

Un nouveau type de co-facteur transcriptionnel impliqué dans la voie de signalisation des rétinoïdes

Les récepteurs nucléaires appartiennent à une famille structurellement et fonctionnellement définie de facteurs de transcription eucaryotes activés par la liaison d'un ligand. En modulant la transcription de gènes cibles en réponse à leur propre ligand et à d'autres signaux afférents, ils jouent des rôles physiologiques clés dans la régulation du développement, dans le métabolisme et dans la reproduction. Le rôle des récepteurs nucléaires activés est de diriger l'assemblage et la stabilisation du complexe de pré-initiation de la transcription dans un environnement permissif sur le promoteur d'un gène cible. Ceci implique l'interaction fonctionnelle du récepteur nucléaire avec des facteurs contenus dans ce complexe. De telles interactions sont certes nécessaires mais insuffisantes pour assurer la régulation de la transcription. Des criblages biochimiques et génétiques ont en effet permis d'identifier des protéines, les co-activateurs, qui interagissent avec les récepteurs activés et stimulent la retransactivation de façon significative sans altérer l'activité transcriptionnelle basale [1, 2].

Plus d'une dizaine de co-activateurs des récepteurs nucléaires ont été clonés depuis dix ans [1, 2]. Un grand nombre interagit avec le domaine AF-2 de fixation du ligand présent dans les récepteurs, par l'intermédiaire de séquences peptidiques LXXLL ou LXXLI (L: leucine; X: acide aminé quelconque; I: isoleucine) (*m/s* 1997, n°10, p.1212), et ont la capacité d'activer la transcription lorsqu'ils sont recrutés à proximité d'un site de démarrage de la transcription. Ils peuvent aussi avoir d'autres fonctions comme le recrutement des facteurs de la machinerie transcriptionnelle, une activité histone acétyl transférase et donc de remodelage de la chromatine, ou être impliqués dans des interactions

protéine/protéine. De plus, un rôle fonctionnel pour un ARN messager dans l'activation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires vient d'être identifié pour la première fois (*m/s* 1999, n°10, p.1153). Cet ARN appelé SRA (pour *steroid receptor RNA activator*) pourrait agir comme un adaptateur nucléaire entre le co-activateur SRC-1 et les récepteurs des hormones stéroïdiennes. Enfin, le modèle de la régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires hormonaux apparaît converger vers le recrutement, par les récepteurs activés, de complexes et de sous-complexes composés de plusieurs polypeptides dont certains sont communs à différents facteurs de transcription. Ces complexes appelés TRAP (*thyroid hormone associated receptor*), ARC (*activator recruited cofactors*), ou encore DRIP (*vitamin D₃ receptor interacting protein*) semblent agir directement, après l'étape de remodelage de la chromatine, au niveau du complexe de préinitiation de la transcription [3].

L'étude de la voie d'activation des rétinoïdes nous a permis d'identifier un co-facteur spécifique de cette voie dont la particularité est de se lier à la fois aux récepteurs et aux ligands.

La voie de signalisation de l'acide rétinoïque : récepteurs nucléaires et autres protéines fixant le ligand

L'acide rétinoïque (AR), métabolite actif de la vitamine A, est un puissant modulateur de la croissance et de la différenciation cellulaire et joue un rôle central dans les processus de développement de l'embryon et dans l'homéostasie des tissus adultes. Si, dès les années 1960, certains éléments des syndromes de carence en vitamine A ont pu indiquer son rôle dans l'hématopoïèse, celui-ci n'a été étudié que dans les années 1980, tout

d'abord dans la différenciation des cellules leucémiques puis dans l'hématopoïèse normale. La plupart des effets biologiques de l'acide rétinoïque sont relayés par deux familles de récepteurs nucléaires, les RAR (*retinoic acid receptor*) dont les ligands sont l'acide rétinoïque tout-*trans* et 9-*cis*, et les RXR (*retinoid X receptor*) qui ne lient que l'acide rétinoïque 9-*cis*. RAR et RXR appartiennent tous deux à la superfamille des récepteurs des stéroïdes/rétinoïdes/hormones thyroïdiennes et de la vitamine D₃ [4]. L'unité fonctionnelle correspond à l'hétérodimère RXR-RAR qui se fixe sur une séquence déterminée de la région promotrice des gènes cibles, l'élément de réponse de l'acide rétinoïque (ou RARE pour *retinoic acid response element*), constitué d'un motif consensus directement répété et espacé de cinq nucléotides (séquence DR5) ([4] et *m/s* 1998, n°11, p.1211). Les deux familles de récepteurs, RAR et RXR, contiennent chacun trois membres, α , β , et γ , codés par des gènes différents, permettant ainsi de nombreuses combinaisons de cette unité fonctionnelle, ce qui est probablement en partie à l'origine de la diversité des effets biologiques de l'acide rétinoïque dans l'organisme. En l'absence de ligand, le dimère RXR-RAR recrute des co-répresseurs (NCoR, mSin3 et une histone désacétylase) provoquant la compression de la chromatine et donc la répression transcriptionnelle des gènes cibles. L'addition du ligand induit la dissociation du complexe co-répresseur et favorise l'association du dimère RXR-RAR avec des co-activateurs. Il s'agit en fait d'un complexe multiprotéique transcriptionnel appelé RANC (*retinoic acid-dependent nuclear complex*) dans lequel on peut noter la présence de la protéine PML (*promyelocytic leukemia*), co-activateur dépendant de l'acide rétinoïque, qui n'interagit pas

directement avec RAR ou RXR, mais avec TIF1 α et CBP, deux partenaires du complexe RANC [5, 6] (figure 1A). Outre les récepteurs nucléaires, deux protéines appelées CRABP I et II (pour *cellular retinoic acid binding proteins*) lient aussi l'acide rétinoïque dans la cellule [7]. Ces deux protéines de petit poids moléculaire (15kDa) présentent 75 % d'homologie et sont toutes deux localisées dans le cytoplasme. Elles possèdent des spécificités distinctes vis-à-vis de leurs ligands (l'acide rétinoïque tout-*trans* et l'acide rétinoïque 9-*cis*) puisque l'affinité de CRABPII pour l'acide rétinoïque tout-*trans* serait environ trois fois moins grande que celle de CRABPI. CRABPI a une plus large distribution tissulaire que CRABPII qui semble surtout exprimée durant l'embryogenèse, et dans les kératinocytes humains. Leurs fonctions fondamentales communes est de solubiliser, protéger contre les réactions d'oxydo-réduction indépendantes du métabolisme des rétinoïdes et transporter leurs ligands endogènes respectifs [7]. Les CRABP modulerait ainsi la voie de signali-

sation de l'acide rétinoïque en le séquestrant ou en intervenant sur son catabolisme par son transport vers le réticulum endoplasmique et le cytochrome P450 associé [7], ce qui permettrait de contrôler la concentration d'acide rétinoïque libre, et donc l'activation des récepteurs nucléaires. Ces protéines cytoplasmiques de liaison aux rétinoïdes n'avaient, jusqu'à très récemment, pas été impliquées dans l'induction d'événements nucléaires.

La leucémie aiguë promyélocytaire: un modèle d'étude de CRABPII

La leucémie aiguë promyélocytaire est caractérisée par l'accumulation dans la moelle osseuse de cellules tumorales bloquées à l'étape promyélocytaire de la maturation myéloïde. Dans la grande majorité des cas, il existe une translocation chromosomique acquise t(15;17). Celle-ci provoque la synthèse d'une protéine de fusion PML/RAR α [8] qui interagit de façon anormale avec les co-répresseurs de la transcription et est responsable du blocage de la différenciation granulo-

cytaire. Les cellules leucémiques porteuses de cette translocation sont cependant sensibles à l'acide rétinoïque qui, à des concentrations pharmacologiques, lève ce blocage et induit leur différenciation. Ces importants résultats ont profondément modifié la survie des patients atteints de cette forme de leucémie et le traitement par l'acide rétinoïque a été la première thérapeutique active par son induction de la différenciation de cellules leucémiques [9, 10].

Nous avons démontré que le traitement des patients atteints de leucémie aiguë promyélocytaire de type M3 par l'acide rétinoïque tout-*trans* provoquait l'induction rapide de l'expression de l'allèle normal RAR α dans les cellules leucémiques [11] et, plus tardivement, quand les patients sont en rémission complète, une augmentation de l'expression de CRABPII dans les cellules mononucléées de la moelle osseuse [12]. Le rôle connu des protéines CRABP dans le métabolisme cellulaire de l'acide rétinoïque, laissant penser que le traitement *in vivo* par des fortes concentrations d'acide rétinoïque tout-*trans* entraînait une hypervitaminose A provoquant l'expression et la synthèse des protéines liées au catabolisme de la vitamine A, en particulier CRABPII. Cette hypothèse était renforcée par le fait que l'expression de CRABPII était contrôlée par un élément de réponse pour l'acide rétinoïque. Ceci permettait en outre d'expliquer l'absence d'efficacité de l'acide rétinoïque tout-*trans* comme traitement d'entretien, les patients rechutant pendant ce traitement, ainsi que la survenue d'une résistance secondaire à ce traitement [12, 13]. En fait, des données plus récentes montrent que le rôle de la protéine CRABPII n'est pas restreint à cette fonction de transport et de métabolisme.

CRABPII est un co-facteur des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque

Nos résultats ont montré que CRABPII augmente l'activité transcriptionnelle de promoteurs synthétiques ou naturels sensibles à l'action de l'acide rétinoïque [14]. Cet effet a été observé dans des lignées myéloïdes, mais aussi

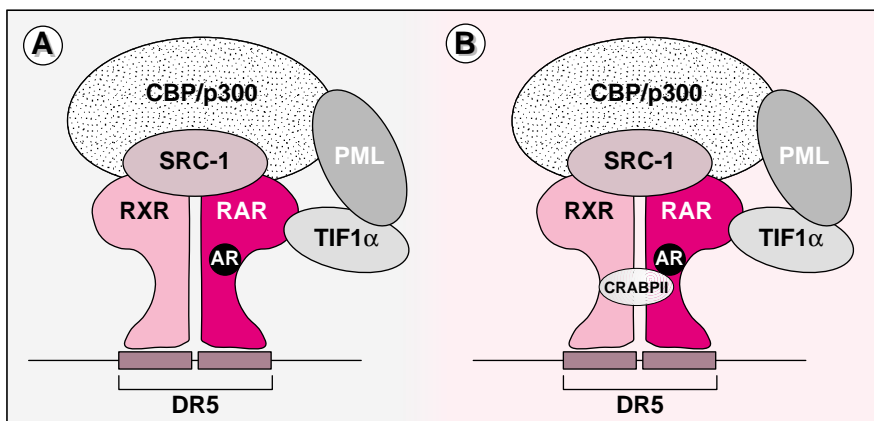


Figure 1. **Complexe transcriptionnel des récepteurs de l'acide rétinoïque.** A. L'hétérodimère RXR-RAR est fixé sur son élément de réponse DR5. La fixation de l'acide rétinoïque (AR) sur son récepteur induit le recrutement de protéines co-actrices appartenant au complexe RANC (retinoic acid-dependent nuclear complex): SRC-1 (steroid receptor coactivator-1), CBP (CREB-binding protein)/p300 qui a une activité histone acetyl transférase, TIF1 α (transcriptional intermediary factor 1 α) et PML (promyelocytic leukemia). PML n'interagit pas directement avec les récepteurs nucléaires RAR et RXR, mais avec TIF1 α et CBP. B. Ce schéma peut être maintenant complété avec la protéine CRABPII (cellular retinoic acid binding protein II) qui a la particularité de fixer à la fois le récepteur (RAR ou RXR) et l'acide rétinoïque. Si la fixation du ligand n'est pas nécessaire à l'interaction physique de CRABPII avec les récepteurs, elle semble en revanche indispensable pour augmenter la transactivation des gènes cibles par le complexe transcriptionnel RANC.

dans des cellules non myéloïdes comme des cellules de tumeurs mammaires ou de tératocarcinomes [14-16]. Il requiert la présence d'un rétinol capable de se lier à la fois aux récepteurs nucléaires de l'acide rétinol et à CRABP II, comme l'acide rétinol tout-*trans* et l'acide rétinol 9-*cis* [14]. Ce rôle de la protéine CRABP II dans la transactivation des gènes sensibles à l'acide rétinol est en accord avec sa localisation à la fois nucléaire et cytoplasmique. En revanche, CRABP I dont la localisation est uniquement cytoplasmique, au moins dans les cellules hématopoïétiques, n'a aucun effet sur l'activité transcriptionnelle de ces gènes [14]. Cependant, contrairement à certains co-activateurs, CRABP II ne possède pas d'activité transcriptionnelle *per se*. En fait, nous avons montré qu'elle fait partie du complexe transcriptionnel des récepteurs nucléaires de l'acide rétinol.

En effet, des expériences de type « retard sur gel » et d'immunoprécipitation d'extraits nucléaires de cellules hématopoïétiques ou de cellules Cos-1 transfectées montrent que CRABP II interagit aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* avec les deux récepteurs RXR α et RAR α . Nos expériences *in vitro* montrent que cette interaction est directe, indépendante de la présence ou non du ligand et semble spécifique aux récepteurs de l'acide rétinol puisque aucune interaction n'a pu être observée avec d'autres membres de la superfamille des récepteurs stéroïdiens ou d'autres protéines nucléaires. Il apparaît donc que CRABP II fait partie de la classe des co-facteurs des récepteurs des rétinol, dont elle possède certaines spécificités (figure 1B). Cependant, contrairement aux autres co-activateurs, CRABP II est de petite masse moléculaire (16 kd) et ne possède pas la signature spécifique des co-activateurs de la transcription (LXXLL). Sa caractéristique la plus remarquable est de fixer à la fois le récepteur et le ligand, avec de plus une synergie pour la liaison entre le récepteur RAR et CRABP II [14, 16]. En outre, la présence de la protéine semble faciliter la fixation du complexe multiprotéique RANC sur l'élément de réponse des gènes cibles.

Il apparaît donc que le CRABP II, du fait de ses fonctions multiples, de liaison, de transport et de métabolisme de l'acide rétinol, et maintenant sa fonction nucléaire, pourrait jouer un rôle central de coordination de la voie de signalisation des rétinol. Ce mécanisme est observé dans différents types cellulaires, mais il reste à déterminer s'il intervient constamment ou seulement dans certaines conditions cellulaires particulières. L'étude des souris invalidées pour le gène codant pour CRABP II qui, dans des conditions normales, ne présentent pas de phénotype particulier, s'avérera sans doute utile pour préciser le rôle de cette protéine dans la voie de signalisation des rétinol.

Conclusions

L'intervention des différents facteurs permettant la transactivation des gènes par les récepteurs nucléaires commence à être mieux connue. Des complexes multiprotéiques impliqués dans le remodelage chromatinien, par une action spécifique sur les nucléosomes, agiraient dans un premier temps, suivis de l'action conjuguée de plusieurs facteurs protéiques possédant une activité histone acétyl transférase. Des complexes multimoléculaires co-activateurs comme DRIP ou TRAP agiraient ensuite au niveau du complexe de pré-initiation de la transcription. L'ensemble de ces processus implique de nombreuses interactions protéine-protéine. L'intervention d'une protéine interagissant à la fois avec le récepteur nucléaire et le ligand dans ces complexes protéiques définit un degré supplémentaire de complexité du contrôle de la transcription ■

RÉFÉRENCES

- Xu L, Glass CG, Rosenfeld MG. Coactivator and corepressors complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Gene Dev* 1999; 9: 140-7.
- Gelman L, Staels B, Auwerx J. Rôle des co-facteurs transcriptionnels dans la transduction des signaux par les récepteurs nucléaires. *Med Sci* 1997; 13: 961-70.
- Lemon BD, Freedman LP. Nuclear receptor cofactors as chromatin remodelers. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 499-504.
- Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 1996; 10: 955-60.

- Zhong S, Delva L, Rachez C, *et al.* A RA-dependent, tumour-growth suppressive transcription complex is the target of the PML-RAR α and T18 oncoproteins. *Nat Genet* 1999; 23: 287-95.

- Wang ZG, Delva L, Gaboli M, *et al.* Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science* 1998; 279: 1547-51.

- Napoli JL. Retinoic acid homeostasis. Perspective roles of β -carotene, retinol, CRBP and CRABP. In: Blomhoff R, ed. Vitamin A in Health and Disease. New York: Marcel Dekker 1994: 135-88.

- Kalanry S, Delva L, Gaboli M, *et al.* Gene rearrangements in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *J Cell Physiol* 1997; 173: 288-96.

- Chomienne C, Fenaux P, Degos L. Retinoid differentiation therapy in promyelocytic leukemia. *FASEB J* 1996; 10: 1025-30.

- Lavau C, Jansen J, Weiss K, Lamond A, Dejean A. Leucémie aiguë promyélocytaire et acide rétinol: le paradoxe. *Med Sci* 1994; 10: 817-24.

- Chomienne C, Balitrand N, Ballerini P, *et al.* All-*trans* retinoic acid modulates the retinoic acid receptor alpha in promyelocytic cells. *J Clin Invest* 1991; 88: 2150-4.

- Cornic M, Delva L, Guidez F, *et al.* Induction of retinoic acid binding protein in normal and malignant human myeloid cells by retinoic acid in AML3 patients. *Cancer Res* 1992; 52: 3329-34.

- Delva L, Cornic M, Balitrand N, *et al.* Resistance to all-*trans* retinoic acid (ATRA) therapy in relapsing acute promyelocytic leukemia: study of *in vitro* ATRA sensitivity and cellular retinoic acid binding protein levels in leukemic cells. *Blood* 1993; 82: 2175-81.

- Delva L, Bastie JN, Rochette-Egly C, *et al.* Physical and functional interactions between the cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7158-67.

- Jing Y, Waxman S, Miray-Lopez R. The cellular retinoic acid binding protein II is a positive regulator of retinoic acid signaling in breast cancer cells. *Cancer Res* 1997; 57: 1668-72.

- Dong D, Ruuska SE, Levinthal DJ, *et al.* Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J Biol Chem* 1999; 274: 23695-8.

Laurent Delva

Jean-Noël Bastie

Nicole Balitrand

Gilles Despouy

Christine Chomienne

Laboratoire de biologie cellulaire hématopoïétique, EMI 00-03, IUH, Hôpital Saint-Louis, 1, avenue Claude-Vellefaux 75010 Paris, France.

TIRÉS À PART

L. Delva.