

Les récepteurs nucléaires d'hormones en folie !

La superfamille des récepteurs nucléaires d'hormones regroupe des facteurs de transcription dont l'activité dépend de la présence de leur ligand hormonal [1] : ce n'est qu'en présence de ces derniers que les récepteurs activent la transcription de leurs gènes cibles. Les premiers membres de cette famille caractérisés ont été les récepteurs des hormones stéroïdes (comme les glucocorticoïdes ou les œstrogènes) ou celui de la vitamine D. Très vite il a été démontré que d'autres membres de cette famille de protéines pouvaient reconnaître des ligands complètement différents, comme les hormones thyroïdiennes ou les acides rétinoïques. Dans tous ces cas, le mode d'action de ces récepteurs (l'activité modulée par le ligand) reste le même.

On s'est cependant aperçu que la situation est plus complexe. En effet, en tirant partie du fort pourcentage d'identité de séquence existant entre les récepteurs, de nombreux chercheurs ont identifié de nouveaux membres de cette famille pour lesquels on ne connaissait aucun ligand [2]. Ces récepteurs « orphelins », d'abord cas isolés, sont rapidement devenu majoritaires dans la famille. A part quelques cas très spéciaux, leur structure est indistinguishable de celle des récepteurs possédant des ligands. Deux types d'explications permettent de rendre compte de l'existence de ces récepteurs orphelins : soit ils n'ont effectivement pas de ligand (mais alors comment fonctionnent-ils ? comment sont-ils apparus ? quelles sont leurs relations avec les récepteurs « classiques » ?) ; soit ils possèdent un ligand encore inconnu et ils constituent alors une piste très

intéressante pour découvrir de nouvelles hormones. Dans la chasse effrénée au ligand, les derniers mois ont été fertiles en rebondissements [3], le dernier en date montrant que l'étude des récepteurs nucléaires d'hormones nous réserve encore bien des surprises. En effet, l'équipe de David Moore au Baylor College of Medicine de Houston (TX, USA), associée à celle de Ron Evans au Salk Institute de San Diego (CA, USA), viennent de démontrer que le récepteur orphelin CAR β reconnaît des métabolites des androgènes, l'androstanol et l'androsténol [4]. Mieux encore, au lieu de stimuler l'activité transcriptionnelle de CAR β , ces deux molécules l'inhibent. Nous sommes donc en présence d'un mode de fonctionnement diamétralement opposé à celui des récepteurs classiques puisque les ligands de CAR β se comportent comme des agonistes à effet négatif vis-à-vis de leur récepteur. Comment en est-on arrivé à ces conclusions et comment expliquer le mode de fonctionnement de ce récepteur étrange ?

La chasse au ligand : succès et difficultés

Par définition, un ligand est une molécule qui se fixe à un récepteur donné de manière spécifique, réversible et saturable. La seule façon vraiment correcte de pouvoir parler d'un nouveau ligand pour un récepteur nucléaire est donc, par une approche biochimique, de réaliser des expériences de fixation de la molécule marquée sur le récepteur.

Dans la grande majorité des cas, les chercheurs ont d'abord recherché un composé capable d'enclencher

l'activité transcriptionnelle du récepteur. Pour ce faire, on co-transfecte, dans des cellules en culture, un vecteur exprimant le récepteur étudié et un vecteur rapporteur. Ce dernier comporte un gène de type luciférase, dont l'expression est sous le contrôle d'un promoteur minimal en amont duquel sont clonés des sites de fixation du récepteur nucléaire étudié. On ajoute ensuite au milieu de culture l'activateur putatif et on compare les activités du gène rapporteur, avec et sans additif. Si une telle expérience montre que l'activateur agit *via* le récepteur, elle ne dit pas si la molécule testée est un ligand. Il est en effet possible que celle-ci soit métabolisée par la cellule en un autre composé qui est, lui, le vrai ligand. C'est ce type d'approche qui a permis l'identification de l'acide rétinoïque 9-*cis*, métabolite de l'acide rétinoïque tout-*trans*, comme ligand du récepteur RXR [5, 6]. Les voies métaboliques intracellulaires qui modifient une molécule peuvent être très complexes et il est parfois long et difficile d'identifier le « vrai » ligand en partant d'une molécule capable d'activer un récepteur. Ainsi plusieurs années de recherches intensives ont été nécessaires pour identifier les leucotriènes B₄ et la prostaglandine J₂ comme ligands respectifs des PPAR α et γ , deux récepteurs activés par les acides gras (*m/s* 1996, n° 12, p. 1428) [7, 8].

Malgré ces difficultés, les deux dernières années ont été riches en identification de nouveaux ligands de récepteurs nucléaires (Tableau I). Il faut pourtant garder présent à l'esprit que le fait que l'on identifie effectivement une molécule comme un vrai ligand d'un récepteur

Tableau I		
ANCIENS ET NOUVEAUX RÉCEPTEURS, NOUVEAUX LIGANDS		
Récepteur	Ligand	Références
PPAR α	Leukotriène B4	[27]
PPAR γ	15-désoxy- Δ 12,14 prostaglandine J2	[7, 8]
LXR α	Oxystérols (activateur) Géranylgéranol (répression)	[20] [21]
FXR	Dérivés des farnésol	[22]
BXR, ONR1	Dérivés des benzoates	[23, 24]
CAR β	Androsténol, androstanol (répression)	[4]
PXR	Dérivés des prégnates	[25]
SXR	Divers dérivés stéroïdes	[26]

Les récepteurs orphelins ayant récemment trouvé leur(s) ligand(s) sont listés. Le récepteur BXR a été originalement décrit comme ONR1 dans [23], ses capacités de fixation des benzoates sont décrites dans [24]. Les récepteurs PXR et SXR semblent en réalité être des orthologues (équivalents géniques dans des espèces différentes). Les divergences dans les pharmacologies de ces deux récepteurs pourraient s'expliquer par les modes de vie différents entre la souris (chez laquelle a été cloné PXR) et l'homme (source du récepteur SXR).

nucléaire dans un test *in vitro*, ne permet encore pas de parler de ligand physiologiquement actif *in vivo*. Pour cela il faut en effet montrer que le ligand est présent *in vivo* dans une gamme de concentration cohérente avec la constante d'affinité déterminée *in vitro*. Les débats qui continuent à faire rage sur le rôle *in vivo* de l'acide rétinoïque 9-*cis*, ligand de RXR, montre que cette discussion est loin d'être close [9]...

CAR β et son activité constitutive

CAR β a été identifié, en parallèle de son plus proche parent CAR α /MB67, par l'équipe de David Moore [10, 11]. Ces deux récepteurs doivent leur nom de CAR (*constitutively active receptor*) à une particularité étonnante de leur mode de fonctionnement : ils sont actifs de façon constitutive, c'est à dire *a priori* même en absence de ligand. Ainsi, introduits dans des cellules de levure ces récepteurs, associés sous forme d'hétérodimères à RXR, comme de très nombreux autres récepteurs nucléaires, sont capables d'activer la transcription. L'interprétation d'une telle expérience restait cependant difficile car

il n'est pas exclu, contrairement à ce que pensent de nombreux auteurs, que la levure contienne des molécules capables de jouer le rôle de ligand d'un récepteur nucléaire.

Pour identifier les ligands des CAR, les chercheurs ont mis en place un système de criblage par co-transfection. Leur surprise fut totale lorsqu'ils observèrent que deux molécules proches, l'androsténol et l'androstanol, règlent négativement l'activité de CAR β (figure 1, [4]). Grâce à la construction de chimères du domaine de fixation du ligand de CAR β avec le domaine de fixation à l'ADN du facteur de transcription GAL4, les auteurs ont montré que cet effet est bien dépendant du domaine de fixation du ligand de CAR β . L'effet de l'androsténol et de l'androstanol est strictement spécifique, d'autres composés proches comme l'androstérone ou la testostérone elle-même sont incapables de régler l'activité de CAR β . En mesurant l'effet de différentes concentrations d'androstanol, les auteurs ont démontré que la dose nécessaire pour obtenir une inhibition de 50 % de l'activité de CAR β est de 400 nM, ce qui suggère que le Kd doit être du même ordre de grandeur.

Pour démontrer la fixation directe des ligands putatifs sur CAR β en l'absence de dérivés radioactifs, les auteurs ont utilisé un test qui repose sur l'interaction des récepteurs

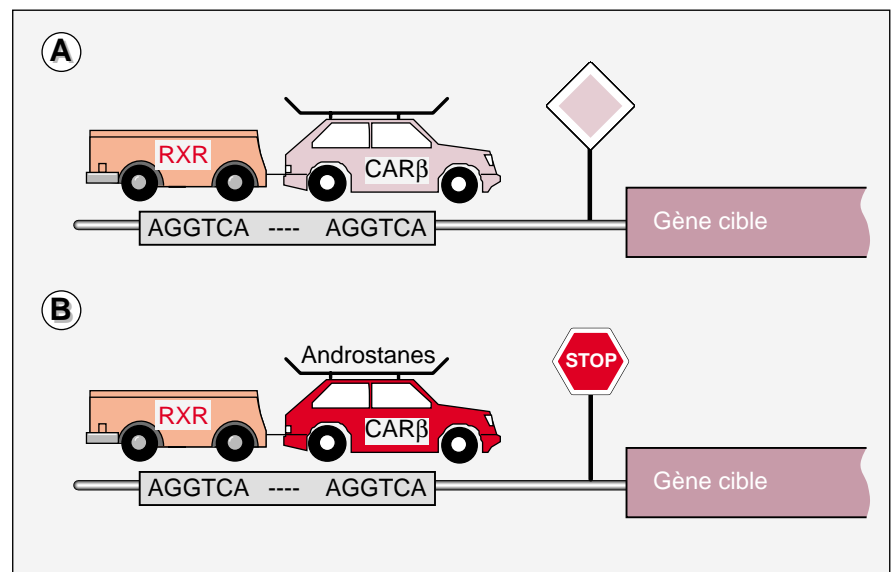


Figure 1. **Mode d'action du récepteur CAR β .** CAR β se fixe en hétérodimère avec RXR sur différents éléments de réponse comportant une répétition de la séquence AGGTCA. **A.** En absence de ligand, CAR β active la transcription de ses gènes cibles. **B.** En présence d'androstanol ou d'androsténol, CAR β réprime la transcription.

nucléaires avec des co-facteurs. En effet, pour régler positivement ou négativement la transcription, les récepteurs nucléaires interagissent avec des molécules capables de se connecter à la machinerie transcriptionnelle de base et/ou de modifier l'état d'acétylation des histones [12, 13]. Ainsi, en absence de ligand, des récepteurs comme TR ou RAR s'associent à des co-répresseurs comme NCo-R ou SMRT (prononcer « Smart » !) qui induisent, grâce à l'interaction avec d'autres molécules une désacétylation des histones [14]. En présence de leurs ligands, ces récepteurs changent de conformation ce qui induit deux phénomènes : la libération des co-répresseurs et la fixation de co-activateurs comme SRC-1 ou TIF-2 qui entraînent une acétylation des histones (figure 2).

Grâce aux co-activateurs, on dispose donc de molécules qui n'interagissent qu'avec des récepteurs transcriptionnellement actifs, à savoir couplés à leur ligand. Cette interaction est mesurable *in vitro* grâce à un test de co-rétention protéique [15]. L'un des partenaires est immobilisé grâce à une fusion avec la protéine GST et on teste si une molécule donnée est capable d'entraîner un changement de conformation du récepteur permettant l'interaction avec les co-activateurs. L'intérêt majeur de ce test est qu'il est réalisé *in vitro* à partir de protéines synthétisées dans des systèmes acellulaires pour lesquels on estime que les ligands ne peuvent être présents. Les auteurs ont émis l'hypothèse que, dans le cas de CAR β , le récepteur étant actif en absence de ligand, il doit être

capable de reconnaître un co-activateur comme SRC-1. Comme le ligand induit une diminution de l'activité du récepteur, ils ont postulé en outre que ce ligand doit, après avoir été reconnu par CAR β , entraîner une libération de SRC-1. L'expérience a parfaitement confirmé ce modèle : dans un système acellulaire, l'androstanol est capable d'interagir spécifiquement avec CAR β [4].

Un nouveau mode de fonctionnement ?

Il est encore trop tôt pour affirmer qu'androstanol et androsténol sont bien des ligands physiologiques de CAR β mais, jusqu'à présent, toutes les expériences réalisées vont dans ce sens. L'existence d'un tel ligand, capable d'inhiber l'activité d'un récepteur nucléaire, pose toute une série de problèmes intéressants qui vont nous permettre d'explorer avec encore plus de détails le mode de fonctionnement des récepteurs nucléaires.

D'abord, comment fonctionne CAR β ? En l'absence de données structurales on est pour l'instant réduit aux conjectures. On sait que, dans les récepteurs nucléaires « classiques », le ligand induit un changement de conformation du domaine qui le fixe [16]. Ainsi dans la forme apo (en l'absence de ligand), l'hélice H12, située du côté carboxy-terminal et portant une région requise pour l'interaction avec les co-activateurs pointe vers l'extérieur du domaine de fixation du ligand. En présence de ligand (forme holo), cette hélice se replie vers l'intérieur et ferme la poche dans laquelle l'hormone est logée [17]. Cette réorganisation de H12 rend accessible la surface d'interaction avec les co-activateurs qui, dans la forme apo, était cachée. Il existe un équilibre dynamique entre forme active et inactive d'un récepteur, le ligand favorisant une conformation par rapport à l'autre. Pour CAR β , il est possible d'imaginer que le récepteur est sous forme active à l'état apo et que l'effet du ligand est d'induire un basculement de l'équilibre en faveur de la conformation inactive. Néanmoins, se pose la question du mécanisme de la transi-

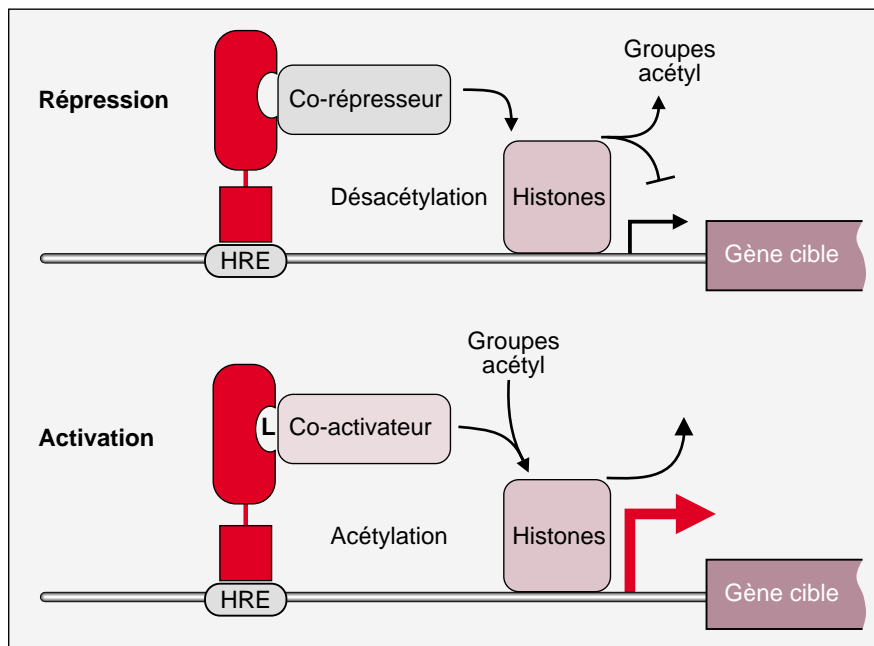


Figure 2. **Mécanismes de régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires.** Les récepteurs nucléaires sont capables de se fixer à leur élément de réponse en présence ou en absence de ligand. En l'absence de ligand, le récepteur contacte, via son domaine de fixation du ligand (en rouge), des co-répresseurs. Ceux-ci, directement ou indirectement, désacétylent les histones ce qui a pour effet de stabiliser leur fixation sur l'ADN. La chromatine étant inaccessible aux facteurs généraux de transcription, l'expression des gènes cibles est donc inhibée. La fixation de ligand induit un changement de conformation du récepteur. Le récepteur fixe maintenant des co-activateurs. Ces derniers, directement ou indirectement, greffent des groupements acétyl sur les histones, ce qui déstabilise leur fixation à l'ADN. Celui-ci est accessible aux facteurs généraux de transcription, l'expression des gènes cibles est activée.

tion entre les deux formes sous l'action du ligand, difficile à imaginer du point de vue structural.

Un autre modèle est possible. Il a été récemment démontré, dans le cas du récepteur des œstrogènes (ER), que les conformations que peuvent prendre les récepteurs nucléaires sont plus nombreuses qu'attendu [18]. La conformation de ER est, en effet, différente en présence d'un agoniste (l'œstradiol) ou d'un antagoniste (ici le raloxifène) (*m/s 1996, n° 12, p. 1426*). Dans ce dernier cas, l'hélice H12 ne pointe pas vers l'extérieur comme dans la forme apo, mais elle n'est pas non plus repliée sur la poche hydrophobe comme dans le cas du récepteur lié à l'œstradiol. Ce repositionnement de H12 ne permet pas la formation d'une surface d'interaction pour les co-activateurs, ce qui permet d'expliquer l'effet antagoniste du raloxifène. Il est possible que la fixation d'androstanol par CAR β induise également un repositionnement de H12, différent de celui de la forme apo classique et ne permettant pas la fixation des co-activateurs. On attend donc avec impatience la résolution de la structure tri-dimensionnelle du domaine de fixation du ligand de CAR β .

Agoniste inverse ou antagoniste

Outre son intérêt structural, cette découverte pose de nombreuses questions sur le rôle physiologique de l'androstanol et de l'androsténol, les nouveaux ligands de CAR β . En particulier, ces composés peuvent être considérés comme des antagonistes ou comme des agonistes inverses [19]. Dans le premier cas, leur activité consisterait à inhiber l'effet activateur d'un agoniste encore inconnu (par compétition pour la fixation sur CAR β). Cela présume que l'agoniste en question est présent dans les cellules mammaires mais également dans les levures et les systèmes *in vitro* utilisés pour tester la liaison de CAR β aux coactivateurs. Bien que cette hypothèse soit peu probable, elle ne peut à l'heure actuelle être formellement exclue. A l'inverse, androstanol et androsténol pourraient être des agonistes inverses. En ce sens, leur effet serait

opposé à ceux des ligands « classiques » des récepteurs nucléaires. Nous serions en présence de composés réprimant (et non plus activant) la transcription de leurs gènes cibles. Sachant que CAR β peut se fixer (en hétérodimère avec RXR) sur toute une gamme d'éléments de réponse reconnus également par d'autres récepteurs nucléaires, la fonction des androsténol et androstanol pourrait être d'exercer un effet de compétition sur les autres hormones nucléaires. Reste à savoir quelles sont les cibles géniques de CAR β et quels sont les effets hormonaux affectés par leurs ligands. CAR β n'est pas un cas complètement isolé : le récepteur LXR fixe les oxystérols [20] mais peut être constitutivement actif et être inhibé par le géranylgeraniol [21]. Au vu du nombre de récepteurs orphelins en quête de foyer, la chasse aux ligands pourrait nous réserver encore bien des surprises ■

Remerciements

Nous remercions Frank Delaunay pour la relecture de ce manuscrit. JMV est soutenu par Rhône-Poulenc-Rorer. Nous remercions le Cnrs, l'École normale supérieure de Lyon, l'Inra, l'ARC et la Fondation pour la Recherche Médicale pour leur soutien financier.

Jean-Marc Vanacker

Chercheur post-doctoral

Vincent Laudet

*Professeur, ENS de Lyon
UMR 49 du Cnrs, École Normale Supérieure de Lyon, 46, Allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France.*

RÉFÉRENCES

1. Gronemeyer H, Laudet V. Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile* 1995; 2: 1173-308.
2. Giguère V. Les récepteurs nucléaires orphelins: régulateurs essentiels du développement, de l'organogenèse et de l'homéostasie. *Med Sci* 1997; 13: 459-66.

3. Blumberg B, Evans RM. Orphan nuclear receptors: new ligands and new possibilities. *Genes Dev* 1998; 12: 3149-55.
4. Forman BM, Tzamelis I, Choi H-S, Chen J, Simha D, Seol W, Evans RM, Moore DD. Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR- β . *Nature* 1998; 395: 612-5.
5. Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Dyck JA, Stein RB, Eichele G, Evans RM, Thaller C. 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 1992; 68: 397-406.
6. Levin AA, Sturzenberg LJ, Kazmer S, et al. 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR α . *Nature* 1992; 355: 359-61.
7. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15 deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 1995; 83: 803-12.
8. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 1995; 83: 813-9.
9. Michaille J, Blanchet S. Les RXR ne sont pas des partenaires d'hétérodimérisation purement passifs. *Med Sci* 1998; 14: 1211-6.
10. Baes M, Gulick T, Choi H-S, Martinoli MG, Simha D, Moore DD. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1544-52.
11. Choi HS, Chung M, Tzamelis I, Simha D, Lee YK, Seol W, Moore DD. Differential transactivation by two isoforms of the orphan nuclear receptor CAR. *J Biol Chem* 1997; 272: 23565-71.
12. Kuo MH, Allis CD. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioAssays* 1998; 20: 615-26.
13. Gelman L, Staels B, Auwerx J. Rôle des co-facteurs transcriptionnels dans la transduction des signaux hormonaux par les récepteurs nucléaires. *Med Sci* 1997; 13: 961-70.
14. Wolffe AP. Sinful repression. *Nature* 1997; 387: 16-7.
15. Krey G, Braissant O, L'Horset F, Kalkoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 779-91.
16. Renaud JP, Rochel N, Ruff M, Vivat V, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D. Crystal structure of the RAR γ ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* 1995; 378: 681-9.

RÉFÉRENCES

17. Laudet V, Delannoy S. Comment mettre en route un récepteur nucléaire? Apport des données structurales. *Med Sci* 1996; 12: 528-32.
18. Brzozowski AM, Pike ACW, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JÅ, Carlquist M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 1997; 389: 753-8.
19. Picard D. Two orphans find a home. *Nature* 1998; 395: 543-4.
20. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falch JA, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α . *Nature* 1996; 383: 728-31.
21. Forman BM, Ruan B, Chen J, Schroeppfer GJ, Evans RM. The orphan receptor LXR is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10588-93.
22. Forman BM, Goode E, Chen J, *et al.* Identification of a nuclear receptor that is identified by farnesol metabolites. *Cell* 1995; 81: 687-93.
23. Smith DP, Mason CS, Jones EA, Old RW. A novel nuclear receptor superfamily member in *Xenopus* that associates with RXR, and shares extensive sequence similarity to the mammalian vitamin D₃ receptor. *Nucleic Acids Res* 1993; 22: 66-71.
24. Blumberg B, Kand H, Bolado J, Chen H, Craig AG, Moreno TA, Umesono K, Perlmann T, De Robertis EM, Evans RM. BXR, an embryonic orphan nuclear receptor activated by a novel class of endogenous benzoate metabolites. *Genes Dev* 1998; 12: 1269-77.
25. Kliewer SA, Moore JT, Wade L, *et al.* An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signalling pathway. *Cell* 1998; 92: 73-82.
26. Blumberg B, Sabbagh W, Juguilon, Bolado J, van Meter CM, Ong ES, Evans RM. SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev* 1998; 12: 3195-205.
27. Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPAR α -leukotriene B₄ pathway to inflammation control. *Nature* 1996; 384: 39-43.

TIRÉS À PART

V. Laudet.

m/s n° 2, vol. 15, février 99

FORMATION PERMANENTE

