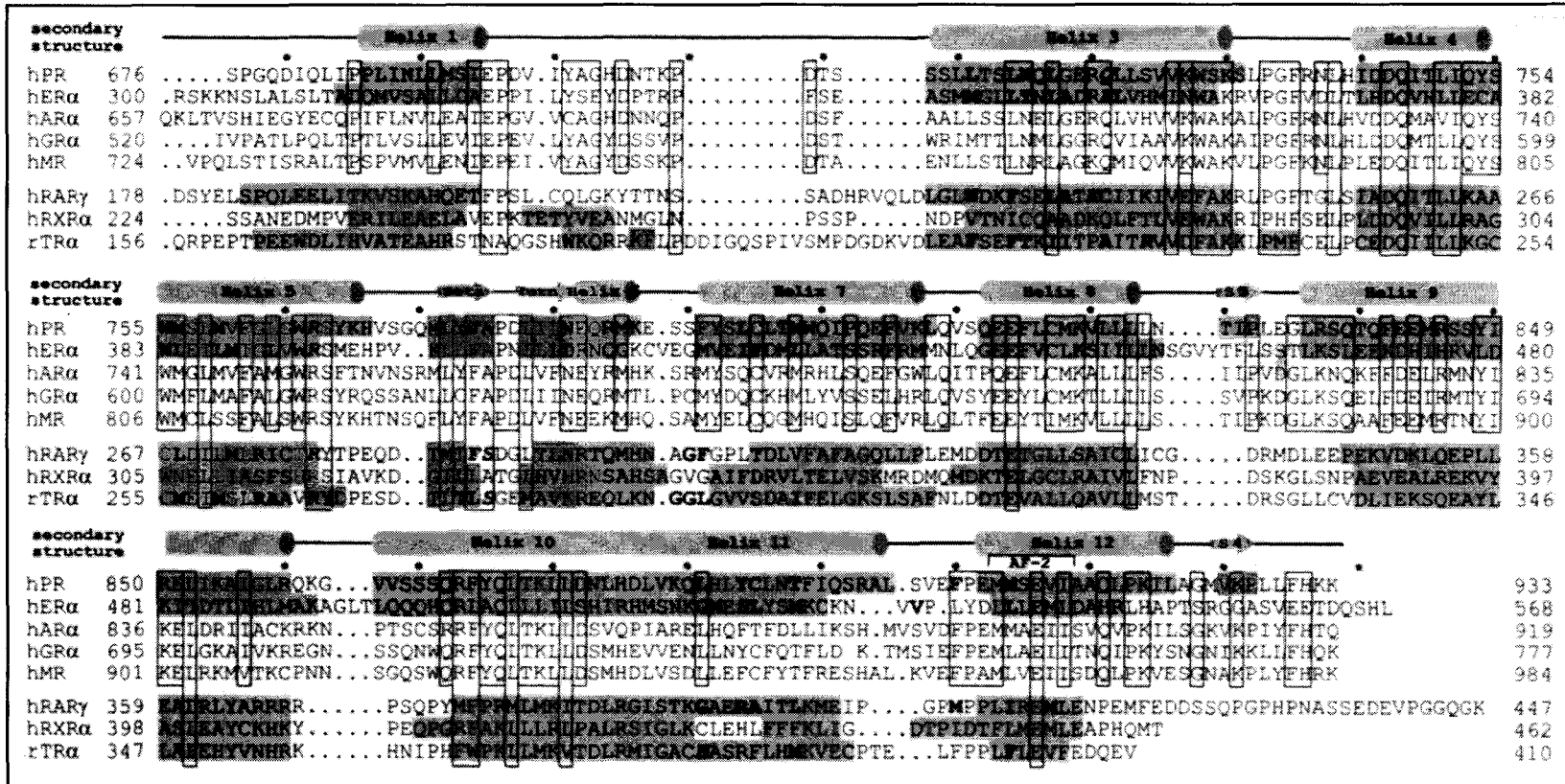


Figure 9 : La séquence du domaine de fixation du ligand du récepteur à la progestérogène, PR, est alignée avec les séquences d'autres récepteurs dont celles des récepteurs dont la structure tridimensionnelle de ce domaine est résolue (RAR, RXR, TR). La structure secondaire de TR est indiquée au dessus des séquences, celles des autres récepteurs est grisée au niveau des séquences. Les résidus conservés entre les récepteurs sont encadrés (d'après Williams et Sigler, 1998).

son partenaire. Le récepteur RXR apparaît être unique dans sa capacité d'hétérodimériser avec les autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires (Mangelsdorf and Evans, 1995). Chez la Drosophile, l'homologue de RXR, Ultraspiracle, forme un hétérodimère avec le récepteur à l'ecdysone, et d'autres récepteurs orphelins, ce qui indique que la fonction d'hétérodimérisation de RXR est non seulement présente chez les vertébrés mais aussi chez les invertébrés (revue de Thummel, 1995).

Etant donné l'interférence des récepteurs au niveau de leurs voies de signalisation, nous nous attendons *in vivo* à l'interaction d'autres protéines pour privilégier l'action d'un récepteur par rapport à un autre.

III- Fixation du ligand

L'activation de la voie de signalisation d'un récepteur est due à la fixation hautement spécifique de son ligand au niveau du domaine E ou LBD. La résolution de la structure tridimensionnelle de ce domaine nous permet de mieux comprendre comment le récepteur fixe son ligand et quelles sont ses interfaces de dimérisation.

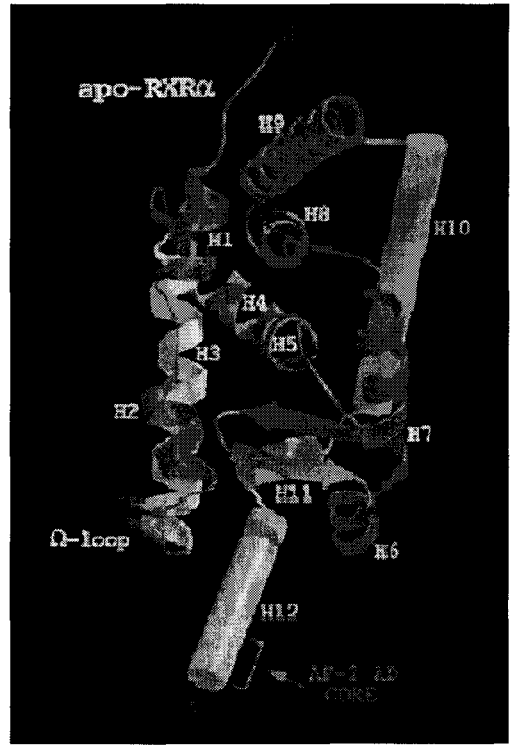
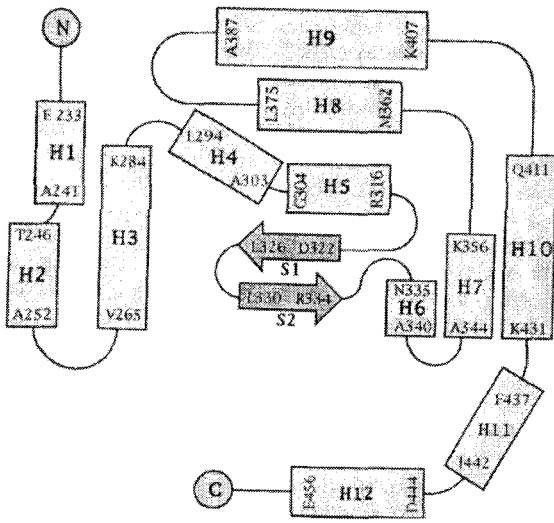
3-1- Structure du domaine de fixation du ligand

Les ligands sont présents dans la cellule à une concentration de l'ordre de 10^{-9} M. Le récepteur cible doit distinguer non seulement entre un ligand et d'autres molécules présentes à des concentrations bien plus élevées, mais également entre les différents ligands présents en petites quantités (Granner *et al.*, 1989). Cette liaison récepteur-ligand doit être spécifique, saturable, réversible et avoir une affinité de liaison très élevée. Nous nous attendons donc à ce que la structure du domaine de fixation du ligand soit finement organisée afin de procurer cette spécificité et affinité.

3-1-1- Structure sans ligand

A l'origine, le domaine E était décrit comme possédant neuf répétitions en heptade d'acides aminés hydrophobes. Ces 9 répétitions occupaient la moitié de ce domaine et étaient situées en son centre. Elles devaient être responsables d'un motif de dimérisation

A



B

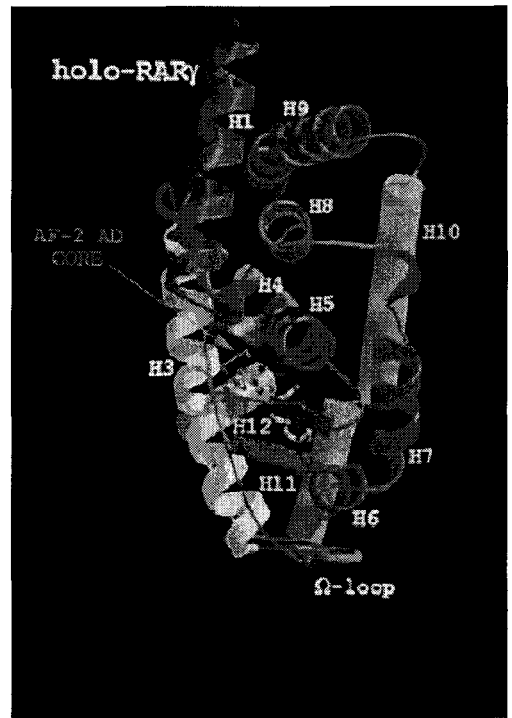
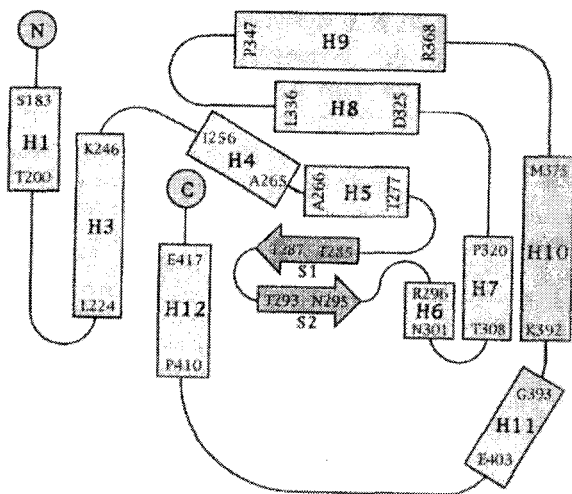


Figure 10 : Représentation schématique de la structure secondaire et tridimensionnelle du récepteur à l'acide rétinoïque 9-*cis* humain, RXR α , sans son ligand (apo RXR α) (A), et du récepteur à l'acide rétinoïque tout-*trans* humain, RAR γ , en présence de son ligand (holo RAR γ) (B). Nous pouvons constater le changement de structure engendré par la fixation du ligand et plus particulièrement le repliement de H12 qui vient se placer sous H4 entraînant une inclinaison de la boucle Ω qui vient alors se positionner sous H6 (d'après Renaud *et al.*, 1995).

superficiellement similaire à celui de la “ fermeture éclair à leucine ” et au motif “ hélice-boucle-hélice ” (Forman et Samuels, 1990). Depuis, la structure en trois dimensions du domaine E a été réalisée par cristallographie pour RXR α et PPAR γ sans ligand (apo récepteurs) et RAR γ , TR α , ER α , PR et PPAR γ avec leurs ligands respectifs (holo récepteurs) (Bourguet *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 1995; Renaud *et al.*, 1995, Brzozowski *et al.*, 1997; Willians et Sigler, 1998; Nolte *et al.*, 1998).

Le domaine E est constitué de onze ou douze hélices α et de deux ou quatre brins β (fig 9). Les récepteurs RXR α et TR α possèdent les 12 hélices tandis que RAR γ , PR et ER α n'ont pas l'hélice H2. Par contre, PPAR γ a l'originalité de posséder une hélice α supplémentaire nommée H2' qui est située juste avant H3. Les deux brins β présents entre les hélices H5 et H6 sont communs à tous les récepteurs étudiés, et ils forment un feuillet β antiparallèle. Les récepteurs TR α , PR et PPAR γ ont deux brins β supplémentaires localisés dans des endroits variables. La structure du domaine E est ainsi constituée d'un sandwich d'hélices α au milieu duquel se trouvent les hélices H4, H5, H8, H9, la partie amino-terminale de l'hélice H11 et les deux brins β tandis qu'orientées perpendiculairement se trouvent d'un coté les hélices H1, H2, H3 et de l'autre coté H6, H7, H10 (fig 10 A). L'hélice H12 pointe vers l'extérieur de la molécule.

3-1-2- Structure avec ligand

La fixation du ligand entraîne un changement de conformation du récepteur qui va lui permettre d'activer la transcription de son gène cible. L'étude des récepteurs RAR γ , TR α , ER α , PR et PPAR γ montre que la structure du récepteur avec son ligand est semblable à celle du récepteur sans ligand (Renaud *et al.*, 1995, Wagner *et al.*, 1995; Brzozowski *et al.*, 1997; Willians et Sigler, 1998; Nolte *et al.*, 1998). En effet, on retrouve la même structure en sandwich d'hélice α et un grand nombre d'hélices placées de façon identiques notamment dans le centre de la structure (fig 10 B). Cependant la structure du récepteur avec son ligand est plus compacte. La différence majeure concerne la réorientation de la partie C-terminale. En effet, l'hélice H12 ne pointe plus vers l'extérieur mais se replie sur la molécule. De plus, du coté amino-terminal ce que l'on nomme la boucle Ω , ou “ Ω loop ”, située avant H3 et qui interagit

avec H12 au niveau de la région AF2 dans la structure sans ligand, va subir une rotation afin de se trouver au-dessous de H6 (Bourguet *et al.*, 1995; White *et al.*, 1997). Le plus étonnant est le fait que la poche contenant le ligand soit entièrement fermée ce qui pose la question : comment le ligand sort du récepteur?

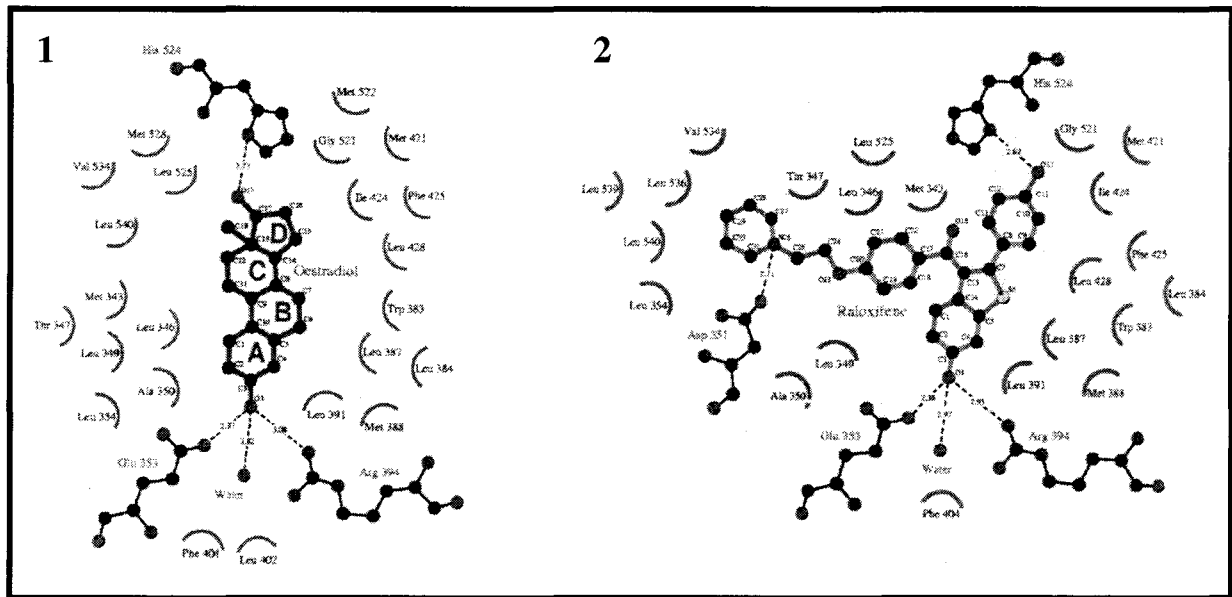
Cependant la dernière cristallisation du domaine de fixation du ligand d'un récepteur a été réalisée pour PPAR γ à la fois avec et sans ligand (Nolte *et al.*, 1998). La comparaison de ces deux structures (apo et holo) montre l'absence de mouvement de la part de l'hélice H12 portant la fonction d'activation AF2. En absence de ligand, H12 est déjà repliée sur la molécule mais pas au niveau de la cavité d'entrée du ligand. La fixation du ligand crée deux liaisons hydrogènes supplémentaires qui permettent de maintenir la région AF2 dans une configuration « active », c'est-à-dire formant le sillon superficielle dans lequel vient interagir le coactivateur. Il semblerait que le modèle du mouvement de H12 en présence du ligand ne puisse pas s'appliquer à tous les récepteurs nucléaires.

L'entrée du ligand dans sa poche, pour le récepteur RAR, est guidée par l'existence d'un gradient électrostatique. Les lignes de ce gradient sont toutes orientées d'un potentiel négatif à partir de la surface, vers un potentiel positif au fond de la cavité (Renaud *et al.*, 1995). L'entrée de l'acide rétinoïque s'effectue par son extrémité carboxylique, elle est facilitée par des résidus chargés qui guident le ligand depuis la surface jusqu'à sa position définitive à l'intérieur de la protéine. L'hélice H11 est poussée par le ligand, et positionnée dans la continuité de H10 ce qui entraîne le mouvement de H12 et la rotation de la boucle Ω (Wurtz *et al.*, 1996). Installé dans sa cavité, le ligand contacte certains acides aminés appartenant aux hélices H3, H5, H7, H11 et H12. Le mécanisme de positionnement de H12 suite à l'entrée du ligand dans sa poche hydrophobe est appelé " piège à souris ". Cette hélice H12 est absolument cruciale pour les récepteurs nucléaires. En effet, elle possède le domaine transactivateur dépendant du ligand, le domaine AF2.

3-1-3- Agonistes et antagonistes

Selon le ligand, un agoniste ou un antagoniste, que fixe le récepteur, sa structure n'est pas tout à fait la même. Dans le cas du récepteur aux oestrogènes, la fixation de l'antagoniste

A



B

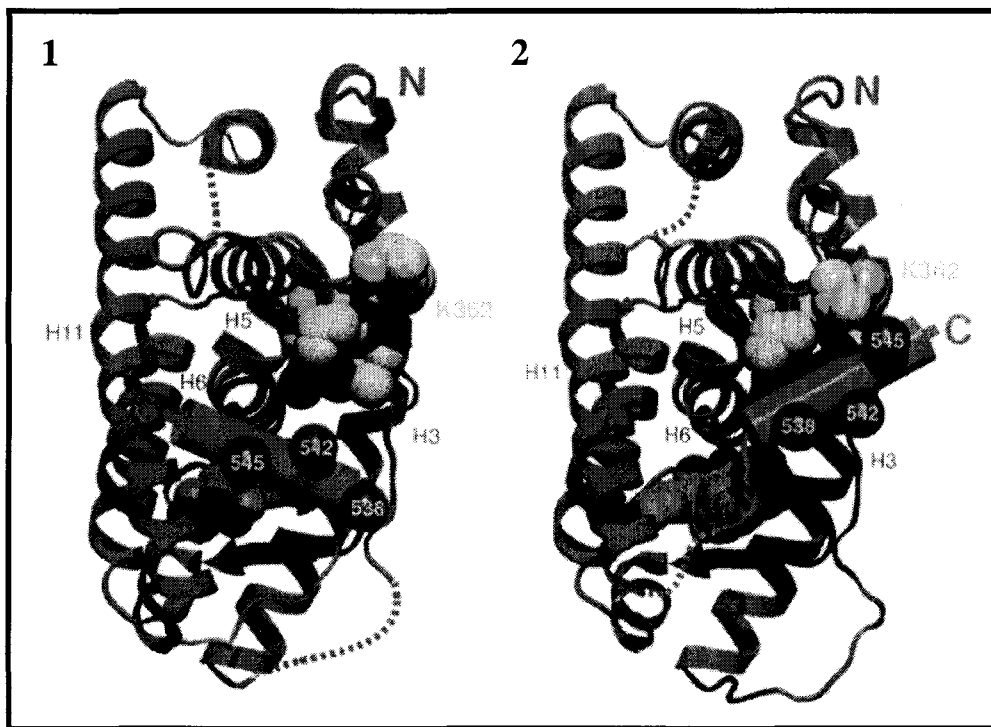


Figure 11 : Mode de fixation de l'agoniste 17β -oestradiol (1), et de l'antagoniste raloxifène (2). (A) Représentation schématique des interactions réalisées dans la poche du ligand. Les résidus du récepteur aux oestrogènes interagissant avec le ligand sont approximativement représentés dans leurs positions. Ceux qui font des liaisons hydrogène ont leurs structures secondaires indiquées et leurs liaisons symbolisées par des pointillées. (B) Position de l'hélice H12 du domaine E de ER en fonction du ligand : oestradiol (1), et raloxifène (2). Les lignes en pointillées indiquent une région non modélisée dans les structures (d'après Brzozowski *et al.*, 1997).

raloxifène, (RAL), se situe dans la même cavité que celle de l'agoniste 17β oestradiol (E_2), mais les acides aminés qui interagissent avec RAL ne sont pas tout à fait les mêmes que pour E_2 (Brzowski *et al.*, 1997; fig 11 A). Les ligands E_2 et RAL ont en commun de faire des liaisons hydrogène directes avec la glutamine 353, l'arginine 394 et l'histidine 524. L'antagoniste RAL étant plus volumineux, il fait en plus des liaisons avec l'asparagine 351.

En présence de E_2 , pour $ER\alpha$, l'hélice H12, qui porte la fonction d'activation transcriptionnelle AF2, se situe au dessus de la cavité du ligand et contre les hélices H3, H5/6 et H11. Elle forme comme un couvercle sur la poche contenant le ligand (fig 11 B). Par contre, en présence du RAL, H12 se trouve dans le sillon formé par H5 et l'extrémité C-terminale de H3. Ainsi l'antagoniste induit une rotation de 130° de H12, et la lysine 362 nécessaire pour le recrutement de coactivateurs se retrouve partiellement cachée lors de la réorientation de H12. L'effet antagoniste du RAL est aussi basé sur sa capacité d'empêcher la formation de la conformation de AF2 transcriptionnellement active.

3-2- La fonction de dimérisation du domaine E

La dimérisation au niveau du domaine E est forte par rapport à celle du domaine C qui n'existe que lorsque les récepteurs sont fixés sur l'ADN. Cette interface de dimérisation du domaine E initie la formation en solution du dimère, puis lorsque le dimère se fixe sur l'ADN apparaît alors la seconde interface au niveau du domaine C. L'étude des zones d'interaction d'un dimère a été principalement réalisée pour des homodimères. Actuellement deux types de modèles existent : celui de $RXR\alpha$ et $ER\alpha$ d'une part, et celui de PR d'autre part (Bourguet *et al.*, 1995; Brzowski *et al.*, 1997; Williams et Sigler, 1998; fig 12).

L'étude des zones d'interaction entre les domaines E des homodimères $RXR\alpha$ sans ligand ou $ER\alpha$ avec ligand indique que chaque monomère contribue pour 11% de sa surface à l'interaction et que c'est surtout H10 et pour une moindre part H9 et la boucle entre H7 et H8 qui forment l'interface de dimérisation (Bourguet *et al.*, 1995; Brzowski *et al.*, 1997; fig 12 B). Les deux monomères $RXR\alpha$ sont symétriques par rapport à un axe avec leurs deux hélices en C terminal correspondant à H12, pointant à l'extérieur chacune avec un angle de 45° . Ce dimère au niveau du domaine E est dit en forme « d'ailes de papillon ».

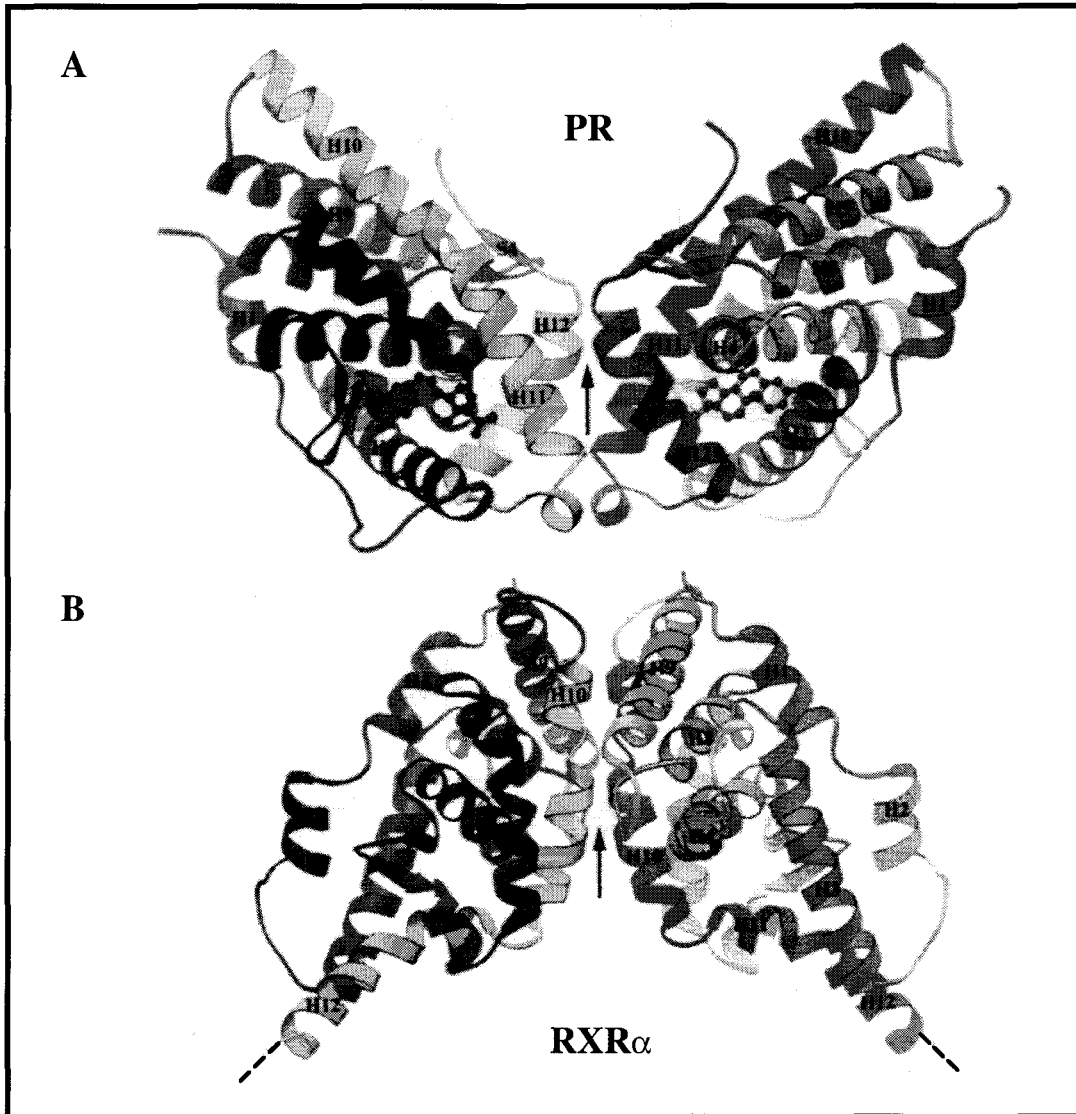


Figure 12 : Structure tridimensionnelle du domaine E du récepteur à la progesterone (**A**) et du récepteur à l'acide rétinoïque 9-*cis* (**B**) formant chacun un homodimère. L'interface de dimérisation, indiquée par la flèche, s'effectue principalement entre les hélices H12 pour le dimère PR, et entre les hélices H10 pour le dimère RXR α . La ligne en pointillée de RXR α indique la troncature de 5 acides aminés dans la partie C-terminale (d'après Williams et Sigler, 1998).

Par contre, la zone de dimérisation du domaine E de l'homodimère PR avec son ligand fait intervenir l'hélice H12 (Williams et Sigler, 1998; fig 12 A). Le récepteur à la progestérone contient une hélice H12 plus longue (15 acides aminés) que celle de RXR α , TR α et ER α (8, 6 et 9 acides aminés respectivement). De plus, il a une extension dans sa partie C-terminale possédant un brin β , S4, qui forme un feuillet β antiparallèle avec S3 situé entre les hélices H8 et H9. Ce feuillet S3-S4 n'existe pas chez les autres récepteurs déjà étudiés (fig 9). Ainsi cette différence d'interface de dimérisation par rapport à RXR α et ER α peut s'expliquer par des différences entre H12 et la création d'un deuxième feuillet β . Cependant, lorsque PR fixe son antagoniste RU486, on peut s'attendre à ce que l'hélice H12 se trouve dans une position différente que celle décrite en présence de l'agoniste. Le positionnement de H12 devrait modifier l'interface de dimérisation de PR, et peut être qu'ainsi on retrouverait un dimère en forme " d'ailes de papillon " comme pour RXR α et ER α .

IV- Activité transcriptionnelle

Les récepteurs nucléaires stimulent la transcription de gènes cibles grâce à deux régions distinctes, AF1 et AF2 (pour "activating function"). Lorsqu'elles sont isolées l'une de l'autre, chacune de ces régions peut activer la transcription. Cependant la fonction d'activation transcriptionnelle des récepteurs nucléaires est principalement réalisée par AF2. L'étude de mutants de délétion des récepteurs GR, ER et RAR β , indique l'existence d'une région à activité transcriptionnelle dans la partie N-terminale de la protéine, dans le domaine A/B (Hollenberg et Evans, 1988; Tora *et al.*, 1989; Folkers *et al.*, 1993). Cette région AF1 fusionnée au domaine de fixation à l'ADN de GAL4, active la transcription indépendamment du ligand et sa délétion dans ER ou RAR β entraîne une diminution de l'activité transcriptionnelle du récepteur. Cependant, cette fonction AF1 n'est pas active dans toutes les cellules, et elle n'est fonctionnelle que dans le contexte de certains promoteurs : AF1 est donc cellule et promoteur-spécifique (Tora *et al.*, 1989; Folkers *et al.*, 1993). C'est la fonction d'activation transcriptionnelle AF2 qui est la plus importante pour les récepteurs nucléaires. Elle est localisée dans la partie C-terminale du domaine de fixation du ligand, et elle est dépendante de la présence du ligand.

L'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires est dépendante de leur interaction avec des cofacteurs qui peuvent être des coactivateurs permettant la transcription de gènes cibles ou bien des corépresseurs inhibant cette activité.

4-1- La fonction d'activation de la transcription dépendante du ligand : AF2

La recherche de régions intervenant dans l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires a permis de mettre en évidence l'importance du domaine E. L'étude par délétion de ce domaine dans les récepteurs aux oestrogènes, aux glucocorticoïdes, à l'acide rétinoïques et aux hormones thyroïdiennes montre que cette région AF2 est formée d'une dizaine d'acides aminés, et les alignements de séquences indiquent que cette région est relativement bien conservée entre les récepteurs nucléaires et qu'elle présente un motif consensus composé de l'acide glutamique encadré par deux paires de résidus hydrophobes (Danielian *et al.*, 1992; Durand *et al.*, 1994; Baretino *et al.*, 1994). Il est résumé par la formule en acides aminés suivante $\Phi\Phi X E \Phi\Phi$ ou Φ est un acide aminé hydrophobe (fig 13). Des mutations dans la région AF2 suppriment sélectivement l'activité transcriptionnelle ligand dépendante sans altérer la fixation à l'ADN ni la dimérisation (Danielian *et al.*, 1992; Durand *et al.*, 1994; Baretino *et al.*, 1994). Lorsque ce motif est fusionné au domaine de fixation à l'ADN de GAL4, il active la transcription sans être gouverné par le ligand, c'est une région transactivatrice autonome.

Les structures tridimensionnelles des domaines de fixation du ligand de RXR α , RAR γ , TR α , ER α , PR et PPAR γ montrent que ce domaine AF2 est localisé dans l'hélice H12 qui intervient dans la fermeture de la poche hydrophobe (Bourguet *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 1995; Renaud *et al.*, 1995; Brzozowski *et al.*, 1997; Willians et Sigler, 1998; Nolte *et al.*, 1998).

Comment une activité transcriptionnelle autonome peut-elle être dépendante de la fixation du ligand? Il semblerait qu'en absence de ligand, la région AF2 soit sous une forme masquée qui la rende inactive. En effet, l'acide glutamique du consensus AF2 ainsi que ses acides aminés hydrophobes créent des liaisons hydrogène avec la boucle Ω (Bourguet *et al.*, 1995). Le ligand dans sa poche provoque le positionnement de l'hélice H12, et la région AF2

se retrouve ainsi démasquée, ce qui lui permet d'interagir avec une autre protéine, un coactivateur (Bourguet *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 1995; Renaud *et al.*, 1995).

				Φ	Φ	x	E	Φ	Φ			consensus	
539	P	L	Y	D	L	L	L	E	M	L	D	A H R L H	554 mER
535	P	L	Y	D	L	L	L	E	M	L	D	A H R L H	550 hER
754	E	F	P	E	M	L	A	E	I	I	T	N Q I P K	769 mGR
748	E	F	P	E	M	L	A	E	I	I	T	N Q I P K	763 hGR
904	E	F	P	E	M	M	S	E	U	I	A	A Q L P K	919 hPR
889	D	F	P	E	M	M	A	E	I	I	S	U Q U P K	904 hAR
955	E	F	P	A	M	L	U	E	I	I	S	D Q L P K	970 hMR
413	K	L	T	P	L	U	L	E	U	F	G	N E I S	• 427 hVDR
405	S	M	P	P	L	I	Q	E	M	L	E	N S E G L	420 hRARα
398	S	M	P	P	L	I	Q	E	M	L	E	N S E G H	413 hRARβ
407	P	M	P	P	L	I	R	E	M	L	E	N P E M F	422 hARγ
446	P	I	D	T	F	L	M	E	M	L	E	A P H Q M	461 hRXRα
394	L	F	P	P	L	F	L	E	U	F	E	D Q E U	• 408 hTRα
445	L	L	P	P	L	F	L	E	U	F	E	D	• 456 hTRβ
507	P	M	H	K	L	F	L	E	M	L	E	A M M D	• 521 hERR1
420	P	M	H	K	L	F	L	E	M	L	E	A K U	• 433 hERR2
430	P	I	D	T	F	L	M	E	M	L	E	A P H Q L	445 mH-2R11BP

Figure 13 : Le domaine AF2. La comparaison des séquences de la partie carboxy-terminale du domaine E de plusieurs récepteurs nucléaires permet de révéler un consensus ΦΦ xE ΦΦ, constitué de deux paires de résidus hydrophobes de chaque coté d'un acide glutamique (d'après Danielian *et al.*, 1992).

Pour les récepteurs nucléaires qui répriment l'activité transcriptionnelle, nous observons plusieurs cas de figures en ce qui concerne la fonction d'activation AF2 : (i) soit ils n'ont pas la région contenant AF2, comme v-erbA qui est tronqué dans cette région ou comme Rev-erbα et Rev-erbβ dont la séquence protéique s'arrête juste avant AF2 (ii) soit ils ont des mutations dans la séquence AF2, comme COUP-TFA perdant ainsi le motif consensus et ne pouvant plus fixer de coactivateurs (Durand *et al.*, 1994; fig 14).

consensus					Φ	Φ	x	E	Φ	Φ		
rTRα:	K	V	E	C	P	T	E	L	F	P	P	L F L E V F E D Q E V
v-erbA:	K	V	E	C	P	T	E	L	S	P Q E V
Rev-erbα:	R	V	D	A	Q							
Rev-erbβ:	K	V	H	P								
COUP-TFA:	R	L	Q	D	K	K	L	R	Q	Q	L	P P L L S E I W D V H

Figure 14 : Séquence des domaines AF2 de certains récepteurs nucléaires répresseurs de la transcription. Comme on peut le constater, v-erbA présente une version tronquée de ce domaine, les Rev-erb ne possèdent pas de domaine AF2 et COUP-TF possède un domaine AF2 muté qui le rend incapable de fixer des co-activateurs (d'après Durand *et al.*, 1994).

4-2- Le cas de l'hétérodimère RXR-RAR

Dans l'hétérodimère RXR-RAR, le ligand de RXR n'est pas capable d'induire la transcription (revue de Leblanc et Stunnenberg, 1995). Cependant, un ligand de RXR, LG100754, est capable d'activer cet hétérodimère, mais uniquement en présence de RAR (Schulman *et al.*, 1997). En effet, des mutations dans la fonction AF2 de RXR n'altèrent pas cette activation de la transcription, alors que des mutations de la fonction AF2 de RAR empêchent toute activité. Il semblerait donc que le ligand de RXR, LG100754, active la transcription par la fonction AF2 de RAR.

L'utilisation d'un mutant de RXR α qui imite la conformation du domaine de fixation du ligand induite par la fixation du ligand, a permis de mieux comprendre pourquoi dans l'hétérodimère RXR-RAR, RXR n'est pas capable d'induire la transcription (Vivat *et al.*, 1997). Le domaine E de ce mutant de RXR α constitutivement actif, fusionné au domaine de fixation à l'ADN de GAL4, ne peut plus activer la transcription en présence du domaine E de RAR, même lorsque ce domaine de RAR est muté de façon à ne plus pouvoir interagir avec un corépresseur (Vivat *et al.*, 1997). Il semblerait que l'inactivation de la fonction AF2 de RXR soit due à une contrainte structurale dans l'hétérodimérisation des domaines de fixation du ligand. Effectivement, lorsque l'on modifie la structure du domaine E de RAR sans ligand en ajoutant un antagoniste, alors l'hétérodimère, formé par RAR et le mutant de RXR constitutivement actif, est capable d'activer la transcription. Cette activation de la transcription n'existe pas si, à la place du mutant RXR, est présent RXR sauvage, ou si le mutant a une fonction AF2 inactive. Ainsi, nous pouvons dire qu'en présence d'un antagoniste de RAR, la contrainte structurale est levée, et la fonction AF2 de RXR devient active.

Cependant cette levée de l'inhibition allostérique est dépendante de la fonction AF2 de chacun des récepteurs (Vivat *et al.*, 1997). L'activité transcriptionnelle d'un récepteur nucléaire est dépendante du recrutement d'un coactivateur. L'hétérodimère RXR-RAR est capable d'interagir avec le coactivateur SRC1 en présence du ligand de RAR mais pas en présence du ligand de RXR (Westin *et al.*, 1998). Mais en présence d'une petite quantité de ligand de RAR (10 nM), alors le ligand de RXR (1 μ M) est capable de permettre à l'hétérodimère d'interagir

avec SRC1. Le ligand de RAR crée une modification de la structure qui permet alors à RXR de fixer son ligand et d'interagir avec le coactivateur : RXR est ainsi subordonné à RAR.

L'hétérodimère RXR-RAR active la transcription en interagissant avec le coactivateur SRC1 (Westin *et al.*, 1998). La région du coactivateur SRC1 qui interagit avec les récepteurs nucléaires possède plusieurs motifs Leu-x-x-Leu-Leu. L'étude par mutation de deux de ces motifs de SRC1 indique que le motif 1 interagit avec la fonction AF2 de RAR, et le motif 2 avec AF2 de RXR. De plus, l'interaction de SRC1 et RXR est dépendante de l'interaction préalable de SRC1 et RAR. Lorsque RAR fixe son ligand, sa fonction AF2 se replie contre la molécule et interagit avec l'un des motifs de SRC1. Ce changement de la conformation permet alors à RXR de fixer son ligand et d'interagir avec un autre motif de SRC1 (fig 15).

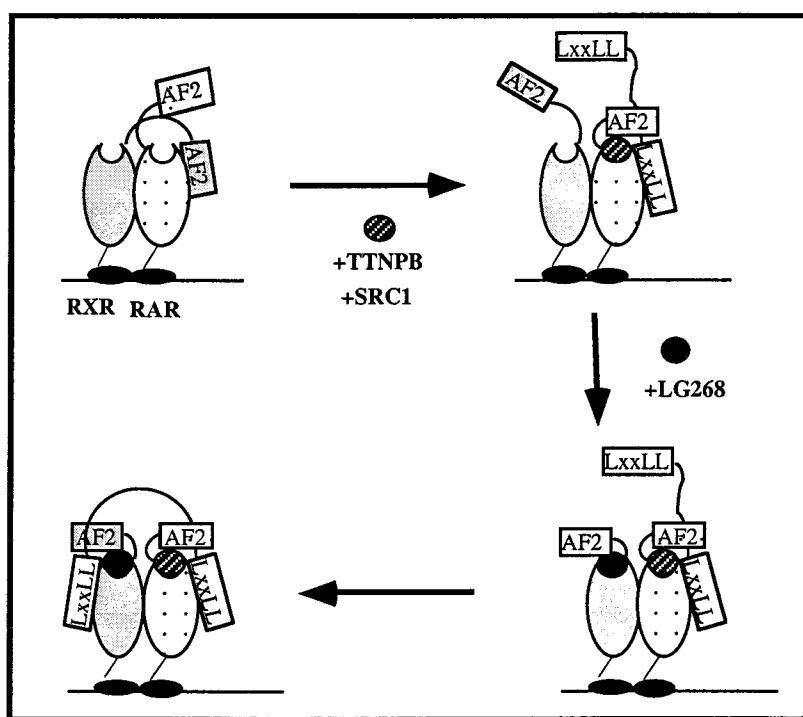


Figure 15 : Schéma du mécanisme de l'inhibition allostérique de RXR dans l'hétérodimère RXR-RAR. Le coactivateur SRC1 est représenté par deux de ses motifs Leu-x-x-Leu-Leu. TTNPB est le ligand de RAR, LG268 celui de RXR (d'après Westin *et al.*, 1998).

La fonction AF2 de RXR interagit avec le domaine de fixation du ligand de RAR. En présence du ligand de RAR et de SRC1, AF2 de RXR se dissocie de RAR (Westin *et al.*, 1998). Il est fort probable que lors de la formation de l'hétérodimère, la fonction AF2 de RXR en interagissant avec RAR crée une conformation structurale qui rend RXR inactif et incapable de fixer son ligand. Lorsque RAR fixe son ligand et le coactivateur, alors RXR subit un

changement allostérique du à la dissociation de son domaine AF2 avec RAR, et devient capable de fixer son ligand (fig 15).

Le récepteur RXR est-il toujours subordonné à son partenaire d'hétérodimérisation? Non. L'hétérodimère RXR-LXR est capable d'activer la transcription soit en présence de l'acide rétinoïque 9-*cis* soit en présence d'oxystérol. La présence simultanée de ces deux ligands, fait que l'induction de la transcription est plus de deux fois plus forte qu'avec un seul de ces ligands (Peet *et al.*, 1998a). Il en est de même pour l'hétérodimère RXR-PPAR (Kliwer *et al.*, 1992).

4-3 Les coactivateurs

La stimulation de la transcription d'un gène rapporteur par le récepteur à la progestérone ou le récepteur aux glucocorticoïdes est inhibée lorsque le récepteur aux oestrogènes (ER) est co-exprimé en présence de son ligand (Meyer *et al.*, 1989). De même l'expression du récepteur à la progestérone ou du récepteur aux glucocorticoïdes, en présence de leur ligands respectifs, inhibe l'activité transcriptionnelle de ER. Il semblerait donc que ces récepteurs nucléaires soient en compétition pour un ou des facteurs transcriptionnels présents en quantité limitante dans la cellule.

Grâce à la caractérisation détaillée de la région AF2 des récepteurs, de nombreuses équipes ont isolé différents facteurs, appelés coactivateurs ou TIF pour « transcriptional intermediary factor » (Le Douarin *et al.*, 1995). Ces coactivateurs agissent comme des médiateurs entre la fonction transactivatrice des récepteurs et la machinerie transcriptionnelle basale. Leur interaction est dépendante du ligand et ils interagissent avec les acides aminés indispensables pour l'activité de AF2. La liste des coactivateurs s'allonge régulièrement mais nous pouvons notamment citer TIF2 (Voegel *et al.*, 1996), TIF1 (Le Douarin *et al.*, 1995), RIP140 pour « receptor interacting protein » (Cavailles *et al.*, 1995), SRC1 pour « steroid receptor coactivator-1 » (Onate *et al.*, 1995), Trip1 pour « thyroid-hormone-receptor interacting protein » (Lee *et al.*, 1995), et RAC3 pour « receptor associated coactivator » (Anzick *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997a; Chen *et al.*, 1997; Takeshita *et al.*, 1997). Toutes ces protéines ont peu d'identité de séquence entre elles, cependant TIF2, SRC1 et RAC3 font partie

de la même famille. Les coactivateurs ont presque tous la caractéristique d'être de grande taille (plus de 100 kDa), localisés dans le noyau, et d'avoir une expression ubiquiste.

4-3-1- Les différents domaines des coactivateurs TIF2/SRC1/RAC3

Ces protéines d'un poids moléculaire de 160 kDa ont toutes une localisation nucléaire et possèdent au moins un signal de localisation nucléaire, NLS, dans la partie N-terminale de la protéine (revue de Moras et Gronemeyer, 1998). Ce NLS est suivi d'un motif "hélice-boucle-hélice" (bHLH) et du domaine PAS, identifié chez les protéines nucléaires Period, ARNT (Aryl hydrocarbon nuclear translocator) et Single minded, et qui est un motif de dimérisation (fig 16). Les protéines TIF2/SRC1/RAC3 interagissent avec les récepteurs nucléaires *via* un domaine nommé NID pour "nuclear receptor interaction domain". Les coactivateurs peuvent être des activateurs de la transcription lorsqu'ils sont fusionnés à un domaine de fixation à l'ADN, grâce à deux domaines d'activation AD1 et AD2. Le domaine AD2 se trouve dans la partie C-terminale de la protéine, et AD1 est indifférencié de la région d'interaction avec le co-intégrateur CBP/P300 (fig 16).

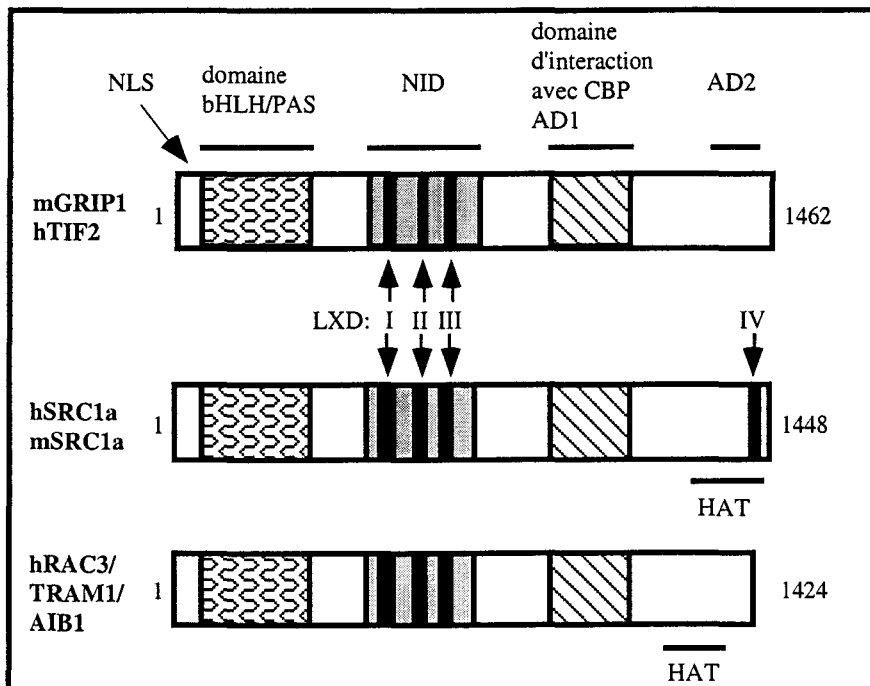


Figure 16 : Les différents domaines de la famille des coactivateurs TIF2/SRC1/RAC3. Le signal de localisation nucléaire (NLS), le domaine basique hélice-boucle-hélice (bHLH)/PAS, le domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires (NID) et le domaine d'interaction avec CBP/P300 sont représentés, ainsi que les régions LXD qui possèdent le motif LxxLL. AD1 et AD2 sont les domaines d'activation de la transcription, et HAT est la région portant l'activité histone acétyltransférase (d'après Moras et Gronemeyer, 1998).

Consensus		L xx LL											
		-1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
RIP140	Y	L	E	G	L	L	M	H	Q	A	A		20-30
	L	L	A	S	L	L	Q	S	E	S	S		132-142
	H	L	K	T	L	L	K	K	S	K	V		184-194
	Q	L	A	L	L	L	S	S	E	A	H		266-276
	L	L	L	H	L	L	K	S	Q	T	I		379-389
	L	L	Q	L	L	L	G	H	K	N	E		499-509
	V	L	Q	L	L	L	G	N	P	K	G		712-722
	L	L	S	R	L	L	R	Q	N	Q	D		818-828
V	L	K	Q	L	L	L	S	E	N	C		935-945	
SRC1a	K	L	V	Q	L	L	T	T	T	A	E		632-642
	I	L	H	R	L	L	Q	E	G	S	P		689-699
	L	L	R	Y	L	L	D	K	D	E	K		748-758
	L	L	Q	Q	L	L	T	E					1434-1441
TIF2	K	L	L	Q	L	L	T	T	K	S	D		640-650
	I	L	H	R	L	L	Q	D	S	S	S		689-699
	L	L	R	Y	L	L	D	K	D	D	T		744-754
CBP	Q	L	S	E	L	L	R	G	G	S	G		68-78
	Q	L	V	L	L	L	H	A	H	K	C		356-366
p300	Q	L	S	E	L	L	R	G	S	S	P		80-90
	Q	L	V	L	L	L	H	A	H	K	C		341-351
TIF1	I	L	T	S	L	L	L	N	S	S	Q		722-732
Trip2	M	L	M	N	L	L	K	D	N	P	A		23-33
Trip3	T	L	R	S	L	L	L	N	P	H	L		97-107
Trip4	R	L	A	V	L	L	P	G	R	H	P		36-46
Trip5	E	L	H	N	L	L	E	V	V	S	Q		26-36
Trip8	T	L	R	D	L	L	T	T	T	A	G		36-46
Trip9	F	L	D	F	L	L	G	F	S	A	G		73-83
	V	L	E	L	L	L	R	A	G	A	N		256-266
	I	L	A	R	L	L	R	A	H	G	A		288-298

Figure 17 : La séquence LxxLL est une signature chez les cofacteurs liant le domaine de fixation du ligand des récepteurs nucléaires. L'alignement de la séquence LxxLL est réalisé pour RIP140 h, SRC1 h, TIF2 m, CBP m, P300 m, TIF1 m et les protéines TRIP h. Les leucines conservées sont encadrées et les numéros des acides aminés de bordure sont indiqués pour chaque motif (d'après Heery *et al.*, 1997).

L'un des mécanismes expliquant comment SRC1 et RAC3 stimulent la transcription, est leur activité intrinsèque d'histone acétyltransférase (Spencer *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997). En effet, l'acétylation de certaines lysines des histones liées à l'ADN rend la chromatine plus lâche et permet à la machinerie transcriptionnelle de base d'accéder au promoteur (revue de Sternglanz, 1996). La région portant cette fonction se situe dans l'extrémité carboxy-terminale des protéines SRC1 et RAC3.

4-3-2- Une signature des coactivateurs

La cartographie des sites d'interaction entre les coactivateurs et les récepteurs nucléaires a permis de définir pour les coactivateurs plusieurs régions. La comparaison des séquences de ces régions pour RIP-140 a permis l'identification du motif LxxLL présent dans les fragments d'interaction (Heery *et al.*, 1997) (fig 17). En tout, neuf copies de ce motif sont présentes dans la protéine RIP140, et les fragments n'ayant pas d'activité de liaison avec les récepteurs ne possèdent pas ce motif. Ces motifs sont suffisants pour interagir de façon ligand dépendante avec le domaine E des récepteurs nucléaires (Heery *et al.*, 1997; Torchia *et al.*, 1997). Les coactivateurs RIP 140, SRC1, TIF2, CBP, P300, TIF1 et différents Trip possèdent tous le motif LxxLL dans la région définie comme servant d'interaction avec les récepteurs nucléaires, NID (Heery *et al.*, 1997; Darimont *et al.*, 1998; Kalkhoven *et al.*, 1998). Ce motif LxxLL définit le domaine LXD (pour « LxxLL domain ») composé d'une vingtaine d'acides aminés.

Le mécanisme d'interaction coactivateur-récepteur n'explique pas les différences de spécificité des domaines LXD présents dans un même domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires. En effet, pour le coactivateur GRIP1 possédant trois domaines LXD, LXD2 est nécessaire et suffisant pour fixer le récepteur aux hormones thyroïdiennes, tandis que LXD3 fixe le récepteur aux glucocorticoïdes (Darimont *et al.*, 1998). L'étude de chimères entre LXD2 et LXD3 montrent que le motif LxxLL est responsable de la spécificité de l'interaction avec un récepteur (Darimont *et al.*, 1998). De plus, l'étude de l'interaction du coactivateur SRC1 avec différents récepteurs nucléaires montre qu'un seul LXD est suffisant pour l'activation de la transcription par le récepteur aux oestrogènes, et que différentes combinaisons de deux LXD sont nécessaires pour l'activation de la transcription par le récepteur aux hormones thyroïdiennes et le récepteur à la progestérone notamment (McInerney *et al.*, 1998). L'étude de

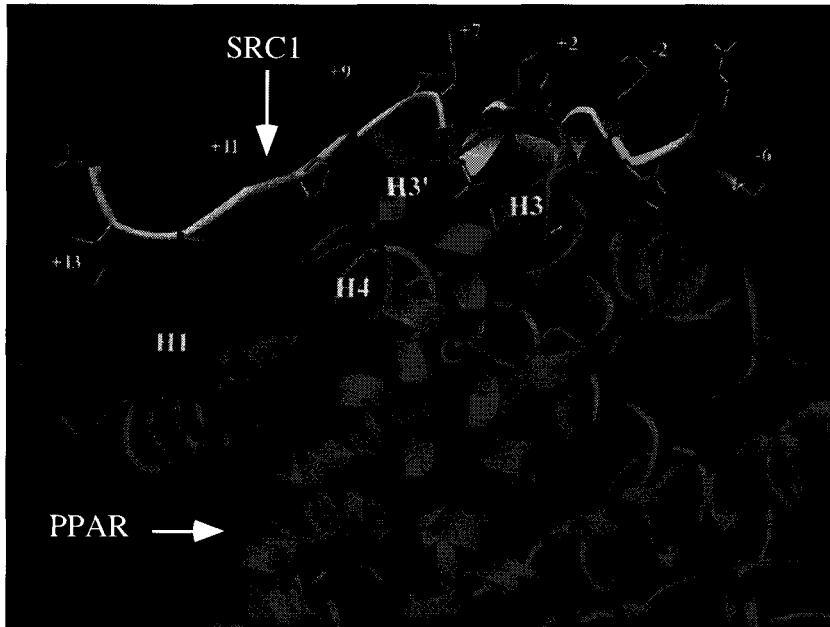


Figure 18 : Interaction entre le coactivateur SRC1 et le domaine de fixation du ligand de PPAR γ . SRC1 contenant 2 domaines LXD 1 et 2, interagit avec le dimère PPAR γ LBD liant son ligand BRL49653. Représentation de LXD2 des positions -6 à +14 fixant le LBD de PPAR γ avec son ligand. Les 3 leucines en +1, +4 et +5 sont au fond du sillon superficiel (d'après Nolte *et al.*, 1998 et Mc Inerney *et al.*, 1998).

mutants dans le domaine LXD indique que les acides aminés adjacents au motif LxxLL, jusqu'à la position +13 sont nécessaires pour permettre l'activation transcriptionnelle par les récepteurs aux oestrogènes et à l'acide rétinoïque. Il y a donc deux niveaux de spécificité pour l'interaction d'un coactivateur avec un récepteur nucléaire. Le premier niveau concerne le nombre de domaine LXD nécessaire pour cette interaction, et le deuxième concerne la présence d'acides aminés spécifique à la fois dans le motif LxxLL mais aussi dans les séquences adjacentes à ce motif.

La détermination de la structure tridimensionnelle du domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires du coactivateur SRC1 a été réalisée pour la région ne contenant que les deux premiers motifs LxxLL, en présence d'un homodimère constitué de deux domaines E du récepteur PPAR γ fixant le ligand (Nolte *et al.*, 1998; fig 18). Le coactivateur SRC1 possède deux hélices α , chacune constituée d'une dizaine d'acides aminés et contenant un motif LxxLL. Dans ce complexe ternaire coactivateur-récepteur-ligand, un motif LxxLL fixe une des molécules PPAR γ et le second motif fixe l'autre molécule de l'homodimère. La co-cristallographie de SRC1 avec le récepteur PPAR γ , ou de GRIP1 avec le récepteur aux hormones thyroïdiennes TR β , nous suggère un modèle d'interaction coactivateur-récepteur nucléaire : la région contenant le motif LxxLL forme une hélice α interagissant avec le récepteur au niveau des hélices H12 et H3 (Nolte *et al.*, 1998; Darimont *et al.*, 1998; fig 18). Au niveau de H12, l'acide glutamique conservé du motif consensus du domaine d'activation AF2, crée des ponts hydrogène avec la leucine +1 du motif, ainsi qu'avec les acides aminés adjacents à ce résidu. Tandis que les leucines en position +4 et +5 créent des ponts hydrogène avec H3. La surface du récepteur qui interagit avec LXD est constituée d'une quinzaine de résidus issus des hélices H3, H4, H5 et H12. Ces résidus forment un sillon superficiel dans lequel le plancher est formé d'acides aminés hydrophobes, et le bord d'acides aminés chargés (Darimont *et al.*, 1998). La leucine +1 de LXD est insérée au début de ce sillon superficiel, elle est maintenue par les ponts hydrogène. Au tour d'hélice suivant, ce sont les leucines en +4 et +5 qui se retrouvent dans la même position (fig 18).

Le coactivateur fixe le récepteur au niveau du sillon superficiel créé notamment par H12. Etant donné que ce sillon n'existe que lors du positionnement de H12 contre la molécule en

présence du ligand, nous comprenons mieux comment et pourquoi un récepteur nucléaire est un activateur de la transcription dépendant du ligand. D'autre part, les différences de conformation de H12 dues à la fixation d'un agoniste ou d'un antagoniste peuvent suffire pour empêcher la formation du sillon superficiel permettant la fixation du coactivateur.

4-4- CBP/P300, le co-intégrateur.

Les facteurs CBP (pour "CREB binding protein"), et P300 ont de forte identité de séquence et des fonctions similaires, ils sont regroupés sous le nom de CBP/P300. Ce sont des protéines nucléaires d'environ 2400 acides aminés qui interagissent avec différents facteurs de transcription mais aussi avec les composants de la machinerie transcriptionnelle basale, et les cofacteurs (revue de Janknecht et Hunter, 1996). Les 100 premiers résidus sont responsables de l'interaction avec les récepteurs nucléaires, la région centrale interagit notamment avec le facteur de transcription TFIIB, et la partie C-terminale fixe les coactivateurs comme SRC1 (fig 19). La région 461-661 lui permet de fixer CREB mais aussi d'autres facteurs de transcription tel que c-Jun, c-Myb, Elk. La protéine CBP/P300 est donc le co-intégrateur de nombreuses voies de signalisation.

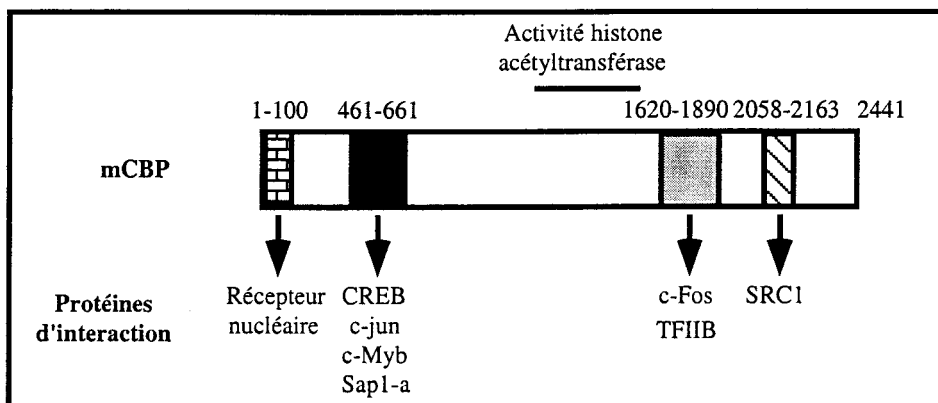


Figure 19 : Représentation de CBP chez la souris, et de ses différents domaines d'interaction protéique, ainsi que la région portant l'activité histone acétyltransférase (d'après la revue de Janknecht et Hunter, 1996).

L'interaction CBP-RXR est dépendante du ligand, et elle permet au récepteur d'activer la transcription (Chakravarti *et al.*, 1996). Le domaine E du récepteur est nécessaire et suffisant pour lier CBP. La protéine CBP/P300 possède aussi le motif LxxLL notamment dans son domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires. Ce LXD est capable, à lui seul, de fixer le domaine E du récepteur aux oestrogènes. Par conséquent, il est fort probable que CBP/P300

interagisse avec les récepteurs nucléaires exactement comme les autres cofacteurs tel que SRC1 (Heery *et al.*, 1997).

L'un des mécanismes expliquant comment CBP/P300 stimule la transcription, est son activité intrinsèque d'histone acétyltransférase dont le domaine est adjacent à celui qui fixe TFIIB (Ogryzko *et al.*, 1996; Bannister et Kouzarides, 1996).

Les récepteurs nucléaires sont donc capables d'interagir avec CBP/P300 mais aussi avec SRC1, par ailleurs CBP/P300 et SRC1 interagissent aussi entre eux (Yao *et al.*, 1996). Afin de déterminer si un tel complexe ternaire existe, l'activité transcriptionnelle du récepteur aux oestrogènes avec son ligand a été testée en présence de CBP et SRC1 (Smith *et al.*, 1996). Cette activité est augmentée de 6 fois en présence de CBP, et de 10 fois en présence de SRC1. Lorsque CBP et SRC1 sont présents, l'activité transcriptionnelle du récepteur aux oestrogènes est augmentée de 30 fois. L'étude de l'interaction directe de CBP et SRC1 en présence d'un récepteur nucléaire a été réalisée pour le récepteur aux hormones thyroïdiennes par la technique de corétention protéique (Kamei *et al.*, 1996). Le domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires de CBP fusionné à la glutathione S-transférase est capable d'interagir avec SRC1 uniquement en présence du récepteur aux hormones thyroïdiennes. Ce qui signifie que le récepteur nucléaire en présence de son ligand peut, en même temps, interagir avec le co-intégrateur CBP/P300 et le coactivateur SRC1, et que ces interactions ont un effet synergique sur l'activité transcriptionnelle.

4-5- Les corépresseurs

Les récepteurs TR et RAR sont connus pour être capables de réprimer la transcription de gènes cibles en absence de ligand, grâce à l'interaction avec des corépresseurs. Actuellement, par la méthode de double hybride, seuls trois corépresseurs ont été identifiés, NCoR pour « nuclear receptor co-repressor », SMRT pour « silencing mediator for retinoid and thyroid-hormone receptors » et Alien (Hörlein *et al.*, 1995; Chen et Evans, 1995; Chen *et al.*, 1996; Dressel *et al.*, 1999). La protéine Alien, qui vient récemment d'être découverte comme un corépresseur des récepteurs nucléaires n'a pas d'identité de séquence avec NCoR et SMRT

(Dressel *et al.*, 1999). Seule la famille de corépresseur NCoR/SMRT sera décrite dans les paragraphes suivants.

Les corépresseurs NCoR et SMRT sont des protéines nucléaires, ubiquistes, apparentées et de grandes tailles, 270 kDa pour NCoR, 276 kDa pour SMRT (Hörlein *et al.*, 1995; Chen et Evans, 1995; Ordentlich *et al.*, 1999). Leurs domaines d'interaction avec les récepteurs nucléaires (NID) sont situés dans la région C-terminal, et ils sont au nombre de deux, NID 1 et 2 (Wong et Privalsky, 1998b). Les corépresseurs fusionnés à un domaine de fixation à l'ADN sont capables de réprimer la transcription. En effet, ils possèdent dans leur partie N-terminale deux domaines de répression nommés RD pour "repression domain" (Li *et al.*, 1997b; fig 20). Les corépresseurs NCoR et SMRT possèdent un domaine SANT, qui est une fonction de répression, identifié chez d'autres protéines comme le facteur de remodelage de la chromatine chez la levure (SWI3) et le facteur de transcription TFIIB notamment. Ce domaine SANT contient deux régions identiques ayant 76% d'identité entre les deux protéines.

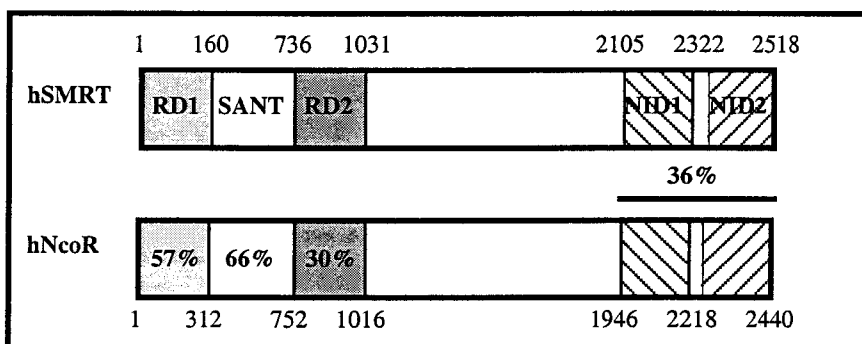


Figure 20 : Les différents domaines des corépresseurs SMRT et NCoR. Les domaines d'interaction avec les récepteurs nucléaires (NID) et les domaines de répression (RD et SANT) sont représentés, ainsi que leur acides aminés de bordure. Les pourcentages d'identité entre les deux corépresseurs sont indiqués (d'après Ordentlich et al, 1999).

4-5-1- Les domaines d'interactions récepteur-corépresseur

Les récepteurs RAR α ou TR β sont capables de s'associer avec un corépresseur, et cette association est inhibée en présence du ligand (Hörlein *et al.*, 1995; Chen et Evans, 1995). L'analyse de mutants de délétion de TR β ou RAR α indique clairement que la troncature de l'hélice H12 du domaine de fixation du ligand augmente l'affinité du récepteur pour SMRT (Li *et al.*, 1997b). L'hélice H12 contient la fonction d'activation AF2 qui agit comme un régulateur négatif de l'interaction avec SMRT. La suppression de l'hélice H11 du LBD de TR β et RAR α ne permet plus l'interaction avec SMRT. De plus, la suppression du domaine D de TR β , au

niveau de la boîte CoR (pour corépresseur), ne permet plus non plus la fixation des corépresseurs SMRT et NCoR (Hörlein *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1997b). Il semblerait donc qu'il y ait chez les récepteurs nucléaires deux régions permettant l'interaction avec les corépresseurs : l'hélice H11 et le domaine D.

RAR α et TR β ne fixent pas de la même façon SMRT. En effet, RAR α semble lier une seule région de SMRT, NID1, alors que TR β peut fixer les deux régions NID1 et NID2 (Li *et al.*, 1997b; Wong et Privalsky *et al.*, 1998 b). Ainsi, les récepteurs nucléaires diffèrent dans leur aptitude à fixer SMRT.

4-5-2- Rôle des corépresseurs dans l'activité des ligands antagonistes

Un récepteur complexé avec son antagoniste ne peut plus activer la transcription (Zhang *et al.*, 1998; Lavinsky *et al.*, 1998). En immunoprécipitant des extraits cellulaires avec des anticorps anti-NCoR, on coimmunoprécipite aussi ER mais uniquement en présence du tamoxifène (Lavinsky *et al.*, 1998). En effet, en absence d'oestradiol, ER n'est pas coimmunoprécipité. Par contre, *in vitro*, la technique de corétention protéique montre que SMRT fixe le récepteur à la progestérone en absence de ligand comme en présence de l'agoniste progestérone, ou de l'antagoniste RU486, et qu'il est aussi capable d'interagir avec le récepteur aux oestrogènes en présence de son agoniste, l'oestradiol, ou de son antagoniste le tamoxifène (Zhang *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1997). Les récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone sont donc capables de fixer un corépresseur en présence de leur antagoniste respectif.

Sur un élément de réponse du récepteur aux oestrogènes, l'incapacité du tamoxifène d'activer la transcription est levée lorsque des anticorps anti NCoR sont microinjectés (Lavinsky *et al.*, 1998). Sur un élément de réponse du récepteur à la progestérone, une activation de la transcription de PR avec son antagoniste RU486 est observée lorsque l'on ajoute le récepteur aux hormones thyroïdiennes sans ligand qui peut interagir avec SMRT, présent en quantité limitante dans la cellule (Zhang *et al.*, 1998). Les corépresseurs sont responsables de l'activité antagoniste du ligand. La fixation de l'antagoniste dans le domaine E du récepteur induit un changement de conformation mais insuffisant pour lever l'interaction du récepteur avec le corépresseur et permettre l'activité transcriptionnelle.

4-5-3- Mode d'action des corépresseurs

Actuellement deux modes d'action des corépresseurs sont identifiés : l'interaction avec un complexe histone déacétylase et l'inhibition de la machinerie transcriptionnelle de base. Ces deux modes d'action ne sont pas exclusifs.

- Le complexe histone déacétylase.

Les techniques de coimmunoprécipitation et de corétention protéique permettent de montrer l'existence d'un complexe formé de mSin3, HDAC1 et NCoR ou SMRT (Heinzel *et al.*, 1997; Nagy *et al.*, 1997; Alland *et al.*, 1997). Les protéines mSin3 et HDAC1 sont connues pour augmenter la répression transcriptionnelle de plusieurs facteurs de transcription, et HDAC1 est une histone déacétylase. La déacétylation de certaines lysines des histones rend la chromatine plus compacte et moins accessible à la machinerie transcriptionnelle basale. La répression transcriptionnelle de TR en absence de ligand ou de ER avec son antagoniste, est empêchée lorsque l'on microinjecte dans la cellule des anticorps anti NCoR ou anti mSin3 ou anti HDAC1 (Heinzel *et al.*, 1997; Lavinsky *et al.*, 1998). De plus l'hétérodimère RXR-RAR fixe directement le complexe SMRT-mSin3 (Nagy *et al.*, 1997). Par conséquent, les récepteurs nucléaires répriment la transcription grâce au complexe répresseur qui est actuellement composé de NCoR/SMRT, mSin3 et HDAC1, mais aussi des protéines associées à mSin3 (SAP pour "mSin3 associated protein") et le produit de l'oncogène c-ski (Zhang *et al.*, 1997; Nomura *et al.*, 1999; revue de Xu *et al.*, 1999).

- L'inhibition de la machinerie transcriptionnelle basale.

La transcription des gènes par l'ARN polymérase II nécessite la formation d'un complexe multiprotéique au niveau de la boîte TATA. Ce complexe d'initiation de la transcription comprend la sous-unité TFIID qui est constituée de la TBP (pour "TATA-binding protein"), et de nombreuses TAFs (pour "TBP-Associated-Factors"). Ce complexe comprend aussi les facteurs de transcription TFIIB, TFIIE, TFIIF et TFIIH.

Les expériences de corétention protéique montrent que NCoR peut fixer TAFII32, TFIIB mais aussi TAFII70 (Muscat *et al.*, 1998). De plus, l'activité transcriptionnelle de TFIIB-TAFII32 est inhibée en présence de NCoR. En conclusion, les corépresseurs sont

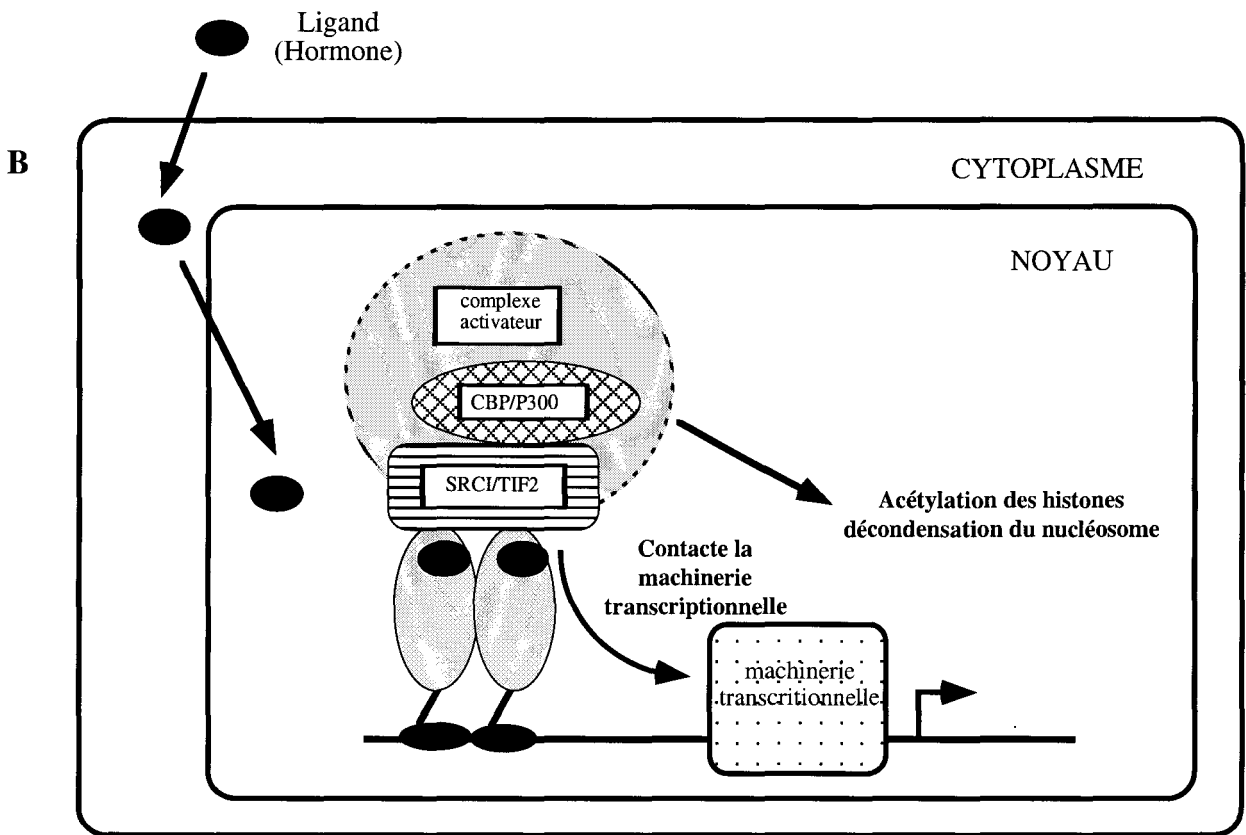
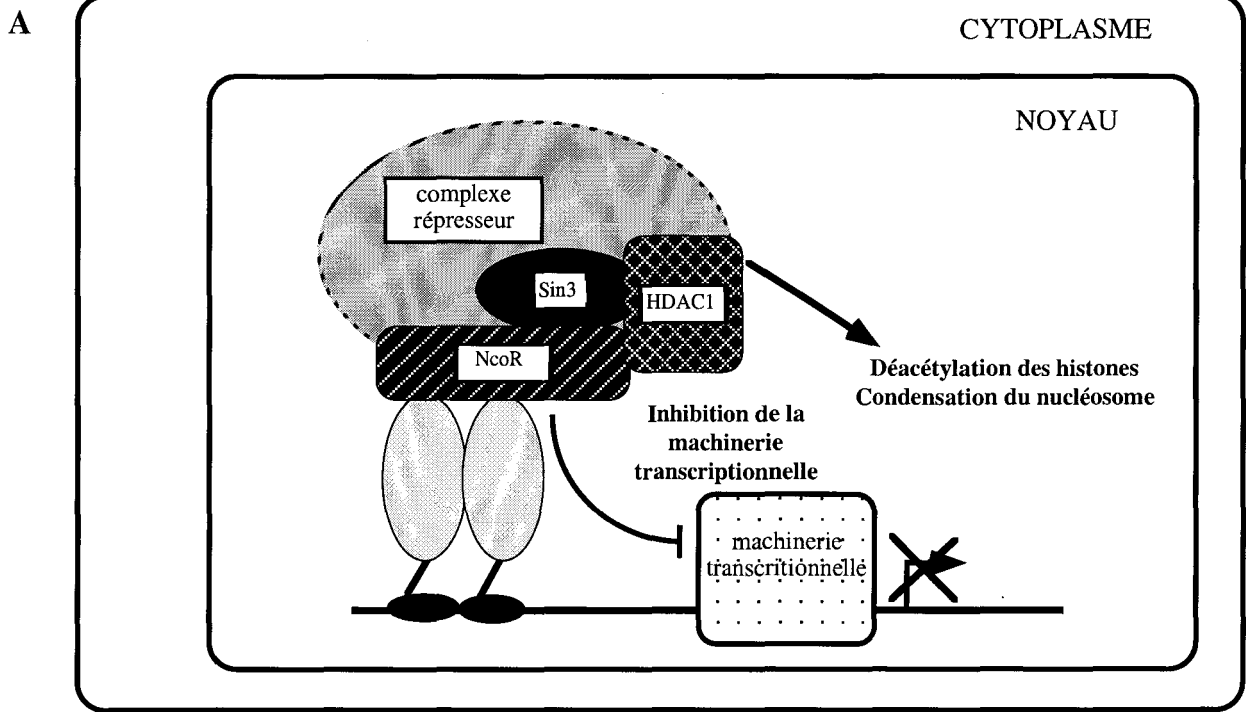


Figure 21 : Modèle de la fonction des récepteurs nucléaires. **(A)** Le récepteur fixant le complexe corépresseur a une activité transcriptionnelle silencieuse. **(B)** En présence de ligand, le récepteur change de conformation, le complexe corépresseur se détache et le complexe coactivateur fixe le récepteur ce qui permet l'activation de la transcription (d'après Moras et Gronemeyer, 1998).

capables d'interagir avec le complexe de la machinerie transcriptionnelle, et cette interaction permet d'inhiber l'activité transcriptionnelle des récepteurs .

Il a été montré que NCoR est capable d'interagir à la fois avec le récepteur nucléaire orphelin Rev-erb β , le complexe répresseur et la machinerie transcriptionnelle (Muscat *et al.*, 1998). Par ailleurs, TFIIB peut aussi fixer SMRT et mSin3 (Wong et Privalsky, 1998a). Il semblerait donc que la répression transcriptionnelle des récepteurs nucléaires passe par un corépresseur qui d'une part interagit avec un complexe actif histone déacétylase, et d'autre part inactive la machinerie transcriptionnelle basale en se fixant avec certaines de ses protéines (fig 21 A).

4-6- Passage du complexe corépresseur au complexe coactivateur.

L'hétérodimère RXR α -TR β réprime la transcription en absence de ligand grâce au complexe répresseur dont le mécanisme d'action est résumé par la figure 21 A. Pour que cet hétérodimère active la transcription, il faut que le complexe répresseur se détache de RXR α -TR β . Pour cela, la présence seule du ligand T3 n'est pas suffisante, il faut à la fois la présence du ligand, mais aussi celle du coactivateur (Olson *et al.*, 1998). En effet, l'étude de l'activité transcriptionnelle de l'hétérodimère montre qu'en présence de corépresseur, lorsque l'on ajoute uniquement le ligand de TR β , il n'y a pas induction de la transcription. Par contre, si avec le corépresseur et le ligand est aussi ajouté le coactivateur SRC1, alors l'activité transcriptionnelle est induite trois fois. Cependant, lorsque le corépresseur n'est pas ajouté avec le ligand et SRC1, l'induction de la transcription est de 4 fois. Le ligand et SRC1 sont donc nécessaires pour libérer le récepteur du corépresseur afin d'induire l'activité transcriptionnelle (revue de Xu *et al.*, 1999; fig 21 B).

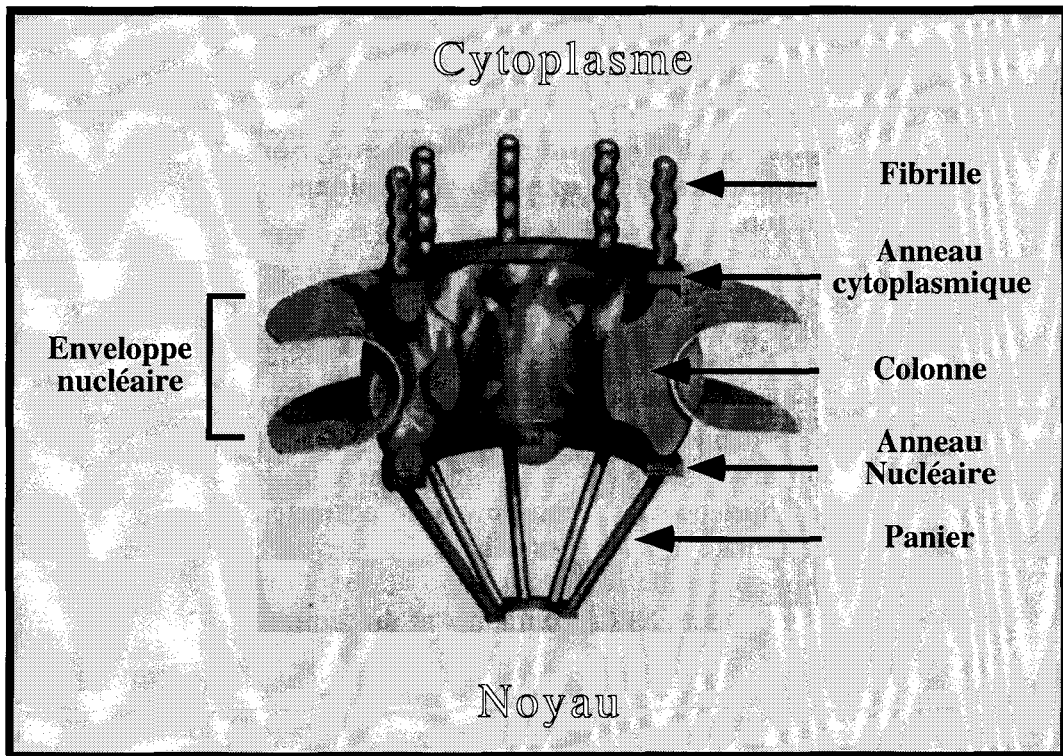


Figure 22 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle du complexe du pore nucléaire en coupe transversale. Le complexe du pore nucléaire apparaît composé de 3 parties : un élément en forme de colonne constituant l'ensemble du "mur" du pore, un élément en forme d'anneau qui émet des rayons vers le noyau en formant un panier, et un élément en forme d'anneau qui émet des fibrilles vers le cytoplasme (d'après Nigg, 1997).

V- Localisation intracellulaire

5-1- Le pore nucléaire

Les récepteurs nucléaires sont synthétisés dans le cytoplasme mais leur lieu d'action est dans le noyau, il leur faut donc traverser les pores de la membrane nucléaire. Un pore nucléaire permet le transport bidirectionnel entre le cytoplasme et le noyau. C'est un canal de 9 nm de diamètre qui permet la diffusion libre des ions, des métabolites et des petites protéines jusqu'à une taille de 40-60 kDa (revue de Nigg, 1997). Il permet aussi le transport sélectif des particules de plus grandes tailles grâce à un mécanisme nécessitant de l'énergie.

Un pore nucléaire est en réalité un complexe de protéines nommées Nup, pour nucléopore, positionné entre un anneau cytoplasmique et un anneau nucléaire (revue de Moore, 1995; fig 22). L'anneau cytoplasmique émet 8 fibrilles, et un complexe en forme de panier est attaché sur l'anneau nucléaire. Le complexe du pore nucléaire a une taille de 120 nm de diamètre, une masse de 125000 kDa, et il contient plus de 1000 protéines dont certaines sont présentes en copies multiples.

5-2- Mécanisme d'importation nucléaire

5-2-1- Les signaux de localisation nucléaire

Les signaux de localisation nucléaire, NLS, sont des séquences qui permettent à une protéine d'être transportée dans le noyau. Un NLS est une séquence de 4 à 30 acides aminés trop courte pour former une structure indépendante (LaCasse et Lefebvre, 1995). Deux critères définissent un signal de localisation nucléaire : (i) lorsqu'il est fusionné à une protéine non nucléaire, le signal de localisation nucléaire doit entraîner cette protéine dans le noyau, (ii) sa délétion ou mutation doit entraîner l'accumulation cytoplasmique d'une protéine normalement nucléaire.

Il est difficile de donner une séquence consensus de NLS, cependant les NLS semblent être riches en acides aminés basiques comme la lysine et l'arginine. Il existe plusieurs types de NLS dont deux principaux : celui qui a été découvert dans SV40, et les NLS bipartites (LaCasse et Lefebvre, 1995). Le premier NLS découvert est celui de l'antigène T du virus SV40, son consensus est K (R/K) x (R/K), où K est une lysine, R une arginine et x peut être

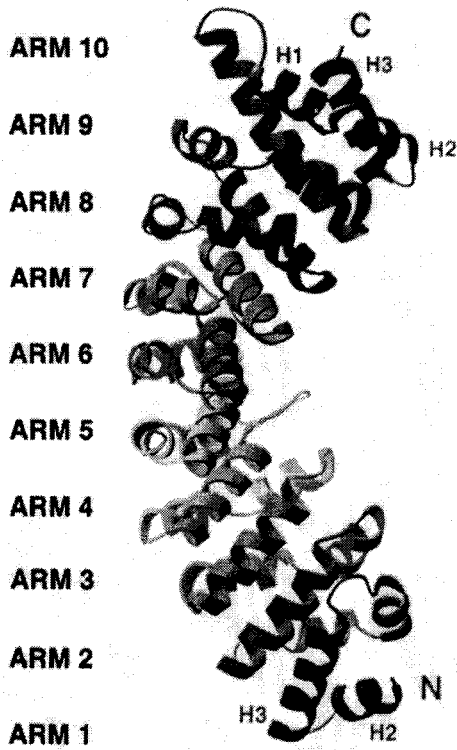
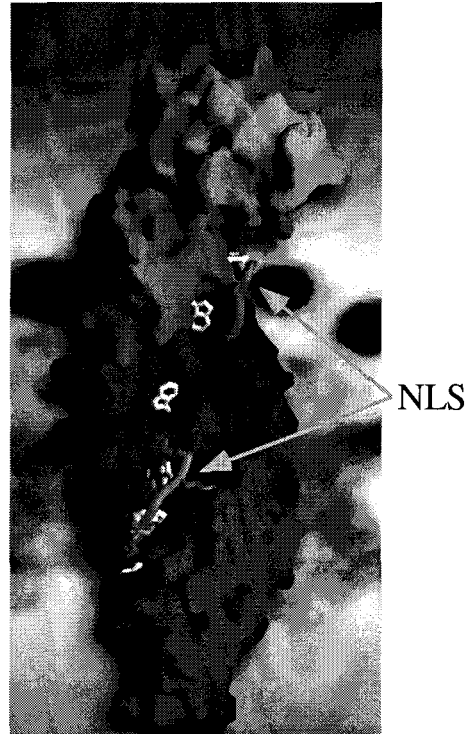
A**B**

Figure 24 : Représentation tridimensionnelle de l'importine α . **(A)** La molécule contient 10 répétitions du domaine ARM et chacun de ces domaines est constitué de 3 hélices α avec une exception pour le premier motif qui n'en contient que 2. L'axe de cette super-hélice est vertical. **(B)** Le long de la face intérieure de cette spirale se trouve une gouttière dans laquelle vient se fixer le signal de localisation nucléaire, NLS. Une molécule d'importine α peut ainsi fixer en même temps dans sa gouttière deux NLS de type antigène T du virus SV40 (d'après Conti *et al.*, 1998).

une arginine, une lysine, une proline, une valine ou une alanine (LaCasse et Lefebvre, 1995). Le NLS bipartite est constitué de deux groupes d'acides aminés séparés par une dizaine d'acides aminés (LaCasse et Lefebvre, 1995). La séquence basique en C-terminale est similaire à celle du NLS de SV40, mais les deux groupements basiques sont nécessaires pour le transport nucléaire.

5-2-2- Ran et les différentes importines

Le mécanisme d'importation nucléaire est basé sur l'utilisation d'énergie grâce au facteur Ran qui a une activité GTPase (Nigg, 1997; Goldfarb, 1997; Görlich, 1998). L'activité GTPase de Ran est fortement stimulée par une protéine activant les GTPase qui est Ran GAP1. D'autre part, le remplacement de RanGDP en RanGTP est stimulé par un facteur échangeant le nucléotide guanine, Ran RCC1. Ces deux régulateurs de Ran sont fortement compartimentés : Ran GAP1 est cytoplasmique alors que Ran RCC1 est majoritairement nucléaire. De ce fait, Ran cytoplasmique est principalement sous la forme GDP alors que RanGTP est la forme majeure dans le noyau (fig 23).

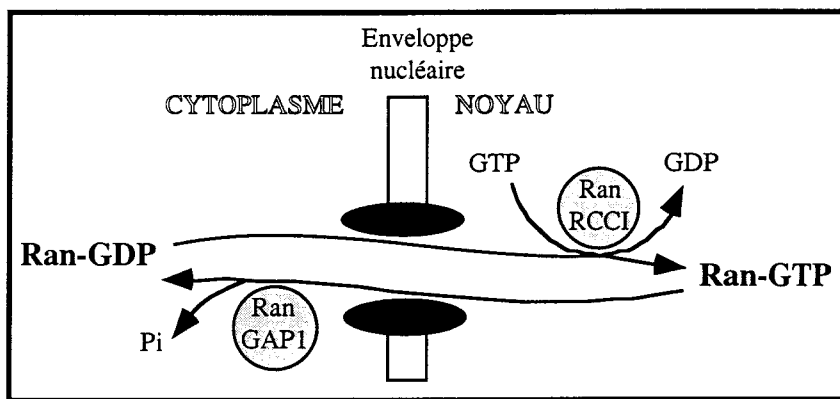


Figure 23 : Cycle de fixation et d'hydrolyse du GTP par Ran.

Deux autres facteurs sont importants pour prendre en charge une protéine contenant un NLS, ce sont les importines α et β (Nigg, 1997; Goldfarb, 1997; Görlich, 1998). Elles forment un hétérodimère dans lequel l'importine α fixe le NLS, et l'importine β fixe l'extrémité distale des fibrilles de l'anneau cytoplasmique du complexe du pore nucléaire. La structure tridimensionnelle de l'importine α ne possède pas les 88 premiers acides aminés, ni les 30 derniers acides aminés de la protéine (Conti *et al.*, 1998). Elle est constituée de 10 domaines

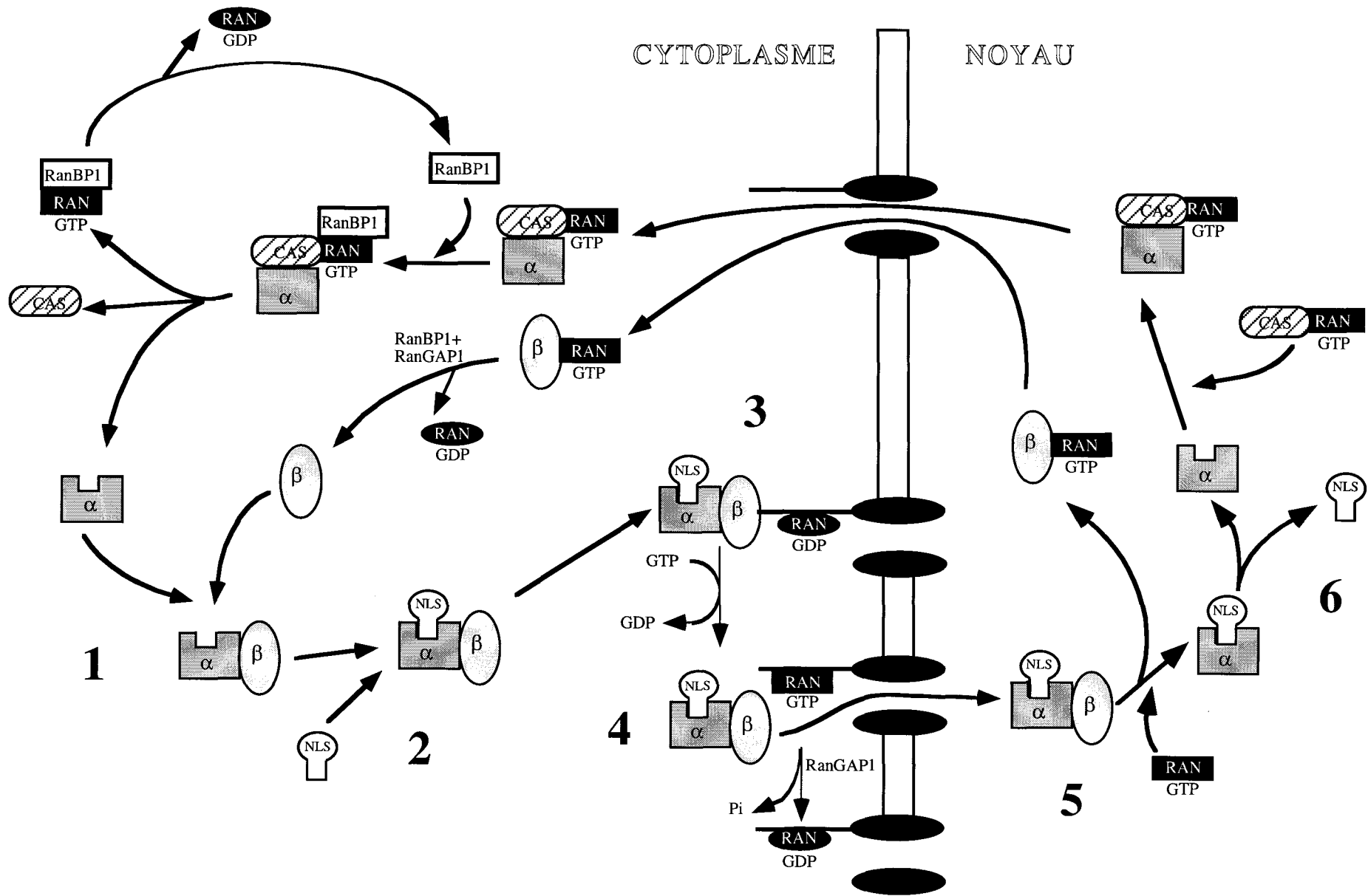


figure 25: Mécanisme de translocation nucléaire à travers l'enveloppe nucléaire *via* le complexe du pore nucléaire. α représente l'importine α ; β , l'importine β ; NLS, une protéine portant un signal de localisation nucléaire (d'après Görlich, 1998).

ARM organisés les uns au dessus des autres en super hélice, et chaque domaine ARM est constitué de 3 hélices α (fig 24 A). Le NLS se fixe dans le creux de la super hélice (fig 24 B).

5-2-3- Le mécanisme

Le premier événement cytoplasmique nécessaire au transport des protéines à NLS est la formation de l'hétérodimère formé par l'importine α et l'importine β (Nigg, 1997; Goldfarb, 1997; Görlich, 1998) (fig 25, point 1). L'importine α porte le site de fixation au NLS qui lui permet de prendre en charge la protéine à transporter, ainsi que le site de fixation de l'importine β (fig 25, point 2). Le trimère NLS, importines α et β se fixe aux fibrilles du complexe du pore nucléaire (fig 25, point 3). Le transport à travers le pore nucléaire est dépendant d'énergie et il nécessite l'hydrolyse du GTP par Ran (fig 25, point 4). Dans le noyau, l'importine β se sépare du trimère en se fixant sur RanGTP (fig 25, point 5), puis la protéine transportée et l'importine α se dissocient (fig 25, point 6). Dans le cytoplasme, au niveau des fibrilles, après translocation du trimère NLS-importines α - β , le RanGTP passe sous la forme GDP sous l'action de Ran GAP1 cytoplasmique.

Pour que le système puisse fonctionner, il faut que les importines α et β soient recyclées en retournant dans le cytoplasme. Dans le noyau, à cause de Ran RCC1, Ran n'existe que sous forme de GTP et peut ainsi séparer l'importine β de NLS-importine α . L'importine β est probablement exportée vers le cytoplasme complexée avec RanGTP. Puis ils se séparent dans le cytoplasme à l'aide d'une protéine fixant RanGTP, qui est Ran BP1. Sous l'action de Ran GAP1, RanGTP se trouve sous forme de RanGDP et de ce fait se détache de Ran BP1 (fig 25).

Pour que l'importine α soit recyclée et exportée vers le cytoplasme, un facteur d'exportation nucléaire spécifique est nécessaire. Il s'agit de CAS, pour « cellular apoptosis susceptibility gene », qui fait partie de la famille des importines β . L'exportine CAS a besoin de RanGTP pour exporter l'importine α . Après avoir traversé le pore nucléaire, le complexe importine α -CAS-RanGTP se retrouve dissocié par l'action de RanBP1 et de Ran GAP1 (fig 25).

5-3- Le transport nucléaire des récepteurs nucléaires

L'étude du transport nucléaire des récepteurs a été réalisée dans des hétérokaryons, qui sont formés, par fusion au polyéthylène glycol, d'une cellule contenant le récepteur sauvage avec un autre type cellulaire qui ne contient pas ce récepteur. Cet hétérokaryon est créé en présence de cycloheximide qui empêche la synthèse de nouvelles protéines. Après fusion, le récepteur de la progestérone par exemple, se retrouve dans le noyau de la cellule qui ne produit pas de PR, et il en est de même pour GR (Guiochon-Mantel *et al.*, 1991; Madam et De Franco, 1993). Par conséquent, le récepteur a migré d'un noyau à l'autre *via* le cytoplasme. Ainsi nous pouvons dire que les récepteurs nucléaires sont capables de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau.

La fixation à l'ADN et la localisation nucléaire sont des fonctions distinctes. En effet, un mutant du récepteur aux glucocorticoïdes incapable de fixer l'ADN, a une localisation nucléaire en présence de son ligand (Sachey *et al.*, 1996).

L'étude de la localisation subcellulaire des récepteurs nucléaires est un sujet de polémique. L'une des raisons de l'obtention de résultats opposés semble être la technique employée. En effet, les premières études utilisaient le fractionnement biochimique noyau/cytoplasme suite à la lyse cellulaire, ou la visualisation indirecte par immunolocalisation dans des cellules fixées et perméabilisées. Le récepteur aux glucocorticoïdes muté de façon à ne plus fixer l'ADN n'a pas la même localisation subcellulaire après traitement à la dexaméthasone selon la technique employée (Sackey *et al.*, 1996). Par immunofluorescence, la protéine est nucléaire, et par fractionnement biochimique, elle est cytoplasmique. Le fait que le récepteur mutant soit faiblement associé avec le noyau fait qu'il se retrouve dans la fraction cytosolique lors d'une lyse cellulaire hypotonique. Depuis, est arrivée une nouvelle technique qui permet la visualisation directe du récepteur dans la cellule non fixée. Le principe consiste à créer des chimères entre le récepteur et une protéine fluorescente : la GFP pour "green fluorescent protein". La GFP, découverte chez la méduse, est une protéine de 238 acides aminés, cytoplasmique. Elle est naturellement fluorescente sous une lumière bleue, sans aucun ajout de substrat (Chalfie *et al.*, 1994).

L'étude par la technique de chimère GFP de la localisation cellulaire des récepteurs en absence de leur ligand indique trois catégories de localisation : exclusivement cytoplasmique pour GR et AR, à la fois cytoplasmique et nucléaire pour MR et TR β , et exclusivement nucléaire pour PR (Htun *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1998; Georget *et al.*, 1998; Fejes-Toth *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 1999). Les techniques d'immunolocalisation montrent que sans ligand, ER, TR α et RAR α sont nucléaires (Welshons *et al.*, 1984; King et Greene, 1984; Lee et Mahdavi, 1993; Kastner *et al.*, 1992; Tahayato *et al.*, 1993). Les récepteurs localisés dans le cytoplasme sont transloqués dans le noyau en présence de leur ligand respectif.

5-3-1- Les protéines de choc thermique, HSP

Les récepteurs aux stéroïdes tel que ER, GR et PR sont capables de fixer la protéine de choc thermique HSP90 en absence de ligand (Chambraud *et al.*, 1990; Pratt, 1993). Or TR et RAR sont connus pour ne pas interagir avec HSP90 (Dalman *et al.*, 1990; Dalman *et al.*, 1991). Il semblerait que les récepteurs nucléaires ne soient pas tous capables d'interagir avec les protéines HSP.

Parmi les récepteurs qui interagissent avec HSP90, ER et PR, en absence de leur ligand respectif, ont une localisation nucléaire alors que GR sans ligand est cytoplasmique (Ylikomi *et al.*, 1992; Madam et De Franco, 1993). Il semblerait donc que GR soit caractérisé par le fait qu'en absence de ligand il soit séquestré dans le cytoplasme, et que cette séquestration serait due aux protéines HSP. En effet, HSP90 et HSP70 principalement fixent ce récepteur au niveau de son domaine E en absence de ligand (Pratt, 1993). En présence du ligand, le domaine E de GR change de conformation, se dissocie du complexe HSP, et le récepteur peut ainsi traverser l'enveloppe nucléaire.

5-3-2- Les signaux de localisation nucléaire

Les récepteurs nucléaires possèdent plusieurs NLS qui sont des séquences riches en acides aminés basiques (revue de Gronemeyer et Laudet, 1995; fig 26). Ces NLS sont localisés pour une partie dans la région C-terminale du domaine de fixation à l'ADN et dans le domaine D. La seconde partie est localisée dans le domaine de fixation du ligand.

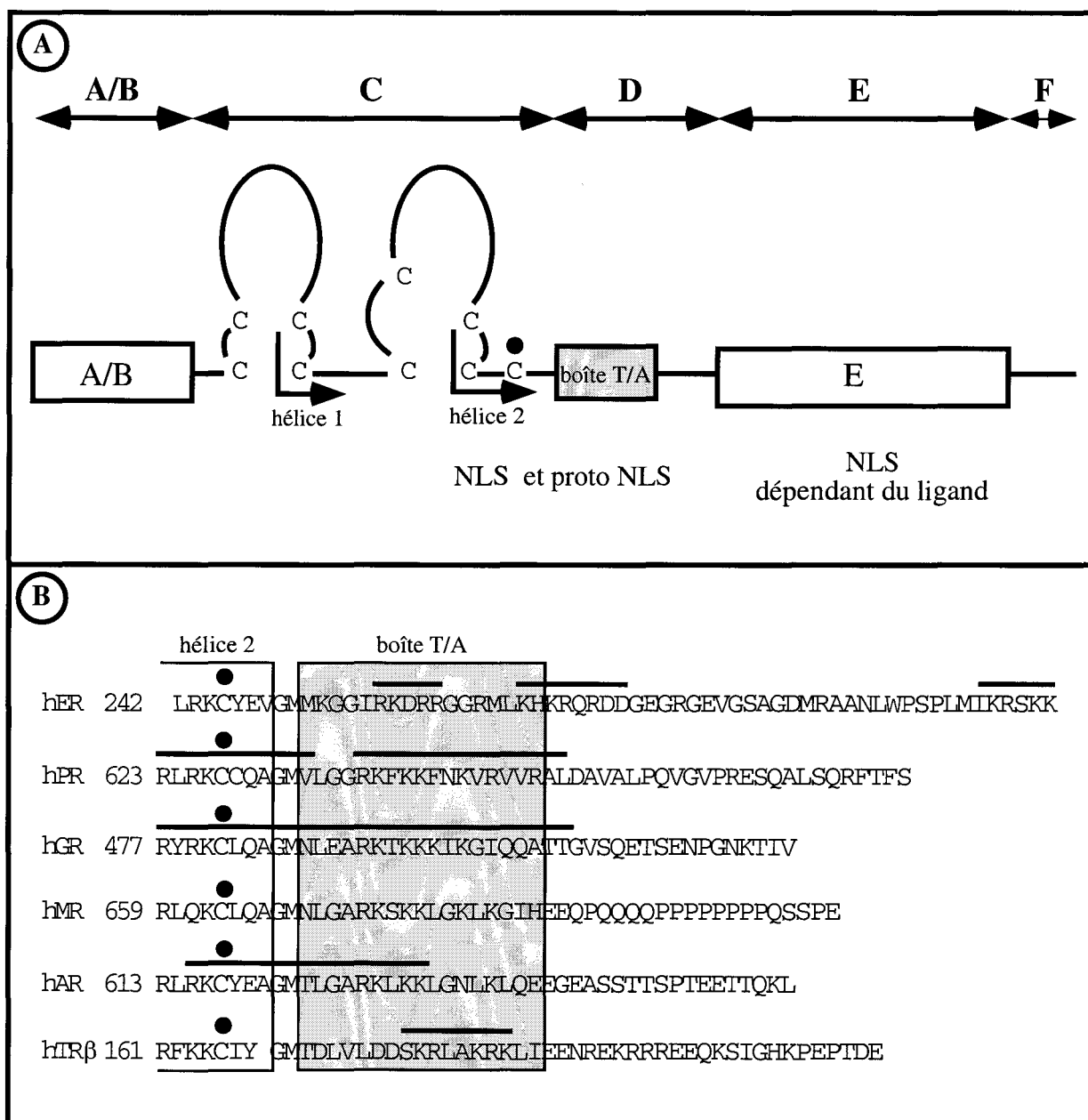


Figure 26 : Représentation des différents NLS chez les récepteurs nucléaires. **(A)** Localisation des NLS et proto-NLS chez un récepteur nucléaire. Les différents domaines sont indiqués, les doigts de zinc avec leurs hélices ainsi que la boîte T/A sont indiqués. **(B)** Représentation par un trait des NLS et proto-NLS de différents récepteurs nucléaires. La neuvième cystéine du domaine C est indiquée par un rond noir. L'hélice 2 et la boîte T/A sont représentées.

Les signaux localisés dans le domaine de fixation du ligand ne sont actifs qu'en présence du ligand. Etant donné que la fixation du ligand entraîne un changement de structure dans ce domaine, nous pouvons penser que ces signaux sont masqués en absence du ligand, et qu'en sa présence le changement de structure fait qu'ils deviennent accessibles. Cependant aucune étude précise de ces signaux dans le domaine de fixation du ligand n'a été réalisée, et nous ne connaissons ni leur séquence ni leur position.

Pour les signaux de localisation nucléaire situés à la jonction des domaines C et D ou dans le domaine D, certains ne sont actifs qu'en présence du ligand, et d'autres sont constitutifs.

Un récepteur nucléaire en absence de son ligand est soit nucléaire, soit cytoplasmique. Actuellement, les récepteurs localisés dans le cytoplasme ou à la fois dans le cytoplasme et le noyau, en absence de leur ligand sont le récepteur aux glucocorticoïdes, le récepteur aux androgènes, le récepteur aux minéralocorticoïdes et le récepteur aux hormones thyroïdiennes (Haché *et al.*, 1999; Georget *et al.*, 1999; Fejés-Tóth *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1998). Ils ont tous pour point commun d'avoir leur NLS dans la boîte T/A du domaine D. Le fait que ces NLS soient dépendant du ligand, nous fait penser que la fixation du ligand doit aussi changer la conformation du domaine D de façon suffisante pour rendre accessible ces NLS.

Les récepteurs localisés dans le noyau en absence de leur ligand sont le récepteur aux oestrogènes et le récepteur à la progestérone (Guiochon-Mantel *et al.*, 1989; Ylikomi *et al.*, 1992). Ils n'ont pas de NLS mais plutôt trois proto-NLS. Un proto-NLS seul n'est pas capable de permettre la translocation de la protéine, mais seul l'association de deux ou trois proto-NLS en est capable. Le récepteur ER possède deux proto-NLS dans la boîte T/A et un à la fin du domaine D (Ylikomi *et al.*, 1992). Le récepteur PR possède un proto-NLS dans le domaine C, un autre à la jonction des domaines C et D, et le troisième dans la boîte T/A (Guiochon-Mantel *et al.*, 1989; Ylikomi *et al.*, 1992). Il semblerait qu'un récepteur localisé dans le noyau en absence de son ligand puisse avoir un proto-NLS dans une région assez grande contenant les domaines C et D.

5-3-3- Le complexe récepteur-importine

Bien que le mécanisme d'importation nucléaire soit connu pour des protéines ayant un NLS similaire à celui des récepteurs, peu d'études ont été réalisées afin de savoir si effectivement les récepteurs nucléaires vont dans le noyau par ce type de transport. L'interaction entre l'importine α et un récepteur n'est pour l'instant décrite que pour le récepteur aux glucocorticoïdes (Savory *et al.*, 1999). En effet, les techniques de corétention protéique et de double hybride montrent une interaction entre le récepteur aux glucocorticoïdes et l'importine α . Le récepteur GR possède deux NLS, NL1, qui est proche du domaine de fixation à l'ADN et NL2, qui est ligand dépendant et localisé dans le domaine de fixation du ligand. L'étude de mutant de GR indique que lorsque NL1 est délété ou muté, GR ne fixe pas l'importine α alors que NL2 est présent. Par ailleurs, il semblerait que l'interaction GR-importine α ne soit pas dépendante du ligand, et que de ce fait, l'importine α puisse fixer GR avec son ligand ou GR avec HSP90. Le récepteur GR, par l'intermédiaire de son signal de localisation constitutif NL1, interagit avec l'importine α , et nous pouvons supposer que cette interaction permet à GR de traverser l'enveloppe nucléaire.

En ce qui concerne le NL2 de GR, localisé dans le domaine de fixation du ligand, non seulement il ne fixe pas l'importine α mais sa cinétique d'importation nucléaire est nettement plus faible que celle du récepteur entier (Savory *et al.*, 1999). Il semblerait donc que NL2, dont la localisation précise et la séquence n'ont pas été déterminées, permette au complexe GR-ligand d'aller dans le noyau par un mécanisme différent de celui de l'hétérodimère importine α - β .

B- LES RECEPTEURS NUCLEAIRES ORPHELINS

A partir du fort pourcentage d'identité de séquence existant entre les récepteurs, de nombreux laboratoires ont identifié de nouveaux membres de cette famille pour lesquels on ne connaissait aucun ligand. Ces récepteurs "orphelins", d'abord cas isolés, sont rapidement devenus majoritaires dans la famille (fig 1). A part quelques cas très spéciaux, leur structure est indiscernable de celle des récepteurs possédant des ligands. Deux hypothèses peuvent expliquer leur mode d'action : (i) soit ils n'ont effectivement pas de ligand, mais alors comment

fonctionnent-ils ? et quelle est leur relation avec les récepteurs “ classiques ” ?, (ii) soit ils possèdent un ligand encore inconnu, et ils constituent une piste intéressante pour découvrir de nouvelles molécules. Parmi ces récepteurs orphelins, Rev-erb et PPAR, sujets de ce travail, seront décrits en détail dans la partie suivante.

I- La recherche de ligand

1-1- Les ligands

Les ligands les plus connus sont les dérivés du cholestérol tel que le 17 β oestradiol, la progestérone et les androgènes. Depuis d'autres stéroïdes comme la prégnénolone se sont avérés être des ligands notamment pour le récepteur PXR, mais il y a aussi les produits de dégradation du cholestérol tels que les oxystérols pour le récepteur LXR, ainsi que les acides biliaires pour le récepteur FXR (Forman *et al.*, 1995a; Janowski *et al.*, 1996; Kliewer *et al.*, 1998, Parks *et al.*, 1999; Makishima *et al.*, 1999). Il en est de même pour les prostaglandines, dérivées de l'acide arachidonique, parmi lesquelles la prostaglandine J2 est capable de fixer à haute affinité le récepteur PPAR γ (Kliewer *et al.*, 1995). Nous pouvons aussi nous attendre à ce que certains ligands des récepteurs orphelins se trouvent dans les nutriments, tels que les vitamines par exemple. En effet, la vitamine D a un récepteur dans la superfamille qui est VDR, et les dérivés de la vitamine A, les acides rétinoïques tout-*trans* et 9-*cis*, ont pour récepteurs RAR et RXR. Ainsi, il s'avère que les ligands des récepteurs nucléaires sont d'origine variable tels que les métabolites du cholestérol ou de l'acide arachidonique, les acides gras, les vitamines et les nutriments.

1-2- Quelques méthodes de recherche de ligand

La méthode la plus utilisée est la mesure de l'activité transcriptionnelle du récepteur. Dans des cultures de cellules, sont co-transfectés un plasmide d'expression du récepteur à tester et un vecteur rapporteur. Ce dernier comporte un gène codant une protéine à activité enzymatique facilement détectable, tel que la luciférase, dont l'expression est sous le contrôle d'un promoteur minimal en amont duquel sont clonés des sites de fixation du récepteur étudié. Les cellules sont traitées avec le ligand candidat, et on compare les activités du gène rapporteur

avec ou sans ligand. Si le ligand candidat est capable d'activer le récepteur, cela ne signifie pas pour autant que la molécule testée soit un ligand. En effet, il est possible que cette molécule soit métabolisée par la cellule en un autre composé qui est, lui, le vrai ligand. C'est le cas notamment pour le récepteur à l'acide rétinoïque RXR α . Des tests d'activité transcriptionnelle montrent que RXR α induit la transcription en présence de l'acide rétinoïque tout-*trans*. Or, RXR α ne fixe que faiblement la forme tout-*trans*, mais dans les cellules l'acide rétinoïque tout-*trans* est transformé en acide rétinoïque 9-*cis*, et c'est la forme 9-*cis* qui est le ligand de haute affinité de RXR α (Levin *et al.*, 1992). Les voies métaboliques intracellulaires peuvent être très complexes, et il est parfois long et difficile d'identifier le véritable ligand en partant d'une molécule capable d'activer un récepteur.

L'une des nouvelles méthodes d'identification de ligand est le test CARLA (pour "coactivator dependent receptor ligand assay") qui est en fait la technique de corétention protéique avec le domaine de fixation du ligand du récepteur fusionné avec la glutathione S transférase, GST (Krey *et al.*, 1997). Si le candidat est un ligand, sa fixation sur le récepteur permet l'interaction avec le coactivateur SRC1 radiomarqué. Cependant, nous pouvons noter que cette technique n'est appropriée que pour des ligands entraînant une activité transcriptionnelle positive.

1-3- Les ligands répresseurs de la transcription

Le récepteur orphelin CAR (pour "constitutive androstane receptor") fixe l'ADN sous forme d'hétérodimère avec RXR, et active la transcription (Choi *et al.*, 1997). La recherche de ligand pour CAR β , a montré que son activité constitutive est inhibée de façon spécifique en présence d'androsténol ou d'androstanol, et que cette inhibition passe par le domaine de fixation du ligand (Forman *et al.*, 1998). Les techniques de double hybride et de corétention protéique indiquent que, à l'opposé des récepteurs nucléaire classiques, l'activité constitutive de CAR β est due au recrutement ligand-indépendant du coactivateur SRC1, et que cette interaction disparaît en présence d'androstanol. Ainsi, apparaît la notion d'agoniste inverse. L'effet de l'androsténol ou de l'androstanol est opposé à celui des ligands "classiques" des récepteurs nucléaires. Ces ligands répriment la transcription de leurs gènes cibles.

La recherche de ligand pour les récepteurs orphelins n'est pas aisée, mais elle nous fait découvrir de nouvelles régulations, de nouvelles molécules à rôle pharmacologique et de nouveaux concepts en matière de régulation de la transcription dépendante du ligand.

II- Les récepteurs nucléaires orphelins atypiques

Les récepteurs orphelins font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires par leur identité de séquence au niveau du domaine de fixation à l'ADN et du domaine de fixation du ligand. Cependant, certains récepteurs orphelins ne possèdent pas l'un des ces deux domaines : les récepteurs Odr7 et Knirps dont la partie C-terminale n'est pas un domaine E, et à l'inverse les récepteurs DAX et SHP ne possèdent pas de domaine C.

2-1- Les récepteurs Knirps et Odr7 sont de vrais orphelins

Les membres du groupe Knirps sont au nombre de trois, les récepteurs (i) KNI et (ii) KNRL sont indispensables durant l'embryogenèse de la Drosophile pour la segmentation abdominale, et (iii) EGON pour "embryonic gonad" qui s'exprime dans les gonades embryonnaires (Nauber *et al.*, 1988; Oro *et al.*, 1988; Rothe *et al.*, 1989) (fig 27). Ces récepteurs ne sont pour l'instant connus que chez la drosophile. Leur domaine de fixation à l'ADN a une identité de séquence de 47% avec celui de RAR α humain, ce qui suggère que ces récepteurs sont capables de se fixer sur l'ADN de façon similaire à celle des récepteurs classiques (Segraves, 1991). Le récepteur KNI se fixe sous forme de monomère, et il n'active pas la transcription (Hoch *et al.*, 1992). Il agit comme un répresseur empêchant l'activité transcriptionnelle de la protéine morphogénique bicoid, par compétition de fixation sur l'ADN au niveau de leurs éléments de réponse chevauchants. Par ailleurs, les trois membres du groupe Knirps possèdent une région conservée nommée boîte Kni, qui se situe après le domaine C. Cette boîte Kni est nécessaire pour la fixation à l'ADN de ces récepteurs monomériques (Gerwin *et al.*, 1994). Le récepteur Odr7, découvert chez le nématode, régule l'expression des molécules du signal olfactif (Sengupta *et al.*, 1994). Ces récepteurs ne possèdent pas le domaine de fixation du ligand, ce qui peut indiquer qu'ils ne sont pas régulés par un ligand, mais sans doute par un autre mécanisme comme la phosphorylation par exemple.

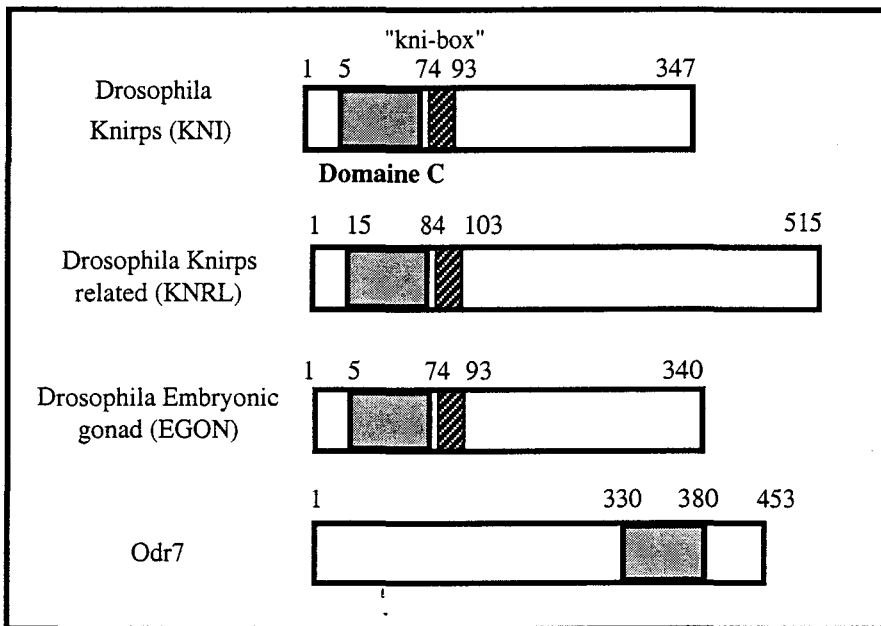


Figure 27 : Structure schématique des récepteurs Knirps et Odr7 ne possédant pas de domaine E mais uniquement le domaine C .

2-2- Les récepteurs DAX-1 et SHP

Le récepteur DAX-1 ne possède pas le domaine de fixation à l'ADN qui est pourtant la signature caractéristique des récepteurs nucléaires (Zanaria *et al.*, 1994; fig 28). Cependant, il possède le domaine de fixation du ligand avec une identité de séquence de 30% avec celui de RXR. A la place des domaines A/B, C et D, DAX-1 possède un domaine constitué de 4 régions riches en glycine et alanine qui lui permet de fixer l'ADN notamment sur le même élément de réponse que celui de RAR. En effet, par la technique de retard sur gel, on observe une fixation spécifique de DAX-1 sur un RARE, qui est déplacée lorsqu'une quantité croissante de RAR est ajoutée. Le récepteur DAX-1 en se fixant sur cet élément de réponse, réprime la transcription, c'est un inhibiteur de la voie de signalisation de RAR (Zanaria *et al.*, 1994). Le récepteur SHP, pour "short heterodimer partner", ne possède pas lui non plus de domaine C, et il est aussi un inhibiteur de la voie de signalisation de RAR (Seol *et al.*, 1996a). Les récepteurs DAX-1 et SHP découverts chez l'homme, sont très proches phylogénétiquement, et il paraît logique que chez la drosophile nous trouvions un homologue unique pour ces deux gènes (Laudet, 1997).

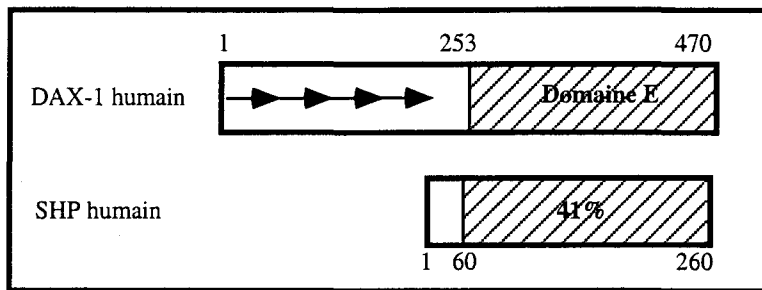


Figure 28 : Structure schématique des récepteurs Dax-1 et SHP ne possédant pas de domaine C, mais uniquement le domaine E, ayant 41% d'identité entre les deux protéines .

III- La phosphorylation, un mode de régulation des récepteurs

Etant donné que ces récepteurs orphelins n'ont pas de ligand pour moduler leur activité transcriptionnelle, comment sont-ils régulés? L'une des réponse est la régulation en fonction de leur état de phosphorylation. En effet, l'étude de la phosphorylation chez les récepteurs nucléaires indique que ce mécanisme régule l'activité transcriptionnelle indépendante du ligand, ainsi que la fixation à l'ADN et la dimérisation indépendante du ligand.

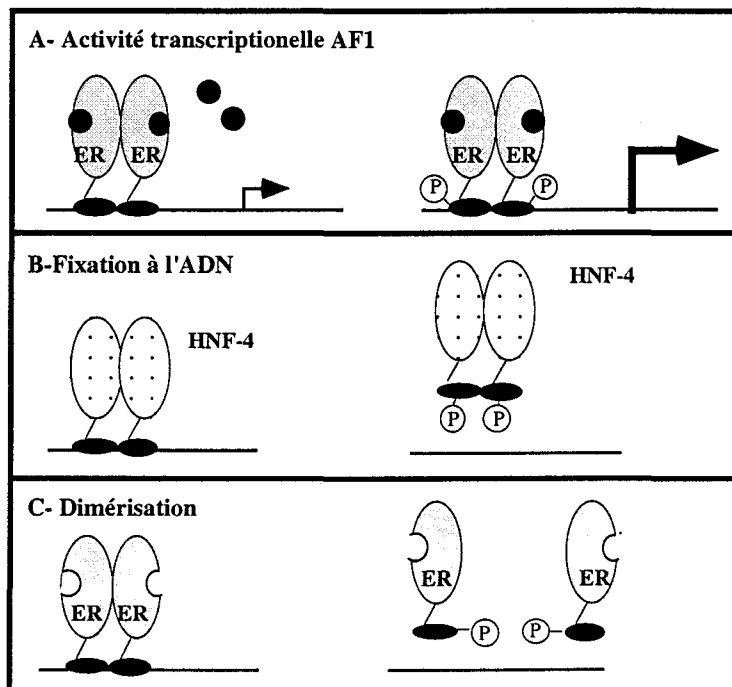


Figure 29 : Les différents effets que peut avoir la phosphorylation sur les récepteurs nucléaires. Elle peut moduler l'activité transcriptionnelle AF1 (A), la fixation à l'ADN (B) et la dimérisation indépendante du ligand (C).

3-1- Modulation de l'activité transcriptionnelle

La fonction d'activation transcriptionnelle indépendante du ligand (AF1), est phosphorylable notamment pour ER, RAR α , GR mais aussi PPAR γ (Ali *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1995; Rochette-Egly *et al.*, 1997; Adams *et al.*, 1997). L'état de phosphorylation de AF1 module l'activité transcriptionnelle du récepteur. En effet, lorsque la sérine 118 dans la région AF1 du récepteur aux oestrogènes est remplacée par une alanine, ER ne transactive presque plus (Ali *et al.*, 1993; fig 29 A). Les 5 acides aminés localisés autour de cette sérine sont Pro-Glu-Leu-Ser-Pro, ce qui correspond au site consensus de phosphorylation de la MAPK (pour "mitogen activated protein kinase") qui est P X_n (S ou T)P, ou x est un acide aminé basique ou neutre, n a une valeur de un ou deux (Kato *et al.*, 1995). Le mutant de ER sans domaine E est phosphorylé *in vitro* par la MAPK et lorsque la sérine 118 est mutée en alanine, il n'y a plus de phosphorylation. La MAPK fait partie de la voie de transduction Ras, et le mutant de ER sans domaine E transactive deux fois plus lorsque cette voie est activée. Par contre lorsque sa sérine 118 est mutée il ne transactive plus même lorsque cette voie de transduction est stimulée (Kato *et al.*, 1995). Par conséquent, la phosphorylation de la sérine 118 de ER par MAPK entraîne une activation transcriptionnelle (Kato *et al.*, 1995).

Alors que pour ER et RAR α la phosphorylation de AF1 entraîne une activation de la transcription, pour PPAR γ , cette phosphorylation inhibe son activité (Hu *et al.*, 1996; Adams *et al.*, 1997). Le récepteur PPAR γ est une protéine phosphorylable, et une série de délétion de sa partie N-terminale indique que la région phosphorylée est au niveau de la sérine 112 (Hu *et al.*, 1996). Cette sérine se trouve dans la séquence Pro-Ala-Ser-Pro qui est le site consensus de phosphorylation de MAPK (Hu *et al.*, 1996; Adams *et al.*, 1997). Lorsque cette sérine est mutée en alanine, l'activité transcriptionnelle de PPAR γ , indépendante du ligand, est trois fois plus importante (Adams *et al.*, 1997).

Par conséquent, la phosphorylation du domaine A/B peut moduler l'activité transcriptionnelle indépendante du ligand, positivement ou négativement, ceci sans modifier la fixation à l'ADN du récepteur.

L'étude de la phosphorylation du récepteur nucléaire orphelin SF1 indique qu'il est phosphorylable dans sa région AF1 par la voie des MAPK (Hammer *et al.*, 1999). Un

traitement à la phosphatase diminue presque totalement son activité transcriptionnelle. La phosphorylation s'effectue majoritairement sur une seule sérine, et la mutation de cette sérine diminue de plus de la moitié l'activité transcriptionnelle de SF1. L'activité transcriptionnelle de SF1 est dépendante du coactivateur GRIP. Lorsque SF1 est phosphorylé, son interaction directe avec GRIP augmente. La mutation de la sérine phosphorylable dans AF1 entraîne une interaction avec GRIP plus faible. L'activité transcriptionnelle indépendante du ligand est donc dépendante de la phosphorylation de AF1 qui module ainsi l'interaction avec les cofacteurs de la transcription.

3-2- Modulation de la fixation à l'ADN

Lorsque le récepteur HNF4 (pour "hepatocyte nuclear factor 4") est traité avec la protéine kinase AMP cyclique dépendante (PKA) sa capacité à fixer l'ADN est diminuée par un facteur 4 (Viollet *et al.*, 1997). Lorsque l'on recherche le site consensus de la PKA qui est RRx(S ou T), on le trouve notamment dans la boîte A, importante pour la fixation à l'ADN d'un autre récepteur orphelin, NGF1-B. Lorsque cette sérine est mutée, HNF4 n'est plus sensible à la PKA pour sa fixation à l'ADN. La phosphorylation de cette sérine située dans la boîte A, par la PKA, empêche HNF4 de fixer l'ADN (fig 29 B).

3-3- Modulation de la dimérisation

Le récepteur aux oestrogènes humain possède une sérine en position 236 phosphorylable par la PKA (Chen *et al.*, 1999). Cette sérine 236 se situe dans le domaine C, dans la boucle du deuxième "doigt de zinc". Alors qu'en présence de la PKA, le récepteur sauvage a une diminution de sa fixation à l'ADN, le récepteur ayant une alanine à la place de la sérine 236 n'a pas de variation de fixation sur l'ADN. Par contre, la mutation en acide glutamique inhibe la fixation sur l'ADN. Cependant, la sérine 236 ne se trouve pas dans les régions du domaine C, qui contactent directement l'ADN, mais plutôt dans des régions intervenant dans la dimérisation. L'état de dimérisation de ER a été testé par gel retard avec deux ER de tailles différentes : le récepteur entier, et ER sans domaine A/B, ER Δ A/B. Le récepteur ER fixe l'ADN sous forme d'homodimère, lorsque les deux types de récepteurs sont

mis ensemble, les homodimères obtenus sont : ER-ER, ER Δ A/B-ER Δ A/B, ER-ER Δ A/B. Lorsque ER Δ A/B est muté en 236 par un acide glutamique, seul l'homodimère ER-ER est visible, et lorsque inversement, ER a la même mutation, seul l'homodimère ER Δ A/B-ER Δ A/B est visible. La sérine 236 intervient donc dans la dimérisation. La phosphorylation de la sérine 236 par la PKA empêche donc la dimérisation de ER en absence de ligand qui ne peut plus alors se fixer sur son élément de réponse (Chen *et al.*, 1999; fig 29 C).

IV- Rôle biologique des récepteurs orphelins

4-1- Les récepteurs nucléaires ont des fonctions importantes

La recherche de gènes cibles et l'inhibition de la fonction de certains récepteurs orphelins par recombinaison homologue chez la souris indiquent qu'effectivement ces récepteurs ont un rôle biologique essentiel. Ces études ont notamment été réalisées pour les récepteurs HNF-4 et SF1. L'interruption du gène codant HNF4 (pour « hepatocyte nuclear factor 4 ») chez la souris entraîne une létalité embryonnaire avant E10.5 et donne un phénotype dans lequel la gastrulation est très fortement perturbée à cause du dysfonctionnement de la membrane vitelline (Chen *et al.*, 1994). En ce qui concerne l'inactivation du gène codant le récepteur orphelin SF1 (pour « steroidogenic factor 1 ») les souris meurent 8 jours après leur naissance (Luo *et al.*, 1995). En effet, ces souris ont une complète absence de glandes surrénales, lieu de synthèse des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes, de ce fait les animaux meurent à cause d'une production insuffisante de corticoïdes.

4-2- Intervention dans les voies de signalisation des récepteurs classiques.

De nombreux récepteurs orphelins interagissent avec les voies de signalisation des récepteurs qui forment des hétérodimères avec RXR. Parmi eux nous pouvons notamment citer le cas de NGF1B (Perlmann et Jansson, 1995). En effet, NGF1B est capable d'hétérodimériser avec RXR sur l'élément de réponse DR5, et en présence du ligand de RXR, l'acide rétinoïque 9-*cis*, induit la transcription. Le récepteur RXR peut aussi hétérodimériser avec RAR, mais ce dimère active la transcription lors de la fixation du ligand de RAR, et RXR se comporte comme

un partenaire silencieux (Schulmann *et al.*, 1997). Les récepteurs NGF1B et RAR sont en compétition pour l'interaction avec RXR. Si RXR en présence de son ligand interagit avec le récepteur orphelin NGF1B, il est capable d'activer la transcription. Si RXR interagit avec un récepteur ayant un ligand, comme RAR, l'activation de la transcription est induite par ce récepteur en présence de son ligand, et non pas par RXR.

Certains récepteurs orphelins peuvent aussi se fixer sur le même élément de réponse que celui du récepteur classique. C'est le cas de COUP-TF1 (pour "chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor") sur l'élément de réponse de RXR du promoteur de l'alpha-fétoprotéine qui est un DR1 (Liu et Chiu, 1994; fig 28). La fixation de RXR en présence de l'acide rétinoïque 9-*cis* sur un DR1 entraîne une activation de la transcription, alors que COUP-TF1 la réprime. Le récepteur RXR et le récepteur orphelin COUP-TF1 sont donc en compétition pour le même site.

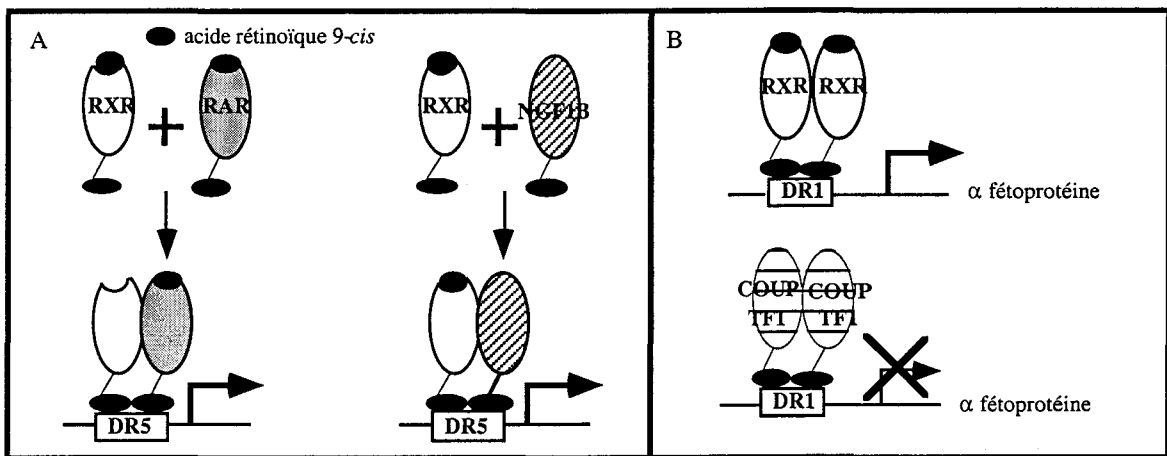


Figure 30 : Les récepteurs orphelins interviennent dans les voies de signalisation des récepteurs "classiques" (A) en interagissant avec leur partenaire RXR , et (B) en fixant les mêmes éléments de réponse.

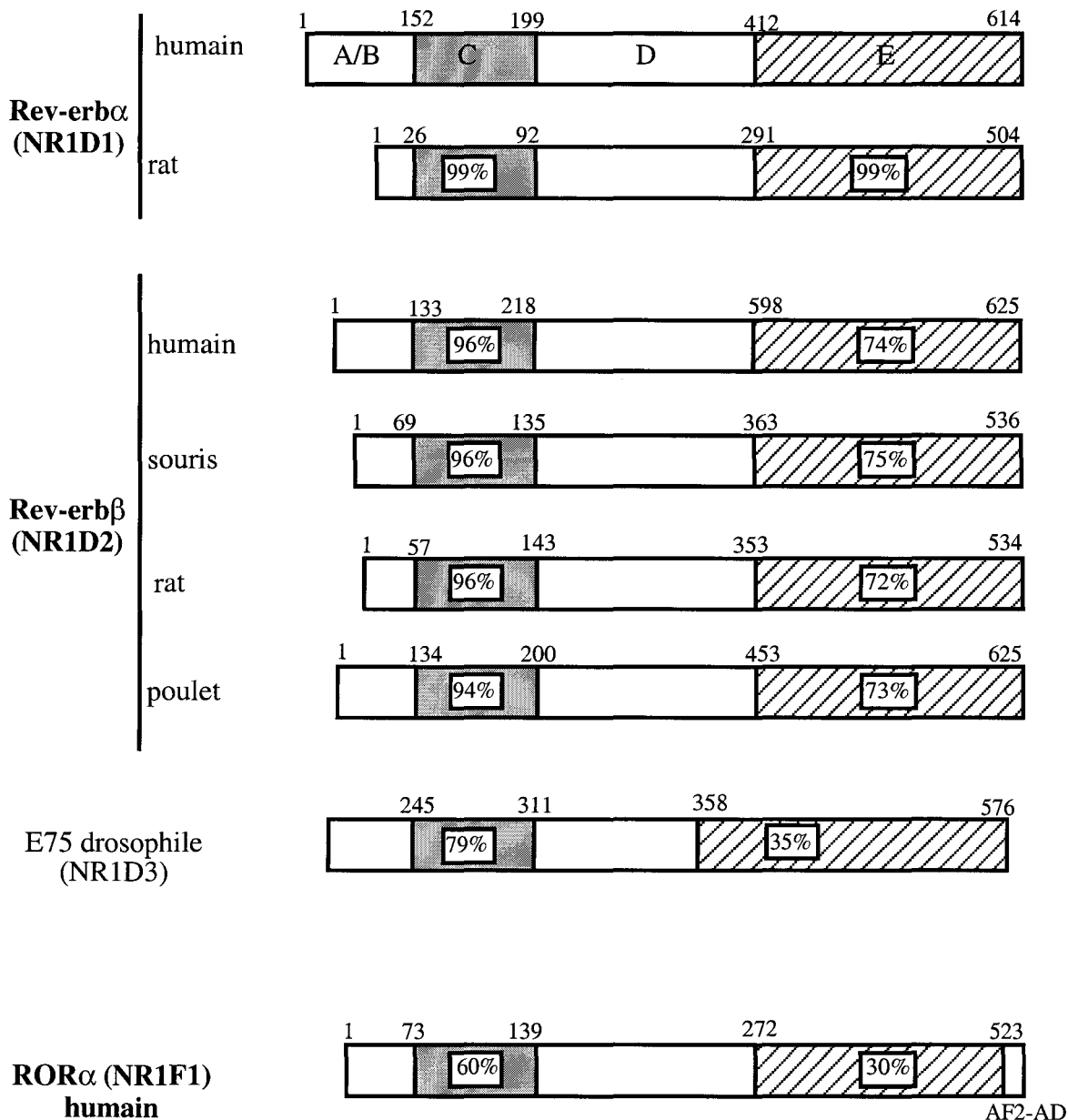


Figure 31 : Représentation des identités de séquences des domaines C et E entre les différents membres de la famille Rev-erb. Ce groupe est constitué de deux gènes Rev-erb α et Rev-erb β . Les gènes les plus proches des Rev-erb sont les gènes codant les récepteurs orphelins ROR. Ils sont au nombre de trois et nous n'avons représenté ici que ROR α afin de montrer les identités de séquences entre un des membres du groupe ROR et les Rev-erb.

C- LES RECEPTEURS REV-ERB ET PPAR

I- Les récepteurs orphelins Rev-erb α et Rev-erb β .

Les gènes du groupe *Rev-erb* sont actuellement au nombre de deux : *Rev-erb α* et *Rev-erb β* . Le gène *Rev-erb α* a été découvert chez le rat et l'homme, car chez ces espèces, il chevauche le gène *c-erbA* qui code le récepteur aux hormones thyroïdiennes TR α , d'où son nom *Rev-erb* pour " Reverse erbA " (Lazar *et al.*, 1989, Miyajima *et al.*, 1989, Laudet *et al.*, 1991). Ce chevauchement se fait sur 269 paires de base de la région exonique de ces deux gènes. Quelques années plus tard fut découvert le gène *Rev-erb β* chez l'homme, la souris, le rat et le poulet (Dumas *et al.*, 1994; Retnakaran *et al.*, 1994; Enmark *et al.*, 1994; Bonnelye *et al.*, 1994). Ces gènes codent des récepteurs orphelins qui ont une identité de séquence de 97% entre leurs domaines de liaison à l'ADN et de 68% entre leurs domaines de fixation du ligand (fig 31). Ces deux récepteurs ont un homologue chez la drosophile, codé par le gène *E75*, qui est inductible par l'ecdysone et intervient dans la métamorphose (Segraves et Hogness, 1990).

Le groupe des récepteurs nucléaires *ROR*, pour " RAR related orphan receptor ", composé de trois gènes, α , β et γ , est proche de *Rev-erb* (Giguère *et al.*, 1994; Carlberg *et al.*, 1994; Hirose *et al.*, 1994). Ces protéines ont, avec *Rev-erb α* , une identité de séquence de 60% pour le domaine C et de 30% pour le domaine E. Ils ont la caractéristique d'être eux aussi des récepteurs orphelins et de fixer le même élément de réponse que les *Rev-erb*.

1-1- Fixation à l'ADN

1-1-1- L'élément de réponse.

L'élément de réponse des protéines *Rev-erb α* et β , nommé *RevRE*, est constitué du motif AGGTCA précédé en 5' d'une région de 5 paires de bases riche en adénine et thymidine dont le consensus est (A/T)A(A/T)NT (Harding et Lazar, 1993; Dumas *et al.*, 1994; Retnakaran *et al.*, 1994; Enmark *et al.*, 1994; Bonnelye *et al.*, 1994). Les *Rev-erb* ont donc la particularité de pouvoir se fixer à l'ADN sous forme de monomère. Les *ROR* sont aussi capables de fixer le motif de reconnaissance AGGTCA sous forme de monomère, et ils ont besoin, comme *Rev-erb* d'une séquence en 5' du motif de reconnaissance riche en A-T (Giguère *et al.*, 1994; Giguère *et al.*, 1995).

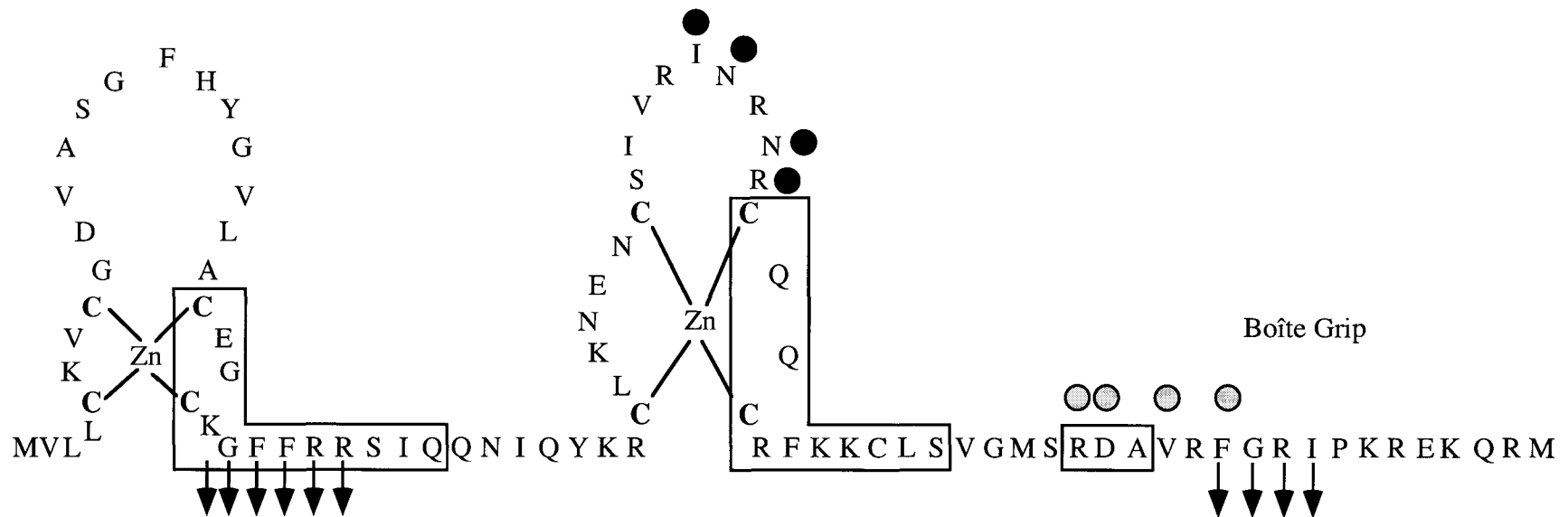


Figure 32 : Domaine de fixation à l'ADN de Rev-erb α humain. Les régions formant des hélices α sont encadrées. Les flèches indiquent les acides aminés qui sont en contact avec l'élément de réponse RevDR2, les ronds noirs indiquent les acides aminés impliqués dans la zone de dimérisation pour la molécule fixée en 5' du RevDR2 et les ronds gris montrent les acides aminés impliqués dans la zone de dimérisation pour la molécule fixée en 3' (d'après Zhao *et al.*, 1998).

Cependant Rev-erb α et β peuvent également se fixer à l'ADN sous forme d'homodimère sur un DR2, ayant la même extension en 5' que pour le RevRE (Harding et Lazar, 1995; Adelmant *et al.*, 1996). Cet élément de réponse particulier est appelé RevDR2.

1-1-2- Structure du domaine de fixation à l'ADN des récepteurs Rev-erb

La structure du domaine de fixation à l'ADN de Rev-erb α a été déterminée par cristallographie dans la configuration où Rev-erb α est fixé sur un RevDR2, en homodimère (Zhao *et al.*, 1998). Deux interfaces protéine-ADN distinctes sont apparentes : (i) l'une, connue pour tous les autres récepteurs, est entre le motif de reconnaissance AGGTCA, présent dans le grand sillon, et l'hélice α conservé du premier doigt de zinc, (ii) l'autre est entre la séquence en 5' riche en A/T présente dans le petit sillon et la boîte T/A en C-terminal du domaine de fixation à l'ADN. Cette seconde nouvelle interface serait due à l'interaction d'une région dans la boîte T/A nommée boîte GRIP, car elle est composée des acides aminés Gly-Arg-Iso-Pro (Zhao *et al.*, 1998). Cette boîte GRIP a une structure en forme de boucle qui interagit avec le petit sillon d'ADN (fig 32).

La zone de dimérisation au niveau du DBD de Rev-erb α se fait entre (i) la boucle juste avant la 3^{ème} cystéine du deuxième doigt de zinc pour la sous unité fixée en 5' de l'élément de réponse et (ii) l'extension en C-terminale juste avant la boîte Grip, pour la sous unité en 3' (Zhao *et al.*, 1998; fig 32).

En ce qui concerne Rev-erb β , le domaine de fixation à l'ADN en lui même n'est pas suffisant pour que la protéine se fixe sur l'ADN, il nécessite aussi l'extension en C-terminal qui est identique entre les Rev-erb (Terenzi *et al.*, 1998). De même, cette région intervient aussi dans la dimérisation de Rev-erb β . Nous pouvons donc nous attendre à ce que le mode de fixation à l'ADN de Rev-erb β soit identique à celui de Rev-erb α .

1-2- Activité transcriptionnelle de Rev-erb

1-2-1- Les Rev-erb sont des répresseurs de la transcription

Lorsque l'élément de réponse dimérique RevDR2 est cloné en amont du promoteur du gène rapporteur luciférase, on observe une répression de ce gène en présence de Rev-erb α ou β . Par conséquent Rev-erb α et β sont des répresseurs de la transcription (Harding et Lazar, 1995; Adelmant *et al.*, 1996). Le mutant de Rev-erb α qui ne possède pas les domaines D et E, ne réprime plus la transcription. Lorsque ces mêmes domaines D et E sont fusionnés au domaine de fixation à l'ADN de GAL4, et que leur activité est testée, avec le vecteur rapporteur luciférase contenant des éléments de réponse à GAL4 dans son promoteur, on observe une répression de la transcription. La fonction d'inhibition de Rev-erb α se trouve dans son extrémité C-terminale contenant les domaines D et E (Harding et Lazar, 1995; Adelmant *et al.*, 1996). La cartographie de ce domaine montre que la fonction de répression de Rev-erb α est constituée de 34 acides aminés dans le domaine E entre les acides aminés 455 et 488, et que celle de Rev-erb β se situe aussi dans le domaine E entre les acides aminés 416 et 449 (Downes *et al.*, 1996a, Burke *et al.*, 1996). La fonction de répression des Rev-erb se situe dans une région du domaine E extrêmement conservée entre les récepteurs nucléaires : le motif signature spécifique du LBD situé dans l'hélice H3, la boucle Ω , H4 et H5 (Wurtz *et al.*, 1996).

Il est clair que Rev-erb α est capable de réprimer la transcription sous forme d'homodimère sur un RevDR2. En ce qui concerne l'activité transcriptionnelle du monomère Rev-erb α deux travaux sont en oppositions : Harding et Lazar montrent que sur un RevRE, Rev-erb α ne réprime pas la transcription, alors que Adelmant et ses collaborateurs, en utilisant un RevDR2 muté sur le motif de reconnaissance en 3', montrent que Rev-erb α s'y fixe sous forme de monomère uniquement, et qu'il est capable de réprimer la transcription (Harding et Lazar, 1995; Adelmant *et al.*, 1996). Cependant, actuellement nous avons montré que les éléments de réponse naturels de Rev-erb α sont soit un site monomérique RevRE pour celui présent dans le promoteur de l'apolipoprotéine AI, soit un site dimérique RevDR2 pour celui présent dans le promoteur de Rev-erb α (Adelmant *et al.*, 1996; Vu Dac *et al.*, 1998). Nous pouvons donc dire que Rev-erb α réprime la transcription à la fois sous forme de monomère et d'homodimère.

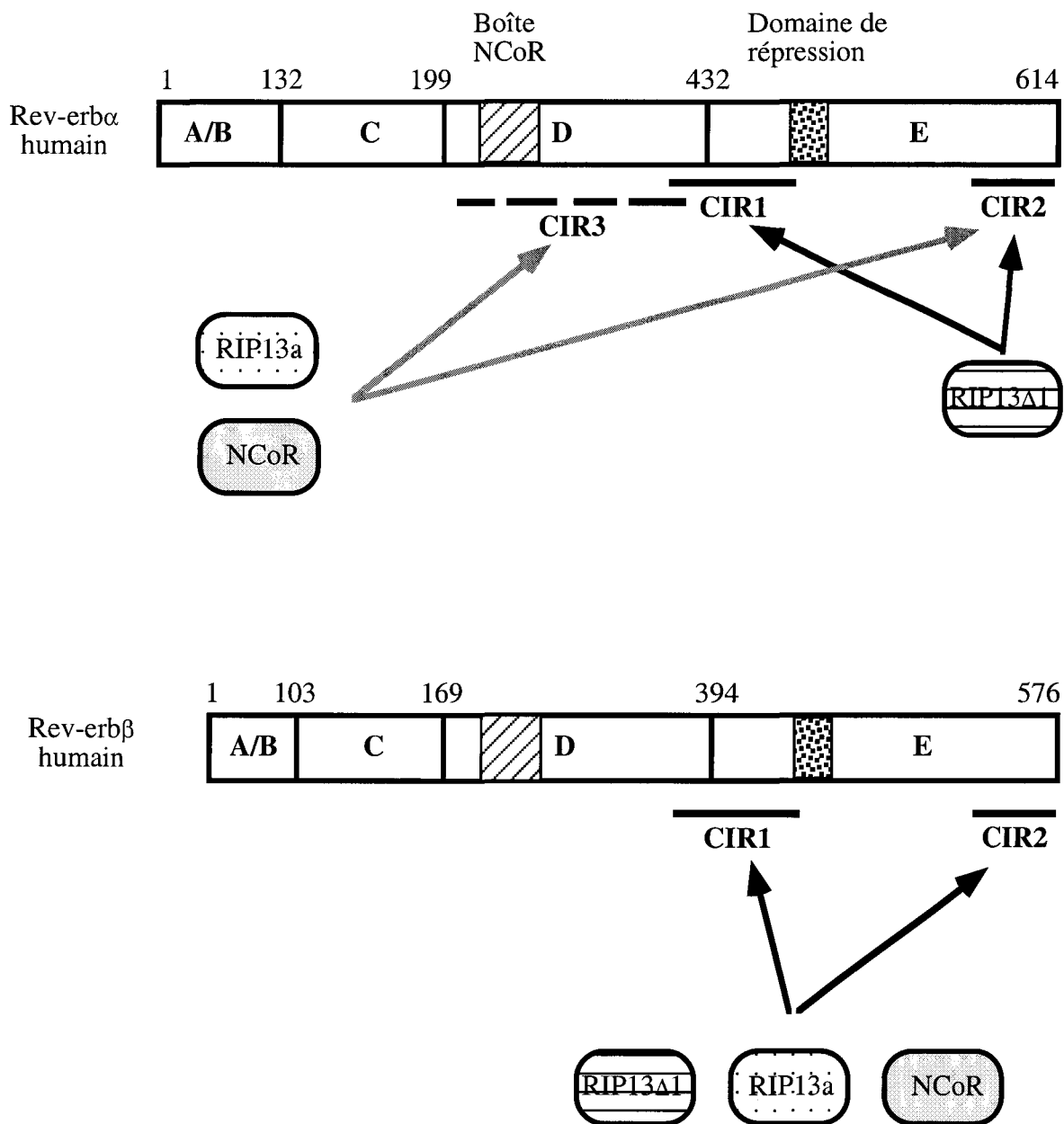


Figure 33 : Zone d'interaction des Rev-erb avec le corépresseur NCoR et ses isoformes RIP13a et RIP13 Δ 1. Les zones CIR1 et CIR2 de Rev-erb α sont nécessaires et suffisantes pour fixer RIP13 Δ 1, alors que NCoR et RIP13a ont besoin de CIR1 et CIR3. Les régions CIR1 et CIR2 de Rev-erb β sont nécessaires et suffisantes pour fixer NCoR et ses isoformes.

Rev-erb α et β ne possèdent pas la fonction d'activation de la transcription ligand dépendant AF2 dont le motif consensus est un acide glutamique encadré par deux paires de résidus hydrophobes (Danielian *et al.*, 1992). Nous pouvons émettre l'hypothèse que Rev-erb ne puisse pas fixer de coactivateur et que, de ce fait, il soit incapable d'activer la transcription, ce qui est en accord avec son rôle de répresseur.

1-2-2- Interaction avec les corépresseurs

Nous savons que TR et RAR sont des répresseurs de la transcription lorsqu'ils fixent le complexe corépresseur en absence de ligand. Etant donné que les Rev-erb sont des répresseurs, leur interaction avec les corépresseurs NCoR et SMRT a été testée (Downes *et al.*, 1996b; Zamir *et al.*, 1996; Zamir *et al.*, 1997a).

- NCoR

L'activité répressive de Rev-erb α est augmentée lorsque l'on rajoute des quantités croissantes de NCoR (Zamir *et al.*, 1996). NCoR intervient donc dans l'activité répressive de Rev-erb. Ce corépresseur possède 2 domaines d'interaction avec les récepteurs nucléaires, RIDI et RIDII, et les Rev-erb ne fixent que la région comprenant à la fois RIDI et RIDII (Downes *et al.*, 1996a; 1996b; Wong et Privalsky, 1998b).

Pour TR et RAR, il y a deux régions permettant l'interaction avec les corépresseurs : la boîte CoR du domaine D, et l'hélice H11 du domaine E. La mutation ou délétion de cette boîte CoR ne modifie en rien l'interaction de Rev-erb α avec NCoR, elle ne semble donc pas nécessaire pour les récepteurs Rev-erb.

La cartographie des régions fixant NCoR et ses deux isoformes RIP13a et RIP13 Δ 1 (pour "RXR interacting proteins") déterminée par le technique de corétention protéique, a permis d'identifier trois domaines : CIR1 qui est localisé au début du domaine E, CIR2 qui correspond aux 10 derniers acides aminés de la protéine, et CIR3 qui est localisé dans le domaine D (Seol *et al.*, 1996b; Downes *et al.*, 1996b; Zamir *et al.*, 1997a; Burke *et al.*, 1998; fig 33).

En ce qui concerne Rev-erb β , quelque soit l'isoforme de NCoR, les domaines CIR1 et CIR2 sont nécessaires pour l'interaction (Burke *et al.*, 1998). Pour Rev-erb α , CIR1 et CIR2

sont nécessaires pour fixer l'isoforme RIP13 Δ 1, tandis que CIR2 et CIR3 permettent l'interaction avec NCoR et son isoforme RIP13a (Zamir *et al.*, 1997a; Burke *et al.*, 1998; fig 33).

Cependant, la mutation dans CIR1, qui empêche l'interaction de Rev-erb α avec RIP13 Δ 1, empêche aussi la fixation de Rev-erb α avec NCoR/RIP13a. La région CIR3 n'est pas clairement définie, et il se peut que dans la structure tridimensionnelle, CIR1 et CIR2 soient proches et que la présence de CIR3 permette un meilleur maintien de cette structure.

- SMRT

La technique de corétention protéique montre que, non seulement Rev-erb α peut fixer NCoR, mais aussi SMRT (Zamir *et al.*, 1997a). Bien que Rev-erb α puisse fixer SMRT, des quantités croissantes de SMRT n'augmentent pas l'activité répressive de Rev-erb α , et de plus, en gel retard, aucune bande supplémentaire n'apparaît en présence de SMRT, suggérant qu'il n'y a pas d'interaction de SMRT avec Rev-erb α sur l'ADN (Zamir *et al.*, 1997a). Le corépresseur SMRT n'est donc pas nécessaire pour l'activité répressive de Rev-erb α .

- SUN-coR

Afin d'identifier d'autres protéines intervenant dans l'activité répressive des Rev-erb, un criblage de banque d'embryon de souris dans le système double hybride de levure a été réalisé avec, comme sonde, la région C-terminale de Rev-erb α (Zamir *et al.*, 1997b). Cette approche a permis de cloner SUN-coR pour "small unique nuclear hormone receptor corepressor". Cette protéine ne montre pas d'identité de séquence avec NCoR/SMRT. Alors que NCoR/SMRT sont des protéines de grandes tailles, 270 et 168 kDa respectivement, SUN-coR est une toute petite protéine de 16 kDa. Elle a, en commun avec les autres corépresseurs, d'avoir une localisation nucléaire et de réprimer la transcription lorsqu'elle est fusionnée à un domaine de fixation à l'ADN hétérologue. La répression transcriptionnelle induite par Rev-erb α est augmentée en présence de quantité croissante de SUN-coR, et SUN-coR est aussi capable d'interagir avec NCoR. En conclusion, NCoR et SUN-coR font tous les deux partie du complexe répresseur qui permet l'activité répressive de Rev-erb α .

1-3- Rôle biologique des Rev-erb

Peu de choses sont connues sur le rôle biologique des Rev-erb. L'étude de leur rôle est basée sur la variation de l'expression de leurs gènes, mais la cause directe de ces variations n'est pas connue, ni l'activité biologique des Rev-erb.

1-3-1- La régulation de l'expression des gènes *Rev-erb*

Le gène *Rev-erba* est fortement exprimé dans la graisse brune et dans le tissu adipeux blanc (Lazar *et al.*, 1989). Dans les cellules préadipocytaires 3T3L1, l'ARNm de *Rev-erba* est très faible, mais lorsque la différenciation des 3T3L1 en adipocyte est induite, le taux de *Rev-erba* est augmenté de 10 fois, et sa vitesse d'induction est similaire à celle de C/EBP α , un important régulateur transcriptionnel des adipocytes (Chawla et Lazar, 1993). Le rôle de cette induction n'est toujours pas connu.

L'expression du gène de *Rev-erba* dans le foie de rat, prélevé à différentes heures de la journée, montre une variation rythmique avec un pic d'expression à 13h30 (Balsalobre *et al.*, 1998). Il a récemment été montré que le rythme circadien, cycle jour-nuit, pouvait être recréé *in vitro* par un choc de sérum (Balsalobre *et al.*, 1998). Dans ces conditions, dans les fibroblastes Rat-1, l'expression du gène *Rev-erba* oscille avec une période d'environ 22,5 heures. Cette expression rythmique est observée pendant 3 cycles consécutifs, et n'est pas spécifique des fibroblastes Rat-1 puisqu'elle a aussi été observée dans les cellules d'hépatome de rat H35. Chez la drosophile, l'expression des gènes *Period*, *Per* et *Timless*, *Tim*, suit un rythme circadien en condition constante : elle est induite par la lumière et réprimée par les protéines PER et TIM. Cette boucle d'autorégulation de *Per* et *Tim* est maintenant considérée comme le mécanisme moléculaire permettant d'engendrer le rythme circadien. Chez les mammifères, *Rev-erba* pourrait être un relais transcriptionnel de l'oscillateur centrale constitué par la boucle d'auto régulation négative du gène *Period*.

En ce qui concerne *Rev-erbb*, son expression a été étudiée dans notre groupe par hybridation *in situ* au cours du développement embryonnaire de poulet (Bonnelye *et al.*, 1994). Le gène *Rev-erbb* est fortement exprimé dans le système nerveux embryonnaire, notamment dans les ventricules cérébraux. Son expression semble persister, quoique faiblement, après la

naissance (Enmark *et al.*, 1994; Retnakaran *et al.*, 1994; Dumas *et al.*, 1994; Bonnelye *et al.*, 1994). Le plus étonnant est l'expression dans la notochorde à 24 heures et dans la plaque basale du tube neural à E4, E6 et E7. Ces deux structures sont essentielles pour la mise en place des neurones, ce qui pourrait suggérer un rôle de Rev-erb β dans le guidage des axones ou la différenciation nerveuse (Bonnelye *et al.*, 1994).

1-3-2- Rôle dans la différenciation musculaire

Rev-erba et *Rev-erb β* sont aussi fortement exprimés dans le muscle squelettique adulte et embryonnaire (Lazar *et al.*, 1989; Enmark *et al.*, 1994; Retnakaran *et al.*, 1994; Dumas *et al.*, 1994; Bonnelye *et al.*, 1994). De plus Rev-erba et β sont capables d'inhiber la différenciation musculaire (Downes *et al.*, 1995; Burke *et al.*, 1996). Le taux d'ARNm des *Rev-erb* est élevé dans les myoblastes et il est très faible dans les cellules différenciées en myotubes, et la surexpression de *Rev-erba* ou *Rev-erb β* dans des cellules myoblastiques C2C12 empêche les cellules de se différencier. La surexpression de *Rev-erb* sans domaine E, c'est-à-dire sans la région portant la fonction de répression, ne bloque pas la myogénèse. Par conséquent le rôle des Rev-erb dans cette inhibition de la différenciation musculaire passe par sa fonction de répresseur transcriptionnel (Downes *et al.*, 1995; Burke *et al.*, 1996). De plus, dans les cellules C2C12 myoblastiques, la surexpression de *Rev-erba* ou *Rev-erb β* réduit le taux d'ARNm de *myoD*, essentiel pour la régulation de la myogénèse, ce qui suggère que les Rev-erb répriment son expression en contrôlant ainsi la différenciation musculaire.

1-3-3- Action antagoniste de Rev-erb et ROR

Les récepteurs Rev-erb sont des répresseurs de la transcription, alors que les ROR sont des activateurs. Or Rev-erb et ROR sont capables de fixer le même élément de réponse monomérique RevRE. Ainsi ROR α en se fixant sur un RevRE active la transcription, et cette activation diminue en présence de quantité croissante de Rev-erba ou Rev-erb β (Forman *et al.*, 1994). Les Rev-erb et ROR α ont donc des effets antagonistes et sont en compétition pour la fixation d'un RevRE monomérique. C'est en effet ce mécanisme qui peut expliquer la régulation transcriptionnelle du proto-oncogène *N-myc* par ROR α et Rev-erb β (Dussault et

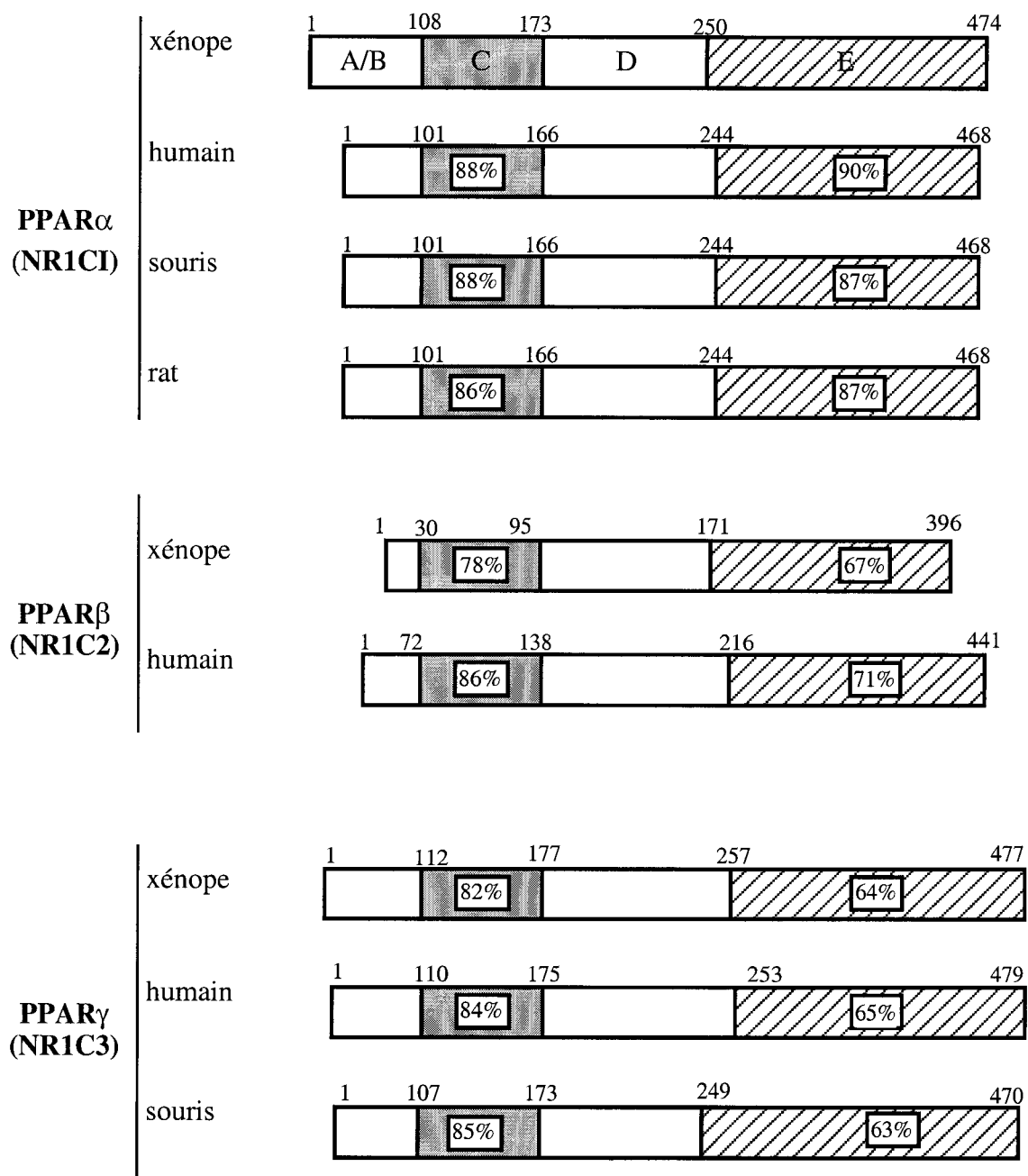


Figure 34 : Représentation des identités de séquence des domaines C et E entre les différents membres de la famille PPAR. Ce groupe est constitué de trois gènes PPAR α , PPAR β et PPAR γ (NR1C1, NR1C2, NR1C3 respectivement dans la nouvelle nomenclature).

Giguère, 1997). Dans le premier intron du gène *N-myc* se trouve un site consensus RevRE monomérique sur lequel sont capables de se fixer spécifiquement ces deux récepteurs orphelins. Le récepteur Rev-erb β réprime *N-myc* alors que ROR α l'active. L'effet proliférateur de *N-myc* est à l'origine de la formation de foyers cancéreux qui traduit l'activation de l'expression de son gène. Des tests de transformation cellulaire dans des cellules de carcinomes embryonnaires P19 indiquent que la surexpression de ROR α entraîne la formation de deux fois plus de foyers de cellules transformées, alors que la surexpression de Rev-erb β n'entraîne pas la formation de foyers cancéreux supplémentaires. Ces effets transcriptionnels passent par le RevRE identifié car sa mutation provoque une augmentation de trois fois du nombre de foyers cancéreux. Cette régulation antagoniste de Rev-erb β et ROR α est sans doute importante pour la régulation des effets proliférateurs de *N-myc*.

II- Les récepteurs activés par les proliférateurs de péroxysome : PPAR

2-1- La famille des PPAR

Les récepteurs PPAR ont ainsi été nommés à cause de leur capacité à être activés par les fibrates, des composants qui ont pour point commun d'induire la prolifération des péroxysomes dans le foie des rongeurs (revue de Desvergne et Wahli, 1995). Les péroxysomes sont des organites intracellulaires, dépourvus de DNA et riches en enzymes, dans lesquels se déroule notamment l'oxydation des acides gras. La prolifération des péroxysomes dans le foie des rongeurs peut être induite par des drogues hypolipémiantes ou des hépatocarcinogènes qui ont pour effet, non seulement d'augmenter les péroxysomes, mais aussi de diminuer la concentration plasmatique des triglycérides et du cholestérol. La famille de récepteurs PPAR est constituée de trois gènes, α , β et γ , découverts chez le xénope, la souris, le rat et l'homme (Isseman et Green, 1990; Dreyer *et al.*, 1992; Göttlicher *et al.*, 1992; Schmidt *et al.*, 1992; Kliewer *et al.*, 1994; Sher *et al.*, 1993; fig 34). Ils sont tous plus ou moins activables par les acides gras et les proliférateurs de péroxysome. Cependant, ils n'ont pas les mêmes ligands ni le même patron d'expression (Braissant *et al.*, 1996).

2-2- Fixation à l'ADN et activité transcriptionnelle

L'élément de réponse de PPAR, PPRE, a été découvert dans le promoteur de l'acyl CoA oxidase, et il est composé du motif de reconnaissance AGG(A/T)CA organisé en DR1 (Kliewer *et al.*, 1992; Tugwood *et al.*, 1992). Le promoteur de l'acyl CoA oxidase est inductible par PPAR en présence de l'acide clofibrique, un proliférateur de péroxysome, mais aussi par RXR en présence de l'acide rétinoïque 9-*cis*. L'action combinée de PPAR et RXR active 4 fois plus que chaque récepteur pris indépendamment. Afin de savoir si PPAR fixe le DR1 en homodimère ou en hétérodimère avec RXR, des gels retard et des coimmunoprécipitations ont été réalisés (Kliewer *et al.*, 1992; Gearing *et al.*, 1993; Isseman *et al.*, 1993; Krey *et al.*, 1993). Ces travaux ont montré que seul l'hétérodimère PPAR-RXR, par opposition aux homodimères PPAR-PPAR et RXR-RXR, est capable de se fixer sur un PPRE.

Cet élément de réponse DR1 cloné en amont du gène rapporteur chloramphénicol acetyl transférase, permet une activation de la transcription en présence de PPAR-RXR et de l'acide clofibrique (Isseman *et al.*, 1993). Cette activation transcriptionnelle requiert le coactivateur SRC1 qui se fixe directement sur le domaine E de PPAR (Nolte *et al.*, 1998; fig 18). Le test CARLA, présenté dans les méthodes de recherche de ligands page 49, est justement basé sur cette interaction spécifique induite par le ligand (Krey *et al.*, 1997).

2-3- Les ligands

Les récepteurs PPAR étaient au début classés parmi les récepteurs orphelins. En effet, on ne leur connaissait que des activateurs, c'est-à-dire des molécules capables d'activer la transcription *via* les PPAR. Un ligand par contre, doit pouvoir se fixer directement sur son récepteur, et cette fixation est saturable et réversible.

L'un des premiers activateurs des PPAR découvert fut l'acide clofibrique, puis à cette activateur synthétique se sont ajoutés des activateurs naturels tels que l'acide arachidonique et l'acide linoléique (Isseman et Green, 1990; Göttlicher *et al.*, 1992). Chez les rongeurs, ces molécules ont pour effet d'augmenter le poids du foie par hypertrophie et hyperplasie des hépatocytes, et aussi d'augmenter le nombre de péroxysomes. La recherche de ligands des

PPAR s'est orientée vers les métabolites des acides gras et notamment les dérivés de l'acide arachidonique.

Le premier ligand découvert de PPAR γ est la molécule synthétique thiazolidinedione BRL49653, qui a une constante de dissociation de 43 nM (Lehmann *et al.*, 1995). Les thiazolidinediones sont connus pour leur effet adipogénique sur les préadipocytes. Lorsque des cellules pluripotentes C3H10T1/2 sont traitées au BRL49653 à 10^{-7} M, elles se différencient en adipocytes, et le niveau d'expression de l'ARN de PPAR γ est augmenté de 36 fois en réponse à ce traitement (Lehmann *et al.*, 1995). Le BRL49653 est un ligand synthétique de PPAR γ . La recherche de ligand naturel de PPAR γ a conduit plusieurs équipes vers les dérivés de la prostaglandine D2, PGD2 (Kliewer *et al.*, 1995; Forman *et al.*, 1995b). En effet la prostaglandine D2 est capable d'activer transcriptionnellement PPAR α et γ mais pas PPAR β . L'analyse, en fonction de la dose, de la réponse de l'activité des chimères du LBD de PPAR α ou γ fusionné au DBD de GAL4 n'atteint pas de plateau pour des concentrations de PGD2 de 10^{-5} M. La PGD2 est un activateur, et non pas un ligand de PPAR α et γ . Les métabolites de PGD2 ont été testés pour leur capacité à déplacer la fixation du ligand synthétique BRL49653 sur PPAR γ . Seule la 15 deoxy-D^{12,14}-prostaglandine J2 est efficace. Un traitement des cellules fibroblastiques murines C3H10T1/2 avec cette molécule entraîne une différenciation adipocytaire. Le 15 deoxy-D^{12,14}-prostaglandine J2 et le BRL49653 sont donc des ligands de PPAR γ (fig 35).

Parmi les fibrates, le Wy-14,643 est le plus efficace des activateurs de PPAR α (Kliewer *et al.*, 1994). Etant donné que les acides gras comme l'acide arachidonique sont des activateurs de PPAR α , des ligands naturels ont été recherchés parmi leurs dérivés. Parmi ces molécules, le leucotriène B4, est capable d'activer la transcription uniquement pour PPAR α et ceci de façon dose-dépendante (Devchand *et al.*, 1996). L'étude de l'affinité par la représentation de Scatchard indique une constante de dissociation de 90nM, par conséquent, le leucotriène B4 est un ligand naturel de PPAR α (fig 35).

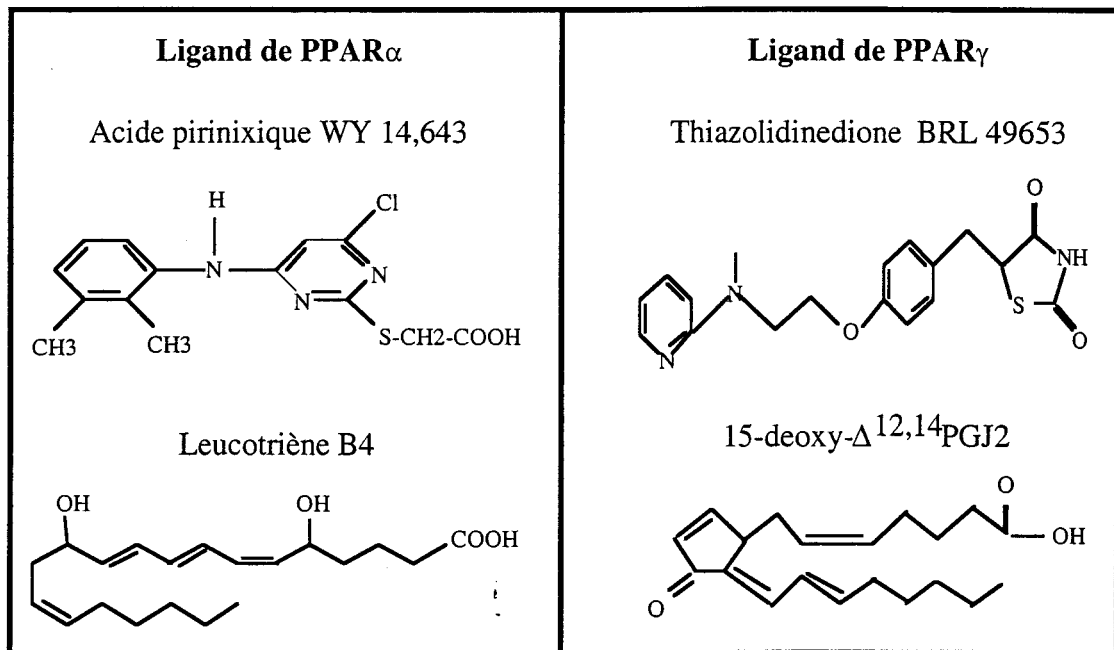


Figure 35 : Représentation des ligands de PPAR α et PPAR γ synthétiques (WY 14,643 et BRL 49653) et naturels (leucotriène B4 et 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandine J2)

2-4- Rôles biologiques de PPAR α

2-4-1- Effet de l'inactivation du gène *PPAR α*

Le gène PPAR α a été inactivé par recombinaison homologue chez la souris (Lee *et al.*, 1995). Les souris PPAR α $-/-$ sont viables, fertiles et ne montrent aucune anomalie phénotypique majeure. Cependant, elles ne sont plus sensibles aux effets ni de l'acide clofibrrique ni du Wy14,643 dans le foie : elles ne développent pas d'hépatomégalie et n'augmentent pas leur nombre de péroxysomes contrairement au souris $+/+$. Par conséquent PPAR α est l'isoforme majeure responsable de l'effet des proliférateurs de péroxysomes qui est spécifique aux rongeurs.

2-4-2- Rôle de PPAR α dans le métabolisme lipidique

Les lipides (acide gras, triglycérides, phospholipides, cholestérol et esters de cholestérols) sont des composés essentiels pour l'organisme, impliqués dans la constitution des membranes, la synthèse des hormones stéroïdiennes et de la bile, mais aussi servent de source et de réserve d'énergie. Les lipides sont des composés très peu solubles dans l'eau, ne pouvant être acheminés dans le plasma sous forme libre. Ils n'existent qu'associés à des particules

lipoprotéiques nommées lipoprotéines. Les lipoprotéines constituent dans le plasma un système dynamique assurant le transport des lipides depuis leur lieu de sécrétion intestinale ou hépatique jusqu'aux tissus où ils seront utilisés. Parmi les lipoprotéines, la lipoprotéine de haute densité, HDL, a la capacité d'effectuer un transport particulier du cholestérol : le transport inverse. Au cours de ce transport inverse, le cholestérol excédentaire des tissus périphériques est capté par les HDL, et ramené au foie où il sera dégradé. Les HDL peuvent être distinguées selon leur composition en apolipoprotéines, en particulier selon leur composition en apo AI et apo AII, les apolipoprotéines majeures des HDL.

Plusieurs éléments de réponse de PPAR, PPRE, fonctionnels ont été identifiés dans les promoteurs des gènes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines : l'apolipoprotéine AI humaine, l'apolipoprotéine AII humaine et la lipoprotéine lipase de rat (Vu-Dac *et al.*, 1994; Vu-Dac *et al.*, 1995, Schoojans *et al.*, 1996). Mais la preuve de l'évidence du rôle de PPAR α dans le métabolisme des lipoprotéines vient principalement de l'étude des souris déficientes en ce récepteur (Peters *et al.*, 1997). Dans ces souris PPAR α $-/-$, la concentration plasmatique des HDL est deux fois supérieure par rapport à celle des souris normales, alors que leur composition est identique. Il semblerait que cette augmentation des HDL soit due à une augmentation des HDL contenant l'apo AI. En effet, dans le foie, alors que le taux d'ARNm de l'apo AII est identique entre les souris $+/+$ et $-/-$, celui de l'apo AI est plus élevé dans les souris $-/-$. Lorsque l'on traite avec des fibrates, le taux d'ARNm de l'apo AI diminue et celui de l'apo AII augmente dans le foie des souris contrôles. Chez les souris $-/-$, il n'y a aucune variation des taux d'ARNm de ces deux apolipoprotéines. Par ailleurs, après un traitement aux fibrates, le taux des triglycérides et l'ARNm hépatique de l'apo CIII, facteur clef du métabolisme des triglycérides, diminue dans les souris $+/+$, alors que dans les souris $-/-$ il n'y a pas de variation (Peters *et al.*, 1997). Enfin, dans les souris $-/-$, certaines enzymes du métabolisme des acides gras ont une activité inférieure de 50% à celui des souris $+/+$ (Aoyama *et al.*, 1998). Leurs ARNm sont aussi fortement diminués dans les souris $-/-$, et ils n'augmentent pas après traitement aux fibrates. Cette régulation négative est sélective puisqu'elle ne concerne que certaines enzymes du métabolisme des acides gras : VLCAD (pour "very long chain acyl-CoA dehydrogenase"), LCAD (pour "long chain acyl-CoA dehydrogenase"), LACS (pour

“ long chain acyl-CoA synthetase ”) et T1 (pour “ short chain-specific3-ketoacyl-CoA thiolase ”). En conclusion, PPAR α module le métabolisme lipidique en étant l’intermédiaire des effets des fibrates sur les apolipoprotéines, et le métabolisme des HDL et des triglycérides, et il intervient aussi dans la synthèse de certaines enzymes du métabolisme des acides gras (fig 36).

		Transport		Métabolisme			
		ARNm apoAI	ARNm apoCIII	ARNm VLCAD	ARNm LCAD	ARNm LACS	ARNm T1
traitement aux fibrates	souris PPAR α +/+	↘	↘	↗	↗	↗	↗
	souris PPAR α -/-	=	=	=	=	=	=

Figure 36 : Effet des fibrates sur des gènes du métabolisme lipidique, dans des souris sauvages (+/+) ou des souris dont le gène de PPAR α a été interrompu (-/-).

2-5- Rôle biologique de PPAR γ

2-5-1- La différenciation adipocytaire

Les cellules adipocytaires sont caractérisées par le fait qu’elles expriment la protéine adipocyte P2 (aP2) qui fixe les lipides (Tontonoz *et al.*, 1994b). La recherche de facteurs capables d’induire cette protéine spécifiquement dans les adipocytes a conduit à l’identification de PPAR γ (Tontonoz *et al.*, 1994b; 1994a). En effet, PPAR γ_2 , une isoforme de PPAR γ , s’exprime uniquement dans la graisse blanche et brune, comme la protéine aP2, et, lors de la différenciation adipocytaire des cellules préadipocyte 3T3-L1, l’expression de PPAR γ_2 précède celle aP2. L’hétérodimère PPAR γ_2 -RXR α est capable de fixer le promoteur du gène codant aP2, et d’induire sa transcription. Le récepteur PPAR γ_2 est donc un facteur de transcription spécifique des adipocytes.

Etant donné que PPAR γ_2 est spécifiquement exprimé dans le tissu adipeux, et qu’il est induit précocement lors de la différenciation adipocytaire, cela suggère un rôle de ce récepteur dans les adipocytes. Afin de répondre à cette question, PPAR γ_2 a été surexprimé stablement, à l’aide de vecteurs rétroviraux, dans des fibroblastes NIH-3T3 (Tontonoz *et al.*, 1994c). La surexpression de PPAR γ_2 en présence de son ligand ETYA stimule la différenciation des fibroblastes en préadipocyte. Cette activité adipogénique est dépendante de

l'intégrité de son domaine de fixation à l'ADN, ce qui suggère sa fonction dans l'activation de gènes critiques pour la différenciation adipocytaire (Tontonoz *et al.*, 1994c).

Un peu de la même façon, l'équipe de Reed Graves a montré le rôle de PPAR γ dans les adipocytes bruns. La protéine UCP1 (pour "uncoupling protein") est exprimée exclusivement dans les adipocytes bruns, et elle est responsable de la spécificité thermogénique de ces cellules. Le récepteur PPAR γ , qui s'exprime dans le tissu adipeux brun, est capable d'induire la transcription du gène codant UCP1, et de se fixer sur son promoteur sous forme d'hétérodimère avec RXR α (Sears *et al.*, 1996; Tai *et al.*, 1996). Dans la lignée cellulaire de préadipocyte brun, HIB-1B, un traitement au BRL4953, le ligand de PPAR γ , induit la différenciation des adipocytes bruns, et régule l'un des gènes fondamentaux de la thermogénèse, UCP1.

Dans les liposarcomes humain, PPAR γ est aussi fortement exprimé (Tontonoz *et al.*, 1997). *In vitro*, les cellules de liposarcomes se différencient lorsqu'elles sont traitées avec le ligand de PPAR γ , le thiazolidinedione, et le ligand de RXR α (Tontonoz *et al.*, 1997). Ce qui signifie que, *in vitro*, les ligands de PPAR γ et RXR α sont capables de sortir les cellules de liposarcomes du cycle cellulaire, et de les orienter vers une différenciation adipocytaire terminale (fig 37).

Chez trois patients atteints de liposarcome avancé, un traitement au troglitazone, un ligand de PPAR γ de la classe des thiazolidinediones, a été réalisé pendant 6 semaines (Demetri *et al.*, 1999). Ce traitement entraîne un changement histologique avec une accumulation de lipide intracellulaire. Par ailleurs, on observe une augmentation de l'expression des gènes liés à une différenciation terminale adipocytaire : PPAR γ , la protéine adipocyte P2 et adiponectine. De plus, le pourcentage de cellules exprimant un marqueur de prolifération diminue, et le taux de triglycéride augmente fortement. Il semblerait donc que, *in vivo*, un traitement au troglitazone, un ligand de PPAR γ , permette aux cellules cancéreuses des liposarcomes de quitter le cycle de prolifération cellulaire afin de se différencier en adipocytes. Le ligand de PPAR γ est en bonne voie pour être utilisé comme thérapie de différenciation dans les cas de liposarcomes. Cependant, cette étude *in vivo* n'a été réalisée que pour trois patients, et elle nécessite donc des tests cliniques plus étendus (fig 37).

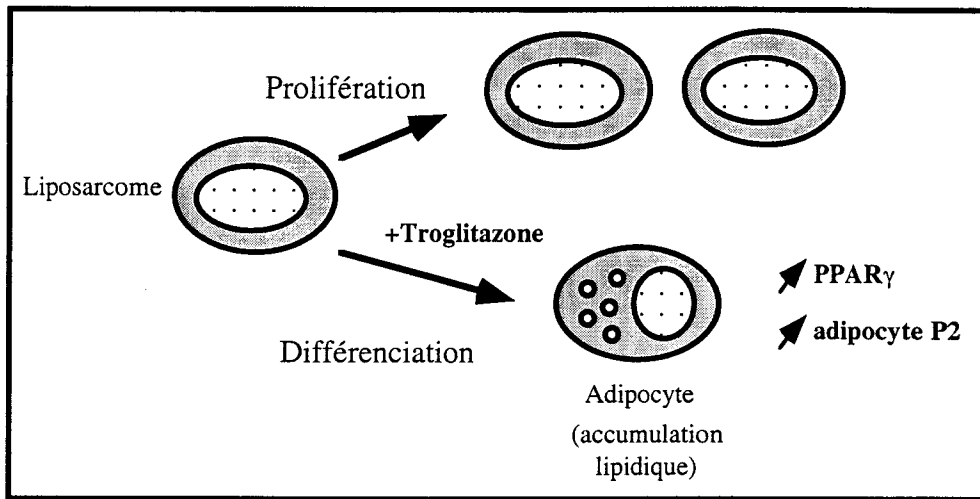


Figure 37 : Rôle de PPAR γ dans la différenciation adipocytaire des cellules cancéreuses de liposarcomes.

2-5-2- Le cancer du colon

Le gène codant PPAR γ s'exprime non seulement dans le tissu adipeux et les liposarcomes humain mais aussi dans le colon et le cancer du colon humain et murin ainsi que le cancer du sein humain (Tontonoz *et al.*, 1997; Demetri *et al.*, 1999; Sarraf *et al.*, 1998; Lefebvre *et al.*, 1998; Saez *et al.*, 1998; Mueller *et al.*, 1998). En ce qui concerne le cancer du colon, il semblerait que PPAR γ ait des effets opposés en fonction des espèces étudiées, l'homme et la souris. Chez l'homme, l'activation de PPAR γ par son ligand, dans des cellules du cancer du colon, entraîne une diminution de la prolifération cellulaire et une différenciation cellulaire (Sarraf *et al.*, 1998). Chez la souris hétérozygote pour le gène suppresseur de tumeur APC, l'activation de PPAR γ par son ligand augmente la fréquence et la taille des tumeurs du colon (Lefebvre *et al.*, 1998; Saez *et al.*, 1998).

Cette différence de résultat peut s'expliquer par le fait que l'étude chez l'homme est réalisée principalement dans des lignées cellulaires, alors que l'étude chez la souris est réalisée d'une part au niveau des tumeurs et d'autre part chez des souris génétiquement prédisposées pour développer des polypes dans le colon. Il se peut que l'effet de l'activation de PPAR γ soit à la fois la différenciation pour des cellules cultivées et la prolifération dans l'épithélium du colon. Par ailleurs, les souris utilisées sont un modèle animal d'étude pour les cancers du colon adenomatous polyposis coli (APC) familial qui ne représente pas la totalité des cancers du

colon. Il serait intéressant de savoir si il y a formation de tumeur lorsque l'on active PPAR γ chez des souris génétiquement non sensible à ce cancer.

2-6 Les récepteurs PPAR et la plaque d'athérome

L'athérosclérose n'est pas une maladie en elle même, mais un processus responsable des infarctus myocardiques et cérébraux. Ce processus a lieu dans la lumière artérielle, au niveau de l'endothélium et des cellules musculaire lisses. Il est du à la formation d'une plaque d'athérome constituée de fibres adipeuses, précédée et accompagnée d'inflammation, allant jusqu'à l'occlusion de l'artère (revue de Ross, 1993; Lee et Libby, 1997).

Le mécanisme de formation de la plaque d'athérome commence par l'agrégation de macrophages riches en lipides (macrophages spumeux) et de lymphocytes T contre la paroi artérielle. Le stade suivant est la formation de plaques fibreuses constituées de macrophages spumeux, de cellules musculaire lisse et de lymphocytes T. L'augmentation de la taille de la plaque d'athérome perturbe le flux sanguin (revue de Ross, 1993).

2-6-1 Les macrophages

Le rôle normal des macrophages, issues des monocytes, est de présenter l'antigène aux lymphocytes T, mais aussi d'enlever les éléments nocifs et de produire des molécules régulatrices de la prolifération et des cytokines (revue de Ross, 1993). Les macrophages sont les médiateurs de l'inflammation dans la plaque d'athérome. En effet, ces cellules internalisent les lipoprotéines de faible densité oxydées présentes dans le plasma. Si il y a un excès de lipoprotéines de faibles densité (LDL) oxydées, les macrophages deviennent des cellules portant le cholestérol, et ils sont qualifiés de spumeux. Ces macrophages spumeux ont la particularité d'être beaucoup moins mobiles que les macrophages, et d'adhérer à l'endothélium artériel. Ce phénomène est l'une des premières étapes de la formation de la plaque d'athérome.

Le récepteur PPAR γ est présent dans le cytoplasme des monocytes et dans le noyau des macrophages (Tontonoz *et al.*, 1998; Ricote *et al.*, 1998a). Dans les lignées cellulaires leucémiques HL60, l'expression du gène de PPAR γ augmente en présence d'agent induisant la différenciation monocyttaire. De plus, les ligands de PPAR γ et de RXR α sont capables

d'induire la différenciation monocyttaire des cellules HL60. Il semblerait donc que PPAR γ interviennent dans la différenciation des cellules en monocyte et en macrophage (fig 38 A).

Par ailleurs, dans les monocytes, l'expression de PPAR γ est augmentée en présence de lipoprotéines de faible densité (LDL) oxydées (Tontonoz *et al.*, 1998). En effet, les LDL oxydées sont capables d'activer la transcription dépendante de PPAR γ , et il semblerait que certains métabolites oxydés de l'acide linoléique soient des ligands de PPAR γ (Nagy *et al.*, 1998; fig 38 B).

Les ligands de PPAR γ et de RXR α favorisent l'internalisation par endocytose des LDL oxydées, et augmentent l'expression du gène codant le récepteur membranaire CD36 qui fixent les LDL oxydées (Tontonoz *et al.*, 1998). En effet, l'hétérodimère PPAR γ -RXR α peut se fixer sur le promoteur du gène codant le récepteur CD36, et en induire la transcription. Enfin, le récepteur PPAR γ est présent dans les macrophages spumeux, et les lésions athérosclérotiques d'aorte.

Il semblerait donc que PPAR γ intervienne dans la différenciation des macrophages en macrophages spumeux, notamment en induisant l'expression du gène codant le récepteur membranaire aux LDL oxydées, en présence de son ligand, un métabolite oxydés de l'acide linoléique.

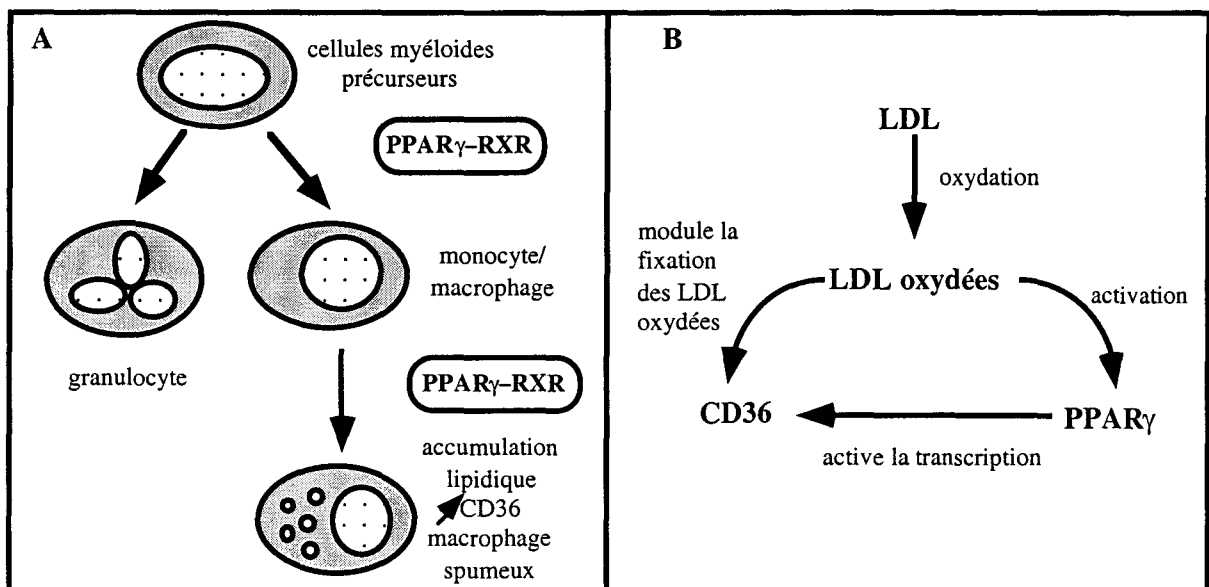


Figure 38 : Rôle de PPAR γ dans la différenciation des macrophages en macrophages spumeux (A), et dans l'activation de l'expression du gène CD36 (B).

2-6-2- La réaction inflammatoire induite par les macrophages

Dans les monocytes, lieu d'expression de PPAR γ , lorsque l'on traite les cellules avec le ligand de PPAR γ , la synthèse de cytokines inflammatoire est plus faible par rapport aux cellules non traitées (Jiang *et al.*, 1998). L'effet du ligand de PPAR γ se retrouve au niveau transcriptionnel, pour la cytokine TNF- α il y a une diminution de l'expression de son gène. Dans les macrophages, le ligand de PPAR γ semble empêcher l'activation de ces cellules entraînant la réponse inflammatoire (Ricote *et al.*, 1998b). En effet, PPAR γ est capable de diminuer l'activation de la transcription du gène codant la synthèse oxyde nitrique, connue pour ses effets cytotoxiques. En fait, PPAR γ interfère négativement avec les facteurs de transcription qui induisent l'expression de la synthèse oxyde nitrique. Il semble donc que PPAR γ diminue la réaction inflammatoire induite par les monocytes et les macrophages.

2-6-3 La réaction inflammatoire induite par les cellules musculaires lisses

Le leucotriène B₄, un agent chimiotactique qui initie et amplifie la réponse inflammatoire, est aussi le ligand du récepteur PPAR α (Devchand *et al.*, 1996). Etant donné que PPAR α régule la dégradation oxydative des acides gras et leurs dérivés, comme par exemple le leucotriène B₄, il semblerait qu'il y ait une boucle de régulation négative de l'inflammation. De plus les souris dont le gène de PPAR α a été interrompu, ont une réponse inflammatoire plus longue que chez les souris normales (Devchand *et al.*, 1996). Dans cette hypothèse de régulation, le leucotriène B₄, qui augmente la réponse inflammatoire, va aussi activer le récepteur PPAR α qui, en induisant le catabolisme du leucotriène B₄, va diminuer l'inflammation (fig 39).

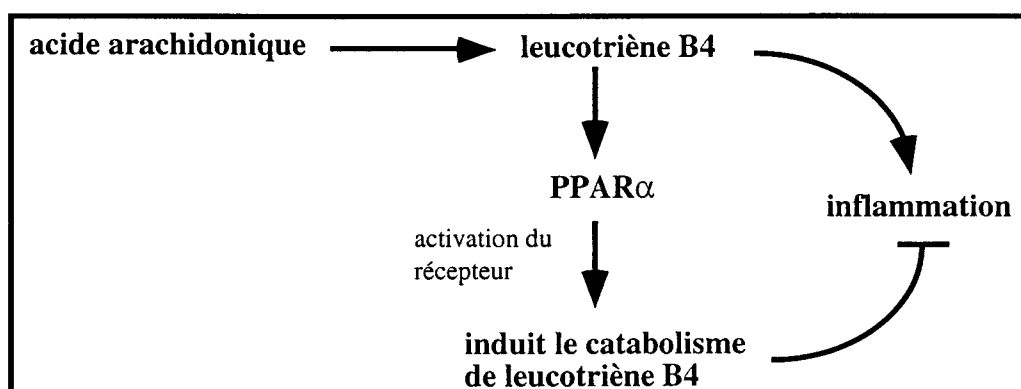


Figure 39 : Rôle de PPAR α dans l'inflammation (d'après Devchand et al, 1996).

Dans les cellules musculaires lisses aortiques, PPAR α et PPAR γ sont exprimés (Iijima *et al.*, 1998; Staels *et al.*, 1998). Le rôle de ces deux récepteurs a été testé pour leur capacité à permettre à l'interleukine 1 d'induire la sécrétion de l'interleukine 6, un marqueur de l'activation des cellules musculaires lisses (Staels *et al.*, 1998). Seul le ligand de PPAR α , par rapport à celui de PPAR γ , empêche l'induction de l'interleukine 6. De plus, seul le ligand de PPAR α est aussi capable d'empêcher l'interleukine 1 d'induire le gène de la cyclooxygénase 2 qui catalyse l'acide arachidonique en prostaglandine. Le récepteur PPAR α interfère négativement avec NF κ B qui induit le gène de la cyclooxygénase 2. Par ailleurs, chez des patients atteints d'athérosclérose, un traitement aux fibrates diminue le taux de triglycérides plasmatique ainsi que celui de l'interleukine 6. Les ligands de PPAR α sont donc capables de diminuer la réponse inflammatoire.

2-7 Conclusion

Le récepteur PPAR α intervient dans le métabolisme lipidique au niveau des transporteurs des lipides et des enzymes du métabolisme des acides gras. Le récepteur PPAR γ a une activité adipogénique et il favorise la différenciation des cellules en adipocytes. Par ailleurs, les deux récepteurs PPAR α et γ interviennent dans la plaque d'athérome lors de la réponse inflammatoire notamment. Ainsi, ces récepteurs ont à la fois des rôles spécifiques mais aussi des fonctions communes.

RESULTATS

I- Articles 1 : The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor α and Rev-erb α mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates

A- Introduction

Les lipides, composés très peu hydrosolubles, n'existent dans le sang qu'associés à des particules lipoprotéiques que l'on nomme lipoprotéines. Même si ils sont indispensables pour la vie, leur taux élevé dans le sang est corrélé avec le développement de l'athérosclérose, maladie au cours de laquelle un des principaux lipides, le cholestérol, s'accumule dans les artères, entravant le flux sanguin.

L'étude de l'effet des fibrates, produits hypolipémiants, sur le métabolisme lipoprotéique est plus particulièrement orienté vers l'étude des lipoprotéines de hautes densités (HDL) du fait de leur capacité à effectuer un transport particulier du cholestérol : le transport inverse du cholestérol à partir des tissus périphériques vers le foie. Les HDL peuvent être distinguées selon leur composition en apolipoprotéines, en particulier selon leur composition en apo AI et apo AII, les apolipoprotéines majeures des HDL. Chez le rat, un traitement à 0,5% de fénofibrate mélangé à la nourriture (0,5% par rapport au poids du repas) pendant 14 jours réduit de deux fois le taux plasmatique de cholestérol par rapport à un animal non traité (Staels *et al.*, 1992). De plus, au bout de trois jours, la concentration plasmatique de l'apo AI est aussi diminuée de deux fois, et l'expression de son gène est diminuée de 4 fois. Par contre chez l'homme, les fibrates entraînent une augmentation du cholestérol (Mellies *et al.*, 1987). Cette opposition de l'effet des fibrates dans le foie entre l'homme et le rongeur est particulièrement évidente dans la souris transgénique pour le gène humain de l'apo AI (Berthou *et al.*, 1996). En effet, un traitement avec 0,5% de fénofibrate dans la nourriture pendant 7 jours entraîne une augmentation massive de la concentration plasmatique de l'apo AI humaine dans les souris transgéniques alors que celle de l'apo AI murine diminue. De plus l'expression hépatique du gène de l'apo AI humaine augmente de 90% chez les souris transgéniques traitées, alors que l'expression hépatique du gène de l'apo AI murine diminue de 50%.

Chez l'homme, l'effet positif des fibrates sur l'expression du gène codant l'apo AI s'explique par le fait que les fibrates sont des activateurs spécifiques des récepteurs nucléaires

PPAR. Parmi les trois gènes PPAR connus, seul PPAR α est clairement exprimé dans le foie (Kliewer *et al.*, 1994; Braissant *et al.*, 1996). Il a été montré que PPAR α est capable de se fixer sur le promoteur humain de l'apo AI, et en présence de fénofibrate, il active la transcription de ce gène (Vu-Dac *et al.*, 1994). Par conséquent, chez l'homme, l'effet positif des fibrates sur l'expression du gène de l'apo AI semble passer par le récepteur PPAR α . Par contre, chez les rongeurs, le mécanisme de régulation négative de l'expression du gène de l'apo AI par les fibrates n'était pas connu (fig 40). Cependant il existe dans le promoteur de l'apo AI de rat un élément de réponse pour le récepteur ROR α (Vu-Dac *et al.*, 1997). Or ROR α et Rev-erb α utilisent le même type d'élément de réponse, et Rev-erb α est un répresseur de la transcription.

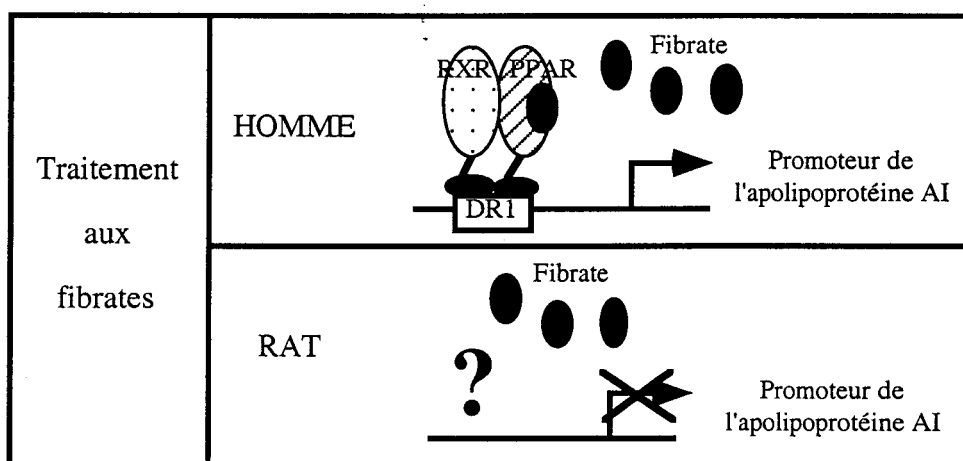


Figure : 40. L'effet des fibrates sur l'expression du gène de l'apolipoprotéine AI est spécifique de l'espèce.

Plusieurs points nous ont menés à tester le rôle fonctionnel de Rev-erb α sur la répression transcriptionnelle du gène de l'apo AI chez le rat, induite par les fibrates. Tout d'abord, la répression de l'apo AI par les fibrates se situe au niveau transcriptionnel. Cette répression est un processus assez lent qui apparaît au bout de 12 à 14 heures, indiquant un effet indirect des fibrates. De plus l'élément de réponse de Rev-erb α , dans le promoteur de l'apo AI est présent uniquement chez le rat et non pas chez l'homme, ce qui correspond aux différences d'effets des fibrates entre l'homme et les rongeurs. Enfin, le gène *Rev-erb α* s'exprime dans le foie qui est le lieu de répression par les fibrates de l'apo AI.

B- Résultats

The Nuclear Receptors Peroxisome Proliferator-activated Receptor α and Rev-erba Mediate the Species-specific Regulation of Apolipoprotein A-I Expression by Fibrates*

(Received for publication, May 12, 1998, and in revised form, July 17, 1998)

Ngoc Vu-Dac \ddagger §, Sandrine Chopin-Delannoy \S ¶, Philippe Gervois \ddagger , Edith Bonnelye \S ,
Geneviève Martin \ddagger , Jean-Charles Fruchart \ddagger , Vincent Laudet \S , and Bart Staels \ddagger ||

From the \ddagger U.325 INSERM, Département d'Athérosclérose, Institut Pasteur, and the Faculté de Pharmacie, Université de Lille II, Lille, France and \S Endocrin'os group, CNRS UMR319, Institut de Biologie de Lille, Lille, France

Fibrates are widely used hypolipidemic drugs which activate the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and thereby alter the transcription of genes controlling lipoprotein metabolism. Fibrates influence plasma high density lipoprotein and its major protein, apolipoprotein (apo) A-I, in an opposite manner in man (increase) versus rodents (decrease). In the present study we studied the molecular mechanisms of this species-specific regulation of apoA-I expression by fibrates. In primary rat and human hepatocytes fenofibric acid, respectively, decreased and increased apoA-I mRNA levels. The absence of induction of rat apoA-I gene expression by fibrates is due to 3 nucleotide differences between the rat and the human apoA-I promoter A site, rendering a positive PPAR-response element in the human apoA-I promoter nonfunctional in rats. In contrast, rat, but not human, apoA-I transcription is repressed by the nuclear receptor Rev-erba, which binds to a negative response element adjacent to the TATA box of the rat apoA-I promoter. In rats fibrates increase liver Rev-erba mRNA levels >10-fold. In conclusion, the opposite regulation of rat and human apoA-I gene expression by fibrates is linked to differences in cis-elements in their respective promoters leading to repression by Rev-erba of rat apoA-I and activation by PPAR α of human apoA-I. Finally, Rev-erba is identified as a novel fibrate target gene, suggesting a role for this nuclear receptor in lipid and lipoprotein metabolism.

the regulatory regions of target genes. PPREs consist of a direct repeat of the degenerated hexamer AGGTCA sequence separated by 1 nucleotide (DR-1). Fibrates exert their effects on plasma lipids by altering the transcription of genes involved in lipoprotein metabolism (1). Direct evidence that fibrate action on lipoprotein metabolism is mediated by PPAR α , the principal PPAR form in liver, came from studies in mice rendered deficient for PPAR α by homologous recombination (4). Functional PPREs have been identified in the promoters of a number of genes involved in plasma triglyceride (e.g. human apoC-III (5) and mouse and human lipoprotein lipase (LPL) (6)) and high density lipoprotein (HDL) metabolism (e.g. human apoA-I (7) and apoA-II (8)).

Whereas both in man and rodents fibrates efficiently decrease plasma triglycerides, their effects on HDL occur in an opposite manner in these species. Whereas in man plasma HDL cholesterol consistently increases upon fibrate treatment (9), a pronounced decrease is observed in rats (10). Previously, it was demonstrated that these species differences in HDL response to fibrates are associated with opposite changes of apoA-I expression, the major HDL apolipoprotein. In rats, fibrate treatment lowers hepatic, but not intestinal, apoA-I mRNA levels, due to a decreased transcription rate of the apoA-I gene in liver (10). In contrast, the transcription rate of the human apoA-I gene is induced by PPAR α , which interacts with a positive PPRE located in the A site of the human apoA-I gene promoter liver-specific enhancer (7). Furthermore, fibrates enhance apoA-I expression and production both *in vivo* in man and *in vitro* in human hepatoma cells (11–14). The observation that fibrates regulate human and mouse apoA-I gene transcription in an opposite manner in livers of transgenic mice overexpressing the human apoA-I gene driven by its homologous promoter including the PPRE sequence (15) suggested that the species-specific differences in fibrate response are due to cis-element sequence differences between the rodent and human apoA-I genes. However, the exact molecular mechanisms implicated have not been determined yet. In addition, although the mechanisms of positive regulation of gene expression by fibrates via PPAR interacting with positive PPRE sequences are well understood (for review, see Schoonjans *et al.* (16)), little is known on the mechanisms of negative gene regulation by fibrates and PPARs.

In this study, we determined the molecular mechanisms behind the differential regulation of rat versus human apoA-I gene expression by fibrates. Our results demonstrate that this opposite regulation is due to sequence differences of two distinct enhancer regions in the rat and human apoA-I genes. On the one hand, the human apoA-I gene promoter A site contains a positive PPRE to which PPAR α binds. The lack of induction of apoA-I gene transcription by fibrates in rats is due to 3

Fibrates are a class of drugs used in the treatment of atherogenic dyslipidemia (1). Fibrates are ligands for transcription factors belonging to the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)¹ subfamily of nuclear receptors (2, 3). After ligand activation and heterodimerization to the 9-*cis* retinoic acid receptor RXR, PPARs bind to specific response elements, termed peroxisome proliferator response elements (PPREs), in

* This research was supported by the Région Nord-Pas de Calais. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Both authors contributed equally to this article.

|| Member of CNRS. To whom correspondence should be addressed: U.325 INSERM, Dépt. d'Athérosclérose, Institut Pasteur, 1 Rue Calmette, 59019 Lille, France. Tel.: 33-3-20-87 73 88; Fax: 33-3-20-87 73 60; E-mail: Bart.Staels@pasteur-lille.fr.

¹ The abbreviations used are: PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PPRE, peroxisome proliferator response element; RXR, 9-*cis* retinoic acid receptor; RevRE, Rev-erba response element; TK, thymidine kinase; HDL, high density lipoprotein; TR, thyroid hormone receptor; EMSA, electrophoretic mobility shift assays; TRE, TR response element; CAT, chloramphenicol acetyltransferase.

nucleotide differences between the rat and the human apoA-I gene promoter A sites, resulting in the transformation of the positive PPRE in the human apoA-I promoter in a nonfunctional site in rats. On the other hand, rat, but not human, apoA-I gene transcription is repressed via an element overlapping the TATA box to which the nuclear orphan receptor Rev-erb α binds. Furthermore, fibrates induce Rev-erb α and repress apoA-I gene expression only in rat liver, but not in intestine. Interestingly, the rat apoA-I promoter Rev-erb α response element (RevRE) is not conserved in the human apoA-I gene promoter.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Fenofibric acid and fenofibrate, and ciprofibrate were kind gifts of Dr. Alan Edgar (Laboratoires Fournier, Daix, France) and Dr. Herbert (Sanofi, Toulouse, France) respectively. Bezafibrate and hematoxylin were from Sigma.

Animal Studies—Adult Sprague-Dawley rats (3 months old) were treated for 14 days with the specified fibrates at the indicated concentrations (w/w) mixed in chow. At the end of the treatment period all animals were fasted overnight, weighed, and sacrificed by exsanguination under ether anesthesia between 9 and 11 a.m. Livers were frozen in liquid N₂ or stored in phosphate-buffered saline until RNA or *in situ* hybridization analysis.

Cell Culture—Human hepatoma HepG2 cells (E.C.A.C.C., Porton Down, Salisbury, UK) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂, 95% air. Medium was changed every other day. Human and rat hepatocytes were isolated by collagenase perfusion and cultured as described previously (17). At the end of the treatment period with fenofibric acid (in Me₂SO), cells were washed three times with ice-cold phosphate-buffered saline, homogenized in 4 M guanidinium isothiocyanate, and used for RNA analysis.

RNA Analysis—RNA preparation, Northern blot hybridizations, and quantifications were performed as described previously (10). The rat apoA-I (10), apoE (10), Rev-erb α (18), HNF-4 (19), and human acidic ribosomal phosphoprotein 36B4 cDNAs (20) were used as probes.

Recombinant Plasmids—Polymerase chain reaction amplification and cloning of the rat apoA-I promoter into the pBLCAT5 promoterless expression vector was described previously (21). Site-directed mutagenesis of the apoA-I RevRE was accomplished using the oligonucleotide 5'-CAC ACA TAT ATA GGC AGG GAA GAA GA-3' as a mutagenic primer on single-stranded DNA templates according to Kunkel (22). The rat wild-type (5'-GAT CCA CAC ATA TAT AGG TCA GGG AAG AAG A-3') and mutant apoA-I RevRE (5'-GAT CCA CAC ATA TAT AGG CAG GGA AGA AGA-3') and the rat (5'-GAT CCA CTG AAC CCT TGA TCC CAG CTC TG-3') and human wild type (5'-GAT CCA CTG AAC CCT TGA CCC CTG CCC TA-3') and mutant (5'-GAT CCA CTG ATC CCT TGT CCC CTG CCC TA-3') apoA-I A-site oligonucleotides were cloned into the BamHI/BglII sites of pIC20H (23), digested with HindIII, and subcloned upstream of the thymidine kinase (TK) promoter of pBLCAT4 (24) to generate, respectively, rAI-TATA_{wt}-TKCAT, rAI-TATA_{mt}-TKCAT, rAIA_{wt}-TKCAT, hAIA_{wt}-TKCAT, and hAIA_{mt}-TKCAT. Identity of all clones was verified by sequence analysis.

Transient Transfections—Transfections in HepG2 cells were performed at 50–60% confluency by the calcium phosphate coprecipitation procedure with a mixture of plasmids that contained in addition to the reporter (1–5 μ g/60 mm culture dish) and expression vector(s) (100–1000 ng), 0.35 μ g of cytomegalovirus- β -galactosidase expression vector as a control for transfection efficiency. All samples were complemented to an equal total amount of DNA. After 4 h cells were washed with phosphate-buffered saline and incubated for another 16 h with the indicated stimuli in fresh medium containing 5% calf serum delipoproteinized by ultracentrifugation in KBr (1.21 g/ml) and subsequently treated with AG-1-X8 resin (Bio-Rad) plus activated charcoal. Stimuli were dissolved in Me₂SO and added to the medium at the indicated concentrations and periods of time. Control cells received vehicle only. CAT activity was determined on cell extracts as described by Gorman *et al.* (25). Autoradiographs were quantified by liquid scintillation counting and results were normalized for transfection efficiency. Transfection experiments were performed at least three times.

Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA)—hPPAR α , mRXR α , and hRev-erb α proteins were synthesized *in vitro* using the rabbit reticulocyte lysate system (Promega). EMSAs with Rev-erb α , PPAR and/or RXR were performed as described previously (7, 26). For competition experiments, increasing amounts of the indicated cold oligonu-

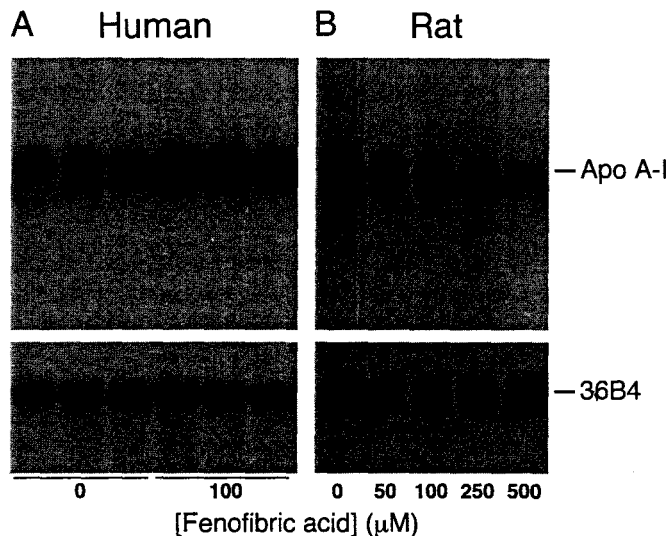


FIG. 1. Fenofibric acid influences apoA-I mRNA levels in primary cultures of adult human and rat hepatocytes in an opposite manner. Human (A) and rat (B) hepatocytes were treated for 24 h with fenofibric acid at the indicated doses. Total RNA (10 μ g) was subjected to Northern blot analysis using human (A) or rat (B) apoA-I (top panels) and 36B4 (bottom panels) cDNA probes.

cleotides were included just before adding labeled oligonucleotide. After 15 min of incubation at room temperature, DNA-protein complexes were separated by electrophoresis on a 4% polyacrylamide gel in 0.25 \times Tris borate-EDTA buffer at 4 °C.

RESULTS

ApoA-I Gene Expression Is Regulated in an Opposite Manner by Fenofibrate in Human Versus Rat Hepatocytes—To study whether the species differences in response to fibrates are due to a distinct regulation of apoA-I expression in liver, the effects of fenofibric acid, the active form of fenofibrate, on apoA-I gene expression were compared between primary cultures of human versus rat hepatocytes. Addition of fenofibric acid to primary human hepatocytes, at a concentration (100 μ M) within the range of plasma concentrations attained in fenofibrate-treated patients, resulted in a >2-fold increase of apoA-I mRNA levels (Fig. 1A). In contrast, in rat hepatocytes fenofibric acid decreased apoA-I mRNA levels in a dose-dependent manner (Fig. 1B). As a control, mRNA levels of the ribosomal protein 36B4 did not change upon treatment of either human or rat hepatocytes with fenofibric acid (Fig. 1). These data indicate that the species-distinct regulation of the apoA-I gene is due to a direct effect of fenofibrate on the hepatocyte.

The Human, but Not the Rat, ApoA-I Promoter A Site Contains a Positive PPAR-response Element—Since previously a positive PPRE has been identified in the human apoA-I promoter A site (7), we wondered whether the lack of induction of apoA-I gene expression by fibrates in rats could be due to the absence of a functional PPRE in the rat apoA-I promoter. Interestingly, when the human and rat apoA-I A sites, which are composed of 3 degenerated hexameric half-sites separated by 2 and 1 nucleotides, respectively (DR-2 and DR-1), were aligned, 3 nucleotide differences were observed (Fig. 2A). To determine whether these nucleotide differences conferred a different PPAR binding potential to the rat and human apoA-I A sites, EMSA experiments were performed. Incubation of radiolabeled human A site oligonucleotide with *in vitro* produced PPAR protein, in the presence of its heterodimeric partner RXR, resulted in the formation of a retarded complex (Fig. 2B, lane 3). This complex was specific since it could be competed out by adding excess unlabeled human A site oligonucleotide

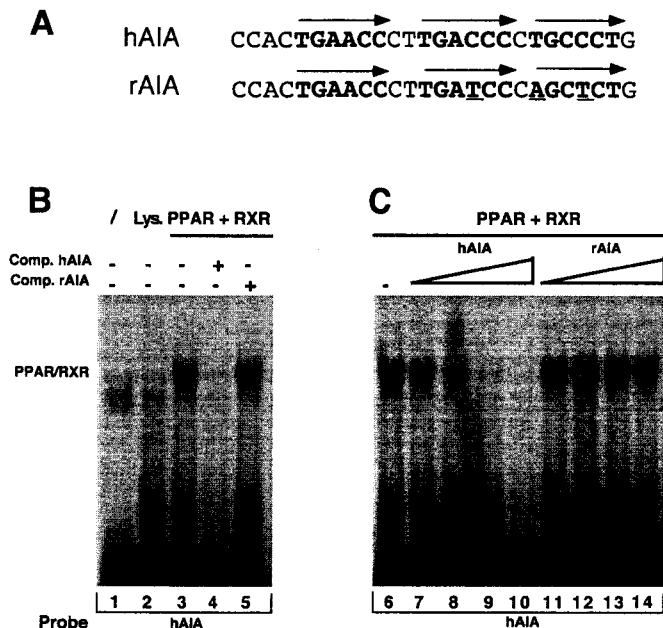


FIG. 2. PPAR/RXR heterodimers bind to the human, but not to the rat apoA-I A site. A, sequence alignment of the human (hAIA) and rat (rAIA) wild-type apoA-I A sites. The degenerated half-sites are indicated by arrows. The sequence differences between the human and rat A sites are underlined. B and C, gel retardation assays were performed on end-labeled hAIA oligonucleotide in the presence of *in vitro* transcribed/translated hPPAR α , mRXR α , or unprogrammed reticulocyte lysate (Lys. = unprogrammed lysate). Competition experiments for binding to *in vitro* transcribed/translated hPPAR α /mRXR α were performed by adding 50 (lanes 7 and 11), 100 (lanes 4, 5, 8, and 12), 200 (lanes 9 and 13) or 400-fold (lanes 10 and 14) molar excess of cold hAIA (lanes 4 and 7–10) or rAIA (lanes 5 and 11–14) oligonucleotide.

(Fig. 2, B, lane 4, and C, lanes 7–10). In contrast, unlabeled rat A site oligonucleotide did not compete for binding to the human A site (Fig. 2, B, lane 5, and C, lanes 11–14).

Next, the human and rat A sites were cloned in front of a heterologous promoter, and transient co-transfection experiments were performed in HepG2 cells. PPAR co-transfection resulted in a significant increase of human A site driven CAT activity (Fig. 3). Due to the high basal activity of PPAR in HepG2 cells, possibly due to the activation by endogenous PPAR ligands, no further activation was observed in the presence of fenofibric acid (Fig. 3). However, activation by fibrates was observed when the same experiments were performed in other cells, such as in HeLa or CV-1 cells (not shown). In contrast, rat apoA-I A site-driven CAT activity was not increased by PPAR, fenofibric acid, or both together (Fig. 3). These data clearly indicate that only the human, but not the rat, apoA-I A site functions as a PPRE.

The Orphan Receptor Rev-erb α Represses Transcription of the Rat ApoA-I Promoter—In a previous report, the nuclear receptor ROR α 1 was identified as a positive regulator of apoA-I expression in the intestine (28). Interestingly, nuclear receptors of the ROR and Rev-erb groups regulate transcription through identical response elements, leading to cross-talk between the positive ROR and the negative Rev-erb nuclear receptors (29–32). Therefore, it was tested whether Rev-erb α , which is expressed in liver (18, 33), could act as a repressor of rat apoA-I transcription. Co-transfection of CAT reporter constructs driven by the rat apoA-I promoter with a Rev-erb α expression vector resulted in dose-dependent repression of CAT activity in HepG2 cells (Fig. 4, A and B). Interestingly, human apoA-I promoter activity was not repressed by Rev-erb α co-transfection (Fig. 4A). These results indicate that the rat, but

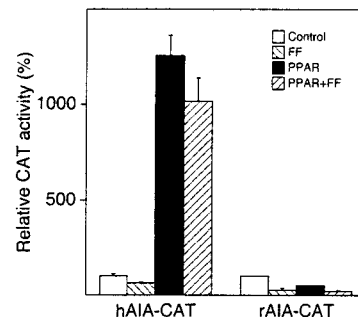


FIG. 3. PPAR activates the human, but not rat, apoA-I A site. The human (hAIA_w) and rat (rAIA_w) apoA-I A sites were cloned upstream of the TK promoter, and HepG2 cells were transfected with the indicated plasmids (5 μ g) in the presence of co-transfected mPPAR α or pSG5 vector plasmids (1 μ g). Cells were treated with fenofibric acid (FF) (500 μ M) or vehicle, and CAT activity was measured and expressed as mean \pm S.D.

not the human, apoA-I gene is a Rev-erb α target gene.

To determine whether this repression of apoA-I promoter activity is mediated by the previously identified response element for ROR α 1 (28) located adjacent to the TATA box, the activity of Rev-erb α was analyzed on an apoA-I promoter construct carrying a mutation in the ROR α 1 response element (see Fig. 6A). Whereas wild-type apoA-I promoter activity was significantly repressed in a dose-dependent manner, Rev-erb α failed to repress the activity of the mutated construct (Fig. 4C), thereby indicating that the Rev-erb α and ROR α response elements coincide.

Rev-erb α Represses Transcription of the Rat ApoA-I Promoter through Both Active and Passive Mechanisms—Since Rev-erb α may repress transcription either actively, by recruiting nuclear co-repressors of the N-CoR family (34, 35), or passively, by competing for binding with other, positive factors, such as the proteins binding to the TATA box, the activity of a C terminus-truncated Rev-erb α 236, which can still bind to DNA, but does not actively repress transcription (36), was tested on rat apoA-I promoter transcription. In contrast to wild-type Rev-erb α , which repressed transcription already at low concentrations, Rev-erb α 236 started to repress apoA-I transcription only at higher amounts of expression vector (Fig. 5A).

To determine whether Rev-erb α could repress transcription from a heterologous promoter, the rat apoA-I TATA site (AI-TATA) was cloned in front of the TK promoter, and transient transfection assays were performed. Compared with the empty expression vector, co-transfection of Rev-erb α resulted in a significant decrease of wild-type rat AI-TATA driven CAT activity (Fig. 5B). In contrast, neither mutated AI-TATA nor TK promoter alone driven CAT activity were repressed by Rev-erb α co-transfection (Fig. 5B). Altogether, these observations suggest that the repression of rat apoA-I transcription by Rev-erb α is likely due to a combination of active and passive transcriptional repression mechanisms.

Rev-erb α Binds to the Rat, but Not the Human, ApoA-I Promoter TATA Site—EMSA were performed to determine whether Rev-erb α could bind to the rat AI-TATA site. Incubation of labeled rat wild-type AI-TATA oligonucleotide with Rev-erb α resulted in the formation of a retarded complex (Fig. 6, A and B, lane 2). The binding was specific since it could be competed out by excess amounts of either unlabeled consensus monomeric RevRE (30, 37) or rAI-TATA_w oligonucleotides (Fig. 6B, lanes 3–6). In contrast, neither rAI-TATA_{mt} nor human AI-TATA oligonucleotides could compete for binding of Rev-erb α to rAI-TATA_w (Fig. 6, lanes 7–10). Similar results were obtained using the consensus RevRE oligonucleotide as a probe (Fig. 6C). Similar as cold RevRE oligonucleotide (Fig. 6C,

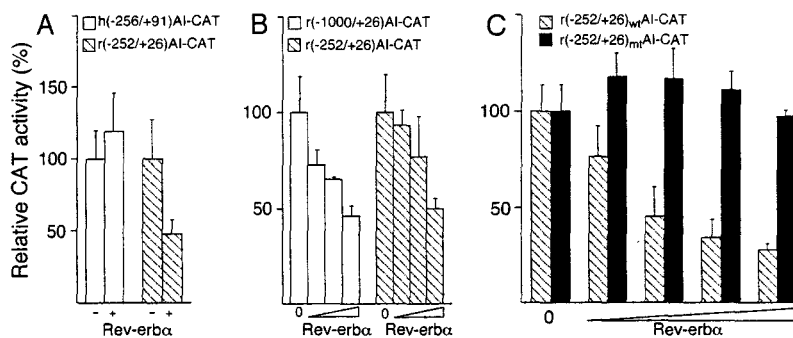


FIG. 4. Rev-erba represses transcription of the rat, but not the human, apoA-I promoter. A, HepG2 cells were transfected with the rat ($r(-256/+91)AI-CAT$) or human ($h(-252/+26)AI-CAT$) apoA-I promoter reporter plasmids (2 μ g) in the presence of co-transfected hRev-erba plasmid (1 μ g). B, HepG2 cells were transfected with the indicated rat apoA-I promoter reporter plasmids (2 μ g) in the presence of increasing amounts (0, 100, 500, and 1000 ng) of co-transfected hRev-erba plasmid. C, HepG2 cells were transfected with the wild-type ($r(-252/+26)_{wt}AI-CAT$) or mutated ($r(-252/+26)_{mt}AI-CAT$) rat apoA-I promoter constructs (2 μ g) in the presence of increasing amounts (0, 100, 250, 500, and 1000 ng) of co-transfected hRev-erba plasmid. Empty pSG5 vector was added to an equal amount of plasmid DNA. CAT activities were measured after 24 h and expressed as mean \pm S.D.

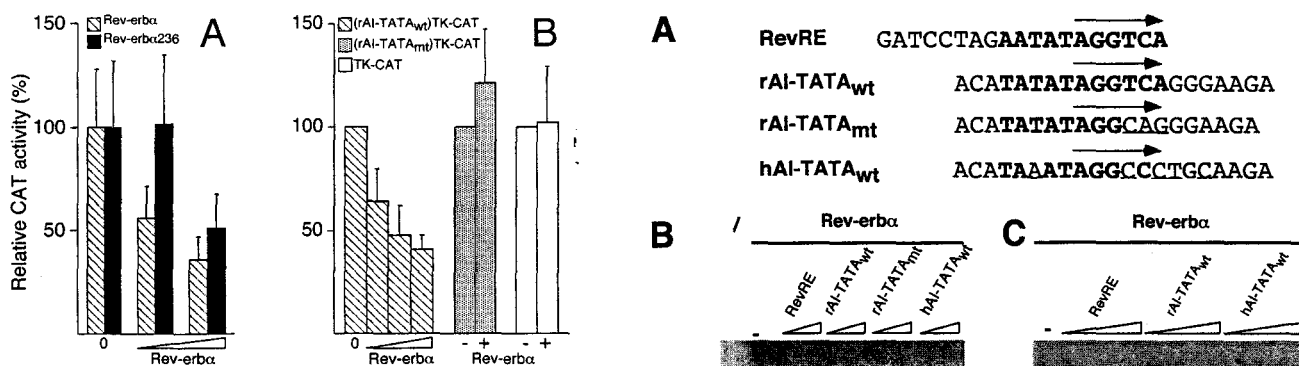


FIG. 5. Repression of the rat apoA-I gene promoter by Rev-erba is due to both active and passive repression mechanisms. A, HepG2 cells were transfected with the $r(-252/+26)AI-CAT$ reporter plasmid (2 μ g) in the presence of increasing amounts (0, 500, and 1000 ng) of either the wild-type (*Rev-erba*) or truncated (*Rev-erba236*) *Rev-erba* expression plasmids. B, HepG2 cells were transfected with the rat wild type ($rAI-TATA_{wt}-TK-CAT$) and mutated ($rAI-TATA_{mt}-TK-CAT$) apoA-I TATA site-containing TK promoter plasmids (2 μ g) in the presence of increasing amounts (0, 250, 500, and 1000 ng) of *Rev-erba* expression plasmid. Empty pSG5 vector was added to an equal amount of plasmid DNA.

lanes 12–14), cold $rAI-TATA_{wt}$ oligonucleotide (Fig. 6C, lanes 15–17) competed efficiently for binding of Rev-erba to RevRE, whereas the human $hAI-TATA_{wt}$ (Fig. 6C, lanes 18–20) oligonucleotide failed to compete. Altogether, these data indicate that whereas the rat apoA-I promoter contains a functional *Rev-erba* response element, the human AI-TATA site does not bind *Rev-erba*.

Fibrates Induce *Rev-erba* mRNA Levels in Rat Liver—To determine whether the negative regulation of rat apoA-I gene expression by fibrates is mediated via *Rev-erba*, adult rats were treated for 14 days with different doses of fenofibrate, and *Rev-erba* mRNA levels were measured by Northern blot analysis in livers and intestines, the major sites of apoA-I production. Administration of fenofibrate resulted in a pronounced induction of *Rev-erba* gene expression (Fig. 7A). This induction of *Rev-erba* mRNA was dose-dependent, being evident at a dose level of 0.05% (w/w) of fenofibrate and further enhanced at 0.5%. Interestingly, the induction of *Rev-erba* mRNA levels was inversely proportional to the decrease of apoA-I mRNA levels in liver (Fig. 7A). In contrast to liver, intestinal *Rev-erba* mRNA levels did not change significantly after fenofibrate treatment (control, $100 \pm 19\%$; fenofibrate 0.005%, $90 \pm 3\%$; fenofibrate 0.05%, $110 \pm 10\%$; fenofibrate 0.5%, $144 \pm 5\%$),

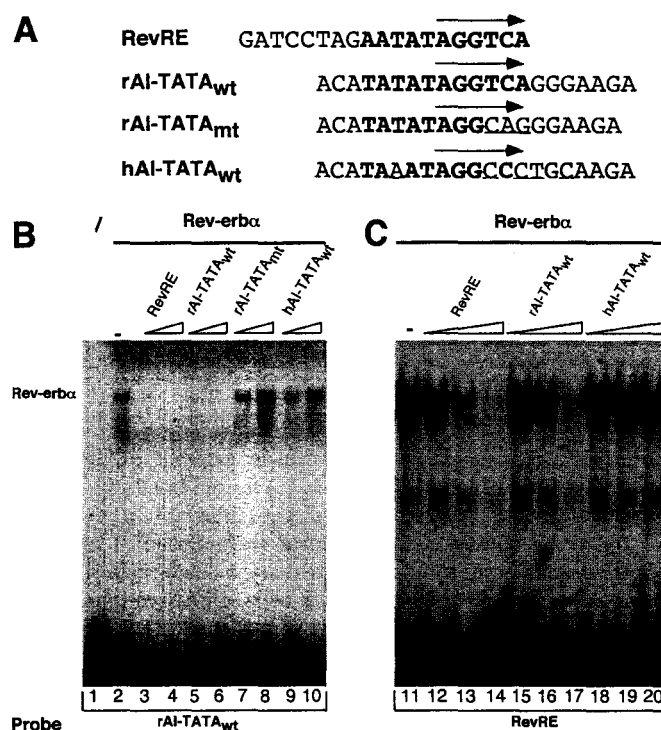
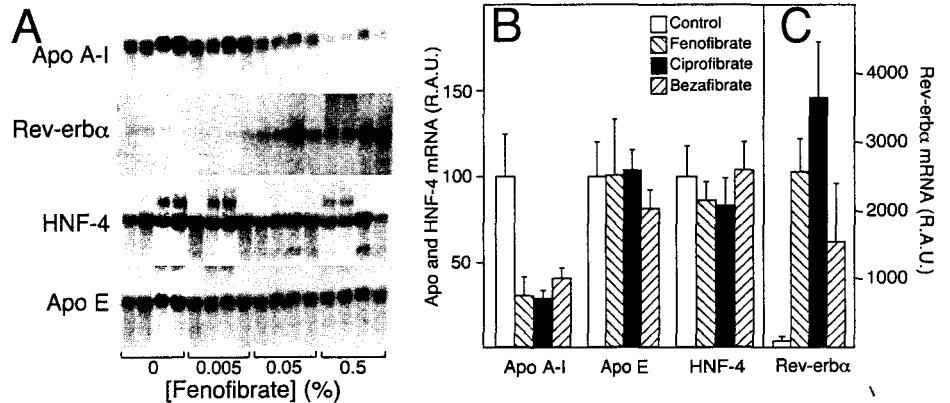


FIG. 6. Rev-erba binds to the wild-type rat, but not to the mutated rat or human apoA-I TATA sites. A, sequence comparison of the consensus (*RevRE*), the rat wild-type ($rAI-TATA_{wt}$) and mutated ($rAI-TATA_{mt}$) and the human ($hAI-TATA_{wt}$) apoA-I TATA sites. The AGGTC half-site is indicated by an arrow. The sequence differences between the rat wild-type, mutated, and human sites are underlined. B and C, gel retardation assays were performed on end-labeled $rAI-TATA_{wt}$ (lanes 1–10) or *RevRE* (lanes 11–20) oligonucleotides in the presence of *in vitro* transcribed/translated hRev-erba or unprogrammed reticulocyte lysate (–). Competition experiments for binding of hRev-erba were performed by adding 1 (lanes 12, 15, and 18), 10 (lanes 3, 5, 7, 9, 13, 16, and 19) and 100-fold (lanes 4, 6, 8, 10, 14, 17, and 20) molar excess of cold *RevRE* (lanes 3, 4, and 12–14), rat wild-type (lanes 5, 6, and 15–17), rat mutated (lanes 7 and 8) or human (lanes 9, 10, and 18–20) apoA-I TATA oligonucleotide (– = no competitor added).

which correlates well with the absence of effects of fibrates on intestinal apoA-I mRNA levels (10).

To determine whether the induction of liver *Rev-erba* gene expression is a general property of fibrates, rats were treated for 14 days with different fibrates. All fibrates tested significantly increased *Rev-erba* mRNA levels, which was most pro-

FIG. 7. Fibrates induce Rev-erb α gene expression in rat liver. Adult male rats were treated for 14 days with fenofibrate at the indicated doses (w/w in chow) (A) or with the indicated fibrates at a dose of 0.5% w/w in chow (B and C). RNA was extracted and apoA-I (A and B), HNF-4 (A and B), apoE (A and B), and Rev-erb α (A and C) mRNA levels were measured. Values are expressed relative (R.A.U. = relative arbitrary units) to chow-treated controls and represent the mean \pm S.D. of four animals/group.



nounced for ciprofibrate (>30-fold), followed by fenofibrate (>25-fold) and bezafibrate (\pm 15-fold) (Fig. 7B). All fibrates also repressed liver apoA-I mRNA levels (Fig. 7B). As a control mRNA levels of apoE, whose expression has been shown not to be controlled by fibrates (10), did not change significantly upon fibrate treatment (Fig. 7, A and B). Interestingly, hepatic mRNA levels of the nuclear receptor HNF-4, which is a major regulator of liver apolipoprotein gene transcription and whose expression has been shown to be repressed by fibrates (5), did not change significantly in either experiment (Fig. 7, A and B).

Finally, the induction of Rev-erb α gene expression by fibrates was also observed by *in situ* hybridization experiments using liver slices from rats treated with different fibrates (data not shown). Compared with controls, hybridization with an antisense Rev-erb α riboprobe resulted in an enhanced signal intensity in livers from fibrate-treated rats, which was evenly distributed throughout the liver, indicating that Rev-erb α mRNA levels increase after fibrate treatment in the apoA-I-producing parenchymal cells of the liver.

DISCUSSION

Fibrates are hypolipidemic drugs, which have been discovered by virtue of their cholesterol-lowering activity in rats (for review, see Staels and Auwerx (1)). Ironically, this cholesterol lowering is entirely due to a decrease of plasma HDL cholesterol concentrations and its major apolipoprotein, apoA-I (10), an effect nowadays considered to be negative, due to the protective activities of HDL and apoA-I against atherosclerosis (38, 39). In contrast, in man fibrates consistently elevate plasma HDL and apoA-I and increase the production rate of its major apolipoproteins, apoA-I and apoA-II (8, 13, 40). In the present study, we addressed the mechanisms of the differential response of apoA-I expression to fibrates in man and rat. Using primary human and rat hepatocytes we demonstrate that the opposite action of fenofibrate is due to a direct effect on the hepatocyte. These data are in line with a previous report showing opposite regulation of human (increase) *versus* mouse (decrease) apoA-I gene expression by fibrates in livers of transgenic mice overexpressing the human apoA-I gene under control of its homologous promoter (15). The experiments in these mice also indicated that this species-specific opposite regulation between human *versus* mouse is due to differences in *cis*-, but not in *trans*-acting elements (15). The results presented in this study indicate that the differences in fibrate response between the human and rat apoA-I genes are due to a combination of two distinct mechanisms implicating two different *cis*-elements binding two distinct nuclear receptors, PPAR α and Rev-erb α (Fig. 8).

On the one hand, the absence of induction of apoA-I gene expression by fibrates in rats is linked to 3-nucleotide differ-

ences between the rat and human apoA-I promoter A sites, thereby rendering the positive PPRE in the human apoA-I promoter nonfunctional in rats. Since *in vitro* promoter mapping studies identified a positive PPRE in the human apoA-I promoter A site (7), and since human apoA-I gene expression is induced at the transcriptional level by fibrate treatment in livers of transgenic mice (15) overexpressing the human apoA-I gene under control of its homologous promoter including this PPRE, it is highly likely that this element indeed confers the positive response of the human apoA-I gene to fibrates. The demonstration that this element is not functional in the rat apoA-I A site would therefore explain the lack of induction of rat apoA-I gene expression by fibrates.

On the other hand, a negative site for the nuclear receptor Rev-erb α is present in the rat, but not in the human, apoA-I promoter, and fibrate treatment results in a pronounced increase of liver expression of the Rev-erb α gene. Together with Rev-erb β (also termed RVR, BD73) and the *Drosophila* receptor E75, Rev-erb α (also termed *ear-1*) belongs to a subfamily of orphan receptors, which repress transcription of target genes (41). Rev-erb α appears to be ubiquitously expressed (18, 33), but its functions are ill defined. A number of indirect observations suggested a role for Rev-erb α in metabolic control and energy homeostasis. First, Rev-erb α expression is induced during differentiation of preadipocytes into adipocytes (42). Second, Rev-erb α is transcribed from the opposite strand of the thyroid hormone receptor (TR) α gene, with its 3' exons overlapping with TR α 2, a dominant negative regulator of TR action, suggesting a role for Rev-erb α as a modulator of thyroid hormone signaling (18, 33, 43, 44). Indeed, the level of Rev-erb α expression appears to be a determinant of the ratio of TR α 1:TR α 2 mRNA levels (42, 45, 46). In addition, Rev-erb α has been suggested to bind to a subset of TR response elements (TREs), composed of DR-4 sequences (47), as well as to compete with TR for binding to TREs (48). Finally, overexpression of Rev-erb α in mouse myoblasts leads to inhibition of muscle differentiation, possibly due to interference with thyroid hormone-induced muscle differentiation pathways (48). Interestingly, a significant level of cross-talk exists also between the peroxisome proliferator and thyroid hormone signaling pathways. Indeed, in rodents peroxisome proliferators and thyroid hormones often regulate the same target genes (49). In addition, certain of these genes have been shown to carry both TREs and PPREs (50, 51). Cross-talk between PPAR and TR may furthermore occur by competition for binding to DNA (52, 53) or for the common heterodimeric partner RXR (53–56), or by formation of PPAR:TR heterodimers, as has been suggested by one report (57). Our data identifying Rev-erb α as a fibrate target gene suggests another layer of cross-talk between the TR and PPAR

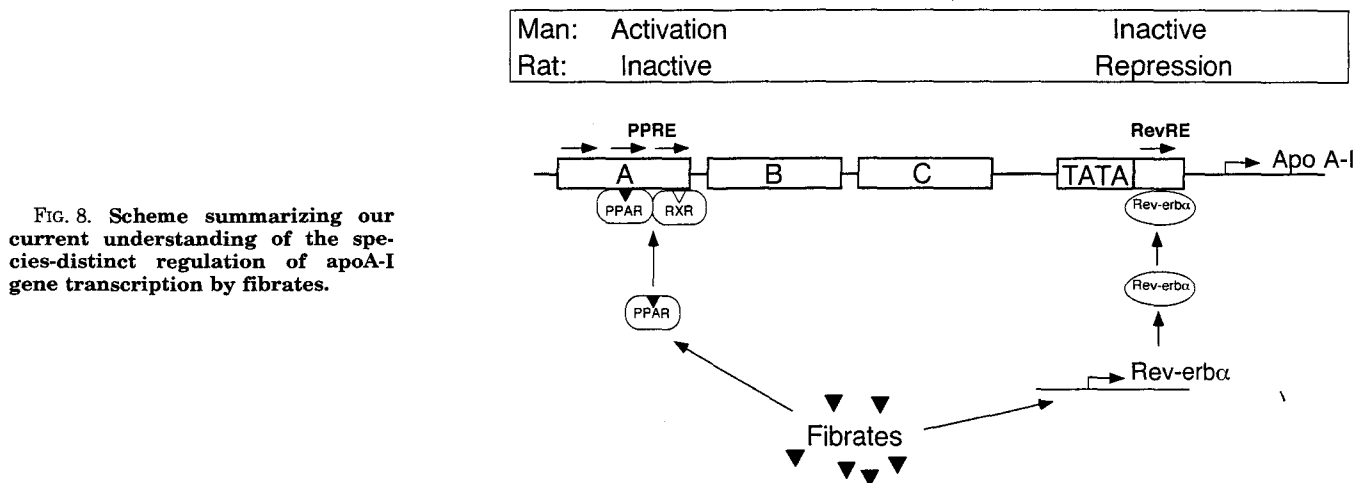


FIG. 8. Scheme summarizing our current understanding of the species-distinct regulation of apoA-I gene transcription by fibrates.

signaling pathways. Indeed it is conceivable that the induction of Rev-erb α expression after fibrates results in decreased TR α 2 mRNA levels, resulting both in a higher level of expression of functionally active TR α 1 as well as lower levels of the dominant negative TR α 2 protein, altogether leading to enhanced thyroid hormone action. Studies to test this hypothesis are currently underway in our laboratory.

The identification of the rat apoA-I gene, a major determinant of HDL metabolism, as a target for Rev-erb α , is the first demonstration of a role for this nuclear receptor in lipoprotein metabolism, albeit in rats. Although this site is not conserved in the human apoA-I gene, the fact that, both in rats (this study) and in man,² Rev-erb α expression is controlled by fibrates, which are major regulators of lipoprotein metabolism, points to a role for this nuclear receptor in lipoprotein metabolism and possibly atherogenesis. It will therefore be of interest to determine which human genes are regulated by Rev-erb α .

Rev-erb family members bind *in vitro* either to a monomeric half-site, to a subset of DR-2 (termed RevDR2) or to DR-4 TRE sequences (29–31, 36, 37, 47, 58, 59). In addition to the human Rev-erb α gene, which is negatively autoregulated by Rev-erb α binding to a RevDR2 sequence (36), the rat apoA-I gene is only the second natural Rev-erb α target gene identified to our knowledge. The Rev-erb α response element in the rat apoA-I promoter is composed of an AGGTCA half-site preceded by an AT-rich region consisting of the TATA box. Previously, it was suggested that Rev-erb α represses transcription only from RevDR2, but not from monomeric sites (31). Our results demonstrating that Rev-erb α represses transcription via a monomeric site, both in the context of the homologous as well as a heterologous promoter, suggest that Rev-erb α is also active on monomeric sites. Similarly, Rev-erb β actively represses transcription of the *N-myc* gene via a monomeric sequence (32). Active transcription repression by Rev-erb α may occur by recruiting nuclear receptor corepressors of the N-CoR family, which interact with the C terminus of Rev-erb α (34, 35). However, the truncated Rev-erb α 236 form (36), which lacks the N-CoR binding domains, also represses transcription, albeit to a smaller extent than wild-type Rev-erb α , suggesting that the repression of apoA-I transcription by Rev-erb α is due to a combination of both active and passive mechanisms. Passive transcriptional repression may occur by competition for binding of either TATA-box binding protein (TBP) to the TATA box or for positive transcription factors to the monomeric site.

Several lines of evidence point to a functional role for Rev-erb α in the transcriptional repression of rat apoA-I gene expression by fibrates. First, the repression of rat apoA-I expression by fibrates occurs at the transcriptional level (10). Second and in contrast to the induction by fibrates of direct PPAR-target genes, such as acyl-CoA oxidase, the repression of apoA-I gene expression is a relatively slow process requiring between 12 and 24 h, pointing to an indirect action of fibrates (60). Third, the Rev-erb α response element is only present in the rat, but not in the human, apoA-I promoter, which correlates well with the difference in response of human *versus* rat apoA-I gene expression to fibrates. Finally, Rev-erb α gene expression is only induced in the liver, but not in the intestine, and fibrates repress apoA-I gene expression only in rat liver, but not in intestine (10).

In addition to the rat apoA-I gene, fibrates have been shown to repress the transcription of a wide array of genes involved in lipid and energy metabolism, such as rat S14 (56), rat apoA-IV (61), rat lecithin:cholesterol acyltransferase (62), rat hepatic lipase (63), and the human, rat, and mouse apoC-III (4, 5, 64, 65) genes in liver. Furthermore, the antidiabetic thiazolidinediones, which are ligands for PPAR γ , have been shown to repress the transcription of the human and rat leptin genes in adipose tissue (66–69). Although the mechanism of positive regulation by fibrates via PPAR interacting with PPPE sequences in target gene promoters has been fairly well studied, relatively little is known about the mechanisms of negative transcriptional regulation by these agents. Since both apoC-III and apoA-I gene expression are increased in livers of PPAR α knock-out mice and since their expression is not repressed by fibrate treatment in the same mice (4), PPAR α expression appears to be required for the negative regulation by fibrates, at least with respect to the mouse apoA-I and apoC-III genes. A previous study indicated that fibrates may repress transcription of the human and rat apoC-III and rat transferrin genes in liver by down-regulating the expression of the strong positive transcription factor HNF-4 as well as by displacement of HNF-4 binding by non-productive PPAR/RXR heterodimers (5, 70). It is unlikely, however, that the repression of rat apoA-I gene transcription occurs through this mechanism. Indeed, we could not confirm any significant regulation of HNF-4 gene expression by fibrates, whereas both Rev-erb α and apoA-I mRNA levels changed much more pronouncedly in the livers of animals treated with all fibrates tested. Moreover, whereas HNF-4 is an important regulator of hepatic apoC-III gene transcription, this transcription factor appears of lesser importance

² N. Vu-Dac, S. Chopin-Delannoy, P. Gervois, E. Bonnelye, G. Martin, J.-C. Fruchart, V. Laudet, and B. Staels, manuscript in preparation.

for human apoA-I transcriptional regulation in HepG2 cells (71, 72). In addition, the role of HNF-4 in controlling rat apoA-I gene transcription is unclear, since HNF-4 may inhibit and activate its transcription via the A and C sites, respectively (73, 74). Finally, down-regulation of HNF-4 expression and competition for its binding would be expected to affect a wide array of genes in liver whose expression is controlled by HNF-4, such as human apoA-II and apoB (75). However, whereas apoB expression is unaffected by fibrates (10), human apoA-II gene expression is induced by fibrates via PPAR:RXR binding to the HNF-4 site (8). It is tempting to speculate that the induction of Rev-erb α expression by fibrates may be a general mechanism leading to the transcriptional repression of a certain number of genes. For instance, since Rev-erb α increases upon adipocyte differentiation (42), it will be of interest to determine whether this nuclear receptor also regulates the transcription of a number of genes in adipose tissue, such as possibly the leptin gene.

In conclusion, the species-distinct regulation of apoA-I gene expression by fibrates is linked to sequence differences in cis-acting elements (see Fig. 8 for overview). In man, apoA-I transcription is induced via PPAR α binding to a positive PPRE. This site is not conserved in rats resulting in the lack of binding of PPAR to the rat apoA-I promoter. In contrast, rat apoA-I transcription is repressed by Rev-erb α , whose expression is induced by fibrates and which binds to a RevRE site adjacent to the TATA box in the rat, but not in the human apoA-I promoter. These observations indicate that the expression of the transcription factor Rev-erb α may be under control not only by pharmacological, but also by dietary factors (such as fatty acids) as well as inflammatory cytokines (such as PG-J2 and LT-B4), which all bind to and activate PPARs (2, 3, 76–78). Altogether these observations suggest a role for the nuclear orphan receptor Rev-erb α in metabolic control.

Acknowledgments—We are grateful to A. Begue, B. Derudas, Y. Delplace, and O. Vidal for technical assistance, to V. Kosykh, Y. De Launoit, and M. Briggs for discussions, and to D. Stéhelin for support.

REFERENCES

1. Staels, B., and Auwerx, J. (1997) *Curr. Pharm. Des.* **3**, 1–14
2. Devchand, P. R., Keller, H., Peters, J. M., Vazquez, M., Gonzalez, F. J., and Wahli, W. (1996) *Nature* **384**, 39–43
3. Forman, B. M., Chen, J., and Evans, R. M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4312–4317
4. Peters, J. M., Hennuyer, N., Staels, B., Fruchart, J.-C., Fievet, C., Gonzalez, F. J., and Auwerx, J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 27307–27312
5. Hertz, R., Bishara-Shieban, J., and Bar-Tana, J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 13470–13475
6. Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A.-M., Heyman, R. A., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B., and Auwerx, J. (1996) *EMBO J.* **15**, 5336–5348
7. Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Laine, B., Fruchart, J.-C., Auwerx, J., and Staels, B. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 31012–31018
8. Vu-Dac, N., Schoonjans, K., Kosykh, V., Dallongeville, J., Fruchart, J.-C., Staels, B., and Auwerx, J. (1995) *J. Clin. Invest.* **96**, 741–750
9. Tikkanen, M. J. (1992) *Curr. Opin. Lipidol.* **3**, 29–33
10. Staels, B., Van Tol, A., Andreu, T., and Auwerx, J. (1992) *Arterioscler. Thromb.* **12**, 286–294
11. Tam, S.-P. (1991) *Atherosclerosis* **91**, 51–61
12. Jin, F.-Y., Kamanna, V. S., Chuang, M.-Y., Morgan, K., and Kashyap, M. L. (1996) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 1052–1062
13. Saku, K., Gartside, P. S., Hynd, B. A., and Kashyap, M. L. (1985) *J. Clin. Invest.* **75**, 1702–1712
14. Hahn, S. E., and Goldberg, D. M. (1992) *Biochem. Pharmacol.* **43**, 625–633
15. Berthou, L., Duverger, N., Emmanuel, F., Langouët, S., Auwerx, J., Guillouzo, A., Fruchart, J.-C., Rubin, E., Denèfle, P., Staels, B., and Branellec, D. (1996) *J. Clin. Invest.* **97**, 2408–2416
16. Schoonjans, K., Staels, B., and Auwerx, J. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1302**, 93–109
17. Li, A. P., Roque, M. A., Beck, D. J., and Kaminski, D. L. (1992) *J. Tissue Cult. Methods* **14**, 139–146
18. Lazar, M. A., Hodin, R. A., Darling, D. S., and Chin, W. W. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1128–1136
19. Sladek, F. M., Zhong, W., Lai, E., and Darnell, J. E. (1990) *Genes Dev.* **4**, 2353–2365
20. Masiakowski, P., Breathnach, R., Bloch, J., Gannon, F., Krust, A., and Chambon, P. (1982) *Nucleic Acids Res.* **10**, 7895–7903
21. Saladin, R., Vu-Dac, N., Fruchart, J.-C., Auwerx, J., and Staels, B. (1996) *Eur. J. Biochem.* **239**, 451–459
22. Kunkel, T. A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 488–492
23. Marsch, J. L., Erfle, M., and Wykes, E. J. (1984) *Gene (Amst.)* **32**, 481–485
24. Luckow, B., and Schütz, G. (1987) *Nucleic Acids Res.* **15**, 5490
25. Gorman, C. M., Moffat, L. F., and Howard, B. H. (1982) *Mol. Cell. Biol.* **2**, 1044–1051
26. Vanacker, J. M., Laudet, V., Adelmant, G., Stéhelin, D., and Rommelaere, J. (1993) *J. Virol.* **67**, 7668–7672
27. Quéva, C., Ness, S. A., Grässer, F. A., Graf, T., Vandembunder, B., and Stéhelin, D. (1992) *Development* **114**, 125–133
28. Vu-Dac, N., Gervois, P., Grötzinger, T., De Vos, P., Schoonjans, K., Fruchart, J.-C., Auwerx, J., Mariani, J., Tedgui, A., and Staels, B. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 22401–22404
29. Retnakaran, R., Flock, G., and Giguère, V. (1994) *Mol. Endocrinol.* **8**, 1234–1244
30. Forman, B. M., Chen, J., Blumberg, B., Kliewer, S. A., Henshaw, R., Ong, E. S., and Evans, R. M. (1994) *Mol. Endocrinol.* **8**, 1253–1260
31. Harding, H. P., and Lazar, M. A. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4791–4802
32. Dussault, I., and Giguère, V. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1860–1867
33. Miyajima, N., Horiuchi, R., Shibuya, Y., Fukushige, S.-i., Matsubara, K.-i., Toyoshima, K., and Yamamoto, T. (1989) *Cell* **57**, 31–39
34. Zamir, I., Harding, H. P., Atkins, G. B., Hörlein, A., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., and Lazar, M. A. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5458–5465
35. Downes, M., Burke, L. J., Bailey, P. J., and Muscat, G. E. O. (1996) *Nucleic Acids Res.* **24**, 4379–4386
36. Adelmant, G., Bègue, A., Stéhelin, D., and Laudet, V. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 3553–3558
37. Harding, H. P., and Lazar, M. A. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3113–3121
38. Miller, N. E., Forde, O. H., and Thelle, D. S. (1977) *Lancet* **1**, 965–968
39. Rubin, E. M., Krauss, R. M., Spangler, E. A., Verstuyft, J. G., and Clift, S. M. (1991) *Nature* **353**, 265–267
40. Lussier-Cacan, S., Bard, J.-M., Boulet, L., Nestruck, A. C., Grothé, A.-M., Fruchart, J.-C., and Davignon, J. (1989) *Atherosclerosis* **78**, 167–182
41. Laudet, V., and Adelmant, G. (1995) *Curr. Biol.* **5**, 124–127
42. Chawla, A., and Lazar, M. A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 16265–16269
43. Lazar, M. A., Jones, K. E., and Chin, W. W. (1990) *DNA Cell Biol.* **9**, 77–83
44. Laudet, V., Bègue, A., Henry-Dutoit, C., Joubel, A., Martin, P., Stéhelin, D., and Saule, S. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 1105–1112
45. Lazar, M. A., Hodin, R. A., Cardona, G., and Chin, W. W. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 12859–12863
46. Munroe, S. H., and Lazar, M. A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 22083–22086
47. Spanjaard, R. A., Nguyen, V. P., and Chin, W. W. (1994) *Mol. Endocrinol.* **8**, 286–295
48. Downes, M., Carozzi, A. J., and Muscat, G. E. O. (1995) *Mol. Endocrinol.* **9**, 1666–1678
49. Hertz, R., Kalderon, B., and Bar-Tana, J. (1993) *Biochimie (Paris)* **75**, 257–261
50. Castellein, H., Gulick, T., Declercq, P. E., Mannaerts, G. P., Moore, D. D., and Baes, M. E. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 26754–26758
51. Hertz, R., Nikodem, V., Ben-Ishai, A., Berman, I., and Bar-Tana, J. (1996) *Biochem. J.* **319**, 241–248
52. Miyamoto, T., Kaneko, A., Kakizawa, T., Yajima, H., Kamijo, K., Sekino, R., Hiramatsu, K., Nishii, Y., Hashimoto, T., and Hashizume, K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 7752–7758
53. Hunter, J., Kassam, A., Winrow, C. J., Rachubinski, R. A., and Capone, J. P. (1996) *Mol. Cell. Endocrinol.* **116**, 213–221
54. Juge-Aubry, C. E., Gorla-Bajszczak, A., Pernin, A., Lemberger, T., Wahli, W., Burger, A. G., and Meier, C. A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 18117–18122
55. Chu, R., Madison, L. D., Lin, Y., Kopp, P., Rao, M. S., Jameson, J. L., and Reddy, J. K. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 11593–11597
56. Ren, B., Thelen, A., and Jump, D. B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 17167–17173
57. Bogazzi, F., Hudson, L. D., and Nikodem, V. M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 11683–11686
58. Dumas, B., Harding, H. P., Choi, H. S., Lehmann, K. A., Chung, M., Lazar, M. A., and Moore, D. D. (1994) *Mol. Endocrinol.* **8**, 996–1005
59. Bonnelye, E., Vanacker, J. M., Desbiens, X., Bègue, A., Stéhelin, D., and Laudet, V. (1994) *Cell Growth Differ.* **5**, 1357–1365
60. Berthou, L., Saladin, R., Yaqoob, P., Branellec, D., Calder, P., Fruchart, J. C., Deneffe, P., Auwerx, J., and Staels, B. (1995) *Eur. J. Biochem.* **232**, 179–187
61. Staels, B., van Tol, A., Verhoeven, G., and Auwerx, J. (1990) *Endocrinology* **126**, 2153–2163
62. Staels, B., van Tol, A., Skretting, G., and Auwerx, J. (1992) *J. Lipid Res.* **33**, 727–735
63. Staels, B., Peinado-Onsurbe, J., and Auwerx, J. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1123**, 227–230
64. Staels, B., Vu-Dac, N., Kosykh, V. A., Saladin, R., Fruchart, J. C., Dallongeville, J., and Auwerx, J. (1995) *J. Clin. Invest.* **95**, 705–712
65. Haubenwallner, S., Essenburg, A. D., Barnett, B. C., Pape, M. E., DeMattos, R. B., Krause, B. R., Minton, L. L., Auerbach, B. J., Newton, R. S., Leff, T., and Bisgaier, C. L. (1995) *J. Lipid Res.* **36**, 2541–2551
66. De Vos, P., Lefebvre, A. M., Miller, S. G., Guerre-Millo, M., Wong, K., Saladin, R., Hamann, L., Staels, B., Briggs, M. R., and Auwerx, J. (1996) *J. Clin. Invest.* **98**, 1004–1009
67. Zhang, B., Graziano, M. P., Doeber, T. W., Leibowitz, M. D., White-Carrington, S., Szalkowski, D. M., Hey, P. T., Wu, M., Cullinan, C. A., Bailey, P., Lollmann, B., Frederick, R., Flier, J. S., Strader, C. D., and Smith, R. G. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 9455–9459
68. Kallen, C. B., and Lazar, M. A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 5793–5796
69. Hollenberg, A. N., Susulic, V. S., Madura, J. P., Zhang, B., Moller, D. E., Tontonez, P., Sarraf, P., Spiegelman, B. M., and Lowell, B. B. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 5283–5290
70. Hertz, R., Seckbach, M., Zakin, M. M., and Bar-Tana, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 218–224
71. Fraser, J. D., Keller, D., Martinez, V., Santiso-Mere, D., Straney, R., and

- Briggs, M. R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 13892-13898
72. Ginsburg, G. S., Ozer, J., and Karathanasis, S. K. (1995) *J. Clin. Invest.* **96**, 528-538
73. Chan, J., Nakabayashi, H., and Wong, N. C. W. (1993) *Nucleic Acids Res.* **21**, 1205-1211
74. Murao, K., Bassyouni, H., Taylor, A. H., Wanke, I. E., and Wong, N. C. W. (1997) *Biochemistry* **36**, 301-306
75. Ladias, J. A. A., Hadzopoulou-Cladaras, M., Kardassis, D., Cardot, P., Cheng, J., Zannis, V., and Cladaras, C. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 15849-15860
76. Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M., and Evans, R. M. (1995) *Cell* **83**, 803-812
77. Kliewer, S. A., Lenhard, J. M., Willson, T. M., Patel, I., Morris, D. C., and Lehman, J. M. (1995) *Cell* **83**, 813-819
78. Kliewer, S. A., Sundseth, S. S., Jones, S. A., Brown, P. J., Wisely, G. B., Koble, C. S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T. M., Lenhard, J. M., and Lehmann, J. M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4318-4323

C- Discussion

Les fibrates influencent l'expression du gène de l'apolipoprotéine AI, constituant majeur des lipoprotéines de hautes densités, de façon opposée entre l'homme et les rongeurs. Nous avons donc voulu comprendre comment les fibrates diminuent l'expression de l'apo AI chez le rat.

L'activation de cette expression chez l'homme est due à la présence d'un élément de réponse au PPAR dans le gène de l'apo AI. L'alignement de séquence entre l'homme et le rat de la région contenant le PPRE montre que cet élément de réponse n'est pas présent dans le promoteur de l'apo AI de rat à cause d'une différence de trois nucléotides. Les tests d'activité transcriptionnelle indiquent que cette région du promoteur chez le rat n'est pas activée par PPAR, et que l'hétérodimère RXR-PPAR ne se fixe pas sur le PPRE muté de rat. De plus le promoteur de l'apo AI de rat possède un élément de réponse à Rev-erb α (RevRE) au niveau de la boîte TATA. Ce RevRE est muté chez l'homme. Le récepteur Rev-erb α est un répresseur de la transcription, et nous avons montré qu'il est capable de réprimer le gène de l'apo AI de rat et de se fixer directement sur le RevRE identifié. De plus, lorsque l'on traite des rats aux fibrates, nous observons dans le foie une induction de l'expression du gène de Rev-erb α de façon dose dépendante, ainsi qu'une répression dose dépendante du gène de l'apo AI. Toutes ces observations convergent vers l'idée que Rev-erb α est responsable de la répression du gène de l'apo AI par les fibrates chez le rat.

1- Régulation de l'expression du gène de l'apo AI chez l'homme et le rat

Chez l'homme, le promoteur de l'apo AI possède un PPRE. Par contre ce promoteur ne possède pas d'élément de réponse pour le répresseur transcriptionnel Rev-erb α . Chez le rat, ce PPRE n'est pas fonctionnel, et il existe un RevRE. Par conséquent, l'opposition de régulation de l'expression du gène de l'apo AI entre le rat et l'homme par les fibrates est due à une combinaison de deux mécanismes distincts impliquant des éléments de réponse : l'un liant PPAR α et l'autre liant Rev-erb α . Cette différence entre ces deux espèces est due à la séquence de leur propre promoteur qui sont différentes que de quelques nucléotides : trois dans le PPRE

et trois dans le RevRE. Cet exemple illustre bien le fait que les promoteurs et leurs séquences peuvent jouer un rôle important dans l'évolution des organismes.

2- Chez le rat, l'apo AI est un gène cible de Rev-erb α

L'identification du gène de l'apo AI de rat, déterminant majeur des HDL, comme gène cible de Rev-erb α est la première démonstration du rôle de ce récepteur nucléaire orphelin dans une fonction physiologique : le métabolisme lipidique. En effet, jusqu'à présent aucun gène cible n'était connu pour Rev-erb α , autre que son propre gène (Adelmant *et al.*, 1996). Les seules données sur l'hypothèse d'un rôle biologique de Rev-erb α viennent de l'étude de la variation de l'expression de son gène lors de la différenciation adipocytaire et musculaire, ainsi que dans le rythme circadien (Chawla et Lazar, 1993; Downes *et al.*, 1995; Balsalobre *et al.*, 1998). Mais ces observations indirectes n'indiquent pas clairement le rôle de Rev-erb α dans ces mécanismes.

Les souris transgéniques pour le gène de l'apo AI humain ont un taux des HDL élevé par rapport aux souris non transgéniques, et elles présentent une résistance au développement de l'athérosclérose (revue de Breslow, 1993). Par conséquent, chez les rongeurs, la présence d'apo AI diminue le risque d'athérosclérose. Le récepteur Rev-erb α est un répresseur du gène de l'apo AI chez le rat. De ce fait il joue probablement un rôle important dans le développement de la maladie chez le rat, hélas sans doute pas chez l'homme.

Rev-erb α est un récepteur nucléaire qui a la capacité de fixer l'ADN non seulement sous forme d'homodimère mais aussi sous forme de monomère (Harding et Lazar, 1995; Adelmant *et al.*, 1996). Il est clair que Rev-erb α est capable de réprimer la transcription sous forme d'homodimère sur un RevDR2. D'ailleurs son premier élément de réponse naturel découvert dans son propre promoteur est un RevDR2. Cependant, en ce qui concerne l'activité transcriptionnelle du monomère Rev-erb α , deux travaux sont en opposition : sur un élément de réponse monomérique (RevRE), Harding et Lazar (1995) montrent que Rev-erb α ne réprime pas, alors que Adelmant *et al.* au laboratoire (1996) montrent qu'il est capable de réprimer. Or l'élément de réponse de Rev-erb α sur le promoteur de l'apo AI de rat est un RevRE, ce qui

semble donc indiquer que Rev-erb α est aussi capable de réprimer activement la transcription *via* un élément de réponse monomérique.

Ce RevRE a tout d'abord été décrit comme l'élément de réponse de ROR α , et ROR α active le promoteur de l'apo AI dans l'intestin de rat (Vu-Dac *et al.*, 1997). Par conséquent, l'effet négatif de Rev-erb α sur la transcription du gène de l'apo AI dans le foie de rat pourrait être du à la compétition de fixation entre Rev-erb α et ROR α . Par ailleurs, le RevRE est au niveau de la boîte TATA, il peut y avoir une compétition entre Rev-erb α et les protéines fixant la boîte TATA (TBP) ce qui pourrait aussi expliquer le mécanisme passif répressif de Rev-erb α .

La fonction de répression transcriptionnelle de Rev-erb α est dans le domaine E, et la délétion de ce domaine donne un mutant incapable de réprimer mais qui se fixe toujours sur un RevRE (Downes *et al.*, 1996a; Adelmant *et al.*, 1996). Le fait qu'à de faibles concentrations le mutant n'induit pas la répression du gène de l'apo AI indique que l'effet répressif de Rev-erb α dans les mêmes concentrations est un mécanisme actif du récepteur. Et le fait qu'à de fortes concentrations le mutant réprime la transcription, montre que cette répression passe aussi par un mécanisme passif du récepteur. Ce dernier mécanisme peut se situer au niveau du RevRE par compétition de fixation à l'ADN avec un facteur de transcription qui reconnaît ce même site monomérique, ou dont son élément de réponse chevauche celui de RevRE.

3- Rev-erb α est-il responsable de tous les effets répresseurs des fibrates?

Les fibrates sont capables de réprimer la transcription de différents gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et énergétique : l'apo AIV, la lipase hépatique de rat et l'apo CIII (Staels *et al.*, 1992; Peters *et al.*, 1997). Par ailleurs, dans les souris dont le gène de PPAR α a été inactivé, l'expression de l'apo CIII et de l'apo AI augmente dans le foie par rapport aux souris normales (Peters *et al.*, 1997). De plus, leur expression dans les souris PPAR α *-/-* n'est plus réprimée lors d'un traitement aux fibrates. Par conséquent, PPAR α semble être nécessaire dans la régulation négative des fibrates pour les gènes de l'apo AI et l'apo CIII. En ce qui concerne l'apo CIII, chez le rat, la diminution de son taux plasmatique est due à une répression transcriptionnelle de son gène (Hertz *et al.*, 1995). Le récepteur orphelin HNF4 active l'expression de l'apo CIII, et lorsque l'on traite aux fibrates l'expression de HNF4 diminue

aussi. Par conséquent, la diminution de l'expression de l'apo CIII par les fibrates semble être due à la diminution de l'expression de son activateur transcriptionnel HNF4. Nous pouvons donc penser que Rev-erb α n'est pas le médiateur de tous les effets répresseurs des fibrates.

II- Article 2 : Fibrates increase human Rev-erb α expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element

A- Introduction

Le récepteur PPAR sert de médiateur entre l'action des fibrates et le métabolisme lipidique grâce à son élément de réponse PPRE. Ce PPRE a été identifié dans le promoteur des gènes qui sont régulés positivement par PPAR. Par contre le mécanisme de répression de la transcription par les fibrates n'est pas clair

Chez les souris déficientes pour le récepteur PPAR α , on observe une augmentation de l'expression du gène de l'apolipoprotéine AI et du gène de l'apolipoprotéine CIII (Peters *et al.*, 1997). Par ailleurs, lorsque ces souris déficientes pour PPAR α sont traitées aux fibrates, on n'observe pas de variation de la transcription de ces deux gènes alors que chez les souris normales ces deux gènes sont réprimés. Il semblerait donc que PPAR α soit un médiateur de la répression de ces gènes par les fibrates.

Nous avons montré dans l'étude précédente, que les fibrates réprime la transcription indirectement en induisant l'expression de facteur de transcription répresseur. En effet, le gène de l'apolipoprotéine AI de rat est réprimé par le récepteur nucléaire orphelin Rev-erb α (Vu-Dac *et al.*, 1998). De plus l'expression de Rev-erb α dans le foie de rat est induite par les fibrates, indiquant qu'il peut être un médiateur de la répression transcriptionnelle des fibrates.

Nous avons donc recherché le mécanisme moléculaire expliquant comment les fibrates induisent le gène Rev-erb α . Or le promoteur de Rev-erb α n'est connu que chez l'homme et nous avons donc du déterminer si les fibrates sont aussi capables d'induire l'expression de Rev-erb α chez l'homme. Etant donné que les fibrates activent la transcription de Rev-erb α dans les hépatocytes humain, nous avons pu étudier le mécanisme de régulation du gène de *Rev-erba* chez l'homme, notamment en testant l'effet transcriptionnel de PPAR α sur ce gène.

B- Résultats

Fibrates Increase Human REV-ERB α Expression in Liver via a Novel Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Response Element

Philippe Gervois*, Sandrine Chopin-Delannoy*, Abdessamad Fadel, Guillaume Dubois, Vladimir Kosykh, Jean-Charles Fruchart, Jamila Najib, Vincent Laudet, and Bart Staels

U.325 INSERM

Département d'Athérosclérose (P.G., A.F., G.D., J.-C.F., J.N., B.S.)
Institut Pasteur de Lille and
The Faculté de Pharmacie
Université de Lille II
59019 Lille, France

Endocrino's Group (S.C.-D.)
CNRS UMR 319
Institut de Biologie de Lille
59019 Lille, France

Cardiology Research Complex (V.K.)
721552 Moscow, Russia

E.N.S. (V.L.)
69364 Lyon cedex 07, France

Fibrates are widely used hypolipidemic drugs that act by modulating the expression of genes involved in lipid and lipoprotein metabolism. Whereas the activation of gene transcription by fibrates occurs via the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) interacting with response elements consisting of a direct repeat of the AGGTCA motif spaced by one nucleotide (DR1), the mechanisms of negative gene regulation by fibrates and PPAR α are largely unknown. In the present study, we demonstrate that fibrates induce the expression of the nuclear receptor Rev-erb α , a negative regulator of gene transcription. Fibrates increase Rev-erb α mRNA levels both in primary human hepatocytes and in HepG2 hepatoblastoma cells. In HepG2 cells, fibrates furthermore induce Rev-erb α protein synthesis rates. Transfection studies with reporter constructs driven by the human Rev-erb α promoter revealed that fibrates induce Rev-erb α expression at the transcriptional level via PPAR α . Site-directed mutagenesis experiments identified a PPAR response element that coincides with the previously identified Rev-erb α

negative autoregulatory Rev-DR2 element. Electromobility shift assay experiments indicated that PPAR α binds as heterodimer with 9-*cis*-retinoic acid receptor to a subset of DR2 elements 5' flanked by an A/T-rich sequence such as in the Rev-DR2. PPAR α and Rev-erb α bind with similar affinities to the Rev-DR2 site. In conclusion, these data demonstrate human Rev-erb α as a PPAR α target gene and identify a subset of DR2 sites as novel PPAR α response elements. Finally, the PPAR α and Rev-erb α signaling pathways cross-talk through competition for binding to those response elements. (*Molecular Endocrinology* 13: 400-409, 1999)

INTRODUCTION

Fibrates are hypolipidemic drugs that lower plasma cholesterol and triglycerides (1). Fibrates exert their effects primarily via the liver by regulating the expression of several genes implicated in lipid metabolism. On the one hand, fibrates stimulate the expression of the human apo A-I (2), rat lipoprotein lipase (3), rat acyl-CoA synthetase (4), rat acyl-CoA oxidase (5), rat multifunctional enzyme (6), and human muscle-type

carnitine palmitoyltransferase I (7) genes in the liver. On the other hand, fibrates repress the expression of the rat apo A-I (8), rat apo A-IV (9), human, rat, and mouse apo C-III (10–13), rat hepatic lipase (14), and rat lecithin-cholesterol acyl transferase (15) genes in the liver. Fibrates have been shown to activate specific receptors, termed peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), belonging to the nuclear receptor gene superfamily (16–18). So far, three different PPAR forms, α , β (δ), and γ , have been identified, of which the PPAR α form mediates the effects of fibrates on liver gene expression (13, 19). After activation, PPARs heterodimerize with the 9-*cis*-retinoic acid receptor (RXR) and subsequently bind to DNA on specific response elements termed peroxisome proliferator response elements (PPRE), located in regulatory regions of target genes, thereby modulating their transcriptional activity. All PPREs identified so far consist of the juxtaposition of two derivatives of the canonical hexamer sequence PuGGTCA spaced by one nucleotide and commonly called direct repeat 1 (DR1).

Whereas PPAR α mediates fibrate action on lipoprotein metabolism through PPREs identified in the regulatory sequences of positively regulated genes, the mechanisms of negative gene regulation by fibrates are unclear. Studies using PPAR α knockout mice demonstrated that PPAR α is a mediator of the negative regulation by fibrates, at least with respect to the mouse apo A-I and apo C-III genes (13). Fibrates may repress transcription by interfering negatively with the expression and activity of positive transcription factors, such as hepatocyte nuclear factor-4 (HNF-4) (11, 20). However, not all fibrate-regulated genes are under transcriptional control by HNF-4. For instance, although fibrates repress rat apo A-I gene transcription, HNF-4 is not considered to be a major regulator of apo A-I gene transcription (21, 22). Alternatively, fibrates may actively repress transcription by activating a negative transcription factor. Interestingly, we recently identified in the rat apo A-I gene promoter a response element for the nuclear receptor Rev-erb α , an orphan receptor of the nuclear receptor family that acts as a negative transcription factor (23). Furthermore, we have shown that Rev-erb α gene expression is induced by fibrates in rat liver, indicating that Rev-erb α may be a mediator of negative gene transcription by fibrates.

The goal of the present study was to determine whether fibrates also regulate human Rev-erb α expression and to investigate the molecular mechanisms involved. Our results demonstrate that fibrates increase Rev-erb α expression in human hepatocytes and in HepG2 cells. Furthermore, we show that the induction of Rev-erb α gene expression occurs at the transcriptional level in hepatocytes and is mediated by PPAR α . Finally, we demonstrate that PPAR α binds to a DR2 site coinciding with the Rev-DR2 site in the human Rev-erb α promoter (24), which constitutes a novel PPAR α response element mediating a cross-talk between the PPAR α and Rev-erb α pathways.

RESULTS

Fibrates Increase Rev-erb α mRNA Expression and Protein Synthesis in Human Liver Cells

The regulation of Rev-erb α by fibrates was analyzed in human primary hepatocytes. Treatment of cells with fenofibric acid or Wy 14,643 induced a pronounced increase of Rev-erb α mRNA levels, whereas control 36B4 mRNA levels did not change (Fig. 1A). In addition, in HepG2 cells treatment with Wy 14,643 increased Rev-erb α mRNA levels in a dose-dependent fashion (Fig. 1B). To analyze whether the induction of Rev-erb α mRNA by fibrates is associated with increased synthesis of Rev-erb α protein, HepG2 cells were cultured for 24 h in the presence of Wy 14,643 or vehicle, labeled with ³⁵S-methionine, and Rev-erb α was subsequently immunoprecipitated. Compared with control, treatment with Wy 14,643 resulted in a significant increase in Rev-erb α protein synthesis (Fig. 1C). By contrast, as a control, apolipoprotein E secretion was not influenced by fibrate treatment (data not shown). These experiments demonstrate that fibrates increase Rev-erb α mRNA levels as well as protein synthesis in human hepatocytes.

Fibrate Induction of Rev-erb α Gene Expression Occurs at the Transcriptional Level via PPAR α Interacting with the Rev-DR2 Site of the Human Rev-erb α Promoter

To investigate whether the effect of fibrates on Rev-erb α expression occurred at the transcriptional level, the 1.7 kb containing Rev-erb α promoter was transiently transfected in HepG2 cells in the presence of a human PPAR α expression vector (pSG5hPPAR α) or empty vector (pSG5) (Fig. 2A). Rev-erb α promoter-driven luciferase activity increased significantly after cotransfection with PPAR α , an effect that was increased in the presence of fenofibric acid (Fig. 2A), indicating that Rev-erb α gene transcription is increased by PPAR α . Two putative nuclear receptor-binding sites containing AGGTCA-like motifs were previously identified in the human Rev-erb α promoter and called distal (Rd) and proximal sites (Rp) (24). To delineate whether one of these putative binding sites mediated PPAR α transactivation, unilateral deletion and site-directed mutagenesis experiments were performed. Hence, a 0.7-kb 5'-deletion of the Rev-erb α promoter containing only the Rp site was transfected in the presence or absence of human PPAR α (Fig. 2A). This deleted Rev-erb α promoter construct was induced by PPAR α . Since both the 1.7-kb and 0.7-kb Rev-erb α promoter constructs responded to the same extent to PPAR α , we hypothesized the existence of a PPRE located near the Rp site of the human Rev-erb α promoter (24). Thus, to determine the role of this site in the transcriptional regulation of Rev-erb α

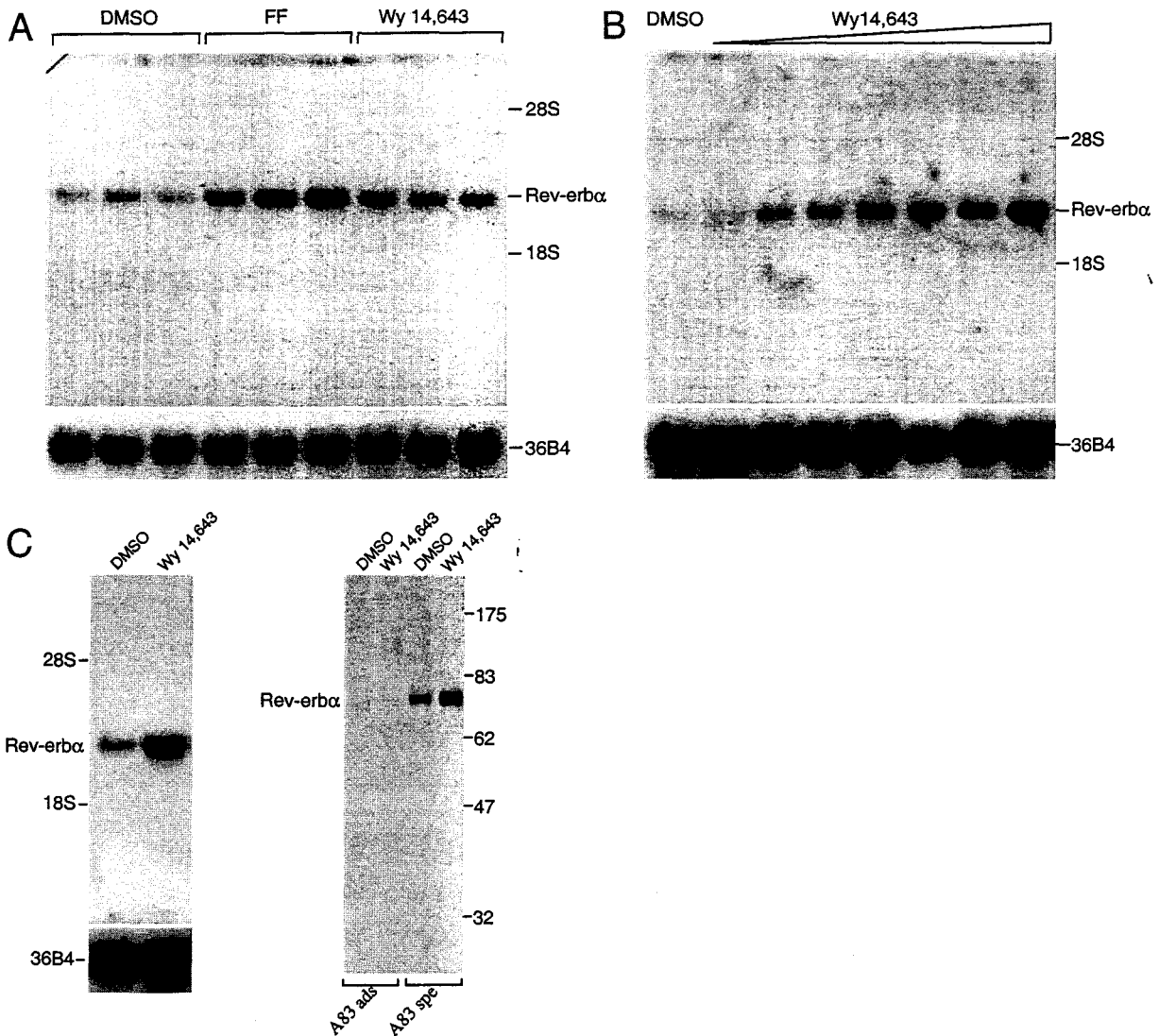


Fig. 1. Fibrates Increase Rev-erb α mRNA Expression and Protein Synthesis in Primary Human Hepatocytes and HepG2 Cells
Total RNA (10 μ g) was subjected to Northern blot analysis using hRev-erb α (top panel) or 36B4 (bottom panel) cDNA probes as described in *Materials and Methods*. A, Human hepatocytes were isolated and treated for 24 h with 100 μ M fenofibric acid, 50 μ M Wy 14,643, or vehicle (DMSO). B, HepG2 cells were treated for 24 h with increasing concentrations of Wy 14,643 (0, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 500 μ M). C, HepG2 cells were treated for 24 h with 500 μ M Wy 14,643 or DMSO. Left, RNA analysis from the same plates used for immunoprecipitation experiments. Right, Cell lysates were subjected to immunoprecipitation using serum depleted of anti-Rev-erb α antibody (A83 ads) or polyclonal anti-Rev-erb α antibody (A83 spe) as described in *Materials and Methods*.

by PPAR α , we explored the influence of PPAR α on various mutations around this region (Fig. 2A). Mutations affecting either the 5'-AGGTCA motif (pGL2hRev-erb α Δ) or the A/T-rich region (pGL2hRev-erb α CCC) of the Rp site resulted not only in a loss of Rev-erb α promoter inducibility by PPAR α , but also in an increase in baseline reporter activity (Fig. 2A). These results indicate that the PPAR α response element colocalizes with the proximal Rev-erb α binding site, referred to as Rev-DR2 (24).

To ascertain that the Rev-DR2 site could function as a PPAR-responsive element, we performed tran-

sient transfection experiments using wild-type and mutated versions of the Rev-DR2 site cloned in front of the heterologous SV40 promoter (Rev-DR2 SV40, M5'Rev-DR2 SV40, and M3'Rev-DR2 SV40) (Fig. 2B). Upon cotransfection with pSG5hPPAR α in HepG2 cells, it was evident that the Rev-DR2 could transmit PPAR α responsiveness to the heterologous SV40 promoter, an effect that was enhanced in the presence of fenofibric acid. By contrast, PPAR α did not activate the SV40 promoter. Furthermore, PPAR α did not induce the activity of the SV40 promoter driven by the Rev-DR2 site mutated in its 5'-half-site (Fig. 2B), confirming the importance of

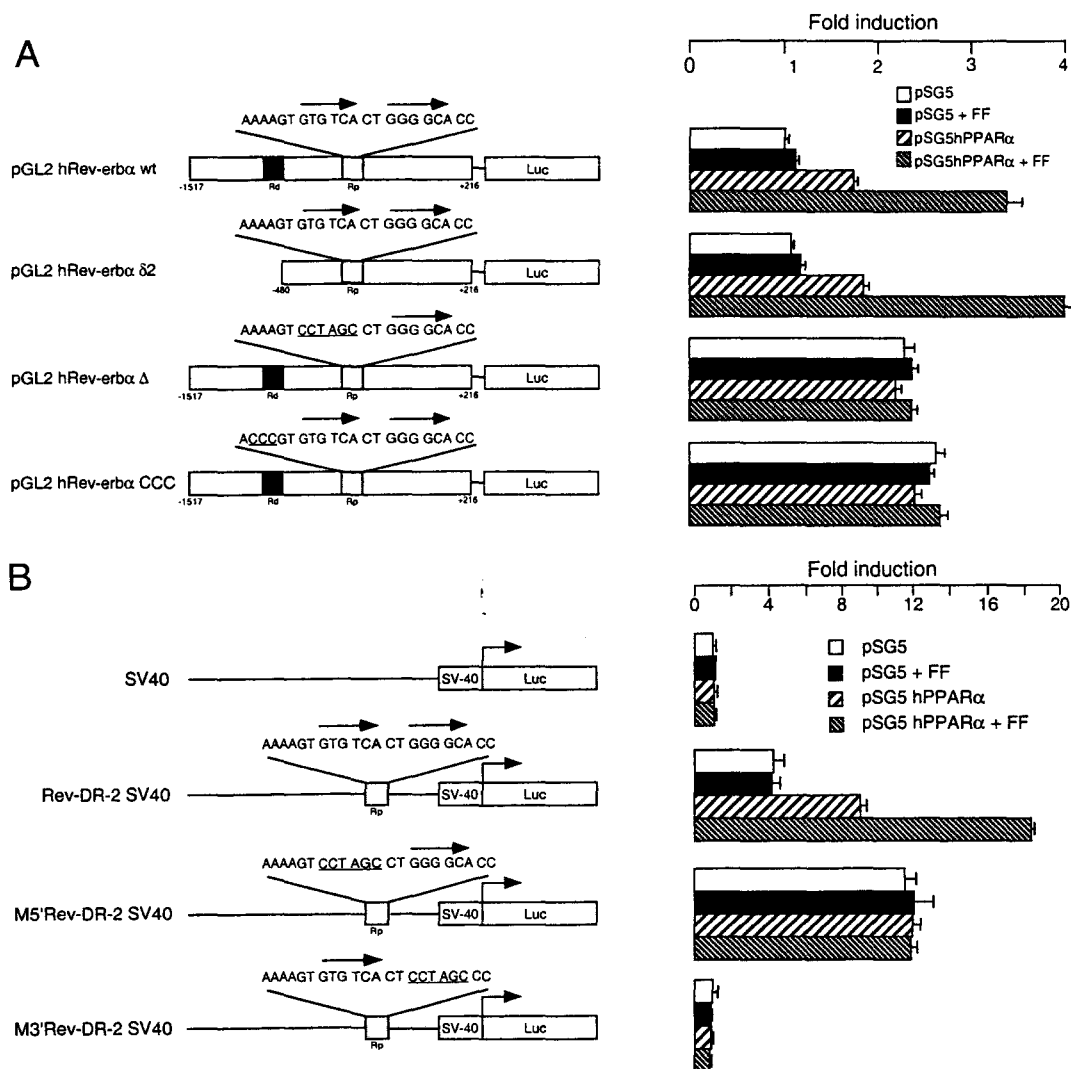


Fig. 2. Fibrate Induction of Rev-erb α Gene Expression Occurs at the Transcriptional Level via PPAR α Interacting with the Rev-DR2 Site of the Human Rev-erb α Promoter

A, Effects of PPAR α on the expression of human Rev-erb α promoter containing a wild-type or mutated Rev-DR2. B, Effects of PPAR α on wild-type or mutated human Rev-erb α Rev-DR2 cloned in two copies upstream of the heterologous SV40 promoter. Luc, luciferase reporter gene. HepG2 cells were transfected with the indicated reporter constructs, in the presence of cotransfected pSG5hPPAR α or pSG5 vector. Cells were treated with fenofibric acid (FF) (10 μ M) or vehicle (DMSO), and luciferase activity was measured as described in *Materials and Methods*. The Rev-DR2 half-site direct repeat sequences are indicated by *arrows*. Rd and Rp putative nuclear receptor-binding sites are shown as *solid and shaded boxes*, respectively. The mutated nucleotides in the Rp site are *underlined*.

this motif in the structure of the PPAR α -responsive element. Interestingly, mutation of the 3'-half-site of the DR2 also abolished transactivation by PPAR α (Fig. 2B), indicating that the 3'-AGGTCA half-site is also implicated in mediating induction of human Rev-erb α gene transcription by PPAR α . Taken together, these data strongly argue that the human Rev-erb α promoter contains a bona fide PPAR-responsive element that coincides with the Rev-DR2 site, which is constituted of two AGGTCA motifs separated by two nucleotides (DR2) and 5'-flanked by an A/T-rich region (Rev-DR2).

PPAR Binds as a Heterodimer with RXR to a DR2 Site Containing an A/T-Rich 5'-Flanking Region, but Not to a Standard DR2 Site

To investigate direct interaction of PPAR α with the Rev-DR2 site, we performed electromobility shift assays (EMSA) using *in vitro* synthesized PPAR α and RXR α protein. RXR α or PPAR α alone did not bind to the Rev-DR2 site oligonucleotides (Fig. 3B, lanes 10–12 and 14 and lanes 15–17 and 19). Furthermore, PPAR α did not bind to an oligonucleotide containing a monomer binding site for Rev-erb α (G8A) (Fig. 3B, lane

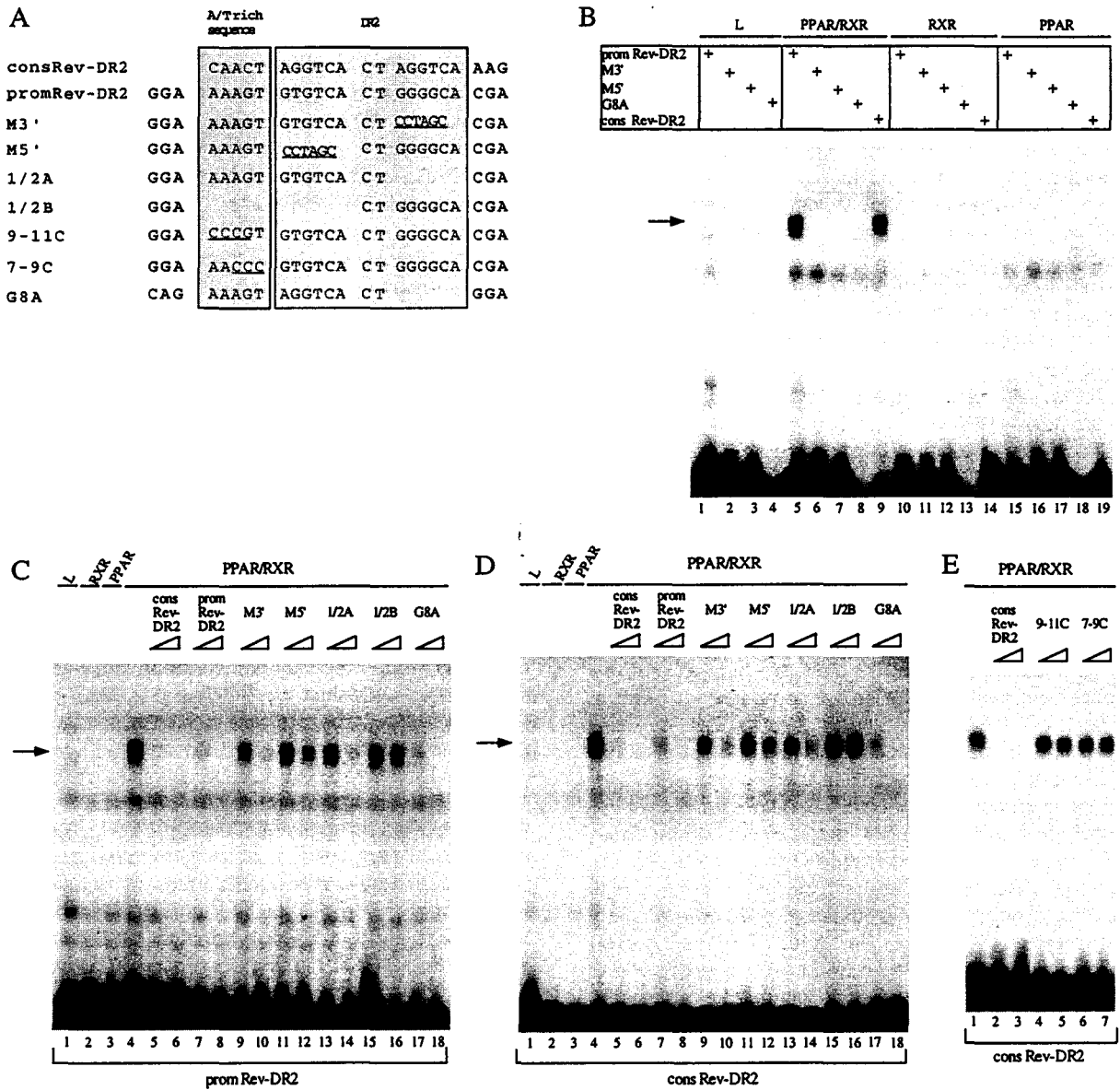


Fig. 3. PPAR α Binds as a Heterodimer with RXR α to a DR2 Site Containing an A/T-Rich 5'-Flanking Region, but Not to a Standard DR2 Site

A, Sequences of the different response elements used as probes or as competitors. The 5'-flanking A/T-rich region and half-site sequences are indicated. The mutated sequences are *underlined*. B, Gel retardation assays were performed on the indicated end-labeled oligonucleotides in the presence of *in vitro* translated hPPAR α and mRXR α or unprogrammed lysate (Unprog. L) (B-E). Competition experiments for binding of PPAR α /RXR α to the human Rev-erb α promoter Rev-DR2 (prom Rev-DR2) (C) or consensus Rev-DR2 (cons Rev-DR2) (D) and (E) oligonucleotides were performed with 10- and 100-fold molar excess of indicated cold oligonucleotide. PPAR/RXR heterodimer or Rev-erb α complexes are indicated by *arrows*.

18) (24), indicating that PPAR α cannot bind as a monomer. By contrast, binding was observed when PPAR α was incubated in the presence of RXR with the Rev-erb α promoter Rev-DR2 as well as the consensus Rev-DR2 sites (direct repetition of the AGGTCA motif separated by two nucleotides), which both contain an A/T-rich region at their 5'-extremities (Fig. 3B, lanes 5 and 9). This binding was specific since it was competed out by excess of unlabeled oligonucleotide (Fig. 3, panel C, lanes 4-8, and panel D, lanes 4-8).

Next, we characterized the structural requirements for PPAR/RXR binding by performing competition EMSAs on the promoter (Fig. 3C) as well as on the consensus (Fig. 3D) oligonucleotides. PPAR/RXR binding to wild-type promoter Rev-DR2 (Fig. 3C, lane 4) or to consensus Rev-DR2 (Fig. 3D, lane 4) oligonucleotides could not be competed either by the promoter Rev-DR2 site carrying a mutation in the 5'-half-site (M5') (24) or in the 3'-half-site (M3') (Fig. 3, C and D, lanes 9, 11, and 12). Interestingly, at high excess (100-fold) of

competitor, the 3'-half-site-mutated oligonucleotide started competing for PPAR/RXR binding, indicating that the 3'-part of the Rev-DR2 site is of lesser importance (Fig. 3, C and D, lane 10). Similar results were obtained with an oligonucleotide containing the promoter Rev-DR2 site completely lacking the second half-site (1/2A) (Fig. 3, C and D, lanes 13 and 14), whereas an oligonucleotide lacking the promoter Rev-DR2 A/T-rich sequence and 5'-half-site (1/2B) did not compete at all (Fig. 3, C and D, lanes 15 and 16). These results indicate that 5'- and 3'-half-sites are both implicated in PPAR/RXR binding, with the 5'-half-site, to which PPAR α presumably binds (25), being most important.

To investigate the role of the 5'-A/T-rich flanking sequence in PPAR/RXR binding to a DR2 site, competition experiments were performed with oligonucleotides in which the 5'-flanking sequence was substituted by C nucleotides (9-11C and 7-9C; Fig. 3A). Neither 9-11C nor 7-9C oligonucleotides competed for PPAR/RXR binding to the consensus Rev-DR2 sequence (Fig. 3E), indicating absolute requirement of the 5'-A/T-rich flanking sequence for PPAR/RXR binding to a DR2 site.

To ensure that Rev-DR2 sites are high-affinity response elements for PPAR α , we compared the relative affinities of PPAR/RXR binding to either DR1 or Rev-DR2 sites by competition EMSA (Fig. 4). Using oligonucleotides labeled to similar specific activities and under identical experimental conditions, a higher intensity shift with PPAR/RXR was obtained on the Rev-DR2 oligonucleotide compared with the naturally occurring DR1 PPARE site of the human apo A-II promoter, which has been shown to drive its regulation by fibrates (26) (Fig. 4, lanes 1 and 10). When increasing amounts of unlabeled oligonucleotide were added, cold Rev-DR2 oligonucleotide competed more efficiently than cold DR1 oligonucleotide for binding of PPAR/RXR to the Rev-DR2 site (Fig. 4, lanes 2-5 and 6-9). Reciprocally, binding of PPAR/RXR to labeled DR1 oligonucleotide was more rapidly competed by

cold Rev-DR2 than by cold DR1 oligonucleotide (Fig. 4, lanes 11-14 and 15-18).

These binding experiments demonstrate that PPAR α binds as a heterodimer with RXR, but not as monomer, to DR2 sites containing a Rev-erb α -type 5'-flanking region and that Rev-DR2 constitutes a novel PPAR α -binding site of higher affinity than the natural apo A-II DR1 PPARE site.

Rev-DR2 Mediates a Cross-Talk between PPAR α and Rev-erb α

To test directly whether PPAR α and Rev-erb α could functionally compete on a Rev-DR2 element, transient cotransfection experiments were performed. As expected, Rev-erb α was able to repress Rev-DR2-driven SV40 promoter activity (24) (Fig. 5A). Cotransfection of PPAR α in increasing proportions against a constant amount of Rev-erb α led to a progressive abolishment of Rev-erb α -mediated repression resulting in a transcriptional activation of the reporter gene at a 3:2 ratio of PPAR α to Rev-erb α , respectively, as evidenced by Western blot analysis of transfected cell extracts (Fig. 5A and inset). Furthermore, in the absence of cotransfected Rev-erb α , reporter transcription activity was even further enhanced by PPAR α (Fig. 5A). Thus, PPAR α and Rev-erb α are able to functionally cross-compete for the same Rev-DR2 element.

Finally, to estimate the relative affinities of PPAR/RXR and Rev-erb α binding to a Rev-DR2 site, EMSAs were performed using Rev-DR2 as probe (Fig. 5B). As expected, PPAR/RXR formed a heterodimeric complex whereas Rev-erb α bound both as monomer and as heterodimer (Fig. 5B, lanes 1 and 6). When competition was performed using cold Rev-DR2 oligonucleotide, PPAR/RXR binding decreased in a manner similar to Rev-erb α monomer (Fig. 5B, compare lanes 2-5 and 7-10). However, Rev-erb α homodimer binding appeared slightly more sensitive to competition with unlabeled Rev-DR2 (Fig. 5B, lanes 7-10). Altogether, these results indicate that PPAR/RXR binds to Rev-DR2 sites with similar affinity as Rev-erb α monomer, whereas Rev-erb α homodimers appear to bind with higher affinity.

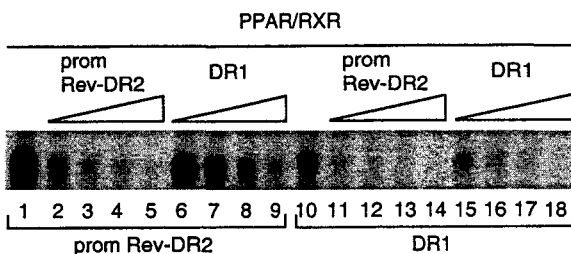


Fig. 4. PPAR α Binds with Similar Affinities to Natural DR2 and DR1 PPAR Response Element

Gel retardation assays were performed on end-labeled RevDR2 (prom Rev-DR2) and apo A-II PPARE DR1 oligonucleotides (29) in the presence of *in vitro* transcribed/translated PPAR α and RXR α protein. Competition experiments were performed by adding 1-, 5-, 10-, and 50-fold molar excess of indicated oligonucleotide.

DISCUSSION

In the present report we studied the regulation of Rev-erb α by fibrates in human liver cells and the molecular mechanisms involved. Our results on human primary hepatocytes and HepG2 cells demonstrate that fibrates induce Rev-erb α mRNA expression, an effect that is associated with induction of Rev-erb α protein synthesis in HepG2 cells. In addition, transfection studies revealed that the regulation of Rev-erb α expression by fibrates occurs at the transcriptional level via PPAR α . Using deleted and mutated Rev-erb α promoter constructs, we localized the fibrate-respon-

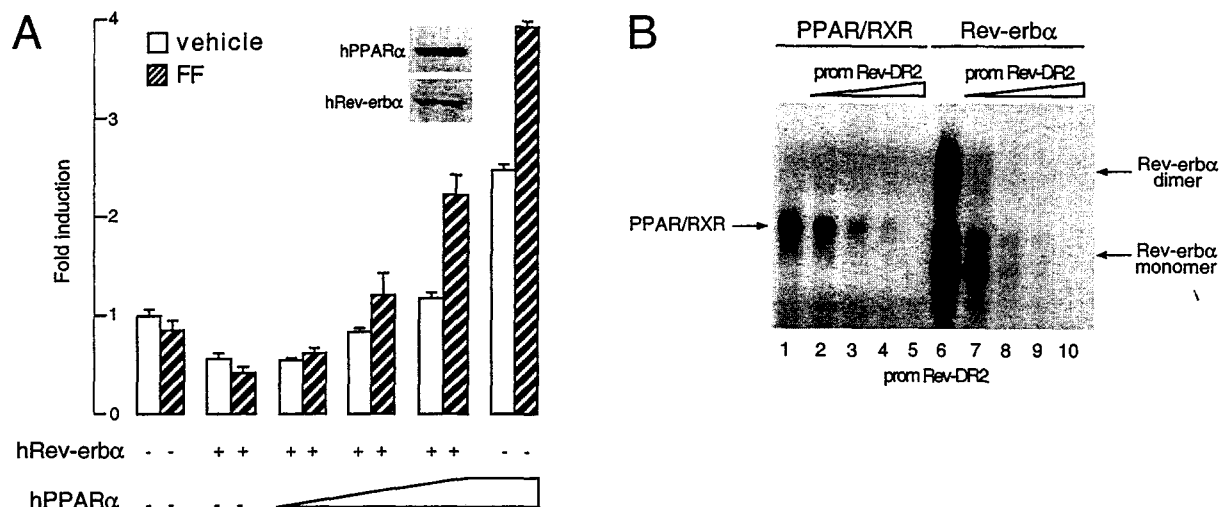


Fig. 5. Rev-DR2 Mediates a Cross-Talk between PPAR α and Rev-erb α

A, PPAR α relieves the repressive activity of Rev-erb α on Rev-DR2-driven transcription. HepG2 cells were transfected with the Rev-DR2 SV40pGL2 reporter construct (Fig. 2B), in the presence of pSG5hPPAR α and/or pSG5hRev-erb α expression vector. Increasing amounts of pSG5hPPAR α (0.5-fold, 1-fold, 1.5-fold) were added to a constant amount of pSG5hRev-erb α . Cells were treated with fenofibric acid (FF) (10 μ M) or vehicle (DMSO), and luciferase activities were measured as described in *Materials and Methods* and expressed relative to control set as 1. Proteins extracted from HepG2 cells transfected with Rev-erb α and 1.5-fold excess of PPAR α were analyzed by immunoblotting (*inset*). B, Competition experiments for binding of PPAR α /RXR α or Rev-erb α to the human Rev-erb α promoter Rev-DR2 (prom Rev-DR2) oligonucleotide. Competition was performed with 1-, 5-, 10-, and 50-fold molar excess of indicated cold oligonucleotide. PPAR/RXR heterodimer and Rev-erb α monomer or homodimer complexes are indicated by *arrows*.

sive region in the human Rev-erb α promoter to the previously identified negative Rev-erb α autoregulation site. Moreover, mutations in the Rev-DR2 site of the Rev-erb α promoter abolished basal Rev-erb α -mediated repression as well as PPAR α -mediated activation. EMSA experiments proved that fibrate signaling occurs through direct interaction of PPAR/RXR heterodimers to the Rev-DR2 site of the human Rev-erb α promoter. Since all PPREs described so far consist of the juxtaposition of the degenerated hexamer AGGTCA sequence separated by one nucleotide (DR1) (4, 6, 11, 26–38), these results represent the first demonstration of a DR2 site as a PPAR-responsive element. Interestingly, a specific structure of the DR2 is required for high-affinity PPAR/RXR binding. In addition to the 5'- and 3'-AGGTCA half-sites, the 5'-flanking region is required for binding of PPAR/RXR to a DR2 site. Thus, several fundamental characteristics of protein-DNA interaction, such as the contact of the receptor with the 5'-A/T-rich flanking sequences of the response element, are conserved among a number of the superfamily members. Taken together, our data suggest that nuclear receptors are more flexible for recognition of responsive elements than previously anticipated.

Rev-erb α belongs to a subfamily of orphan receptors that are repressors of target gene transcription (for review see Ref. 39). Rev-erb α appears to be ubiquitously expressed (40, 41), but its functions are ill defined. Several observations suggest a role for Rev-erb α in metabolic control and energy homeostasis.

First, Rev-erb α mRNA levels increase during differentiation of preadipocytes into adipocytes (42). Second, Rev-erb α has been suggested to act as a modulator of thyroid hormone signaling (40, 41, 43, 44). Indeed, Rev-erb α has been shown to bind a subset of thyroid hormone-response elements (45). Interestingly, a significant level of cross-talk exists also between peroxisome proliferator and thyroid hormone-signaling pathways (46–52). Our present data identify Rev-erb α as a fibrate target gene and reveal the existence of cross-talk between the PPAR α and Rev-erb α -signaling pathways. This cross-talk is governed via two mechanisms (see Fig. 6 for overview). First, PPAR α induces Rev-erb α expression by interfering with the negative autoregulatory loop of Rev-erb α expression via the Rev-DR2 site. Therefore, genes regulated by Rev-erb α , such as *N-myc* (53) and rat apo A-I (23), will be negatively regulated by PPAR α via an indirect mechanism. Second, PPAR α and Rev-erb α may compete for binding to similar DR2 sites. Rev-erb α itself is an example of a gene containing a response element recognized by both PPAR α and Rev-erb α . Hence, target genes containing Rev-DR2 sequences to which PPAR α , as heterodimer with RXR, and Rev-erb α compete for binding will be derepressed by fibrates. By contrast, genes carrying monomeric Rev-RE, to which Rev-erb α binds exclusively as monomer, will be further repressed after fibrate treatment. Therefore, whether a gene will be predominantly regulated by PPAR α or Rev-erb α will depend on the relative levels of ligands for each receptor, the relative concentra-

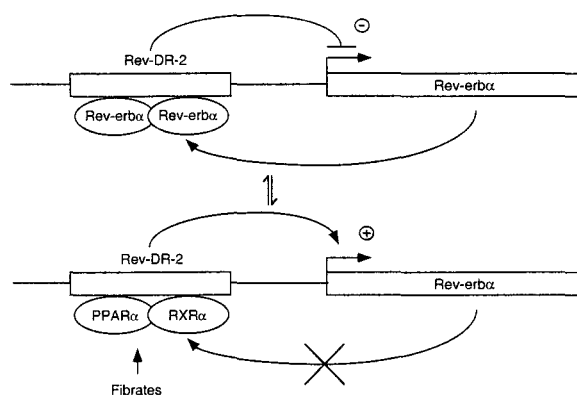


Fig. 6. Scheme Describing the Mechanism Implicated in the Regulation of Rev-erb α Expression by Fibrates

It is conceivable that an equilibrium exists between inducible activation of the Rev-erb α promoter by PPAR/RXR heterodimer and its repression by Rev-erb α . This allows a fine tuning of Rev-erb α mRNA and protein levels and hence of Rev-erb α target gene expression.

tions of each receptor, and on the structure of the target gene DR2 sequence that determines the relative binding affinities of PPAR α and Rev-erb α . The fact that PPAR α and Rev-erb α bind to similar DR2 subset sites is most likely due to the similarity of their T/A boxes (25), which are involved in the recognition of the 5'-half-site extension (24, 45, 54–56). Therefore, PPAR α could repress genes by inducing Rev-erb α while simultaneously activating its own target genes via either DR1 or DR2 sites.

In a previous study, we demonstrated that differences between human and rat apo A-I gene regulation in response to fibrates are due to a combination of two distinct mechanisms implicating the nuclear receptors PPAR α and Rev-erb α (23). Our data indicated that the species-distinct regulation of apo A-I gene expression by fibrates is due to sequence differences in *cis*-acting elements. In man, apo A-I transcription is induced via PPAR α binding to a positive PPRE located in the A site footprint (2). This site is not conserved in rats, resulting in a lack of binding of PPAR to the rat apo A-I promoter site. By contrast, rat apo A-I gene transcription is repressed by Rev-erb α , the expression of which is induced by fibrates and which binds to a Rev-RE site adjacent to the TATA-box in the rat, but not in the human apo A-I gene promoter. The identification of rat apo A-I as a target gene for Rev-erb α suggests an implication of Rev-erb α in lipoprotein metabolism (23). Although the rat apo A-I Rev-RE is not conserved in man, Rev-erb α expression is controlled by fibrates both in rats and in man, which may point to a role for this nuclear receptor as a modulator in lipid and lipoprotein metabolism and possibly in atherosclerosis susceptibility in both species. It will be of interest, therefore, to identify target genes involved in lipid metabolism that are also under control of Rev-erb α in man.

In conclusion, our data indicate that the human Rev-erb α gene is regulated at the transcriptional level by fibrates in liver. Furthermore, this regulation is mediated by PPAR α , which binds to a novel response element consisting of a 5'-A/T-rich preceded DR2 sequence. Finally, we provide evidence that PPAR α and Rev-erb α bind to the same regulatory site, indicating the existence of a cross-talk between PPAR α and Rev-erb α -signaling pathways.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Human hepatocytes, isolated by collagenase perfusion, and HepG2 cells were cultured exactly as described previously (12).

RNA Analysis

RNA extraction and Northern blot analysis were performed as described (3) using human Rev-erb α (43) and human acidic ribosomal phosphoprotein 36B4 (57) cDNA probes.

Construction of Recombinant Plasmids and Transfection

Cloning of the human Rev-erb α promoter fragments into pGL2 promoterless or SV40pGL2 reporter vectors (Promega, Madison, WI) and site-directed mutagenesis of Rev-erb α response elements were as described (24). Human hepatoma HepG2 cells were obtained from European Collection of Animal Cell Culture (Porton Down, Salisbury, UK). Cells were grown in DMEM, supplemented with 2 mM glutamine and 10% (vol/vol) FCS, in a 5% CO $_2$ humidified atmosphere at 37 C. Stimuli were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO). Control cells received vehicle only. All transfections were performed with a mixture of plasmids containing reporter (2 μ g) and expression vectors (0.3 to 1 μ g). The luciferase activity in cell extracts was determined using a luciferase assay system (Promega) following the supplier's instruction. Transfection experiments were performed in triplicate and repeated at least three times.

In Vitro Translation and EMSAs

pSG5hPPAR α , pSG5mRXR α , and pSG5hRev-erb α were *in vitro* transcribed with T7 polymerase and translated using the rabbit reticulocyte lysate system (Promega). EMSAs with Rev-erb α , PPAR α , and/or RXR α were performed exactly as described previously (2, 58). For competition experiments, increasing amounts of indicated cold probe were added just before the labeled oligonucleotide. The complexes were resolved on 5% polyacrylamide gels in 0.25 \times TBE buffer (90 mM Tris-borate, 2.5 mM EDTA, pH 8.3) at 4 C. Gels were dried and exposed overnight at -70 C to x-ray film (XOMAT-AR, Eastman Kodak, Rochester, NY).

Coimmunoprecipitation from Cell Extracts

HepG2 cells incubated in DMEM + 0.2% BSA were treated with fenofibric acid (0.5 mM) or vehicle (DMSO) for 24 h. Cells were subsequently washed in PBS and incubated in methionine-free DMEM supplemented with 35 S-labeled methionine (0.1 mCi/ml medium) for 5 h. Cells were lysed in 1 ml RIPA

buffer [20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM sodium chloride, 2 mM EDTA, 1% (wt/vol) sodium deoxycholate, 1% (vol/vol) Triton X-100, 0.25% (wt/vol) SDS]. Lysates were centrifuged at 100,000 × g for 30 min, and the supernatant was subsequently incubated with polyclonal anti-Rev-erb α antibody (S. Chopin-Delannoy and V. Laudet, manuscript in preparation) overnight at 4 C in RIPA buffer. Immune complexes were collected using protein A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ) and washed six times in RIPA buffer. Protein complexes were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels under reducing conditions. Gels were dried and exposed at -70 C to BIOMAX-MS film (Kodak).

Acknowledgments

We thank Olivier Chassande, Jean-Marc Vanacker, and Franck Delaunay for critical reading.

Received July 13, 1998. Revision received November 5, 1998. Accepted November 23, 1998.

Address requests for reprints to: Dr. Bart Staels, U.325 INSERM, Département d'Athérosclérose, Institut Pasteur, 1 Rue Calmette, 59019 Lille, France. E-mail Bart.Staels@pasteur-lille.fr.

This research was sponsored by grants from INSERM, Fondation pour la Recherche Médicale, and the Région Nord-Pas de Calais.

* Both authors have equally contributed to this work.

REFERENCES

1. Staels B, Auwerx J 1997 Role of PPAR in the pharmacological regulation of lipoprotein metabolism by fibrates and thiazolidinediones. *Curr Pharm Des* 3:1-14
2. Vu-Dac N, Schoonjans K, Laine B, Fruchart JC, Auwerx J, Staels B 1994 Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. *J Biol Chem* 269:31012-31018
3. Staels B, Auwerx J 1992 Perturbation of developmental gene expression in rat liver by fibric acid derivatives: lipoprotein lipase and alpha-fetoprotein as models. *Development* 115:1035-1043
4. Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, Grimaldi P, Staels B, Yamamoto T, Auwerx J 1995 Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem* 270:19269-19276
5. Reddy JK, Goel SK, Nemali MR, Carrino JJ, Laffler TG, Reddy MK, Sperbeck SJ, Osumi T, Hashimoto T, Lalwani ND, Rao MS 1986 Transcriptional regulation of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase and enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase in rat liver by peroxisome proliferators. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:1747-1751
6. Bardot O, Aldridge TC, Latruffe N, Green S 1993 PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response element upstream of the bifunctional enzyme gene. *Biochem Biophys Res Commun* 192:37-45
7. Mascaro C, Acosta E, Ortiz JA, Marrero PF, Hegardt FG, Haro D 1998 Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem* 273:8560-8563
8. Staels B, Van Tol A, Andreu T, Auwerx J 1992 Fibrates influence the expression of genes involved in lipoprotein metabolism in a tissue-selective manner in the rat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 12:286-294
9. Staels B, van Tol A, Verhoeven G, Auwerx J 1990 Apolipoprotein A-IV messenger ribonucleic acid abundance is regulated in a tissue-specific manner. *Endocrinology* 126:2153-2163
10. Haubenwallner S, Essenburg AD, Barnett BC, Pape ME, DeMattos RB, Krause BR, Minton LL, Auerbach BJ, Newton RS, Leff T, Bisgaier CL 1995 Hypolipidemic activity of select fibrates correlates to changes in hepatic apolipoprotein C-III expression: a potential physiologic basis for their mode of action. *J Lipid Res* 36:2541-2551
11. Hertz R, Bishara-Shieban J, Bar-Tana J 1995 Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs, suppression of apolipoprotein C-III. *J Biol Chem* 270:13470-13475
12. Staels B, Vu-Dac N, Kosykh V, Saladin R, Fruchart JC, Dallongeville J, Auwerx J 1995 Fibrates down-regulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal Acyl Co-enzyme A Oxidase. *J Clin Invest* 95:705-712
13. Peters JM, Hennuyer N, Staels B, Fruchart JC, Fievet C, Gonzalez FJ, Auwerx J 1997 Alterations in lipoprotein metabolism in PPAR α -deficient mice. *J Biol Chem* 272:27307-27312
14. Staels B, Peinado-Onsurbe J, Auwerx J 1992 Down-regulation of hepatic lipase gene expression and activity by fenofibrate. *Biochim Biophys Acta* 1123:227-230
15. Staels B, van Tol A, Skretting G, Auwerx J 1992 Lecithin: cholesterol acyltransferase gene expression is regulated in a tissue-selective manner by fibrates. *J Lipid Res* 33:727-735
16. Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W 1996 The PPAR α -leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384:39-43
17. Forman BM, Chen J, Evans RM 1997 Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4312-4317
18. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, JML 1997 Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4318-4323
19. Lee SST, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, Fernandez-Salguero PM, Westphal H, Gonzalez FJ 1995 Targeted disruption of the α isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* 15:3012-3022
20. Hertz R, Seckbach M, Zakin MM, Bar-Tana J 1996 Transcriptional suppression of the transferrin gene by hypolipidemic proliferators. *J Biol Chem* 271:218-224
21. Ginsburg GS, Ozer J, Karathanasis SK 1995 Intestinal apolipoprotein AI gene transcription is regulated by multiple distinct DNA elements and is synergistically activated by the orphan nuclear receptor, hepatocyte nuclear factor 4. *J Clin Invest* 96:528-538
22. Fraser JD, Keller D, Martinez V, Santiso-Mere D, Straney R, Briggs MR 1997 Utilization of recombinant adenovirus and dominant negative mutants to characterize hepatocyte nuclear factor 4-regulated apolipoprotein AI and CIII expression. *J Biol Chem* 272:13892-13898
23. Vu-Dac N, Chopin-Delannoy S, Gervois P, Bonnelye E, Martin G, Fruchart JC, Laudet V, Staels B 1998 The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor α and Rev-erb α mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates. *J Biol Chem* 273:25713-25720
24. Adelmant G, Bègue A, Stéhelin D, Laudet V 1996 A functional Rev-erb α responsive element located in the human Rev-erb α promoter mediates a repressing activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3553-3558
25. Ijpenberg A, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B 1997

- Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. *J Biol Chem* 272:20108–20117
26. Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Fruchart JC, Staels B, Auwerx J 1995 Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J Clin Invest* 96:741–750
 27. Reue K, Leff T, Breslow JL 1988 Human apolipoprotein C-III gene expression is regulated by positive and negative cis-acting elements and tissue-specific protein factors. *J Biol Chem* 263:6857–6864
 28. Osumi T, Wen JK, Hashimoto T 1991 Two cis-acting regulatory elements in the peroxisome proliferator-responsive element enhancer region of rat acyl-CoA oxidase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 175:866–871
 29. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W 1992 Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68:879–887
 30. Isseman I, Prince R, Tugwood J, Green S 1992 A role for fatty acids and liver fatty acid binding protein in peroxisome proliferation. *Biochem Soc Trans* 20:824–827
 31. Tugwood JD, Isseman I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL, Green S 1992 The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J* 11:433–439
 32. Zhang B, Marcus SL, Sajjadi FG, Alvares K, Reddy JK, Subramani S, Rachubinski RA, Capone JP 1992 Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the gene encoding rat peroxisomal enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7541–7545
 33. Krey G, Keller H, Mahfoudi A, Medin J, Ozato K, Dreyer C, Wahli W 1993 Xenopus peroxisome proliferator activated receptors: genomic organization, response element recognition, heterodimer formation with retinoid X receptor and activation by fatty acids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 47:65–73
 34. Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD, Kelly DP 1994 The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11012–11016
 35. Rodriguez JC, Gil-Gomez G, Hegardt FG, Haro D 1994 Peroxisome proliferator activated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J Biol Chem* 269:18767–18772
 36. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM 1995 PPAR γ 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 15:351–357
 37. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman R, Briggs M, Cayet D, Deeb S, Staels B, Auwerx J 1996 PPAR α and PPAR γ activators direct a tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J* 15:5336–5348
 38. Varanasi U, Chu R, Huang Q, Castellon R, Yeldandi AV, Reddy JK 1996 Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the human peroxisomal fatty acyl coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem* 271:2147–2155
 39. Laudet V, Adelmant G 1995 Lonesome orphans. *Curr Biol* 5:124–127
 40. Lazar MA, Hodin RA, Darling DS, Chin WW 1989 A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat c-erbA α transcriptional unit. *Mol Cell Biol* 9:1128–1136
 41. Miyajima N, Horiuchi R, Shibuya Y, Fukushige Si, Matsumura Ki, Toyoshima K, Yamamoto T 1989 Two erbA homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus. *Cell* 57:31–39
 42. Chawla A, Lazar MA 1993 Induction of Rev-ErbA α , an orphan receptor encoded on the opposite strand of the α -thyroid hormone receptor gene during adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 268:16265–16269
 43. Lazar MA, Jones KE, Chin WW 1990 Isolation of a cDNA encoding human Rev-ErbA α : transcription from the non-coding DNA strand of a thyroid hormone receptor gene results in a related protein that does not bind thyroid hormone. *DNA Cell Biol* 9:77–83
 44. Laudet V, Bègue A, Henry-Duthoit C, Joubel A, Martin P, Stéhelin D, Saule D 1991 Genomic organisation of the human thyroid hormone receptor α (c-erbA-1) gene. *Nucleic Acids Res* 19:1105–1112
 45. Spanjaard RA, Nguyen VP, Chin WW 1994 Rat Rev-erbA α , an orphan receptor related to thyroid hormone receptor, binds to specific thyroid hormone response elements. *Mol Endocrinol* 8:286–295
 46. Hertz R, Aurbach R, Hashimoto T, Bar-Tana J 1991 Thyromimetic effect of peroxisomal proliferators in rat liver. *Biochem J* 274:745–751
 47. Hertz R, Kalderon B, Bar-Tana J 1993 Thyromimetic effect of peroxisome proliferators. *Biochimie* 75:257–261
 48. Castelein H, Gulick T, Declercq PE, Mannaerts GP, Moore DD, Baes ME 1994 The peroxisome proliferator activated receptor regulates malic enzyme gene expression. *J Biol Chem* 269:26754–26758
 49. Chu R, Madison LD, Lin Y, Kopp P, Rao MS, Jameson JL, Reddy JK 1995 Thyroid hormone (T3) inhibits ciprofibrate-induced transcription of genes encoding beta-oxidation enzymes: cross talk between peroxisome proliferator and T3 signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11593–11597
 50. Juge-Aubry CE, Gorla-Bajszczak A, Pernin A, Lemberger T, Wahli W, Burger AG, Meier CA 1995 Peroxisome proliferator-activated receptor mediates cross-talk with thyroid hormone receptor by competition for retinoid X receptor. Possible role of a leucine-zipper-like heptad repeat. *J Biol Chem* 270:18117–18122
 51. Hunter J, Kassam A, Winrow CJ, Rachubinski RA, JPC 1996 Crosstalk between the thyroid hormone and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating peroxisome proliferator-responsive genes. *Mol Cell Endocrinol* 116:213–221
 52. Miyamoto T, Kanoko A, Kakizawa T, Yajima H, Kamijo K, Sekino R, Hiramatsu K, Nishii Y, Hashimoto T, Hashizume K 1997 Inhibition of peroxisome proliferator signaling pathway by thyroid hormone receptor. Competitive binding to the response element. *J Biol Chem* 272:7752–7758
 53. Dussault I, Giguère V 1997 Differential regulation of the N-myc proto-oncogen by ROR α and RVR, two orphan members of the superfamily of nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol* 17:1860–1867
 54. Harding HP, Lazar MA 1993 The orphan receptor Rev-ErbA α activates transcription via a novel response element. *Mol Cell Biol* 13:3113–3121
 55. Forman BM, Chen J, Blumberg B, Kliewer SA, Henshaw R, Ong ES, Evans RM 1994 Cross-talk among ROR α and the Rev-erb family of orphan nuclear receptors. *Mol Endocrinol* 8:1253–1260
 56. Harding HP, Lazar MA 1995 The monomer-binding orphan receptor Rev-erb repress transcription as a dimer on a novel direct repeat. *Mol Cell Biol* 15:4791–4802
 57. Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, Gannon F, Krust A, Chambon P 1982 Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from MCF-7 human breast cancer cell line. *Nucleic Acids Res* 10:7895–7903
 58. Vanacker JM, Laudet V, Adelmant G, Stéhelin D, Rommelaere J 1993 Interconnection between thyroid hormone receptor signalling pathway and parvovirus cytototoxic functions. *J Virol* 67:7668–7672

C- Discussion

Nous avons montré, dans les hépatocytes humains et dans la lignée d'hépatome humain HepG2, que Rev-erb α est également fortement induit par les fibrates, et que cette induction est dose dépendante. L'induction par les fibrates de l'expression du gène de Rev-erb α et aussi accompagnée par une augmentation de la synthèse protéique de Rev-erb α . L'étude du promoteur humain de Rev-erb α indique que l'induction du gène par les fibrates passe par la fixation de PPAR α sur l'élément de réponse RevDR2. Les gels retardés montrent la fixation directe de l'hétérodimère RXR-PPAR α sur ce RevDR2. Ce RevDR2 dans le promoteur de Rev-erb α permet aussi la régulation négative de Rev-erb α par lui même. Les fibrates activent donc l'expression du gène de Rev-erb α humain *via* l'activateur transcriptionnel PPAR α .

1- Rev-erb α est un gène cible de PPAR α .

Avant de commencer cette étude, le seul régulateur de la transcription de Rev-erb α connu était Rev-erb α lui même (Adelmant *et al.*, 1996). En effet, Rev-erb α s'auto-régule en réprimant le promoteur de son propre gène. A l'inverse, nous avons montré que le récepteur PPAR α active la transcription du gène de Rev-erb α . Par conséquent, le gène codant Rev-erb α est l'objet d'une régulation complexe faisant intervenir des répresseurs et des activateurs de la transcription

2- Interférence entre les voies de signalisation de Rev-erb α et PPAR α

L'élément de réponse qu'utilise PPAR α pour activer Rev-erb α est exactement le même que celui qu'utilise Rev-erb α pour réprimer son propre gène : un RevDR2. Jusqu'à présent, le seul élément de réponse connu pour RXR-PPAR était un DR1. Ce travail montre pour la première fois la fixation de RXR-PPAR α sur un DR2. Cependant ce DR2 est très caractéristique car son extension en 5', riche en adénine et thymidine, est indispensable pour la fixation de l'hétérodimère. Ce qui signifie que PPAR α ne peut pas se fixer sur tous les DR2, mais uniquement sur un RevDR2. Cette extension en 5' est connue pour interagir avec les boîtes T/A adjacentes au domaine de fixation à l'ADN de Rev-erb α (Zhao *et al.*, 1998). Nous

pouvons donc nous attendre à ce que RXR-PPAR α se fixe sur un RevDR2 de la même façon que l'homodimère Rev-erb α .

Les récepteurs PPAR α et Rev-erb α sont en compétition pour la fixation d'un RevDR2, et ils sont en opposition sur l'effet transcriptionnel produit. Par contre sur un site monomérique RevRE, comme celui présent dans le promoteur de l'apo AI de rat, seul Rev-erb α peut se fixer et il n'y a donc pas d'interférence avec PPAR α . En ce qui concerne PPAR α , son activité transcriptionnelle est déplacée par Rev-erb α uniquement sur un RevDR2, et pas sur son élément de réponse déjà connu, un DR1. De ce fait, ces deux voies de signalisation ne sont en compétition que dans le contexte de certains éléments de réponse comme le RevDR2.

3- Mécanismes de l'effet négatif des fibrates

Nous savons que les fibrates sont des ligands des PPAR. Nous venons de montrer que RXR-PPAR est capable de se fixer sur l'élément de réponse RevDR2 présent dans le promoteur du gène Rev-erb α , et que cette fixation induit l'expression de ce gène. Un traitement aux fibrates induit aussi l'augmentation de la synthèse protéique de Rev-erb α . Dans le premier article, nous avons montré que Rev-erb α est capable de réprimer le gène de l'apo AI de rat. Nous pouvons donc dire que le seul effet direct de ces molécules est d'activer PPAR α qui est un activateur de la transcription du gène *Rev-erb α* notamment. Ce mécanisme de répression par les fibrates de l'apo AI de rat peut être résumé par le schéma suivant (fig 41). Cependant le promoteur de Rev-erb α de rat n'est pas connu et ce schéma émet l'hypothèse de l'existence d'un RevDR2 dans ce promoteur.

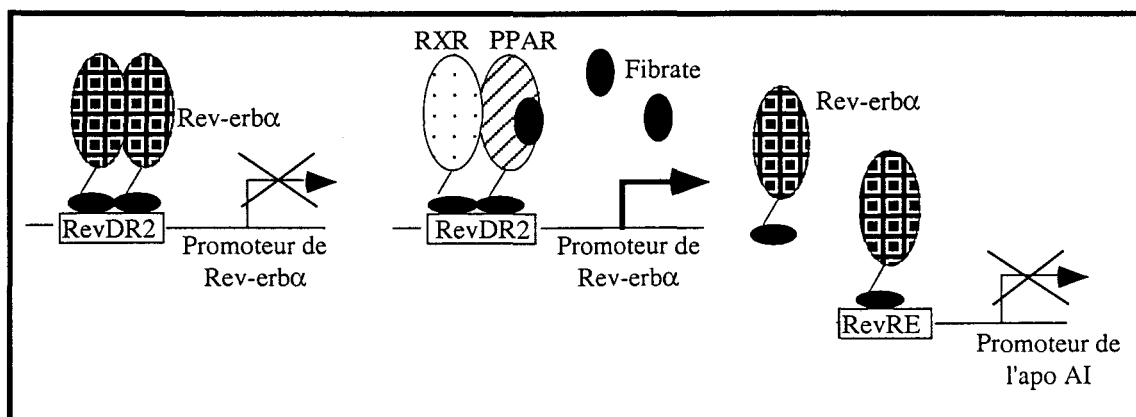


Figure : 41. Schéma de l'effet répresseur des fibrates sur le promoteur de l'apolipoprotéines AI de rat.

4- La différenciation adipocytaire

Les travaux de Chawla et ses collaborateurs montrent que l'expression de Rev-erb est induite lors de la différenciation adipocytaire (Chawla et Lazar, 1993). Les cellules préadipocytaires 3T3-L1 n'expriment pas Rev-erb α alors que ces mêmes cellules différenciées en adipocyte expriment fortement ce gène. La différenciation est maximale au bout de 7 jours, et dès le troisième jour, Rev-erb α atteint la moitié de son expression maximum. La transcription de Rev-erb α apparaît dès le premier jour alors que celle des gènes caractéristiques des adipocytes, C/EBP α et adipocyte P2, n'apparaît qu'au deuxième jour de l'induction de la différenciation. Ceci indique que Rev-erb α est induit assez rapidement lors du processus de différenciation adipocytaire. Or Rev-erb α est un répresseur transcriptionnel, notamment de son propre gène, et il est étonnant que lors de ce processus l'expression de Rev-erb α soit augmentée.

Le récepteur PPAR γ est spécifiquement exprimé dans la graisse, et son expression est induite lors de la différenciation adipocytaire (Tontonoz *et al.*, 1994 a et b). Dans les cellules 3T3-L1 en cours de différenciation adipocytaire, PPAR γ commence à être exprimé dès le deuxième jour et ceci avant l'expression de adipocyte P2 qui code une protéine fixant les lipides, exclusivement exprimée dans les cellules adipocytes. Le récepteur PPAR γ est donc lui aussi induit rapidement lors du processus de différenciation adipocytaire, et l'expression de ces deux récepteurs augmente au cours de ce processus.

Nous avons montré que PPAR α peut aussi se fixer sur un RevDR2. Nous pouvons émettre l'hypothèse que PPAR γ soit aussi capable de se fixer sur un RevDR2 et qu'il induise le gène Rev-erb α . De plus si, lors de la différenciation adipocytaire, PPAR γ s'exprime avant Rev-erb α , nous pourrions penser que Rev-erb α est un gène cible de PPAR γ . La recherche des gènes cibles de Rev-erb α , dans le tissu adipeux, pourrait être orientée vers les gènes réprimés spécifiquement et indirectement par PPAR γ au cours de la différenciation adipocytaire, c'est-à-dire des gènes réprimés par les ligands de PPAR γ .

5- La différenciation musculaire

Lors de la différenciation musculaire, *Rev-erb α* est réprimé (Downes *et al.*, 1995). Des cellules myoblastiques surexprimant *Rev-erb α* ont le gène *MyoD* réprimé. Le gène *MyoD* est un gène clef de la régulation de la myogénèse : sa surexpression est capable de transdifférencier des cellules adipeuses en cellules musculaires (Weintraub *et al.*, 1989). Nous pouvons donc nous demander si *MyoD* est un gène cible de *Rev-erb α* .

Il est à noter que *PPAR γ* , qui ne s'exprime pas dans le muscle, est capable en présence de *C/EBP α* de transdifférencier des myoblastes en adipocytes matures, et que la surexpression du gène codant *Rev-erb α* empêche la différenciation des cellules myoblastiques (Hu *et al.*, 1995; Downes *et al.*, 1995). De plus, dans les cellules myoblastiques surexprimant *PPAR γ* , l'expression de *MyoD* est réprimée uniquement lorsqu'elles sont traitées avec du ETYA, un activateur des *PPAR*. Nous pouvons émettre l'hypothèse que *PPAR γ* induit l'expression de *Rev-erb α* qui va réprimer *MyoD*.

Les myocytes squelettiques, les adipocytes ainsi que les chondrocytes ont la même origine embryonnaire : le mésoderme (Taylor et Jones, 1979). Il y a souvent une relation inverse entre le développement du tissu adipeux et du muscle squelettique comme par exemple dans la maladie de dystrophie musculaire de Duchenne où la perte des myofibrilles est accompagnée d'une extension de la masse adipeuse dans le muscle (Berkow *et al.*, 1988). Une des hypothèses du rôle de *Rev-erb α* serait que l'induction de la transcription de son gène oriente une cellule indifférenciée du mésoderme vers la différenciation adipocytaire, et l'empêcherait d'aller vers la voie de différenciation musculaire.

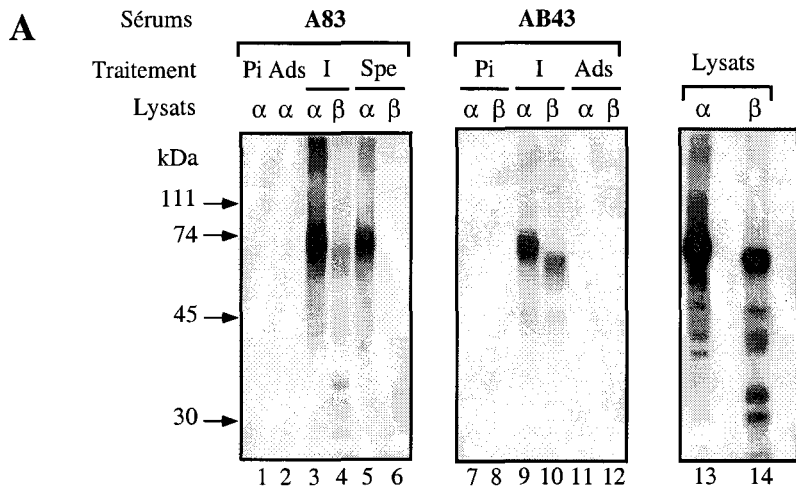
III- Article 3 : Identification d'un signal de localisation nucléaire dans le domaine de fixation à l'ADN du récepteur nucléaire orphelin Rev-erb α

A- Introduction

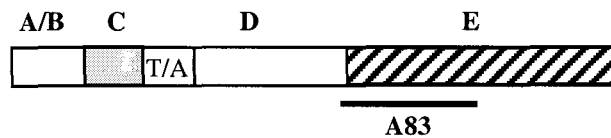
La localisation intracellulaire des récepteurs nucléaires est le résultat d'une situation dynamique entre le noyau et le cytoplasme à travers les pores nucléaires de l'enveloppe nucléaire (Guiochon-Mantel *et al.*, 1991; Madam et De Franco, 1993). Les signaux de localisation nucléaires, NLS, sont des séquences à l'intérieur d'une protéine qui lui permettent d'être transportée dans le noyau, et trop courte pour former une structure indépendante (LaCasse et Lefebvre, 1995). Un NLS est une séquence riche en arginine et en lysine. Les récepteurs nucléaires possèdent plusieurs NLS localisés pour une partie dans la région C-terminale du domaine de fixation à l'ADN et dans le domaine D, et pour une seconde partie dans le domaine de fixation du ligand (revue de Gronemeyer et Laudet, 1995).

Ces signaux de localisation nucléaires ont principalement été étudiés pour des récepteurs nucléaires ayant un ligand connu, comme les récepteurs aux oestrogènes, à la progestérone, aux androgènes, aux glucocorticoïdes et aux hormones thyroïdiennes (Picard et Yamamoto, 1987; Guiochon-Mantel *et al.*, 1989; Ylikomi *et al.*, 1992; Lee et Mahdavi, 1993; Zhou *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1998). Peu d'études ont été réalisées pour les récepteurs orphelins. Seul le NLS du récepteur orphelin TR2 a été déterminé, et il se situe dans le deuxième doigt de zinc du domaine de fixation à l'ADN (Yu *et al.*, 1998). Pour les autres récepteurs orphelins, nous avons quelques informations lorsque la fonctionnalité des mutants est testée par étude de leur localisation subcellulaire. Ainsi, nous savons que SF1 est nucléaire, et que son mutant délété du domaine de fixation à l'ADN est cytoplasmique (Hammer *et al.*, 1999). Il semblerait donc que le NLS de SF1 se situe dans son domaine de fixation à l'ADN. Le récepteur COUP-TFII est aussi nucléaire, et son NLS semble plutôt être dans le domaine D (Achatz *et al.*, 1997).

Les récepteurs nucléaires orphelins, par définition, n'ont pas leur fonction régulée par un ligand. L'un des modes de régulation de ces récepteurs pourrait être leur transport dans le noyau, lieu d'action de ces protéines. En effet, nous savons que le récepteur aux glucocorticoïdes est séquestré dans le cytoplasme par les protéines de choc thermique HSP (Pratt, 1993). Cette séquestration le rend inactif et seule la présence du ligand lui permet d'aller



Rev-erb α humain



Rev-erb β de poulet

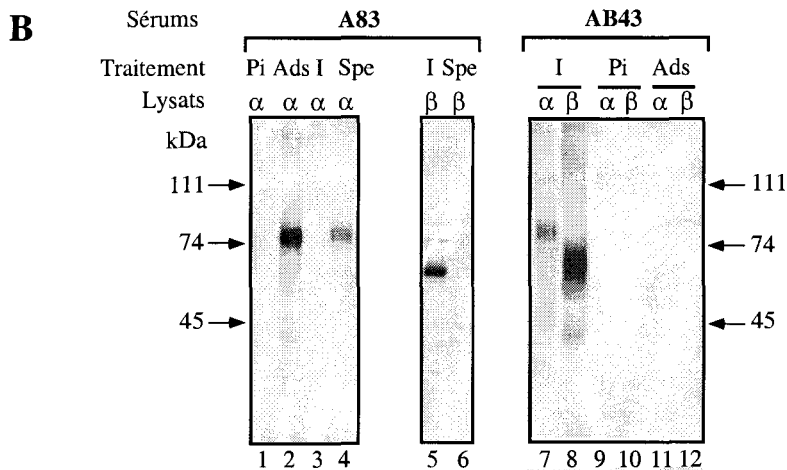
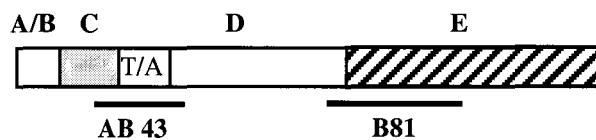


Figure 1 : Caractérisation des sérums A83 et AB43 par immunoprécipitation des protéines Rev-erb α (α) et Rev-erb β (β). Les protéines sont produites en lysats de réticulocyte (A) ou obtenues à partir du lysats de cellules COS-1 transfectées transitoirement par pSG5 Rev-erb α et pSG5 Rev-erb β (B). Dans chaque cas les immunoprécipitations sont réalisées avec le sérum pré-immun (Pi), le sérum adsorbé (Ads) qui correspond au sérum adsorbé sur le peptide de fusion contre lequel il est dirigé, le sérum immun (I). Le sérum A83 spécifique (Spe) correspond au serum A83 adsorbé sur le peptide de fusion MS2-B81. Sur les protéines Rev-erb α humain et Rev-erb β de poulet schématisées sont localisées les régions protéiques fusionnées à la RNA polymérase MS2, et qui ont servi à l'immunisation. Ces régions sont celles contre lesquelles les sérums AB43, A83, et B81 sont dirigés.

dans le noyau et de moduler la transcription de gènes cibles. Nous avons donc étudié la localisation subcellulaire de Rev-erb α par immunofluorescence. Afin de déterminer ses signaux de localisation nucléaire, nous avons construit des chimères avec la protéine GFP, "Green Fluorescent Protein". Ces résultats nous indiquent que Rev-erb α est constitutivement nucléaire et qu'elle possède un NLS dans une région assez inhabituelle qui est les doigts de zinc. Rev-erb β , le second gène du groupe Rev-erb, possède aussi un NLS dans cette région.

B- Résultats

Production d'anticorps polyclonaux anti Rev-erb

Afin d'étudier les protéines Rev-erb, nous avons produit des anticorps polyclonaux anti Rev-erb chez le lapin. Dans ce but, différentes séquences issues des ADN complémentaires de Rev-erb α ou Rev-erb β ont été clonées dans le vecteur d'expression procaryote pPLC24, dans lequel elles sont fusionnées à celle codant les 98 premiers acides aminés de l'ARN polymérase du phage MS2. Ce type de vecteur permet la production de peptides de fusion MS2-Rev-erb α et MS2-Rev-erb β . Nous avons voulu produire un sérum qui reconnaît spécifiquement Rev-erb α dans sa partie C-terminale, un sérum qui reconnaît spécifiquement Rev-erb β , et un sérum qui reconnaît à la fois Rev-erb α et Rev-erb β dans leur partie N-terminale. Pour cela nous nous sommes appuyés sur le fait que les protéines Rev-erb α et Rev-erb β ont entre elles 97% d'identité au niveau de leur domaine de liaison à l'ADN, et 68% au niveau de leur domaine de liaison du ligand, ceci aussi bien chez l'homme que chez le rat ou le poulet. Pour obtenir le sérum AB43, qui reconnaît sans distinction les protéines Rev-erb α et Rev-erb β , nous l'avons dirigé contre le domaine de liaison à l'ADN qui est le domaine le plus conservé (fig 1B). Pour obtenir le sérum A83, qui reconnaît spécifiquement Rev-erb α dans sa partie C-terminale, nous nous sommes placés au niveau du domaine de liaison du ligand, de même pour le sérum B81 qui reconnaît spécifiquement Rev-erb β .

Pour mettre en évidence la capacité du sérum A83 à reconnaître spécifiquement la protéine Rev-erb α , et pour le sérum AB43 de reconnaître les deux protéines Rev-erb α et Rev-erb β sans distinction, des immunoprécipitations ont été réalisées (fig 1A) sur des lysats de réticulocytes programmés à l'aide des ADN complémentaires de Rev-erb α humain et de Rev-

erb β de poulet. Les protéines obtenues (fig 1A, canaux 13 et 14) ont la taille attendue pour Rev-erb α et Rev-erb β qui sont respectivement 68kDa et 60kDa. Le sérum pré-immun permet de visualiser les immunoprécipitations obtenues avec des anticorps présents avant les injections du peptide de fusion. Le sérum pré-immun A83 (fig 1A, canal 1) sur la protéine Rev-erb α humain montre l'absence d'immunoprécipitation aspécifique. Le sérum adsorbé A83 (fig 1A, canal 2), qui correspond au sérum immun A83 pré-incubé 18h à 4°C avec la protéine de fusion MS2-A83, est incapable de reconnaître la protéine Rev-erb α . Le sérum immun A83 (fig 1A, canaux 3 et 4) reconnaît principalement la protéine Rev-erb α , et plus faiblement la protéine Rev-erb β . Ceci n'est pas étonnant puisque ce sérum est dirigé contre une portion protéique de Rev-erb α humain qui a 68% d'identité avec Rev-erb β , permettant ainsi d'envisager l'existence d'épitopes communs. De ce fait, le sérum immun A83 a été rendu spécifique (sérum A83 spécifique) en le pré-incubant, 18h à 4°C avec la protéine de fusion MS2-B81. Cette opération permet non seulement de neutraliser les anticorps qui reconnaissent les épitopes communs aux peptides MS2-A83 et MS2-B81, mais aussi de supprimer les anticorps anti MS2. (canaux 5 et 6). Le sérum A83 spécifique ne reconnaît plus que la protéine Rev-erb α (fig 1A, canaux 5 et 6). Par conséquent, le sérum immun A83 spécifique reconnaît spécifiquement la protéine Rev-erb α .

Les contrôles négatifs du sérum AB43, le pré-immun (fig 1A, canaux 7 et 8), et l'adsorbé (fig 1A, canaux 11 et 12) indiquent l'absence de signaux aspécifiques. Le sérum AB43, dirigé contre le domaine de liaison à l'ADN de la protéine Rev-erb β , reconnaît spécifiquement les protéines Rev-erb α humain de 68 kDa et Rev-erb β de poulet de 60 kDa (fig 1A, canaux 9 et 10). Ce résultat était celui attendu dans la mesure où dans le domaine considéré il n'y a qu'un acide aminé qui diffère entre Rev-erb α et Rev-erb β .

Les mêmes résultats sont obtenus pour les immunoprécipitations à partir de lysats de cellules COS-1 transfectées transitoirement (fig 1B). Par conséquent nous pouvons conclure que nous disposons d'un sérum A83 spécifique qui ne reconnaît que Rev-erb α et d'un sérum AB43 qui reconnaît à la fois Rev-erb α et Rev-erb β .

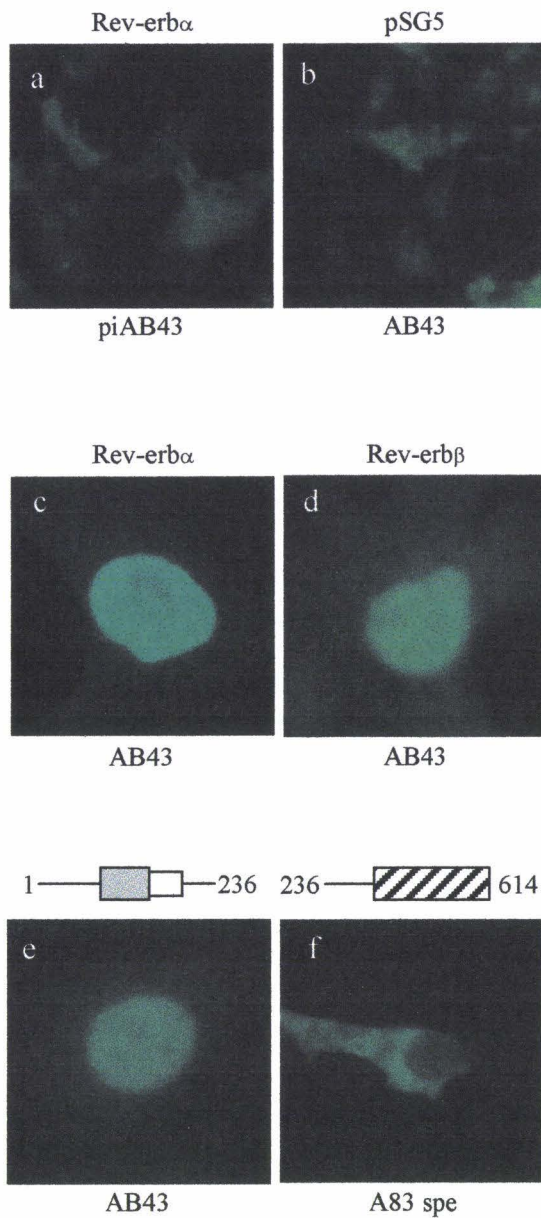


Figure 2 : Etude de la localisation subcellulaire des protéines Rev-erb α et β , et de deux délétants de Rev-erb α . Les cellules COS-1 sont transfectées transitoirement par pSG5 Rev-erb α (a et c), pSG5 (b), pSG5 Rev-erb β (d), pSG5 Rev-erb α 1-236 (e) et pSG5 Rev-erb α 236-614 (f). L'immunofluorescence est réalisée à l'aide du sérum pré-immun AB43 (a) ou du sérum AB43 (b, c, d et e) ou du sérum A83 spécifique (f). Dans chaque cas, la construction transfectée est indiquée en haut de l'image, et le sérum utilisé en bas de l'image.

Localisation nucléaire de Rev-erb α et Rev-erb β

Dans le but d'étudier la localisation subcellulaire des protéines Rev-erb α et Rev-erb β , des immunofluorescences ont été réalisées à l'aide des sérums obtenus. Les cellules COS-1 ont été transfectées transitoirement par pSG5-Rev-erb α humain et pSG5-Rev-erb β de poulet. Ces expériences comportent les mêmes témoins que ceux des immunoprécipitations. L'immunofluorescence des cellules COS-1 transfectées par pSG5-Rev-erb α , lors de l'incubation avec le pré-immun AB43 (fig 2a) ou le pré-immun A83 (donnée non présentée), ne montre pas de marquage particulier mais juste un bruit de fond, de même pour les cellules transfectées par pSG5-Rev-erb β (donnée non présentée). Le vecteur vide pSG5 transfecté ne montre pas non plus de signal lors de l'incubation avec le sérum AB43 (fig 2b) ou le sérum A83 spécifique (donnée non présentée). L'immunofluorescence des cellules transfectées par pSG5-Rev-erb α montre un marquage du noyau lors de l'incubation avec le sérum AB43 (fig 2c). Les cellules transfectées par pSG5-Rev-erb β montrent également un marquage du noyau lors de l'incubation avec AB43 (fig 2d). En conclusion, les protéines Rev-erb α et Rev-erb β sont des protéines nucléaires dans le contexte de cellules COS-1 transfectées transitoirement par un vecteur d'expression.

Le signal de localisation nucléaire de Rev-erb α est dans sa partie N-terminale

Puisque Rev-erb α est une protéine de 64 kDa, il doit y avoir un mécanisme de transport actif qui lui permet de passer dans le noyau. Ce mécanisme est basé sur l'existence de signaux de localisation nucléaires (NLS). Afin de cartographier ce NLS chez Rev-erb α nous avons construits différents mutants de délétions de Rev-erb α clonés dans le vecteur d'expression pSG5 dans le but de réaliser des immunofluorescences dans des cellules COS-1 transfectées transitoirement. Nous avons tout d'abord coupé la protéine en deux afin de déterminer si ce NLS est dans la partie N- ou C-terminale de Rev-erb α . L'immunofluorescence de cellules COS-1 transfectées par pSG5-1-236 montre un marquage du noyau (fig 2e), alors que l'immunofluorescence des cellules transfectées par pSG5-236-614 montre un marquage cytoplasmique (fig 2f). Le NLS majeur de Rev-erb α se trouve donc dans sa partie N-terminale qui comprend les domaines A/B, C et un tiers du domaine D.

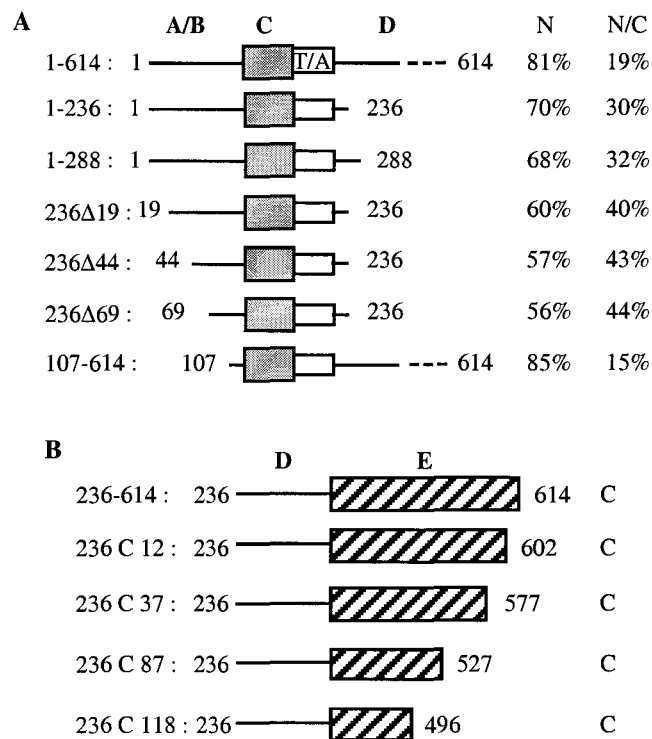


Figure 3 : Etude de la localisation subcellulaire de différents mutants de Rev-erb α humain. Cette étude a été réalisée par immunofluorescence dans des cellules COS-1 transfectées transitoirement par les différentes constructions schématisées. Le sérum utilisé est soit le sérum AB43 (A) soit le sérum A83 spécifique (B). Les cellules transfectées sont classées et comptées en fonction de leur marquage subcellulaire : N pour exclusivement nucléaire, C pour exclusivement cytoplasmique, N/C pour nucléaire et cytoplasmique. Les acides aminés de bordure des différentes constructions sont indiqués. Les mutants de Rev-erb α sont schématisés en fonction des domaines A/B, C, D et E des récepteurs nucléaires. La boîte T/A du domaine D est aussi représentée.

Afin de cartographier plus précisément ce NLS, nous avons construits des mutants de délétions de la partie N-terminale de Rev-erb α dans lesquels le domaine A/B est tronqué (fig 3A). Ces mutants, clonés dans le vecteur d'expression pSG5, sont aussi testés par immunofluorescence, avec le sérum AB43, dans des cellules COS-1 transfectées transitoirement. La protéine Rev-erb α entière est nucléaire avec 80% des cellules COS-1 transfectées ayant un marquage uniquement nucléaire, et 20% des cellules transfectées ayant un marquage à la fois dans le noyau et le cytoplasme (fig 3A). Le mutant 1-236 est nucléaire avec 70% des cellules transfectées ayant un marquage uniquement dans le noyau et 30% ayant un marquage dans le noyau et le cytoplasme. Le pourcentage de cellules montrant un marquage uniquement nucléaire avec le mutant 1-236 est 10% plus faible par rapport à la protéine entière. Afin de déterminer si en arrêtant le mutant à l'acide aminé 236 on interrompt un NLS, un mutant un peu plus long dans le domaine D (jusque l'acide aminé 288) a été réalisé. Ce mutant 1-288 montre un marquage dans le noyau dans 70% des cellules transfectées, et 30% ont un marquage noyau/cytoplasme. Nous pouvons dire que les mutants 1-236 et 1-288 se comportent de la même façon, et que l'arrêt de la protéine à l'acide aminé 236 n'interrompt pas de NLS.

Les délétions successives du domaine A/B du mutant 1-236, c'est-à-dire les mutants 236 Δ 19, 236 Δ 44 et 236 Δ 69 (fig 3A), montrent un marquage du noyau avec une diminution du marquage exclusivement nucléaire (60%, 57% et 56% respectivement) en faveur d'une augmentation du pourcentage de cellule ayant un marquage noyau/cytoplasme (40%, 43% et 44%). Cependant le pore nucléaire est capable de laisser diffuser des protéines jusqu'à une taille de 30k Da. Les mutants 1-288, 1-236, 236 Δ 19, 236 Δ 44 et 236 Δ 69 ont des tailles de 31,7 kDa, 26 kDa, 24 kDa, 21 kDa et 18 kDa respectivement. Nous pouvons donc penser que cette augmentation de la proportion de cellules ayant le double marquage noyau/cytoplasme est due à un phénomène passif de fuite vers le cytoplasme. Pour nous assurer que le domaine A/B n'est pas nécessaire pour que Rev-erb α se localise dans le noyau, nous avons construits le mutants 107-614 qui ne possède presque plus de domaine A/B (fig 3A). Ce mutant 107-614 est nucléaire avec 85% des cellules transfectées ayant un marquage uniquement nucléaire. Nous pouvons donc dire que le NLS de Rev-erb α se situe dans sa région N-terminale, entre le domaine C et le premier tiers du domaine D, c'est-à-dire entre les acides aminés 107 et 236.

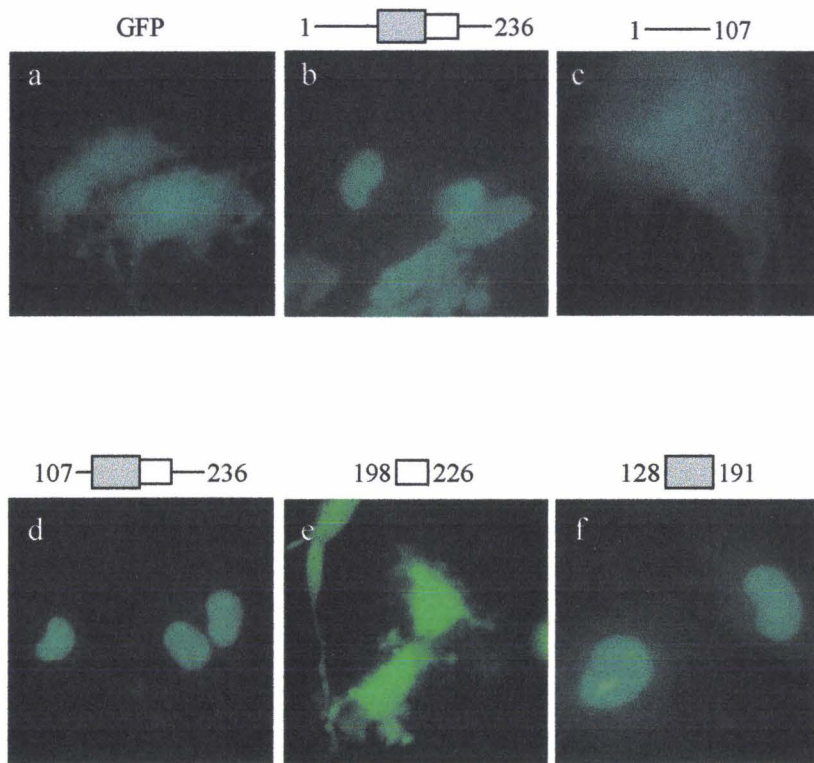


Figure 4 : Etude de la localisation subcellulaire de différents mutants de la région N-terminale de Rev-erb α humain. Cette étude a été réalisée dans des cellules COS-1 transfectées transitoirement par différentes chimères GFP/Rev-erb α . Ne sont représentées en haut de l'image que les régions de Rev-erb α fusionnées à la GFP. Les acides aminés de bordure de ces régions sont indiqués, et ces régions sont schématisées en fonction des différents domaines des récepteurs nucléaires. La boîte T/A est aussi représentée.

La partie C-terminale de Rev-erb α ne semble pas posséder de NLS. Etant donné que les NLS présents dans le domaine E dépendent du ligand pour être accessible au mécanisme de transport nucléaire, nous avons construit différents mutants de la partie C-terminale dans le but de tenter de faire apparaître des NLS cryptiques (fig 3B). Les mutants 236-C12, 236C37, 236C87 et 236C118 transfectés dans les cellules montrent tous un marquage cytoplasmique après incubation avec le sérum A83 spécifique. De ce fait, le NLS de Rev-erb α se situe dans sa partie N-terminale uniquement, et la partie C-terminale ne contient aucun NLS cryptique.

Le NLS des protéines Rev-erb α et Rev-erb β est dans les doigts de zinc du domaine C

Afin de palier au problème de diffusion passive à travers le pore nucléaire, nous avons construits des protéines chimères avec la GFP ("Green Fluorescent Protein") et des régions de Rev-erb α . La GFP est une protéine cytoplasmique (fig 4a). Un NLS, lorsqu'il est fusionné à une protéine cytoplasmique, doit permettre à cette protéine de se retrouver dans le noyau. La GFP est clonée dans le vecteur d'expression pEGFP-C1 qui permet d'étudier la localisation des chimères GFP dans des cellules COS-1 transfectées transitoirement. La région 1-236 de Rev-erb α fusionnée dans la partie C-terminale de la GFP donne une chimère nommée GFP/1-236. La chimère GFP/1-236 montre un marquage dans le noyau (fig 4b), par conséquent la région 1-236 de Rev-erb α possède bien un NLS. La chimère GFP/1-107 donne un marquage cytoplasmique, par conséquent il n'y a pas de NLS dans le domaine A/B. Les résultats obtenus avec les chimères GFP/1-236 et GFP/1-107 sont en accord avec ceux obtenus par immunofluorescence.

La chimère GFP/107-236 (fig 4d) montre un marquage nucléaire ce qui signifie que le NLS de Rev-erb α se situe entre les acides aminés 107 et 236. Cette région comprend la boîte T/A du domaine D qui est entre les acides aminés 198 et 226. Les boîtes T/A des récepteurs aux hormones thyroïdiennes et aux androgènes sont connus pour contenir un NLS. Cette région est riche en arginine et en lysine chez Rev-erb α . Nous avons donc construits et testé la chimère GFP/198-226 qui ne contient que la boîte T/A. Cette chimère montre un marquage cytoplasmique (fig 4e). La boîte T/A de Rev-erb α ne possède donc pas de NLS. Nous avons recherché la région la plus petite de Rev-erb α capable de créer une chimère montrant un

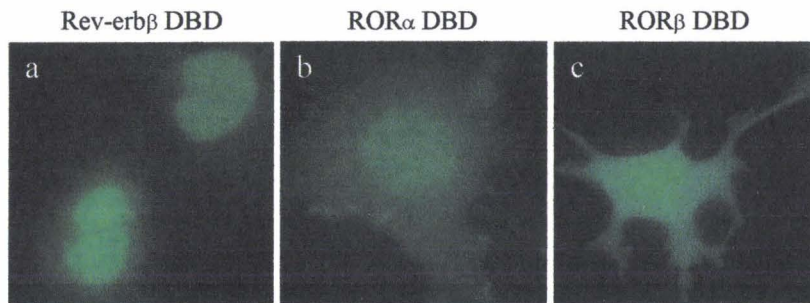
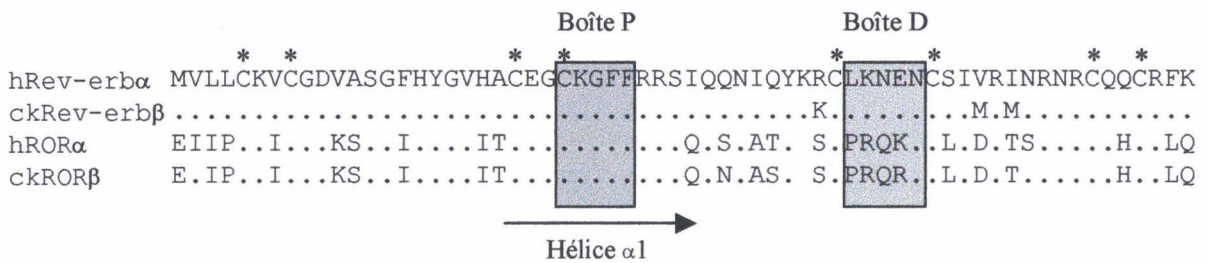


Figure 5 : Etude de la localisation des chimères GFP fusionnées aux doigts de zinc de Rev-erb β ou ROR α ou ROR β . Les séquences des doigts de zinc fusionnés sont alignées par rapport à Rev-erb α humain. Le point indique un acide aminé identique à celui de Rev-erb α à cette position. Les cystéines qui coordonnent un ion zinc sont indiquées par une astérisque, les boîtes P et D sont encadrées en gris, et l'hélice α 1 est symbolisée par une flèche. L'étude de la localisation subcellulaire des chimères GFP est réalisée dans des cellules COS-1 transfectées transitoirement.

marquage nucléaire. La chimère GFP/128-191 montre un marquage nucléaire (fig 4f). Cette région comprend le premier doigt de zinc du domaine C ainsi que le deuxième doigt de zinc tronqué dans son hélice (fig 5).

Cette même région chez Rev-erb β a été fusionnée à la GFP. La chimère obtenue, GFP/Rev-erb β DBD, montre aussi un marquage nucléaire (fig 5a). Les protéines Rev-erb α et Rev-erb β possèdent donc leur NLS dans une région inhabituelle que celle des doigts de zinc du DBD. Afin de savoir si ce type de NLS peut se généraliser à d'autres récepteurs orphelins proches phylogénétiquement des Rev-erb, nous avons fusionné les doigts de zinc du récepteur ROR. Les protéines Rev-erb et ROR ont pour point commun d'être capable de se fixer à l'ADN sous forme monomérique et de reconnaître le même type d'élément de réponse. De ce fait ROR α et Rev-erb α ont une identité de séquence de 60% au niveau de leur domaine de fixation à l'ADN. Les chimères GFP/ROR α DBD et GFP/ROR β DBD montrent toutes les deux un marquages cytoplasmique. Par conséquent leur NLS n'est pas dans les doigts de zinc.

C- Discussion

Par la technique d'immunofluorescence dans des cellules COS-1 transfectées transitoirement, nous avons montré que les récepteurs orphelins Rev-erb α humain et Rev-erb β de poulet sont localisés dans le noyau. La recherche de signaux de localisation nucléaire pour Rev-erb α montre qu'ils se situent dans la partie N-terminale de la protéine. Il semblerait qu'il n'y ait pas de NLS dans le domaine de fixation du ligand de Rev-erb α . La construction de chimères GFP-Rev-erb α montre que le NLS majeur de Rev-erb α se trouve dans le domaine de fixation à l'ADN, et plus précisément dans les doigts de zinc. Le récepteur Rev-erb β possède aussi un NLS dans cette région. L'identité de séquence entre Rev-erb α et ROR α dans cette région est de 60%. Nous avons donc testé si le récepteur phylogénétiquement le plus proche des Rev-erb, ROR, possède aussi un NLS au niveau des doigts de zinc. La région des doigt de zinc de ROR α et ROR β fusionnée à la GFP est cytoplasmique. Par conséquent, il n'y a pas de NLS dans les doigts de zinc de ROR. La présence d'un NLS majeur dans la région des doigts de zinc des protéines Rev-erb semble être spécifique de ces récepteurs.

1- Les protéines Rev-erb sont nucléaires

Les récepteurs nucléaires en absence de ligand sont localisés soit dans le noyau, soit dans le cytoplasme, soit à la fois dans le noyau et le cytoplasme. Les protéines Rev-erb α et Rev-erb β font partie des récepteurs localisés majoritairement dans le noyau. Il semblerait que de façon générale les récepteurs nucléaires orphelins comme TR2, SF1 et COUP-TFII, soient constitutivement localisés dans le noyau (Yu *et al.*, 1998; Hammer *et al.*, 1999; Achatz *et al.*, 1997).

2- Rev-erb α n'a pas de NLS dans son domaine E

L'étude de la localisation subcellulaire des mutants de la partie C-terminale de Rev-erb α a été réalisée par immunofluorescence. La visualisation indirecte de leur localisation dans le cytoplasme est faite à partir du sérum A83 spécifique, alors que le sérum AB43 est utilisé pour les mutants de la partie N-terminale. Cette différence de sérum pourrait expliquer les différences de localisation. Cependant, la protéine Rev-erb α entière a la même localisation dans les mêmes proportions que ce soit avec le sérum A83 spécifique ou le sérum AB43. Par conséquent le sérum A83 spécifique est capable de pénétrer dans le noyau et d'y reconnaître la protéine Rev-erb α . Cette différence de localisation subcellulaire n'est donc pas un artefact.

Etant donné que le ligand de Rev-erb α , si il existe, n'est pas connu, nous ne pouvons pas identifier les NLS qui fonctionnent qu'en présence du ligand. Or actuellement, les NLS présents dans le domaine E sont tous dépendants du ligand. Il semblerait que ces NLS soient masqués dans la molécule et que la fixation du ligand, entraînant une modification de la structure, démasque les NLS. Différentes délétions du domaine E ont été réalisées afin de démasquer un NLS mais aucun signal n'est apparu. Cependant, les récepteurs nucléaires ayant un ligand connu n'ont pas tous un NLS dans le domaine E. C'est le cas notamment du récepteur à la progestérone (Ylikomi *et al.*, 1992). Nous pouvons conclure qu'il n'y a pas de NLS constitutif dans le domaine E de Rev-erb α .

3- Rev-erb α n'a pas de NLS dans la jonction entre les domaines C et D

Nous pouvons remarquer que, en absence de leur ligand, les récepteurs nucléaires qui sont cytoplasmiques, comme GR, ou les récepteurs qui sont à la fois cytoplasmiques et nucléaires, comme Tr β et AR, ont tous la caractéristique d'être transloqués dans le noyau en présence de leur ligands, mais aussi de posséder leur NLS dans la boîte T/A du domaine D (Zhou *et al.*, 1994; Picard et Yamamoto, 1987; Haché *et al.*, 1999; Geoget *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1998). Il se pourrait que la fixation du ligand dans le domaine E, entraîne une modification de la structure de ce domaine, et modifie également la structure du domaine D contenant la boîte T/A. En effet, pour le récepteur aux hormones thyroïdiennes TR α 1, des mutations dans sa boîte T/A ont été réalisées (Lee et Mahdavi, 1993). Ces mutants, alors qu'ils sont toujours capables de fixer leur élément de réponse, ne peuvent pas activer la transcription, ni la réprimer en absence de ligand. La fixation du ligand dans le domaine E doit certainement modifier la structure tridimensionnelle de la boîte T/A et permettre ainsi l'activation transcriptionnelle. Il est possible que ce changement de structure rende alors le NLS accessible aux mécanisme d'importation nucléaire.

La fusion de la boîte T/A de Rev-erb α en C-terminal de la GFP ne permet pas à la GFP de se retrouver dans le noyau. Par conséquent, il n'y a pas de NLS dans cette région. Cependant la cartographie des NLS n'a été réalisée que pour des récepteurs qui activent la transcription et possèdent l'hélice H12 du domaine E. Or, les Rev-erb sont des répresseurs de la transcription, et ils ne possèdent pas l'hélice H12 contenant la fonction AF2. De ce fait, même si ils ont un ligand, la modification de la structure lors de la fixation du ligand, due notamment au mouvement de l'hélice H12, ne peut pas avoir lieu de la même façon chez les Rev-erb.

4- Le NLS de Rev-erb α est dans le domaine de fixation à l'ADN

Lorsque l'on étudie la localisation des NLS par rapport aux domaines de fixation à l'ADN de nombreux facteur de transcription, on constate que dans 75% des cas, le NLS se situe dans ce domaine, ou juste à côté, à une distance inférieure à dix acides aminés (LaCasse et Lefebvre, 1995). Cette proximité entre ces deux fonctions semble être indépendante du mode de fixation à l'ADN et du type de NLS. Ainsi, les facteurs de transcription comme c-ets-1, mais

aussi les protéines à homéodomaine, comme PDX-1, ont leur NLS dans leur domaine de fixation à l'ADN (Boulukos *et al.*, 1989; Hessabi *et al.*, 1999). Les récepteurs nucléaires font partie des facteurs de transcription dont le NLS est très proche du domaine de fixation à l'ADN. Mais aussi, certains récepteurs comme TR2 et SF1 ont leur NLS à l'intérieure de ce domaine (Yu *et al.*, 1998; Hammer *et al.*, 1999).

En ce qui concerne les protéines Rev-erb, nous venons de montrer que leur NLS se situe aussi dans le domaine de fixation à l'ADN. Le récepteurs nucléaires le plus proche phylogénétiquement de Rev-erb α est ROR α (60% d'identité dans leurs domaines de fixation à l'ADN). Or nous avons montré que ce domaine chez ROR α et ROR β ne possède pas de NLS. Par conséquent, le NLS des protéines Rev-erb peut se trouver dans les 40% de non identité entre les protéines Rev-erb et ROR. Ainsi la comparaison de ces domaines nous montre deux zones de différences notables : l'une est dans la boucle du premier doigt de zinc, l'autre est entre la fin de l'hélice $\alpha 1$ et la première cystéine du deuxième doigt de zinc. De ces deux régions, seule celle qui est entre l'hélice $\alpha 1$ et la boîte D, possède des résidus arginine et lysine. Par ailleurs, la cristallisation du domaine de fixation à l'ADN de Rev-erb α montre que ces deux résidus arginine et lysine sont accessible, c'est-à-dire pointant vers l'extérieure de la molécule (Zhao *et al.*, 1998).

De plus, dans l'alignement de séquence entre Rev-erb et ROR, là où Rev-erb α et Rev-erb β ont deux résidus basiques, les protéines ROR n'ont qu'une seule sérine. Il semblerait donc que le NLS des protéines Rev-erb se situe juste avant la boîte D. Ce qui signifie que le remplacement de ces deux résidus basiques par une sérine doit donner une chimère GFP/Rev-erb α DBD muté incapable de se localiser dans le noyau. A l'inverse, le remplacement de la sérine par deux résidus basiques doit permettre à la chimère GFP/ROR α DBD muté de se localiser dans le noyau.

Par ailleurs, ces deux résidus basiques n'existe que pour Rev-erb α et Rev-erb β . En effet, dans l'alignement de 58 récepteurs nucléaires dans la revue de Gronemeyer et Laudet (1995), 48 des récepteurs, dont ROR, ont un espace dans leur séquence au niveau de la lysine de Rev-erb α . Sur les 10 n'ayant pas d'espace de séquence, il y a bien sur les Rev-erb qui sont les seuls à avoir deux résidus basiques, les récepteurs E75 et PPAR (α , β et γ) qui ont un seul

résidus basique sur les deux acides aminés, et 4 récepteurs n'ayant pas de résidus basiques à cet emplacement. De ce fait, ces deux résidus basiques sont spécifiques des protéines Rev-erb, et il est fort probable qu'ils portent leur signal de localisation nucléaire.

D- Matériels et méthodes

Expression de fragments de Rev-erb chez la bactérie, et obtention de sérum chez le lapin

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été utilisée pour amplifier des fragments d'ADN complémentaire de Rev-erb α humain et de Rev-erb β de poulet. Les oligonucléotides de la région 5' des fragments amplifiés par PCR comprennent un site de restriction BamHI et ceux de la région 3', un site de restriction HindIII. Le site de restriction est choisi dans l'oligonucléotide 5' de manière à conserver le cadre de lecture des ADNc *Rev-erb α* et *Rev-erb β* en phase avec le cadre de lecture du gène MS2 du vecteur d'expression procaryote pPLC24. Ainsi ce clonage permet d'obtenir des vecteurs d'expression codant les protéines de fusion MS2-Rev-erb α ou MS2-Rev-erb β dont la structure comprend dans la partie N-terminale les 98 premiers acides aminés de la polymérase MS2.

Les oligonucléotides utilisés pour amplifier le fragment de la région de liaison à l'ADN de Rev-erbb de poulet (AB43) sont : en 5' TAGGGATCCCAATAGAAACAGATGCCAG et en 3' ATCAAGCTTACATGGCACTCTGCATTTC.

Les oligonucléotides utilisés pour amplifier le fragment de la région de liaison du ligand de Rev-erba humain (A83) sont : en 5' TAGGGATCCCCGGCAGGGCAACTCAAAG et en 3' ATCAAGCTTACACGTTGAACAACGAAGC.

Les oligonucléotides utilisés pour amplifier le fragment de la région de liaison du ligand de Rev-erbb de poulet (B81) sont : en 5' TAGGGATCCCAACACTGGAGGAAGAATG et en 3' ATCAAGCTTATGCATCAAACAAAGATGC.

Après digestion par les enzymes de restriction BamHI et HindIII (BRL), les fragments de séquences *Rev-erb α* et *Rev-erb β* sont clonés dans le vecteur pPLC24 préalablement digéré par BamHI et HindIII. La production plasmidique se fait dans la souche bactérienne *E.coli* LE 392 qui réprime constamment le promoteur du plasmide pPLC24 contrôlant l'expression de la séquence de fusion MS2-Rev-erb. L'expression des protéines de fusion MS2-AB43, MS2-A83

et MS2-B81 est réalisée dans la souche *E.coli* SG4044 qui possède le répresseur thermosensible pour le promoteur pL. L'induction de l'expression des protéines recombinantes est réalisée à 42°C pendant 3h. Le culot bactérien est lysé avec du Tris 50mM, EDTA 1mM pH8,0 (tampon TE) et du lysosyme à 1 mg/ml, à 4°C 15 min. A cette préparation sont ajoutés 40 ml de TE, NP-40 à 0,5% après 10 min, la préparation est amenée à 0,35M NaCl et 10 mM MgCl₂. La préparation subit ensuite 1h de traitement à la DNase I bovine (Boehringer) à 100 µg/ml à 4°C. Lorsque le lysat est moins visqueux, il est centrifugé à 8 000 rpm en rotor à angle fixe (Sorval), 15 min. Le culot est lavé deux fois par 10 ml de TE /NP-40 0,5% puis une fois par 10 ml de TE . Le culot est repris dans 3 ml de TE pH 6,5 et 3 ml de tampon de dépôt . Cette solution est ensuite bouillie 10 min, et centrifugée à 6 000 rpm en rotor à angle fixe (Sorval), 10 min. La préparation est purifiée sur gel d'acrylamide-SDS à 15%. La protéine est identifiée par coloration d'une bande de gel, puis isolée et extraite du gel par électroélution dans du tampon Tris 50 mM; glycine 200 mM; SDS 0,1%; aprotinine 0,1%. Les protéines électroéluées sont déposées sur un gel de polyacrylamide-SDS à 15% afin de connaître leur degré de pureté, détecter une éventuelle dégradation, et estimer leur concentration avec une gamme de BSA de concentration connue. Les sérums de le lapin sont obtenus à partir de ces protéines.

Les sérums pré-immuns sont obtenus avant toute immunisation. Le sérum immun va nous permettre d'obtenir deux sortes de sérums adsorbés. Le premier correspond au sérum immun pré-incubé toute la nuit à 4°C avec la protéine ayant été injectée au lapin, ce sérum est nommé "sérum adsorbé" (Ads). Le second est réalisé pour le sérum A83 épuisé contre la portion peptidique de Rev-erb β (MS2-B81) qui correspond à la même région de fixation du ligand que chez Rev-erb α qui a permis d'obtenir le sérum immun A83. Ce sérum est qualifié de "spécifique" (A83 Spe).



Clonage

Les différents mutants de Rev-erb α utilisé en immunofluorescence sont obtenue par PCR à partir du plasmide pSG5 Rev-erb α humain. Les oligonucléotides de la région 5' des fragments amplifiés par PCR comprennent un site de restriction BamHI et ceux de la région 3' ,

un site de restriction HindIII. Le fragment ainsi amplifié est digéré par les enzymes de restriction HindIII et BamHI puis inséré entre les sites HindIII-BamHI du vecteur d'expression pSG5.

Les différentes chimères construites avec la GFP sont obtenues par PCR à partir des plasmides pSG5 Rev-erb α humain, pSG5 Rev-erb β de poulet, pCMX ROR α humain et pCMX ROR β de poulet. Les oligonucléotides de la région 5' des fragments amplifiés par PCR comprennent un site de restriction BamHI et ceux de la région 3', un site de restriction HindIII. Le site de restriction est choisi dans l'oligonucléotides de manière à conserver le cadre de lecture du gène GFP en phase avec le cadre de lecture des fragments amplifiés. Le fragment ainsi amplifié est digéré par les enzymes de restriction HindIII et BamHI puis inséré entre les sites HindIII-BamHI du vecteur d'expression pEGFP-C1. Ainsi ce clonage permet d'obtenir des vecteurs d'expression codant les protéines de fusion GFP/Rev-erb α , GFP/Rev-erb β , GFP/ROR α et GFP/ROR β .

Traduction en lysats de réticulocytes.

On utilise le kit de traduction en lysat de réticulocytes de Promega pour traduire les vecteurs pSG5 Rev-erb α humain ou pSG5 Rev-erb β de poulet. La traduction est réalisée avec la polymérase T7 pendant 1 h 30 à 30°C selon le protocole du fournisseur. Ces lysats de réticulocytes sont testés et quantifiés sur un gel de polyacrylamide-SDS à 10%.

Transfection transitoire en cellules COS-1

Les cellules COS-1 sont transfectées avec 1 μ g d'ADN plasmidique et du PEI (Euromedex). Les cellules sont mises à incuber 6h à 37°C. La transfection est interrompue par ajout de 2 ml de milieu DMEM à 10% de sérum de veau foetal (SVF). Les cellules vont croître dans ce même milieu, ce qui va permettre l'expression de l'ADN transfecté. Les produits de cette expression peuvent être détectés 24 à 72 h plus tard.

Les cellules sont lysées 48h après la transfection dans du tampon RIPA (20mM Tris, pH7,5; 150mM sodium chloride; 2mM EDTA, 1% (wt/vol) sodium deoxycholate, 1% (vol/vol)

TritonX-100, 0,25% (wt/vol)SDS), sur la glace. Le lysat récupéré est centrifugé à 30 000 rpm en TL100 en rotor à angle fixe (Beckman) pendant 30 min à 4°C, puis le surnageant est récolté.

Immunoprécipitation et électrophorèse.

Les protéines synthétisées en lysat de réticulocyte sont incubées avec le sérum 18h à 4°C sous agitation douce dans 500 µl tampon RIPA (20mM Tris, pH7,5; 150mM sodium chloride; 2mM EDTA, 1% (wt/vol) sodium deoxycholate, 1% (vol/vol) TritonX-100, 0,25% (wt/vol)SDS). 50 µl d'une suspension de billes de Sépharose-protéine A (Pharmacia) à 50% dans du RIPA est additionnée, et le tout est maintenu sous agitation douce pendant 30 min. L'immun adsorbant, constitué du complexe de billes de sépharose-protéine A-anticorps-protéine Rev-erb α ou Rev-erb β , est ensuite lavé 4 fois, chaque lavage est séparé du suivant par une centrifugation à 14 000 rpm en centrifugeuse Eppendorf, 2 min à 4°C. L'immun adsorbant est donc repris successivement dans 1 ml de RIPA, 1 ml RIPA / 0,5 M NaCl, 1 ml de RIPA / TNE (v/v), puis dans 1 ml de TNE. Le culot est finalement repris dans du tampon de dépôt puis bouilli 10 min. Le surnageant est déposé sur un gel de polyacrylamide-SDS à 10%. Le gel est ensuite traité 1h dans de l'Amplify (Amersham) puis 1h dans un mélange acide acétique/méthanol/eau (1/5/5). Après séchage, il est mis en autoradiographie avec les films Hyperfilm-MP (Amersham).

Immunofluorescence et GFP

L'immunofluorescence est réalisée sur des cellules COS-1 transfectées. 24h après la transfection, les cellules sont déposées dans des cupules contenant des lamelles couvre-objet préalablement traitées à l'éthanol. Au bout de 24h, après 2 rinçages au PBS, les cellules sont fixées par du paraformaldéhyde à 4% dans du PBS pendant 20 min à 4°C. A la suite de 2 rinçages au PBS, les cellules sont rendues perméables par du triton X100 à 0,2% dans du PBS pendant 5 min, puis les groupements aldéhyde libres sont bloqués par de l'éthanolamine 0,2M dans du PBS, pendant 20 min à 4°C. Un rinçage au tampon PBS, bovine sérum albumine 0,5%, sérum de veau fœtal 0,5% (PBS-BSA-SVF) permet, par l'apport de protéines, d'inhiber les sites de liaison non spécifiques. Les cellules sont incubées en présence du sérum dilué au

1/100^{ème} dans du PBS-BSA-SVF pendant 3h. Après 3 rinçages de 5 min au PBS-BSA-SVF, la préparation est mise en présence d'un anticorps secondaire de porc dirigé contre le fragment Fc des immunoglobulines de lapin. Cet anticorps marqué à la fluorescéine et dilué au 1/100^{ème} dans du PBS-BSA-SVF, est incubé pendant 1h à 37°C. Après 4 rinçages de 5 min au PBS-BSA-SVF et un rinçage bref au PBS, les lamelles sont montées sur des lames porte-objet à l'aide du mélange glycérol/PBS (4v/1v). Les lames sont ensuite observées au microscope Axioscope (Zeiss) par fluorescence sous UV.

Les cellules COS-1 transfectées transitoirement par le plasmide pEGFP-C1 sont fixées 24h après la transfection dans du PBS, 2% paraformaldéhyde, 0,2% glutaraldéhyde

REFERENCES

- **Achatz,G.**, Hölzl,B., Speckmayer,R., Hauser,C., Sandhofer,F. and Paulweber,B. (1997). Functionnal domains of the human orphan receptor ARP-1/COUP-TFII involved in active repression and transrepression. *Mol.Cell.Biol.* 17 : 4914-4932.
- **Adams,M.**, Reginato,M.J., Shao,D., Lazar,M.A. and Chatterjee, V.K. (1997). Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor γ is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J.Biol.Chem.* 272 : 5128-5132.
- **Adelmant,G.**, Bègue,A., Stéhelin,D. and Laudet,V. (1996). A functional Rev-erb α responsive element located in the human Rev-erb α promoter mediates a repressing activity. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 93 : 3553-3558.
- **Ali,S.**, Metzger,D., Bornert,J.M. and Chambon,P. (1993). Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. *EMBO J.* 12 : 1153-1160.
- **Alland,L.**, Muhle,R, Hou,A, Potes,J, Chin,L, Schreiber-Agus,N and DePinho,R.A. (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* 387 : 49-55.
- **Anzick,S.L.**, Kononen,J., Walker,R.L., Azorsa,D.O., Tanner,M.M., Guan,X.Y., Sauter,G., Kallioniemi,O.P., Trent,J.M. and Meltzer,P.S. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277 : 965-968.
- **Aoyama,T.**, Peters,J.M., Iritani,N., Nakajima,T., Furihata,K., Hashimoto,T. and Gonzalez,F.J. (1998). Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α). *J.Biol.Chem.* 273 : 5678-5684.
- **Balsalobre,A.**, Damiola,F., and Schibler,U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93 : 929-937.
- **Bannister,A.J. and Kouzarides,T.** (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384 : 641-643.
- **Barettino,D.**, Vivanco Ruiz,M.D.M. and Stunnenberg,H.G. (1994). Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. *EMBO J.* 13 : 3039-3049.
- **Beato,M.** Gene regulation by steroid hormones. (1989). *Cell* 56 : 335-344.
- **Berkow,R.**, Fletcher,A.J, Bondy,P.K, Faling,L.J, Feinstein,A.R, Frenkel,E.P, Hoekelman,R.A, Petersdorf,P.G, Plum,F, Romano,J, Rossi,G.V, Talbott,J.H et Tanser,P.H. (1988). Manuel Merck de diagnostic et thérapeutique. Editions Sidem-T-M
- **Berthou,L.**, Duverger,N., Emmanuel,F., Langouët S., Auwerx,J., Guillouzo,A., Fruchart,J.C., Rubin,E., Denèfle,P., Staels,B. and Branellec,D. (1996). Opposite regulation of human versus mouse apolipoprotein A-I by fibrates in human apolipoprotein A-I transgenic mice. *J.Clin.Invest.* 97 : 2408-2416.
- **Blumberg,B. and Evans,R.M.** (1998). Orphan nuclear receptors—new ligand and new possibilities. *Genes & Dev.* 12 : 3149-3155.
- **Bonnelye,E.**, Vanacker,J.M., Desbiens,X., Bègue,A., Stéhelin D. and Laudet,V. (1994). Rev-erb β , a new member of the nuclear receptor superfamily, is expressed in the nervous system during chicken development. *Cell Growth and Differentiation* 5 : 1357-1365.

- **Boulukos,K.E.**, Pognonec,P., Rabault,B., Begue,A. and Ghysdael,J. (1989). Definition of an Ets1 protein domain required for nuclear localization in cells and DNA-binding activity in vitro. *Mol.Cell.Biol.* 9 : 5718-5721.
- **Bourguet,W.**, Ruff,M., Chambon,P., Gronemeyer,H. and Moras,D. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nature* 375 : 377-382.
- **Braissant,O.**, Foufelle,F., Scotto,C., Dauça,M. and Wahli,W. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) : tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. *Endocrinology* 137 : 354-366.
- **Breslow,J.L.** (1993). Transgenic mouse models of lipoprotein metabolisms and atherosclerosis. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 90 : 8314-8318.
- **Brzowski,A.M.**, Pike,A.C.W., Dauter,Z., Hubbard,R.E., Bonn,T., Engström,O., Öhman,L., Greene,G.L., Gustafsson,J.A. and Carlquist,M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389 : 753-758.
- **Burke,L.**, Carlquist,M, Carozzi A., Giguère,V. and Muscat,G.E.O. (1996). Transcriptional repression by the orphan steroid receptor RVR/Rev-erb β is dependent on the signature motif and helix 5 in the E region : functional evidence for a biological role of RVR in myogenesis. *Nucleic Acids Res.* 24 : 3481-3489.
- **Burke,L.J.**, Downes,M., Laudet,V. and Muscat,G.E.O. (1998). Identification and characterisation of a novel corepressor interaction region in RVR and Rev-erb α . *Mol.Endocrinol.* 12 : 248-262.
- **Carlberg,C.**, van Huijsduijnen,R.H., Staple,J.K., DeLamarter,J.F. and Becker-André,M. (1994). RZR α , a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and heterodimer. *Mol.Endocrinol.* 8 : 757-770.
- **Cavaillès,V.**, Dauvois,S., L'Horst,F., Lopez,G., Hoare,S., Kushner,P.J. and Parker,M.G. (1995). Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J.* 14 : 3741-3751.
- **Chalfie,M.**, Tuy,Y., Euskirchen,G., Ward,W.W, and Prasher,D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene rexpession. *Science* 263 : 802-805.
- **Chakravarti,D.**, LaMorte,V.J., Nelson,M.C., Nakajima,T., Schulman,I.G., Juguilon,H., Montminy,M., Evans,R.M. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* 383 : 99-103.
- **Chambraud,B.**, Berry,M., Redeuilh,J., Chambon,P. and Baulieu,E-E. (1990). Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock proyein 90 complexes. *J.Biol.Chem.* 265 : 20686-20691.
- **Chawla,A. and Lazar,M.A.** (1993). Induction of Rev-ErbA α , an orphan receptor encoded on the opposite strand of the α -thyroid hormone receptor gene, during adipocyte differentiation. *J.Biol.Chem.* 268 : 16265-16269.
- **Chen,D.**, Pace,P.E, Coombes,R.C. and Ali,S. (1999). Phosphorylation of human estrogen receptor α by protein kinase A regulates dimerisation. *Mol.Cell.Biol.* 19 : 1002-1015.
- **Chen,J.D. and Evans,R.M.** (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377 : 454-457.

- **Chen, J.D.**, Umesono, K. and Evans, R.M. (1996). SMRT isoforms mediate repression and anti-repression of nuclear receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93 : 7567-7571.
- **Chen, H.**, Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y and Evans, R.M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90 : 569-580.
- **Chen, W.S.**, Manova, K., Weinstein, D.C., Duncan, S.A., Plump, A.S., Presiozo, V.R., Bachvarova, R.F. and Darnell, J.E. (1994). Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes & Dev.* 8 : 2466-2477.
- **Choi, H-S.**, Chung, M., Tzamelis, I., Simhe, D., Lee, Y-K., Seol, W., Moore, D.D. (1997). Differential transactivation by two isoforms of the orphan nuclear hormone receptor CAR. *J. Biol. Chem.* 272 : 23565-23571.
- **Conti, E.**, Uly, M., Leighton, L., Blodell, G., Kuriyan, J. (1998). Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α . *Cell* 94 : 193-204.
- **Dalman, F.C.**, Koenig, R.J., Perdrew, G.H., Massa, E. and Pratt, W.B. (1990). In contrast to the glucocorticoid receptor, the thyroid hormone receptor is translated in the DNA binding state and is not associated with hsp90. *J. Biol. Chem.* 265 : 3615-3618.
- **Dalman, F.C.**, Sturzenbecker L.J., Levin, A.A., Lucas, D.A., Perdrew, G.H., Petkovitch, M., Chambon, P., Grippo, J.F. and Pratt, W.B. (1991). Retinoic acid receptor belongs to a subclass of nuclear receptors that do not form "docking" complexes with hsp90. *Biochemistry* 30 : 5605-5608.
- **Danielian, P.S.**, White, R., Lees, J.A. and Parker, M.G. (1992). Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.* 11 : 1025-1033.
- **Darimont, B.D.**, Wagner, R.L., Apriletti, J.W., Stallcup, M.R., Kushner, P.J., Baxter, J.D., Fletterick, R.J and Yamamoto, K.R. (1998). Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes & Dev.* 12 : 3343-3356.
- **Demetri, G.D.**, Fletcher, C.D.M., Mueller, E., Sarraf, P., Naujoks, R., Campbell, N., Spiegelman, B.M. and Singer, S. (1999). Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 : 3951-3956.
- **Desvergne, B. and Wahli, W.** (1995). PPAR : a key nuclear factor in nutrient/gene interactions ? In " *Inducible gene expression* ". vol 1 : 142-176 Bauerle, P. ed., Birkhäuser, Boston, MA.
- **Devchand, P.R.**, Keller, H., Peters, J.M., Vasquez, M., Gonzalez, F.J. and Wahli, W. (1996). The PPAR α -leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384 : 39-43.
- **Downes, M.**, Carozzi, A.J. and Muscat, G.E.O. (1995). Constitutive expression of the orphan receptor, Rev-erbA α , inhibits muscle differentiation and abrogates the expression of the myoD gene family. *Mol. Endocrinol.* 9 : 1666-1678.
- **Downes, M.**, Burke, L.J. and Muscat, G.E.O. (1996a). Transcriptional repression by Rev-erbA α is dependent on the signature motif and helix5 in the ligand binding domain : silencing does not involve an interaction with N-CoR. *Nucleic Acids Res.* 24 : 3490-3498.

- **Downes,M.**, Burke,L.J., Bailey,P.J. and Muscat,G.E.O. (1996b). Two receptor interaction domains in the corepressor, N-CoR/RIP-13, are required for an efficient interaction with Rev-erbA α and RVR : physical association is dependent on the E region of the orphan receptors. *Nucleic Acids Res.* 24 : 4379-4386.
- **Dressel,U.** , Thormeyer,D., Altincicek,B., Paululat,A., Eggert,M., Schneider,S., Tenbaum,S.P., Renkawitz,R. and Baniahmad,A. (1999). Alien, a highly conserved protein with characteristics of a corepressor for members of the nuclear hormone. *Mol.Cell.Biol* 19 : 3383-3394.
- **Dreyer,C.**, Krey,G., Keller,H., Givel,F., Helftenbein,G. and Wahli,W. (1992). Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* 68 : 879-887.
- **Dumas,B.**, Harding,H.P., Choi,H.S., Lehmann,K.A., Chung,M., Lazar,M.A. and Moore D.D. (1994). A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily closely related to Rev-Erb. *Mol.Endocrinol.* 8 : 996-1005.
- **Durand,B.**, Saunders,M., Gaudon,C., Roy,B., Losson,R. and Chambon P. (1994). Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor : presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *EMBO J.* 13 : 5370-5382.
- **Durand,B.**, Saunders,M., Leroy,P., Leid,M. and Chambon,P. (1992). All-trans and 9-cis retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs. *Cell* 71 : 73-85.
- **Dussault,I. and Giguère,V.** (1997). Differential regulation of the N-myc proto-oncogene by ROR α and RVR, two orphan members of the superfamily of nuclear hormone receptors. *Mol.Cell.Biol.* 17 : 1860-1867.
- **Enmark,E. and Gustafsson,J.A.** (1996). Orphan nuclear receptors - The first eight years. *Mol.Endocrinol.* 10 : 1293-1307.
- **Enmark,E.**, Kainu,T., Pelto-Huikko,M. and Gustafsson,J.A. (1994). Identification of a novel member of the nuclear receptor superfamily which is closely related to Rev-erb α . *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 204 : 49-56.
- **Evans,R.M.** (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240 : 889-895.
- **Fejes-Toth,G**, Pearce,D. and Naray-Fejes-Toth,A. (1998). Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells : effects of receptor agonists and antagonists. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 95 : 2973-2978.
- **Folkers,G.E.**, van der Leede,B.J.M. and van der Saag,P.T. (1993). The retinoic acid receptor- β 2 contains two separate cell-specific transactivation domains, at the N-terminus and in the ligand-binding domain. *Mol.Endocrinol.* 6:616-626.
- **Forman,B.M. and Samuels,H.H.** (1990). Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors : the regulatory zipper model. *Mol.Endocrinol.* 4 : 1294-1301.
- **Forman,B.M.**, Good,E., Chen,J., Oro,A.E., Bradley,D.J., Perlmann,T., Noonan,D.J., Burka,L.T., McMorris,T., Lamph,W.W., Evans,R.M. and Weinberger C. (1995a). Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* 81 : 687-693.

- **Forman,B.M.**, Chen,J., Blumberg,B., Kliewer,S.A., Henshaw,R., Ong,E.S. and Evans,R.M. (1994). Cross-talk among ROR α 1 and the Rev-erb family of orphan nuclear receptors. *Mol.Endocrinol.* 8 : 1253-1261.
- **Forman,B.M.**, Tontonoz,P., Chen,J., Brun,R.P., Spiegelman,B.M. and Evans,R.M. (1995b). 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 83 : 803-812.
- **Forman,B.M.**, Tzamelis,I., Choi,H-S., Chen,J., Simha,D., Seol,W., Evans,R.M. and Moore,D.D. (1998). Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR- β . *Nature* 395 : 612-615.
- **Gearing,K.L.**, Göttlicher,M., Teboul,M., Widmark,E. and Gustafsson,J.A. (1993). Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90 : 1440-1444.
- **Georget,V.**, Trérouanne,BV., Lumbroso,S., Nicolas,J.C. and Sultan,C. (1998). Trafficking of androgen receptor mutants fused to green fluorescent protein : a new investigation of partial androgen insensitivity syndrome. *J.Clin.Endocrinol. and Metab.* 83 : 3597-3603.
- **Gervois,P.**, Chopin-Delannoy,S., Fadel,A., Dubois,G., Kosykh,V.,Fruchart,J-C., Najib,J., Laudet,V.and Staels,B. (1999). Fibrates increase human Rev-erb α expression in liver via a novel peroxisome proliferator-activated receptor response element. *Mol.Endocrinol.* 13 : 400-409
- **Gerwin,N.**, La Rosée,A., Sauer,F., Halbritter,H-P., Neumann,M., Jäckle,H. and Nauber,U. (1994). Functional and conserved domains of the *Drosophila* transcription factor encoded by the segmentation gene *knirps*. *Mol.Cell.Biol* 14 : 7899-7908.
- **Giguère,V.**, Ong,E.S., Segui,P. and Evans,R.M. (1987). Identification of a receptor for the Morphogen retinoic acid. *Nature* 330 : 624-629.
- **Giguère,V.**, McBroom,L.D.B. and Flock,G. (1995). Determinants of target gene specificity for ROR α 1: monomeric DNA binding by an orphan nuclear receptor. *Mol.Cell.Biol.* 15 : 2517-2526.
- **Giguère,V.**, Tini,M., Flock,G., Ong,E., Evans,R.M. and Otulakowski,G. (1994). Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR- α , a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes & Dev.* 8 : 538-553.
- **Giguère,V.**, Yang,N., Segui,P. and Evans,R.M. (1988). Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* 331 : 91-94.
- **Glass,C.K.** (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocrine Reviews* 15 : 391-407.
- **Goldfard,D.S.** (1997). Whose finger is on the switch?. *Science* 276 :1814-1816
- **Görlich,D.** (1998). Transport into and out of the cell nucleus. *EMBO J.* 17 : 2721-2727.
- **Göttlicher,M.**, Widmark,E., Li,Q. and Gustafsson,J.A. (1992). Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc.Natl.Azcad.Sci. USA* 89 : 4653-4657.
- **Granner,D.K**, Mayes,P.A, Murray,R.K and Rodwell,V.W. (1989). Précis de biochimie de Harper. Les presses de l'Université Laval-éditions ESKA.

- **Green,S.** (1993). Promiscuous liason. *Nature* 361 : 590-591.
- **Gronemeyer,H. and Moras,D.** (1995). How to finger DNA. *Nature* 375 : 190-191.
- **Gronemeyer,H. and Laudet,V.** (1995). Transcription factors 3 : nuclear receptors. *Protein Profile* 2 : 1173-1213.
- **Guiochon-Mantel,A., Loosfelt,H., Lescop,P., Sar,S., Atger,M., Perrot-Applanat,M. and Milgrom,E.** (1989). Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor : evidence for interaction between monomers. *Cell* 57 : 1147-1154.
- **Guiochon-Mantel,A., Loosfelt,H., Lescop,P., Christin-Maitre,S., Loosfelt,H., Perrot-Applanat,M. and Milgrom,E.** (1991) Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *EMBO J.* 10 : 3851-3859.
- **Haché,R.J.G., Tse,R., Reich,T. Savory,J.G.A. and Lefebvre,Y.A.** (1999). Nucleocytoplasmic trafficking of steroid-free glucocorticoid receptor. *J.Biol.Chem.* 274 : 1432-1439.
- **Hammer,G.D., Krylova,I., Zhang,Y., Darimont,B.D., Simpson,K., Weigel,N.L. and Ingraham,H.A.** (1999). Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment : integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Molecular Cell* 3 : 521-526.
- **Härd,T., Kellenbach,E., Boelens,R., Maler,B.A., Dahlman,K., Freedman,L.P., Carlstedt-Duke,J., Yamamoto,K.R., Gustafsson,J.A. and Kaptein,R.** (1990). Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science* 249 : 157-160.
- **Harding,H.P. and Lazar,M.A.** (1995). The monomer-binding orphan receptor Rev-Erb represses transcription as a dimer on a novel direct repeat. *Mol.Cell.Biol.* 15 : 4791-4802.
- **Harding,H.P. and Lazar,M.A.** (1993). The orphan receptor Rev-ErbA α activates transcription via a novel response element. *Mol.Cell.Biol.* 13 : 3113-3121.
- **Heery,D.M., Kalkhoven,E., Hoare,S. and Parker,M.J.** (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387 : 733-736.
- **Heinzel T, Lavinsky,R.M, Mullen,T-M, Söderstrom,M, Laherty,C.D., Torchia,J., Yang,W-M, Brard,G., Ngo,S.D., Davie,J.R, Seto,E, Eisenman,R.N, Rose,D.W, Glass,C.K. and Rosenfeld,M.G.** (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* 387 : 43-48.
- **Hertz,R. , Bishara-Shieban,J. and Bar-Tana,J.** (1995). Mode of action of peroxisome proliferators as hypolipidemic drugs. *J.Biol.Chem.* 270 : 13470-13475.
- **Hessabi,B., Ziegler,P., Schmigtl,I., Hessabi,C and Walther,R.** (1999). The nuclear localization signal (NLS) of PDX-1 is part of the homeodomain and represents a novel type of NLS. *Eur.J.Biochem* 263 : 170-177.
- **Hirose,T., Smith,R.J. and Jetten,A.M.** (1994). ROR γ : the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 205 : 1976-1983.
- **Hoch,M., Gerwin,N., Taubert,H. and Jackle,H.** (1992). Competition for overlapping sites in the regulatory region of the Drosophila gene Kruppel. *Science* 256 : 94-97.

- **Hollenberg,S.M.**, Weinbergber,C., Ong,E.S., Cerelli,G., Oro,A., Lebo,R., Thompson,E.B., Rosenfeld,M.G. and Ervans,R.M. (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318 : 635-641.
- **Hollenberg,S.M. and Evans,R.M.** (1988). Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 55 : 899-906.
- **Hörlein,A.J.**, Näär,A.M., Heinzl,T., Torchia,J., Gloss,B., Kurokawa,R., Ryan,A., Kamei,Y., Söderström,M., Glass,C.K. and Rosenfeld,M.G. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377 : 397-403.
- **Htun,H** , Barsony,J., Renyi,I., Gould,D.L. and Hager,G.L. (1996). Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intranuclear organization in living cells with a green fluorescent protein chimera. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 93 : 4845-4850.
- **Hu,E.**, Tontonoz,P. and Spiegelman,B.M. (1995). Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR γ and C/EBP α . *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 92 : 9856-9860.
- **Hu,E.**, Kim,J.B., Sarraf,P. and Spiegelman,B.M. (1996). Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR γ . *Science* 247 : 2100-2103.
- **Iijima,K.**, Yoshizumi,M., Ako,J., Eto,M., Kim,S., Hashimoto,M., Sugimoto,N., Liang,Y.Q., Sudoh,N., Toba,K. and Ouchi,Y. (1998). Expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem. and Biophys.Res.Com.* 247 : 353-356.
- **Issemann,I. and Green,S.** (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347 : 645-650.
- **Issemann,I.**, Prince,R.A., Tugwood,J.D. and Green,S. (1993). The retinoid X receptor enhances the function of the peroxisome proliferator activate receptor. *Biochimie* 75 : 251-256.
- **Janknecht,R. and Hunter,T.** (1996). A growing coactivator network. *Nature* 383 : 22-23.
- **Janowski,B.A.**, Willy,P.J, Devi,T.R., Falck,J.R. and Mangelsdorf,D.L. (1996). An axysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α . *Nature* 383 : 728-731.
- **Jensen,E.V.**, Suzuki,T., Kawashima,R., Stumpf,W.E., Jungblut,P.W. and Desombre,E.R. (1968). A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Biochemistry* 59 : 632-638.
- **Jiang,C.**, Ting,A.T. and Seed,B. (1998). PPR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391 : 82-86.
- **Kalkhoven,E.**, Valentine,J.E., Heery,D.M. and Parker,M.G. (1998). Isoforms of steroid receptor co-activator 1 differ in their ability to potentiate transcription by the oestrogen receptor. *EMBO J.* 17 : 232-243.
- **Kamei,Y.**, Xu,L., Heinzl,T., Torchia,J., Kurokawa,R., Gloss,B., Lin,S.C., Heyman,R.A., Rose,D.W., Glass,C.K. and Rosenfeld,M.G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85 : 403-414.

- **Kastner,P.**, Perez,A., Lutz,Y., Rochette-Egly,C., Gaub,M-M., Durand,B., Lanotte,M., Berger and Chambon,P. (1992). Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor α fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL) : structural similarities with new family of oncoproteins. *EMBO J.* 11 : 629-642.
- **Kastner,P.**, Mark,M. and Chambon,P. (1995). Nonsteroid nuclear receptors : what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 83 : 859-869.
- **Kato,S.**, Endoh,H., Masuhiro,Y., Kitamoto,T., Uchiyama S., Sasaki,H., Masushige,S., Gotoh,Y., Nishida,E., Kawashima,H., Metzger,D. and Chambon,P. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270 : 1491-1494.
- **King,W.J. and Greene,G.L.** (1984). Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 307 : 745-747.
- **Kliwer,S.A.**, Umesono,K., Noonan,D.J., Heyman,R.A. and Evans,R.M. (1992). Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358 : 771-774.
- **Kliwer,S.A.**, Lenhard,J.M., Willson,T.M., Patel,I., Morris,D.C. and Lehmann,J.M. (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83 : 813-819.
- **Kliwer,S.A.**, Forman,B.M., Blumberg,B., Ong,E.S., Borgmeyer,U., Mangelsdorf,B.J, Umesono,K. and Evans,R.M. (1994). Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91 : 4355-7359.
- **Kliwer,S.A.**, Moore,J.T, Wade,L., Staudinger,J.L., Watson,M.A., Jones,S.A., McKee,D.D., Olivier,B.B., Willson,T.M., Zetterström, R.H., Perlmann,T. and Lehmann,J.M. (1998). An orphan nuclear receptor activated pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* 92 : 73-82.
- **Krey,G.**, Keller,H., Mahfoudi,A., Medin,J., Ozato,K., Dreyer,C. and Wahli,W. (1993). *Xenopus* peroxisome proliferator activated receptors : genomic organization, response element recognition, heterodimer formation with retinoid X receptor and activation by fatty acids. *J.Steroid.Biochem.Mol.Biol.* 47 : 65-73.
- **Krey,G.**, Braissant, O., L'Horset, F., Kalkhoven, E., Peroud, M., Parker, M.G. and Wahli, W. (1997). Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptors ligand assay. *Mol.Endocrinol.* 11 : 779-791.
- **Krust,A.**, Green,S., Argos,P., Kumar,V., Walter,P., Bornert ,J.M. and Chambon,P. (1986). The chicken oestrogen receptor sequence : homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J.* 5 : 891-897.
- **Kurokawa,R.**, Yu,V.C., Näär,A., Kyakumoto,S., Han,Z., Silverman,S., Rosenfeld,M.G. and Glass,C.K. (1993). Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxyterminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. *Genes & Dev.* 7 : 1423-1435.
- **LaCasse,E.C. and Lefebvre,Y.A.** (1995). Nuclear localization signals overlap DNA- or RNA-binding domains in nucleic acid-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 23 : 1647-1656.
- **Laudet,V.** (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily : early diversification from an ancestral orphan receptor. *J.Mol.Endocrinol.* 19 : 207-226.

- **Laudet,V.**, Bègue,A., Henry-Duthoit,C., Joubel,A., Martin,P., Stéhelin,D. and Saule,S. (1991). Genomic organization of the human thyroid hormone receptor α (c-erba-1) gene. *Nucleic Acids Res.* 19 : 1105-1112.
- **Laudet,V.** (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97 : 161-163.
- **Lavinsky,R.M.**, Jepsen,K., Heinzl,T. Torchia,J. Mullen,T.M., Schiff,R., Del-Rio,A.L., Ricote,M., Ngo,S , Gemsch,J., Hilsenbeck,S.G., Osbornes,C.K., Glass,C.K., Rosenfeld,M.G. and Rose,D.W. (1998). Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 95 : 2920-2925.
- **Lazar,M.A.**, Hodin,R.A., Darling,D.S. and Chin,W.W. (1989). A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat c-erbA α transcriptional unit. *Mol.Cell.Biol.* 9 : 1128-1136.
- **Lazar,M.A.**, Hodin,R.A., Cardona,G. and Chin,W. (1990). Gene expression from the c-erbA α /Rev-Erb α genomic locus. *J.Biol.Chem.* 265 : 12859-12863.
- **Le Douarin,B.**, Zechel,C., Garnier,J.M., Lutz,Y., Tora,L., Pierrat,B., Heery,D., Gronemeyer,H., Chambon,P. and Losson,R. (1995). The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J.* 14 : 2020-2033.
- **Leblanc,B.P. and Stunnenberg,H.G.** (1995). 9-cis retinoic acid signaling : changing patterns causes some excitement. *Genes & Dev* 9 : 1811-1816.
- **Lee,R.T. and Libby,P.** (1997). The unstable atheroma. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17 : 1859-1867.
- **Lee,J.W.**, Ryan,F., Swaffield,J.C., Johnston,S.A. and Moore,D.D. (1995). Interaction of thyroid-hormone receptor with a conserved transcriptional mediator. *Nature* 374 : 91-94.
- **Lee,M.S.**, Kliewer,S.A., Provencal,J., Wright,P.E., Evans,R.M. (1993). Structure of the retinoid X receptor α DNA binding domain : a helix required for homodimeric DNA binding. *Science* 260 : 1117-1121.
- **Lee,S.S.T.**, Pineau,T., Drago,J., Lee,E.J., Owens,J.W., Kroetz,D.L., Fernandez-Salgero,P.M., Westphal,H. and Gonzalez,F. (1995). Targeted disruption of the α isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol.Cell.Biol.* 15 : 3012-3022.
- **Lee,Y. and Mahdavi,V.** (1993). The D domain of the thyroid hormone receptor α 1 specifies positive and negative transcriptional regulation functions. *J.Biol.Chem.* 268 : 2021-2028.
- **Lefebvre,A. M.**, Chen,I., Desreumaux,P., Najib,J. Fruchart,J.C., Geboes,K., Briggs,M., Heyman,R. and Auwerx,J. (1998). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ promotes the development of colon tumors in C57BL/6JAPCMin/+mice. *Nature Medicine* 4 : 1053-1057.
- **Lehmann,J.M.**, Moore,L.B., Smith-Oliver,A., Wilkison,W.O., T.M.Willson and Kliewer,S.A. (1995). An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand For Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ). *J.Biol.Chem.* 270 : 12953-12956.

- **Levin,A.A.**, Sturzenbecker,L.J., Kazmer,S., Bosakowski,T., Huselton,C., Allenby,G., Speck,J., Kratzeisen,Cl., Rosenberger,M., Lovey,A. and Grippo,J.F. (1992). 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR α . *Nature* 355 : 359-361.
- **Li,H.**, Gomes,P.J. and Chen,J.D. (1997a). RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 94 : 8479-8484.
- **Li,H.**, Leo,C., Schoren,D.J. and Chen,J.D. (1997b). Characterization of receptor interaction and transcriptional repression by the corepressor SMRT. *Mol.Endocrinol.* 11 : 2025-2037.
- **Lim,C.S.**, Gaumann,C.T., Htun,H., Xian,W., Irie,M., Smith,C.L. and Hager,G.L. (1999). Differential localization and activity of the A- and B-forms of the human progesterone receptor using green fluorescent protein chimeras. *Mole.Endocrinol.* 13 : 366-375.
- **Liu,Y. and Chiu,J-F.** (1994). Transactivation and repression of the α -fetoprotein gene promoter by retinoid X receptor and Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor. *Nucleic Acid Res.* 22 : 1079-1086.
- **Luisi,B.F.**, Xu,W.X, Otwinowski,Z., Freedman,L.P., Yamamoto,K.R. and Sigler,P.B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352 : 497-505.
- **Luo,X.**, Ikeda,Y., Schlosser,D.A. and Parker,K.L. (1995). Steroidogenic factor 1 is the essential transcript of the mouse Ftz-F1 gene. *Mol.Endocrinol.* 9 : 1233-1239.
- **McInerney,E.M.**, Rose,D.W, Flynn,S.E., Westin,S., Mullen,T-M., Kronen,A., Inostroza,J., Torchia,J., Nolte,R.T. Assa-Munt,N., Milburn,M.V., Glass,C.K. and Rosenfeld,M.G. (1998). Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Gens & Dev.* 12 : :3357-3368.
- **Madam,A.P. and DeFranco,D.B.** (1993). Bidirectional transport of glucocorticoid receptors across the nuclear envelope. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 90 : 3588-3892.
- **Mader,S.**, Chen,J.Y., Chen,Z., White,J., Chambon,P. and Gronemeyer,H. (1993). The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains. *EMBO J.* 12 : 5029-5041.
- **Mader,S.**, Kumar,V., de Verneuil,H. and Chambon,P. (1989). Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. *Nature* 338 : 371-274.
- **Makishima,M.**, Okamoto,A.Y., Repa,J.J., Tu,H., Learned,M., Luck,A., Hull,M.V., Lustig,K.D., Mangelsdorf,D.J., and Shan,B. (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284 : 1362-1365.
- **Mangelsdorf,D.J. and Evans,R.M.** (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83 : 841-850.
- **Mangelsdorf,D.J.**, Thummel,C., Beato,M., Herrlich,P. and Schütz,G. (1995). The nuclear receptor superfamily : the second decade. *Cell* 83 : 835-839.
- **Meinke,G and Sigler,P.B.** (1999). DNA-binding mechanism of the monomeric orphan nuclear receptor NGF1B. *Nature Struct.Biol.* 6 : 471-477.
- **Mellies,M.J.**, Stein,E.A., Khoury,P., Lamkin,G. and Glueck,C.J. (1987). Effects of fenofibrate on lipids, lipoproteins, and apolipoproteins in 33 subjects with primary hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 63 : 57-64.

- **Meyer, M.E.**, Gronemeyer, H., Turcotte, B., Bocquel, M.T., Tasset, D and Chambon, P. (1989). Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell* 57 : 433-442.
- **Miyajima, N.**, Horiuchi, R., Shibuya, Y., Fukushima, S.I., Matsubara, K.I., Toyoshima, K. and Yamamoto, T. (1989). Two erbA homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus. *Cell* 57 : 31-39.
- **Miyamoto, T.**, Kaneko, A., Kakizawa, T., Yajima, H., Kamijo, K., Sekine, R., Hiramatsu, K., Nishii, Y., Hashimoto, T. and Hashisume, K. (1997). Inhibition of peroxisome proliferator signaling pathways by thyroid hormone receptor. *J.Biol.Chem.* 272 : 7752-7758.
- **Moore, M.S.** (1995). David and Goliath in nuclear transport. *Current Biology* 5 : 1339-1341.
- **Moraitis, A.N. and Giguère, Y.** (1999). Transition from monomeric to homodimeric DNA binding by nuclear receptors : identification of RevErbA α determinants required for ROR α homodimer complex formation. *Mol.endocrinol.* 13 : 431-439.
- **Moras, D. and Gronemeyer, H.** (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain : structure and function. *Curr.Opin.Cell.Biol.* 10 : 384-391.
- **Mueller, E.**, Sarraf, P., Tontonoz, P., Evans, R.M., Martin, K.J., Zhang, M., Fletcher, C., Singer, S. and Spiegelman, B.M. (1998). Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR γ . *Molecular Cell* 1 : 465-470.
- **Muscat, G.E.O.**, Burke, L.J. and Downes, M. (1998). The corepressor N-CoR and its variants RIP13a and RIP13 Δ 1 directly interact with the basal transcription factors TFIIB, TAF $_{II}$ 32, TAF $_{II}$ 70. *Nucleic Acids Res.* 12 : 2899-2907.
- **Näär, A.M.**, Boutin, J.M., Lipkin, S.M., Yu, V.C., Holloway, J.M., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1991). The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* 65 : 1267-1279.
- **Nagy, L.**, Kao, H.Y., Chakravarti, D., Lin, R.J., Hasig, C.A., Ayer, D.E., Schreiber, S.L. and Evans, R.M. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 89 : 373-380.
- **Nagy, L.**, Tontonoz, P., Alvarez, J.G.A., Chen, H. and Evans, R.M. (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell* 93 : 229-240.
- **Nauber, U.**, Pankratz, M.J, Kienlin, A, Seifert, E, Klemm, U and Jäckle, H. (1988). Abdominal segmentation of the *Drosophila* embryo requires a hormone receptor-like protein encoded by the gap gene Knirps. *Nature* 336 : 489-492.
- **Nigg, E.A.** (1997). Nucleocytoplasmic transport : signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386 : 779-787.
- **Nolte, R.T.**, Wisely, G.B, Westin, S., Cobb, J., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K., Milburn, M. (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Nature* 395 : 137-143.
- **Nomura, T.**, Khan, Md.M, Kaul, S.C., Dong, H-D., Wadhwa, R., Colmenares, C., Kohno, I. and Ishii, S. (1999). Ski is a component of the histone deacetylase complex required for transcriptional repression by Mad and thyroid hormone receptor. *Genes & Dev.* 13 : 412-423.

- **Ogryzko, V.V.**, Schiltz, R.L., Russanova, V., H.Howard, B. and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87 : 953-959.
- **Olson, D.P.**, Sun, B. and Koenig, R.J. (1998). Thyroid hormone response element architecture affects corepressor release from thyroid hormone receptor dimers. *J.Biol.Chem.* 273 : 3375-3380.
- **Onate, S.A.**, Tsai, S.Y., Tsai, M.J., O'Malley, B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270 : 1354-1357.
- **Ordentlich, P.**, Downe, M., Xie, W., Genin, A., Spinner, N.B. and Evans, R.M. (1999). Unique forms of human and mouse nuclear receptor corepressor SMRT. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 96 : 2639-2644.
- **Oro, A.E.**, Ong, E.S., Margolis, J.S., Posakony, J.W., McKeown, M. and Evans, R.M. (1988). The Drosophila gene knirps-related is a member of the steroid-receptor gene. *Nature* 336 : 493-496.
- **Parks, D.J.**, Blanchard, S.G, Bledsoe, R.K, Chandra, G, Consler, T.G, Kliewer, S.A, Stimmel, J.B, Willson, T.M, Zavacki, A.M, Moore, D.D and Lehmann, J.M. (1999). Bile acids : natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 284 : 1365-1368.
- **Pazin, M.J. and Kadonaga, J.T.** (1997). What's up and down with histone deacetylation and transcription ? *Cell* 89 : 325-328.
- **Peet, D.J.**, Janowski, B.A. and Mangelsdorf, D.J. (1998). The LXRs : a new class of oxysterol receptors. *Current Opinion in Genetics & Development* 8 : 571-575. (a)
- **Peet, D.J.**, Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J-M.A., Hammer, R.E. and Mangelsdorf, D.J. (1998b). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired oxysterol receptor LXR α . *Cell* 93 : 693-704.
- **Perlmann, T. and Jansson, L.** (1995). A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes & Dev.* 9 : 769-782.
- **Peters, J.M.**, Hennuyer, N., Staels, B., Fruchart, J-C., Fievet, C., Gonzalez, F.J. and Auwerx, J. (1997). Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor α -deficient mice. *J.Biol.Chem.* 272 : 27307-27312.
- **Petkovich, M.**, Brand, N.J., Krust, A. and Chambon, P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330 : 444-450.
- **Picard, D. and Yamamoto, K.R.** (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6 : 3333-3340.
- **Pratt, W.B.** (1993). The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J.Biol.Chem.* 268 : 21455-21458.
- **Predki, P.F.**, Zamble, D., Sarkar, B. and Giguère, V. (1994). Ordered Binding of Retinoic Acid and Retinoid-X Receptors to Asymmetric Response Element Involves Determinants Adjacent to the DNA-Binding Domain. *Mol.Endocrinol.* 8 : 31-39.
- **Rastinejad, F.**, Perlmann, T., Evans, R.M. and Sigler, P.B. (1995). Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* 375 : 203-211.

- **Renaud, J.P.**, Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Moras, D. (1995). Crystal structure of the RAR- γ ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* 378 : 681-689.
- **Retnakaran, R.**, Flock, G. and Giguère, V. (1994). Identification of RVR, a novel orphan nuclear receptor that acts as a negative transcriptional regulator. *Mol. Endocrinol.* 8 : 1234-1244.
- **Ricote, M.**, Huang, J., Fajas, L., Li, A., Welch, J., Najib, J., Witztum, J.L., Auwerx, J., Palinski, W. and Glass, C.K. (1998a). Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 : 7614-7419.
- **Ricote, M.**, Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J. and Glass, C.K. (1998b). The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391 : 79-82.
- **Rochette-Egly, C.**, Adam, S., Rossignol, M., Egly, J-M. and Chambon, P. (1997). Stimulation of RAR α activation function AF1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* 90 : 97-107.
- **Ross, R.** (1993). The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s. *Nature* 362 : 801-809.
- **Rothe, M.**, Nauber, U. and Jäckle, H. (1989). Three hormone receptor-like Drosophila genes encode and identical DNA-binding finger. *EMBO J.* 8 : 3087-3094.
- **Sackey, F.N.A.**, Haché, R.J.G., Reich, T., Kwast-Welfed, J. and Lefebvre, Y.A. (1996). Determinants of cellular distribution of the glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.* 10 : 1191-1205.
- **Saez, E.**, Tontonoz, P., Nelson, M.C., Alvarez, J.G.A., Ming, U.T., Baird, S.M., Thomazy, V.A. and Evans, R.M. (1998). Activators of the nuclear receptor PPAR γ enhance colon polyp formation. *Nature Medicine* 4 : 1058-1061.
- **Sap, J.**, Munoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H. and Vennström, B. (1986). The c-erbA protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324 : 635-640.
- **Sarraf, P.**, Mueller, E., Jones, D., King, F.J., Deangelo, D.J., Partridge, J.B., Holden, S.A., Chen, L.B., Singer, S., Fletcher, C. and Spiegelman, B.M. (1998). Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR γ . *Nature Medicine* 4 : 1046-1052.
- **Savory, J.G.A.**, Hsu, B., Laquian, I.R., Giffin, W., Rich, T., Haché, R.J.G. and Lefebvre, Y.A. (1999). Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Mol. Cell. Biol.* 19 : 1025-1037.
- **Schmidt, A.**, Endo, N., Rutledge, S.J., Vogel, R., Shinar, D. and Rodan, G.A. (1992). Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol. Endocrinol.* 6 : 1634-1641.
- **Schoonjans, K.**, Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A-M., Heyman, R.A., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B. and Auwerx, J. (1996). PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 15 : 5336-5348.

- **Schulman,I.R.**, Li,C., Schwabe,J.W.R. and Evans,R.M. (1997). The phantom ligand effect : allosteric control of transcription by the retinoid X receptor. *Genes & Dev.* 11 : 299-308.
- **Schwabe,J.W.R.**, Chapman,L., Finch,J.T. and Rhodes,D. (1993). The crystal structure of the Estrogen Receptor DNA-binding domain bound to DNA : how receptors discriminate between their response elements. *Cell* 75 : 567-578.
- **Schwabe,J.W.R.**, Neuhaus,D. and Rhodes,D. (1990). Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature* 348 : 458-461.
- **Schwabe,J.W.R. and Rhodes,D.** (1991). Beyond zinc finger : steroid hormone receptors have a novel structural motif for DNA recognition. *T.I.B.S.* 16 : 291-296.
- **Sears,I.B.**, MacGinnitie,M.A., Kovacs,L.G. and Graves,R.A. (1996). Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene : regulation by peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Mol.Cell.Biol.* 16 : 3410-3419 .
- **Sengupta,P.**, Colbert,H.A. and Bargmann,C.I. (1994). The *C.elegans* gene *odr-7* encodes an olfactory-specific member of the nuclear receptor superfamily. *Cell* 79 : 971-980.
- **Segraves,W.A. and Hogness,D.S.** (1990). The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of the steroid receptor superfamily. *Genes & Dev.* 4 : 204-219.
- **Segraves,W.A.** (1991). Something old, some things new : the steroid receptor superfamily in *Drosophila*. *Cell* 67 : 225-228.
- **Seol W**, Mahon,M.J, Lee,Y-K and Moore,D.D. (1996a). Two receptor interacting domains in the nuclear hormone receptor corepressor RIP13/N-CoR. *Mol Endocrinol.* 10 : 1646-1665.
- **Seol,W.**, Choi,H.S. and Moore,D.D. (1996b). An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science* 272 : 1336-1338.
- **Sher,T.**, Yi,H.F. McBride,O.W. and Gonzalez,F.J. (1993). cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* 32 : 5598-5604.
- **Smith,C.L.**, Onate,S.A, Tsai,M-J. and O'Malley,B.W. (1996). CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 93 : 8884-8888.
- **Smith,C.L.**, Nawaz,Z., and O'Malley,B.W. (1997). Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol. Endocrinol.* 11 : 657-666.
- **Spencer,T.E.**, Jenster,G., Burcin,M., Allis,C.D., Zhou,J. Mizzen,C.A., McKenna,N.J., Onate,S.A. , Tsai,S.Y., Tsai,M.J. and O'Malley,B.W. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389 : 194-198.
- **Staels,B.** , van Tol,A., Andreu,T. and Auwerx,J. (1992). Fibrates influence the expression of genes involved in lipoprotein metabolism in a tissue-selective manner in the rat. *Arteriosclerosis and thrombosis* 12 : 286-294.

- **Staels,B.**, Koenig,W., Habib,A., Merval,R., Lebret,M., Pineda Torra,I., Delerive,P., Fadel,A., Chinetti,G., Fruchart,J.C., Najib,J., Maclouf,J. and Tedgui,A. (1998). Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators. *Nature* 393 : 790-793.
- **Sternglanz,R.** (1996). Histone acetylation : a gate to transcriptional activation. *T.I.B.S.* 21 : 357-358.
- **Tahayoto,A.**, Lefebvre,P., Formstecher,P and Dautrevaux,M. (1993). A protein kinase C-dependent activity modulates retinoic acid-induced transcription. *Mol.Endocrinol.* 7 : 1642-1653.
- **Tai,T-A.C.**, Jennermann,C., Brown,K.K., Oliver,B.B., MacGinnitie,A., Wilkinson,W.O., Brown,H.R., Lehmann,J.M., Kliewer,S.A., Morris,D.C. and Graves,R.A. (1996). Activation of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor γ promotes brown adipocyte differentiation. *J.Biol.Chem.* 271 : 29909-29914.
- **Takeshita,A.**, Cardona,G.R., Kojibuchi,N., Suen,C.S. and Chin,W.W. (1997). TRAM-1, a novel 160 kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *J.Biol.Chem.* 272 : 27629-27634.
- **Taylor,S.M. and Jones,P.A.** (1979). Multiple new phenotypes induced in 10T 1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 17 : 771-779.
- **Terenzi,H.**, Alzari,P.M., and Zakin,M.M. (1998). Structural features involved in the formation of a complex between the monomeric or the dimeric form of the Rev-erb β DNA-binding domain and its DNA reactive sites. *Biochemistry* 37 : 11488-11495.
- **Thummel,C.S.** (1995). From embryogenesis to metamorphosis : the regulation and function of drosophila nuclear receptor superfamily members. *Cell* 83 : 871-877.
- **Tontonoz,P.**, Graves,R.A., Budavari,A.I., Erdjument-Bromage,H., Lui,M., Hu,E., Tempst,P. and Spiegelman,B.M. (1994). Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR γ and RXR α . *Nucleic Acids Res.* 22 : 5628-5634. (a)
- **Tontonoz,P.**, Hu,E., Graves R.A., Budavari,A.I. and Spiegelman,B.M. (1994b). mPPAR γ 2 : tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes & Dev.* 8 : 1224-1234.
- **Tontonoz,P.**, Hu,E. and Spiegelman,B.M. (1994c). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79 : 1147-1156.
- **Tontonoz,P.**, Nagy,L., Alvarez,J.G.A., Thomazy,V.A. and Evans,R.M. (1998). PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93 : 241-252.
- **Tontonoz,P.**, Singer,S., Forman,B.M., Sarraf,P., Fletcher,J.A., Fletcher,C.D.M., Brun,R.P., Mueller,E., Altiock,S., Oppenheim,H., Evans,R.M. and Spiegelman,B.M. (1997). Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ and the retinoid X receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 94 : 237-241.
- **Tora,L.**, White,J., Brou,C., Tasset,D., Webster,N., Scheer,E. and Chambon,P. (1989). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59 : 477-487.

- **Torchia,J.,** Rose,D.W., Inostroza,J., Kamei,Y., Westin,S., Glass,C.K. and Rosenfeld,M.J. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387 : 677-684.
- **Tugwood,J.D.,** Issemann,I., Anderson,R.G., Bundell,K.R., McPheat,W.L. and Green,S. (1992). The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. *EMBO J.* 11 : 433-439.
- **Umesono,K. and Evans,R.M.** (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 57 : 1139-1146.
- **Umesono,K.,** Murakami,K.K., Thompson,C.C. and Evans,R.M. (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65 : 1255-1266.
- **Vallee,B.L.,** Coleman,J.E. and Auld,D.S. (1991). Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 88 : 999-1003.
- **Viollet,B.,** Kahn,A. and Raymondjean,M. (1997). Protein kinase-dependent phosphorylation modulates DNA-binding activity of hepatocyte nuclear factor 4. *Mol.Cell.biol.* 17 : 4208-4219.
- **Vivat,V.,** Zechel,C., Wurtz,J.M., Bourguet,W., Kagechika,H., Umemiya,H., Shudo,K. and Moras,S. (1997). A mutation mimicking ligand-induced conformational change yields a constitutive RXR that senses allosteric effects in heterodimers. *EMBO J.* 16 : 5697-5709.
- **Voegel,J.J.,** Heine,M.J.S., Zechel,C., Chambon,P. and Gronemeyer,H. (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* 15 : 3667-3675.
- **Vu-Dac,N.,** Chopin-Delannoy,S., Gervois,P., Bonnelye,E., Martin,G., Fruchart,J-C., Laudet,V.,and Staels,B. (1998). The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor α and Rev-erb α mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates. *J.Biol.Chem.* 273 : 25713-25720
- **Vu-Dac,N.,** Schoonjans,K., Laine,B., Fruchart,J-C., Auwerx,J. and Staels,B. (1994). Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element. *J.Biol.Chem.* 269 : 31012-31018.
- **Vu-Dac,N.,** Schoonjans,K., Kosykh,V., Dallongeville,J., Fruchart,J.C., Staels,B. and Auwerx,J. (1995). Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor. *J.Clin.Invest.* 96 : 741-750.
- **Vu-Dac,N.,** Gervois,P., Grötzinger,T., De Vos,P., Schoonjans,K., Fruchart,J.C., Auwerx J., Mariani,J., Tedgui,A. and Staels B. (1997). Transcriptional regulation of apolipoprotein A-I gene expression by the nuclear receptor ROR α . *J.Biol.Chem.* 272 : 22401-22404.
- **Wagner,R.L.,** Apriletti,J.W., McGrath,M.E., West,B.L. Baxter,J.D. and Fletterick,R.J. (1995). A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* 378 : 690-697.
- **Walter,P.,** Green,S., Green,G., Krust,A., Bornert,J.M., Jeltsch,J.M., Staub,A., Jensen,E., Scrace,G., Waterfield,M. and Chambon,P. (1985). Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 82 : 7889-7893.

- **Weinberger,C.**, Hohenberg,S.M., Ong,E.S., Harmon,J.M., Brower,S.T., Cidlowski,J., Thompson,E.B., Rosenfeld,M.G. and Evans,R.M. (1985). Identification of human glucocorticoid receptor complementary DNA clones by epitope selection. *Science* 228 : 740-742.
- **Weinberger,C.**, Thompson,C.C., Ong,E.S., Lebo,R., Gruol,D.J. and Evans,R.M. (1986). The c-erbA gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature* 324 : 641-646.
- **Weintraub,H.**, Tapscott,S.J., Davis,R.L., Thayer,M.J., Adam,M.A., Lassar,A.B. and Miller,A.D. (1989). Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 86 : 5434-5438.
- **Welshons,W.V.** (1984). Lieberman,M.E. and Gorski,J. Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature* 307 : 747-749.
- **Westin,S.**, Kurokawa,R., Nolte,R.T., Wisely,G.B., McInerney,E.M., Rose,D.W., Milburn,M.V. and Rosenfeld,M.G. (1998). Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators. *Nature* 395 : 199-202.
- **White,R.**, Sjöberg,M., Kalkhoven,E. and Parker,M.G. (1997). Ligand-independent activation of the oestrogen receptor by mutation of a conserved tyrosine. *EMBO J.* 16 : 1427-1435.
- **Williams, S.P. and Sigler, P.B.** (1998). Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature* 393 : 392-396.
- **Wilson,T.E.**, Paulsen,R.E., Padgett,K.A. and Milbrandt,J. (1992). Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science* 256 : 107-110.
- **Wilson,T.E.**, Fahrner,T.J. and Milbrandt,J. (1993). The orphan receptors NGFI-B steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol.Cell.Biol.* 13 : 5794-5804.
- **Wong,C-W. and Privalsky,M.L.** (1998a). Transcriptional repression by the SMRT-mSin3 corepressor : multiple interactions, multiple mechanisms, and a potential role for TFIIB. *Mol.Cell.Biol.* 5500-5510.
- **Wong,C-W. and Privalsky,M.L.** (1998b). Transcriptional silencing is defined by isoform- and heterodimer-specific interactions between nuclear hormone receptors and corepressors. *Mol.Cell.Biol.* 5724-5733.
- **Wurtz,J.M.**, Bourguet,W., Renaud,J.P., Vivat,V., Chambon,P., Moras,D. and Gronemeyer,H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Struct.Biol.* 3 : 87-94.
- **Xu,L.**, Glass,C.K., and Rosenfeld,M.G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr.Op in genetics and development* 9 : 140-147.
- **Yamamoto,K.R. and Alberts,B.M.** (1976). Steroid receptors : elements for modulation of eukaryotic transcription. *Annu.Rev.Biochem.* 45 : 721-746.
- **Yao,T-P.**, Ku,G., Zhou,N., Scully,R. and Livingston,D.M. (1996). The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of P300? *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 93 : 10626-10631.

- **Ylikomi,T.,** Bocquel,M.T., Berry,M., Gronemefar,H. and Chambon,P. (1992). Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *EMBO J.* 11 : 3681-3694.
- **Yu,Z.,** Chinpaisal,C. and Wei,L-N. (1998). A constitutive nuclear localization signal from the second zinc-finger of orphan nuclear receptor TR2. *Journal of Endocrinology* 159 : 53-60.
- **Zamir,I.,** Harding,H.P., Atkins,G.B., Hörlein, A., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. and Lazar M.A. (1996). A nuclear hormone receptor corepressor mediates transcriptional silencing by receptors with distinct repression domains. *Mol.Cell.Biol.* 16 : 5458-5465.
- **Zamir,I.,** Zhang, J. and Lazar, M.A. (1997a). Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors. *Genes & Dev.* 11 : 835-846.
- **Zamir,I.,** Dawson,J., Lavinsky,R.M., Glass,C.K., Rosenfeld,M.G and Lazar,M.A. (1997b). Cloning and characterization of a corepressor and potential component of the nuclear hormone receptor repression complex. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 94 : 14400-14405.
- **Zanaria,E.,** Muscatelli,F., Bardoni,B., Strom,T.M., Guioli,S., Guo,W., Lalli,E., Moser,C., Walker,A.P., McCabe,E.R., Meitinger,T., Monaco,A.P., Sassone-Corsi,P., Camerino,G. (1994). An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372 : 635-641.
- **Zechel,C.,** Shen,X.Q., Chambon,P. and Gronemeyer,H. (1994a). Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements. *EMBO J.* 13 : 1414-1424.
- **Zechel,C.,** Shen,X.Q., Chen,J.Y., Chen,Z.P., Chambon,P. and Gronemeyer,H. (1994b). The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *EMBO J.* 13 : 1425-1433.
- **Zhang,X.,** Jeyakumar,M., Petukhov,S. and Bagchi,M.K. (1998). A nuclear receptor corepressor modulates transcriptional activity of antagonist-occupied steroid hormone receptor. *Mol.Endocrinol.* 12 : 513-524.
- **Zhang,Y.,** Iratni,R., Erdjument-Bromage,H., Tempst,P. and Reinberg,D. (1997). Histone deacetylases and SAP18, a novel polypeptide are components of a human Sin3 complex. *Cell* 89 : 357-364.
- **Zhao,K.,** Khorasanizadeh,S., Miyoshi,Y., Lazar,M.A. and Rastinejad,F. (1998). Structural elements of an orphan receptor-DNA complex. *Molecular Cell* 1 : 849-861.
- **Zhou,Z.X.,** Sar,M., Simental,J.A., Lane,M.V. and Wilson,E.M. (1994). A ligand-dependent bipartite nuclear signal in the human androgen receptor. *J.Biol.Chem.* 269 : 13115-13123.
- **Zhu,X.G.,** Hanover,J.A., Hager,G.L. and Cheng,S.Y. (1998). Hormone-induced translocation of thyroid hormone receptors in living cells visualized using a receptor green fluorescent protein chimera. *J.Biol.Chem.* 273 :27058-27063.
- **Zilliacus,J.,** Wright,A.P.H., Carlstedt-Duke,J. and Gustafsson,J.A. (1995). Structural determinants of DNA-binding specificity by steroid receptors. *Mol.Endocrinol.* 9 : 389-400.

