

Régulation de la synthèse des acides rétinoïques tout-trans et 9-cis : rôle d'une nouvelle rétinal déshydrogénase

Jean Labrecque
Pangala V. Bhat
André Lacroix

La vitamine A, essentielle à la croissance et à la différenciation de plusieurs tissus, est stockée dans le foie qui la transforme et sécrète du rétinol; celui-ci est oxydé dans ses tissus cibles en acide rétinoïque, un de ses métabolites actifs majeurs, grâce à l'action successive de la rétinal déshydrogénase puis de la rétinal déshydrogénase. L'isomère *trans* de l'acide rétinoïque (AR *trans*), le mieux connu, active les récepteurs nucléaires RAR. L'isomère 9-*cis* (AR 9-*c*) représente un nouveau métabolite actif qui peut activer les deux familles connues de récepteurs nucléaires des acides rétinoïques, les RAR et les RXR. Le rein joue probablement un rôle à part dans le métabolisme de l'acide rétinoïque. On y a trouvé une nouvelle isoenzyme de rétinal déshydrogénase, nommée RALDH, qui catalyse l'oxydation du rétinaldéhyde en AR. Spécifique des AR 9-*cis* et *trans*, elle est deux fois plus active sur le rétinaldéhyde 9-*cis* que sur l'isomère tout-*trans*: le rétinol *trans* serait donc d'abord isomérisé en rétinol 9-*cis* qui pourrait ensuite être oxydé en rétinol 9-*cis* puis en AR 9-*cis*.

ADRESSES

J. Labrecque: *étudiant en doctorat, stagiaire postdoctoral*. Laboratoire d'hématopoïèse et de leucémie, Institut de recherches cliniques de Montréal, 110, rue des Pins-Ouest, Montréal, Québec, H2W 1R7 Canada. P.V. Bhat: *chercheur senior*. A. Lacroix: *directeur*. Laboratoire de nutrition et cancer, Département de médecine, Université de Montréal, Centre de recherche, Hôtel-Dieu de Montréal, 3850, rue Saint-Urbain, Montréal, Québec, H2W 1T8 Canada.

La vitamine A exerce plusieurs effets physiologiques majeurs. Elle est essentielle au processus visuel, à la reproduction, à la croissance et à la différenciation des tissus épithéliaux, des os, des cartilages, et des cellules hématopoïétiques [1]. L'intérêt pour la vitamine A et les carotènes a crû considérablement lorsque leurs apports ont été associés à la prévention et au traitement de certains cancers [1-3].

Les rétinoïdes se sont également révélés efficaces pour le traitement de diverses maladies dermatologiques (*m/s* n° 1, vol. 11, p. 140) dont le psoriasis et l'acné sévère [4]. Le terme vitamine A englobe plusieurs métabolites actifs incluant le rétinol (ROL), le rétinaldéhyde (ou rétinol: RAL), et l'acide rétinoïque (AR). Le rétinol est la forme majeure de transport qui peut subvenir à tous les effets physiologiques de la vitamine

RÉFÉRENCES

1. Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS, eds. *The retinoids: biology, chemistry and medicine*. 2nd ed. New York: Lippincott-Raven, 1993: 1-679.
2. Huang ME, Ye YI, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhou L, Gu LJ, Wang ZY. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1988; 72: 567-71.
3. Degos L, Castaigne S, Fenaux P, Daniel M, Chomienne C. Le traitement des leucémies aiguës à promyélocytes par l'acide tout-trans rétinol. *Med Sci* 1991; 7: 460-4.
4. Goodman DS. Vitamin A and retinoids in health and disease. *N Engl J Med* 1984; 310: 1023-31.
5. Blomhoff R, Green MH, Norum KR. Vitamin A: physiological and biochemical processing. *Annu Rev Nutr* 1992; 12: 37-57.
6. Green MH, Green JB. Multicompartmental analysis of whole body retinol dynamics in vitamin A-sufficient rats. *Fed Proc* 1987; 46: 1011.
7. Båvik CO, Busch C, Erickson U. Characterization of plasma retinol-binding protein membrane receptor expressed in the retinal pigment epithelium. *J Biol Chem* 1992; 267: 23035-42.
8. Blomhoff R. Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr Rev* 1994; 52: S13-23.
9. Giguère V. Retinoic acid receptor and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocrinol Rev* 1994; 15: 61-79.
10. Heyman R, Mangelsdorf PJ, 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.
11. Guftafson AL, Dencker L, Eriksson U. Non-overlapping expression of CRBPI and CRABPI during pattern formation of the limbs and craniofacial structures in the early mouse embryo. *Development* 1993; 117: 451-60.
12. Fiorella PD, Napoli JL. Expression of cellular retinoic binding protein (CRABP) in *Escherichia coli*. Characterization and evidence that *holo*-CRABP is a substrate in retinoic acid metabolism. *J Biol Chem* 1991; 266: 16572-9.
13. De Thé H, Marchio A, Thiollais P, Dejean A. Differential expression and ligand regulation of retinoic acid receptor α - and β -genes. *EMBO J* 1989; 8: 429-33.
14. Kastner P, Krust A, Mendelsohn C, Garnier JM, Zelent A, Leroy P, Staub A, Chambon P. Murine isoforms of retinoic acid receptor γ with specific patterns of expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2700-4.
15. Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, Kakizuka A, Evans RM. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis-retinoic acid. *Genes Dev* 1992; 6: 329-44.

A. Le rétinol est le métabolite intermédiaire lors de la formation de l'acide rétinolique à partir du rétinol; son isomère 11-*cis* est aussi le chromophore qui est lié à la rhodopsine pour la détection de la lumière par la rétine. Il est classiquement admis que l'acide rétinolique *trans* (AR*t*) est le métabolite actif qui assure les effets de la vitamine A sur la croissance et la différenciation cellulaire, mais qui ne remplit toutefois pas les fonctions de la vitamine A au niveau de la vision et de la reproduction.

Absorption et mise en réserve

Les sources nutritionnelles de la vitamine A sont: (1) les caroténoïdes d'origine végétale possédant une activité de provitamine A (α , β - et γ -carotène et cryptoxanthine); (2) les esters de rétinol d'origine animale; (3) et, dans une moindre mesure, le rétinol d'origine animale [5]. Le β -carotène est converti par voie enzymatique en rétinol au niveau des entérocytes; ce dernier est réduit en rétinol par une activité réductase (figure 1). D'autre part, les esters de rétinol d'origine alimentaire sont hydrolysés dans la lumière intestinale et sont absorbés grâce à un mécanisme de diffusion facilitée [6]; le rétinol est ensuite estérifié avec des acyl-CoA dans les entérocytes et acheminé jusqu'au foie *via* les chylomicrons où il est stocké sous forme d'esters. Après déstérification, le foie sécrète du rétinol associé à son transporteur plasmatique, la RBP (retinol binding protein) qui forme un complexe avec la transthyrétine (TTR). La majorité du rétinol plasmatique est recyclée; c'est-à-dire qu'il est absorbé, réestérifié et resécrété. Chez le rat, une molécule est en moyenne recyclée 7 à 13 fois (rein 50 %, foie 20 %) avant son utilisation finale [6]. L'absorption du rétinol par les cellules cibles semble être relayée par un récepteur membranaire spécifique du complexe RBP-ROL [7]. Les fantômes des chylomicrons peuvent aussi être absorbés par des tissus extra-hépatiques dont la moelle, les cellules hématopoïétiques, le rein et les muscles squelettiques [8]. Le rétinol, se retrouvant dans les tissus cibles, doit être activé pour exercer ses effets. L'AR*t* est pro-

duit à partir du rétinol à l'aide de deux étapes oxydatives. Il exerce ses effets en se liant à des récepteurs nucléaires, les RAR (retinoic acid nuclear receptors), qui modulent l'expression de plusieurs gènes. D'autres stéréo-isomères de l'acide rétinolique sont aussi retrouvés dans l'organisme, dont l'acide rétinolique 9-*cis* (AR 9-*c*) (figure 2). Deux types de récepteurs nucléaires de l'acide rétinolique sont connus à ce jour, les RAR et les RXR. Les stéréo-isomères *trans* et 9-*cis* de l'acide rétinolique peuvent se lier et activer les RAR, mais les RXR ne sont directement activés que par l'AR 9-*c* [9, 10].

Métabolisme et protéines cellulaires

Différentes protéines cytosoliques peuvent lier spécifiquement le rétinol, le rétinol ou l'AR*t*. Leur rôle a été associé à l'absorption, à la mise en réserve, au transport et au métabolisme de la vitamine A. Ce sont: (1) les protéines cellulaires de type I (CRBP-I, cellular retino-binding protein) et de type II (CRBP-II) qui lient le rétinol; (2) les protéines cellulaires de type I (CRABP-I, cellular retinoic acid-binding protein) et de type II (CRABP-II) qui lient l'acide rétinolique. La CRBP-I et la CRABP-I sont retrouvées dans plusieurs tissus qui utilisent la vitamine A. La CRBP-II est retrouvée exclusivement dans l'intestin grêle, tandis que la CRABP-II est présente en grande quantité dans la peau [9]. Les CRABP-I et -II semblent avoir des fonctions différentes puisque leur distribution n'est pas la même durant l'embryogenèse chez la souris. D'autre part, la synthèse des CRBP-I et CRABP-I pendant le développement est mutuellement exclusive. La CRABP-I est synthétisée dans des tissus qui se développent anormalement lorsqu'ils sont soumis à des excès d'acide rétinolique [9, 11]. Ces protéines semblent jouer un rôle dans le métabolisme de la vitamine A. Le complexe CRBP-II-ROL serait le substrat de la lécithine-rétinyl acyl transférase (LRAT). Le complexe CRBP-II-RAL servirait de substrat spécifique à une rétinol réductase microsomale dans l'intestin. Le CRBP-I du foie et des autres tissus serait impliqué, par sa liaison du rétinol, dans les processus d'estérification par la LRAT. Le

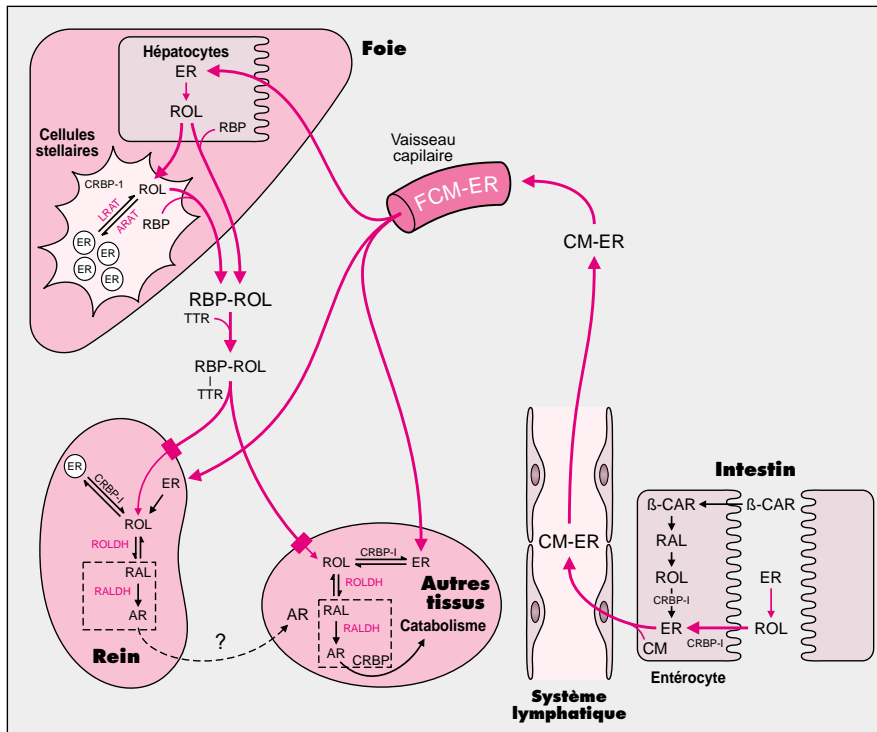


Figure 1. **Métabolisme de la vitamine A.** Les esters de rétinol (ER) sont hydrolysés en rétinol (ROL) dans la lumière intestinale avant d'être absorbés par les entérocytes. Les caroténoïdes, en majorité du β -carotène (β -CAR), sont absorbés et convertis en rétinol dans les entérocytes. Dans ces mêmes cellules, le rétinol est estérifié puis incorporé aux chylomicrons (CM). Le complexe CM-ER est transporté via le système lymphatique jusqu'à la circulation sanguine où les fantômes des chylomicrons (FCM) sont formés dans les vaisseaux capillaires. Ces FCM sont absorbés en majorité par les hépatocytes mais aussi par d'autres tissus. Dans les hépatocytes, les esters de rétinol sont hydrolysés en rétinol. Ce dernier peut être acheminé aux cellules étoilées du foie où il est réestérifié pour sa mise en réserve sous la forme d'esters de rétinol (ER). L'estérification du rétinol peut être catalysée par la LRAT (lécithine-rétinol acyltransférase) ou la ARAT (acyl-Coa-rétinol acyltransférase). Par ailleurs, l'hydrolyse des esters de rétinol est catalysée par une REH (rétinol-ester hydrolase) [5, 8]. Les hépatocytes et les cellules stellaires sécrètent dans la circulation le rétinol lié au RBP (retinol binding protein) (RBP-ROL). Le complexe RBP-ROL est lié à la transthyréine (TTR). Le rétinol est absorbé sous la forme de ce complexe par plusieurs tissus, dont le rein. Cette absorption est relayée par un récepteur membranaire du complexe RBP-ROL [7], qui est représenté par une boîte rouge. Le rétinol absorbé par le rein peut être oxydé en acide rétinique (AR) à la suite de deux étapes oxydatives catalysées par des enzymes cytosoliques, la rétinol déshydrogénase (ROLDH) puis la rétinol déshydrogénase (RALDH). (Figure adaptée de [5]). CRBP: cellular retinol-binding protein ; CRABP: cellular retinoic acid-binding protein.

CRBP-I libre stimule la désestérification du rétinol par la rétinol-ester hydrolase. Le complexe CRBP-I-ROL permettrait l'oxydation du rétinol en rétinol par une activité déshydrogénase microsomale utilisant le NADP comme cofacteur. *In vitro*, le complexe CRABP-I-AR servirait de substrat spécifique pour des enzymes de type cytochrome P-450 impliqués dans le catabolisme de l'acide rétinique [12].

Les RAR et les RXR

Les RAR appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires hormonaux de type II qui regroupe, outre les RAR, les récepteurs de la T_3 (T_3R), de la vitamine D₃ (VDR) et les récepteurs des agents induisant la prolifération des peroxyssomes (PPAR). Cette famille comporte aussi des récepteurs « orphelins » qui ne

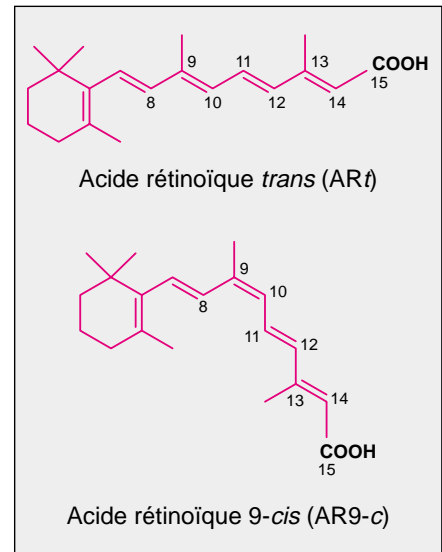


Figure 2. **Activateurs des RAR et des RXR.** L'acide rétinique trans (ARt) n'active que les RAR. L'acide rétinique 9-cis (AR 9-c) active les deux types de récepteurs nucléaires. Les deux molécules ne diffèrent que par l'orientation cis de la double liaison située entre les carbones 9 et 10 de la chaîne latérale.

possèdent pas de ligand endogène, ou dont le ligand n'a pas encore été identifié. Les RAR incluent trois protéines, les RAR α , RAR β et RAR γ , qui présentent chacune plusieurs isoformes. La synthèse de RAR α est ubiquitaire mais plus importante dans des régions spécifiques du cerveau [13]. L'ARNm de RAR β est retrouvé dans plusieurs tissus, mais plus abondamment dans le rein, la prostate, l'hypophyse, la glande surrénale et le système nerveux central. RAR γ est surtout exprimé dans la peau et les poumons [9, 13, 14].

Trois RXR (a, b et g), codés par des gènes différents, sont retrouvés chez les vertébrés. Chez le rat, le RXR α est surtout synthétisé dans les tissus viscéraux comme le foie, les reins, les poumons, les muscles, la rate et aussi à un moindre niveau dans l'hypophyse, le cerveau, le cœur, les intestins et les testicules. Le RXR β est retrouvé dans tous les tissus exceptés l'intestin, le foie et les testicules où il est produit à un moindre niveau. D'autre part, RXR γ est détecté dans la glande surrénale, le rein, le foie, le cerveau, les poumons, le cœur et les muscles [9, 15].

RÉFÉRENCES

16. Lavau C, Jansen J, Weis K, Lamond A, Dejean A. Leucémie aiguë promyélocytaire et acide rétinolique: le paradoxe. *Med Sci* 1994; 10: 817-24.
17. Thaller C, Hofmann C, Eichele G. 9-*cis*-retinoic acid, a potent inducer of digit pattern duplication in the chick wing bud. *Development* 1993; 118: 957-65.
18. Davis KD, Berrodin TJ, Stelmach JE, Wonkler JD, Lazar MA. Endogenous retinoid X receptors can function as hormone receptors in pituitary cells. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 7105-10.
19. Allegretto EA, Shevde N, Zou A, Howell SR, Boehm MF, Hollis BW, Pike JW. Retinoid X receptor acts as hormone receptor *in vivo* to induce a key metabolic enzyme for 1,25-dihydroxy vitamin D₃. *J Biol Chem* 1995; 270: 2306-9.
20. Leblanc BP, Stunnenberg HG. 9-*cis* retinoic acid signaling: changing partners causes some excitement. *Genes Dev* 1995; 9: 1811-6.
21. Parés X, Cederlund E, Moreno A, Saubi N, Höög JO, Jörnvall H. Class IV alcohol dehydrogenase (the gastric enzyme). Structural analysis of human sigma-ADH reveals class IV to be variable and confirms presence of a fifth mammalian alcohol dehydrogenase class. *FEBS Lett* 1992; 303: 69-72.
22. Yang ZN, Davis GJ, Hurley TD, Stone CL, Li TK, Bosron WF. Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenases for retinol oxidation and retinal reduction. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 496.
23. Pocker Y, Li H. The catalytic specificity of liver alcohol dehydrogenase: vitamin A alcohol and vitamin A aldehyde activities. *Adv Exp Med Biol* 1993; 328: 411-8.
24. Duyster G, Shean ML, McBride MS, Stewart MJ. Retinoic acid response element in the human alcohol dehydrogenase gene ADH3: implications for regulation of retinoic acid synthesis. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 1638-46.
25. Zoombic-Knight M, Satre MA, Duyster G. Differential activity of the promoter for the human alcohol dehydrogenase (retinol dehydrogenase) gene ADH3 in neural tube of transgenic mouse embryos. *J Biol Chem* 1994; 269: 6790-5.
26. Chai X, Boerman MH, Zhai Y, Napoli JL. Cloning of a cDNA for liver microsomal retinol dehydrogenase. A tissue-specific, short-chain alcohol dehydrogenase. *J Biol Chem* 1995; 270: 3900-4.
27. Dockham PA, Lee M-O, Sladek NE. Identification of human liver aldehyde dehydrogenases that catalyse the oxidation of aldophosphamide and retinaldehyde. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 2453-69.
28. Lee MO, Manthey CL, Sladek NE. Identification of mouse liver aldehyde dehydrogenases that catalyse the oxidation of retinaldehyde to retinoic acid. *Biochem Pharm* 1991; 42: 1279-85.

Les RAR activent leurs éléments de réponse lorsqu'ils sont hétérodimérisés avec les RXR [16]. Dans ce cas, seuls les RAR peuvent être activés directement par l'acide rétinolique. D'autre part, des homodimères de RXR activent, *in vitro*, la transcription en réponse à l'AR 9-*c*; cette activation n'est toutefois pas privilégiée physiologiquement. L'AR 9-*c* peut, dans certains cas, exercer des effets biologiques beaucoup plus puissants que l'ARt; par exemple, dans l'induction d'une duplication au niveau des ailes embryonnaires du poulet [17]. L'AR 9-*c* produit aussi une réponse spécifique dans des cellules hypophysaires [18]. Ce métabolite, ou encore des analogues synthétiques stimulant uniquement les RXR, peuvent aussi induire, *in vivo*, la synthèse de la vitamine D3-24-hydroxylase (24-(OH)ase) rénale, une enzyme impliquée dans le catabolisme de la vitamine D [19]. Une réponse spécifique de l'AR 9-*c* est relayée par les RXR lorsqu'ils s'hétérodimérisent avec certains récepteurs orphelins comme le NGFI-B qui est un des gènes très précoces induits par les facteurs de croissance. D'autre part, un complexe formé entre les RXR et le hLXR α , un autre récepteur orphelin, répond spécifiquement à des ligands synthétiques qui activent les RXR. L'activation de ces hétérodimères pourrait représenter une voie physiologique de réponse à l'AR 9-*c* [20].

La complexité de la réponse à l'ARt est produite en partie par l'existence de différents types de RAR et de RXR, de leurs isoformes, de leur expression variée selon les tissus et de leur interaction avec d'autres récepteurs nucléaires. Cette complexité réside aussi en l'existence d'autres métabolites actifs. Ainsi, les niveaux relatifs d'ARt et 9-*cis* jouent probablement un rôle important dans l'activation transcriptionnelle relayée par les RAR et les RXR. La compréhension de la régulation de la biosynthèse de l'ARt et 9-*cis* est donc aussi importante dans la compréhension des effets de la vitamine A.

Oxydation du rétinol

L'oxydation du rétinol en rétinol est une activité réversible. La voie classique proposée met en jeu une rétinol déshydrogénase cytosolique du type alcool déshydrogénase (ADH, alcool: NAD⁺ oxydoréductase, EC

1.1.1.1). Ces enzymes peuvent catalyser l'oxydation d'une grande variété d'alcools en aldéhydes ou cétones. Les isoenzymes de mammifères, provenant de gènes différents, ont été regroupées en cinq classes (I à V) [21]. Les études faites à partir d'isoenzymes purifiées ont démontré que les classes I, II et IV possèdent une activité rétinol déshydrogénase *in vitro* [22, 23]. La classe I regroupe trois isoenzymes codées par des gènes différents (ADH1, ADH2, ADH3) qui ont été clonés chez l'homme. Le gène de l'ADH3 est le seul à posséder un promoteur contenant un élément de réponse à l'AR (RARE); ce promoteur a pu répondre à l'ARt lors d'études de cotransfection avec un RAR [24]. La synthèse de cette enzyme pourrait donc être réglée *in vivo* par l'acide rétinolique, ce qui suggère un rôle de l'ADH3 dans le métabolisme de la vitamine A. Le promoteur du gène humain de l'ADH3 couplé à un gène rapporteur a été exprimé chez des souris transgéniques. L'ADH3 présente des profils d'expression modulés lors du développement: ainsi, lors de l'embryogenèse, le promoteur du gène ADH3 est activé dans certains tissus, dont le tube neural, les bourgeons des membres, le cœur, la région cranio-faciale, les yeux, les oreilles et les reins [25]. Chez la souris, on ne retrouve toutefois qu'une seule ADH de classe I (Adh-1) et le promoteur de son gène ne contient pas de RARE: la modulation *via* les RAR de la synthèse des gènes ADH de classe I n'est donc pas universelle. Une enzyme microsomale exerce aussi une activité rétinol déshydrogénase; le substrat préférentiel de cette enzyme serait le complexe CRBP-ROL. L'ADNc de cette enzyme a été cloné et la synthèse de son message est restreinte au foie [26]. Ces différentes enzymes pourraient faire partie de voies alternatives d'oxydation du rétinol.

Oxydation du rétinol

L'oxydation du rétinol en acide rétinolique est irréversible. Ce sont des aldéhyde déshydrogénases de classe I (ALDH ou AHD, EC 1.2.1.3) qui sont le plus spécifiquement impliquées dans cette catalyse [27, 28]. Chez les mammifères, les ALDH sont regrou-

pées en trois classes [29] : La classe 1 (ALDH1), des enzymes cytosoliques, comprend : (a) des ALDH utilisant le NAD comme co-facteur, qui sont constitutives chez les mammifères ; (b) une ALDH qui est inductible dans le foie de certains rats par le phénobarbital (peu ou pas d'ALDH constitutive de classe I dans le foie de rat). La classe 2 (ALDH2) regroupe les ALDH mitochondriales. La classe 3 (ALDH3) englobe les ALDH qui peuvent utiliser le NADP comme co-facteur ; plus précisément : (a) les ALDH cytosoliques inductibles par la dioxine (TCDD) ou le 3-méthyl cholanthrène (3-MC) ; (b) une ALDH dont la synthèse est associée à des hépatocarcinomes induits chimiquement chez le rat ; (c) les ALDH microsomaux constitutifs et inductibles. Ces enzymes sont des multimères (de dimères à tétramères), composés de sous-unités identiques d'environ 53 kDa. Le pourcentage de résidus identiques entre les différentes formes est élevé. Elles diffèrent par leur localisation intracellulaire, leur point isoélectrique, leur efficacité à oxyder certains substrats et leur sensibilité à différents inhibiteurs [29]. Une même isoenzyme peut catalyser l'oxydation de plusieurs aldéhydes d'origine endogène ou exogène. Ces enzymes ont été étudiées surtout au niveau du foie, dans le contexte de la détoxification de l'éthanol dont l'oxydation de l'acétaldéhyde en acide acétique constitue une étape importante (*m/s n° 4, vol. 12, p. 540*). Plusieurs de ces isoenzymes ayant déjà été purifiées et leurs ADNc clonés ; certaines équipes ont aussi testé leur fonction, l'oxydation du rétinol en acide rétinoïque. Des études détaillées ont démontré que ce sont les ALDH de classe 1 qui catalysent l'oxydation du rétinol *trans* en acide rétinoïque *trans*. Les ALDH de classe 2 et 3 possèdent très peu ou pas d'activité catalytique vis-à-vis du rétinol [28]. Chez la souris, les isoformes AHD-2 et AHD-7 (classe 1) catalysent *in vitro* cette réaction [27]. Dans le foie humain, c'est l'isoforme E1 (ALDH1) qui peut catalyser, *in vitro*, cette oxydation [28]. Dans le foie de rat, il ne semble y avoir que très peu d'ALDH constitutive de classe I [29]. Une ALDH cytosolique de classe I (ALDH-PB) peut, toutefois, être induite dans le foie de cer-

Tableau I			
SPÉCIFICITÉ DE LA RÉTINAL DÉSHYDROGÉNASE VIS-À-VIS DE DIFFÉRENTS STÉRÉO-ISOMÈRES DU RÉTINAL			
Isomère du rétinol	Km (m M)	Vmax (m M/60 min)	Vmax/Km
9- <i>cis</i>	5,70	1,10	0,19
<i>trans</i>	9,80	0,77	0,08
11- <i>cis</i>	10,50	0,39	0,04

Ces constantes ont été obtenues à l'aide d'études cinétiques de saturation par le substrat. Le rapport Vmax/Km représente l'efficacité catalytique globale de l'enzyme sur le substrat. La rétinol déshydrogénase (RALDH) présente la plus grande spécificité pour le rétinol 9-*cis*, suivi du rétinol *trans* avec deux fois moins d'efficacité catalytique. De façon intéressante, l'enzyme ne catalyse pas l'oxydation du rétinol 11-*cis*. Les isomères 9-*cis* et *trans*, qui sont favorisés par cette stéréospécificité, sont les mêmes isomères que ceux de l'acide rétinoïque qui activent les RAR et les RXR. Ces données indiquent donc que la RALDH est une enzyme spécifiquement impliquée dans la synthèse des acides rétinoïques biologiquement actifs.

tains rats par un traitement au phénobarbital. Cette enzyme a été purifiée et son ADNc a été cloné, mais il n'y a pas eu d'étude sur sa capacité d'oxyder le rétinol [30].

Un groupe travaillant sur la différenciation de la rétine lors de l'embryogenèse de souris a identifié une protéine qui était produite de manière asymétrique dans la rétine en développement [31]. Cette protéine apparaît au jour 9 de l'embryogenèse dans la partie dorsale de la vésicule de l'œil et elle garde cette localisation jusqu'à ce que la rétine soit complètement formée. Le séquençage de cette protéine a démontré qu'il s'agissait d'une aldéhyde déshydrogénase de classe 1. Les données de séquence, ainsi que la détermination de son point isoélectrique, ont indiqué qu'il s'agissait probablement de l'AHD-2. Cette protéine peut catalyser l'oxydation du RALt en ARt. Une modulation de la synthèse de l'AHD-2 pourrait jouer un rôle dans l'embryogenèse de souris en modulant la production d'acide rétinoïque.

Métabolisme de l'acide rétinoïque chez le rat

Il y a naturellement peu ou pas d'acide rétinoïque dans l'alimentation du rat. Lorsqu'on y ajoute de l'ARt, il est absorbé *via* la voie portale, métabolisé et excrété dans la bile [32]. Cet ARt supplante fonctionnellement la vitamine A endogène du foie comme source d'acide rétinoïque [33]. Notre équipe a examiné l'effet de l'absorption d'ARt sur le métabolisme du rétinol [34]. Après six jours d'ajout d'ARt à l'alimenta-

tion, la production endogène d'ARt est abolie dans tous les tissus à l'exception du rein. Ces résultats ont indiqué que le rein joue probablement un rôle particulier dans la synthèse de l'acide rétinoïque, *in vivo*. Cette hypothèse est appuyée par d'autres observations. Par exemple, dans des conditions normales, le foie est l'organe qui emmagasine le plus d'esters de rétinol ; toutefois, à mesure que les réserves d'esters de rétinol du foie diminuent, les reins en emmagasinent de plus en plus [35].

Une nouvelle rétinol déshydrogénase

Nous avons étudié le système enzymatique pouvant mener à la formation de l'ARt dans le rein, plus particulièrement la rétinol déshydrogénase. Cette activité enzymatique n'a été retrouvée *in vitro* que dans la fraction cytosolique [36]. Chez le rat, le tissu rénal présente la plus grande activité, suivi du testicule et du poumon ; peu ou pas d'activité n'a été détectée dans le foie. L'activité spécifique rénale est trois fois plus élevée chez des rats déficients en vitamine A.

A partir des reins de rat, nous avons purifié cette enzyme, que nous avons nommée RALDH [37, 38]. Après avoir séquencé l'extrémité aminoterminal et différents fragments internes de la protéine purifiée obtenus par clivage au bromure de cyanogène (CNBr), nous avons cloné l'ADNc de la RALDH à partir d'une bibliothèque d'ADNc de rein de rat [39]. La séquence d'ADNc de la RALDH, qui correspond à la séquence de la protéine purifiée, a

RÉFÉRENCES

29. Lindahl R. Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1992; 27: 283-335.

30. Dunn TJ, Koleske AJ, Lindahl R, Pitot HC. Phenobarbital-inducible aldehyde dehydrogenase in the rat. cDNA sequence and regulation of the mRNA by phenobarbital in responsive rats. *J Biol Chem* 1989; 264: 13057-65.

31. McCaffery P, Lee M-O, Wagner MA, Sladek NE, Dräger UC. Asymmetrical retinoic acid synthesis in the dorsoventral axis of the retina. *Development* 1992; 115: 371-82.

32. Fidge NH, Shiratori T, Ganguly J, Goodman DS. Pathways of absorption of retinol and retinoic acid in the rat. *J Lipid Res* 1968; 9: 103-9.

33. Bhat PV, Lacroix A. Effects of retinoic acid on the metabolism of vitamin A in the liver. *Nutr Res* 1986; 6: 429-35.

34. Bhat PV, Lacroix A. Effects of retinoic acid on the concentrations of radioactive metabolites of retinol in tissues of rats maintained on a retinol-deficient diet. *Can J Physiol Pharmacol* 1991; 69: 826-30.

35. Lewis KC, Green MH, Underwood BA. Vitamin A turnover in rats influenced by vitamin A status. *J Nutr* 1981; 111: 1135-44.

36. Bhat PV, Poissant L, Falardeau P, Lacroix A. Enzymatic oxidation of all-trans retinal to retinoic acid in rat tissues. *Biochem Cell Biol* 1988; 66: 735-40.

37. Labrecque J, Bhat PV, Lacroix A. Purification and partial characterization of a rat kidney aldehyde dehydrogenase that oxidizes retinal to retinoic acid. *Biochem Cell Biol* 1993; 71: 85-9.

38. Labrecque J, Dumas F, Lacroix A, Bhat PV. A novel isozyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-cis and all-trans retinoic acid. *Biochem J* 1995; 305: 681-4.

39. Bhat PV, Labrecque J, Boutin JM, Lacroix A, Yoshida A. Cloning of a cDNA encoding rat aldehyde dehydrogenase with high activity for retinal oxidation. *Gene* 1995; 166: 303-6.

40. Rout UK, Elkington J SH, Holmes RS. Developmental changes in aldehyde dehydrogenases from mouse tissues. *Mech Ageing Dev* 1987; 40: 103-13.

41. Newcomer ME, Pappas RS, Ong DE. X-ray crystallographic identification of a protein-binding site for both all-trans and 9-cis retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9223-7.

42. Cowan SW, Newcomer ME, Jones TA. Crystallographic studies on a family of cellular lipophilic transport proteins. *J Mol Biol* 1993; 230: 1225-46.

43. Carlberg C, Saurat JH, Siegenthaler G. 9-cis retinoic acid is a natural agonist for the retinoic acid response pathway. *Biochem J* 1993; 295: 343-6.

44. Deigner PS, Law WC, Canada FJ, Rando RR. Membranes as the energy source in the endergonic transformation of vitamin A to 11-cis-retinol. *Science* 1989; 244: 968-71.

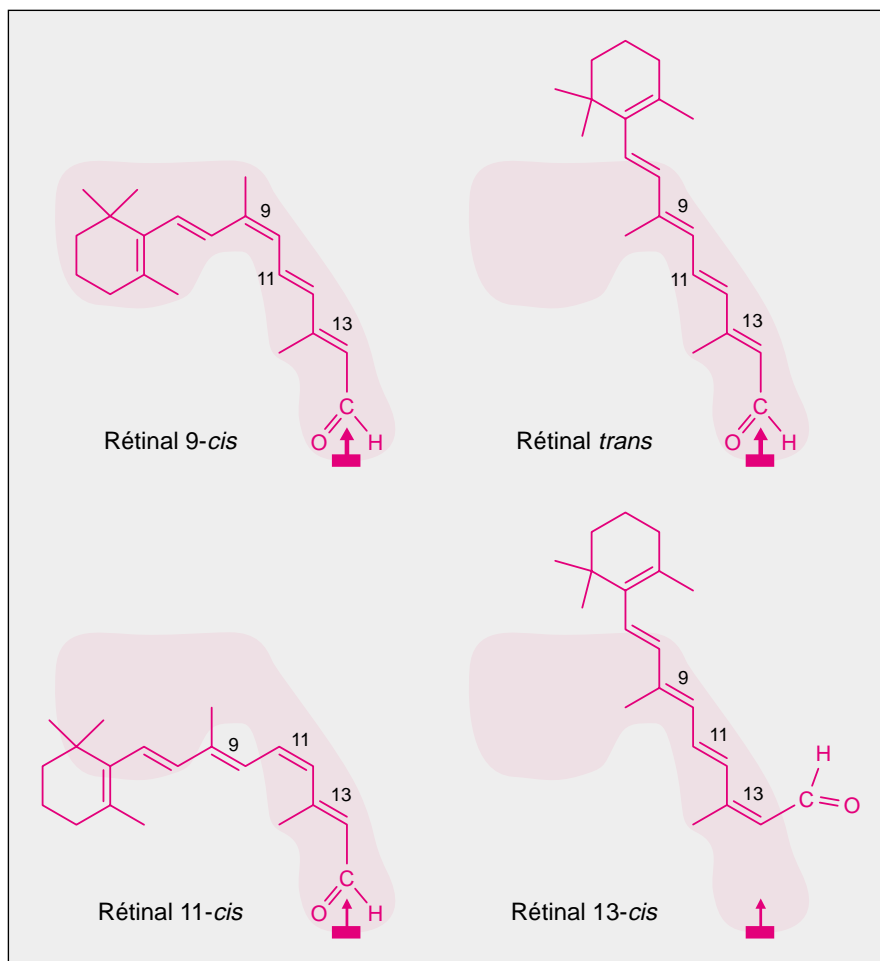


Figure 3. **Représentation schématique de l'interaction entre la RALDH et différents isomères du rétinol.** Les données cinétiques (Tableau I) permettent de proposer le modèle suivant: les molécules de rétinol 9-cis (RAL 9-c) et de rétinol-trans (RAL-t) étant identiques entre les carbones 10 et 15, cette région favoriserait la formation d'un complexe catalytique efficace; le site de reconnaissance de l'enzyme ayant une affinité plus grande pour la chaîne latérale du rétinol 9-c que pour celle du rétinol-t on peut penser que l'angle créé par l'orientation cis situé à la position 9 du rétinol 9-c augmente son affinité pour la RALDH, (K_m de 5,7 μM pour le rétinol 9-c comparé au K_m de 9,8 μM pour le rétinol-t) et que le site de reconnaissance optimal est probablement constitué de deux régions orientées selon un angle correspondant à celui du rétinol 9-c. D'autre part, l'absence de catalyse avec le rétinol 13-c indique que l'orientation trans en position 13 (caractéristique des rétinals-t, 9-c, et 11-c) est essentielle à la catalyse. Une molécule de rétinol 13-c est superposable à une molécule trans à l'exception de l'orientation de la tête polaire, ce qui indique que l'orientation en position 13 serait la seule responsable de l'absence d'activité. La faible activité observée avec le rétinol 11-c pourrait résulter du fait que cette molécule ne possède pas la structure partagée par les rétinals 9-c et t entre les carbones 9 et 15. Le site d'interaction de l'enzyme avec le ligand est figuré par la forme ombrée. Le site d'action de l'enzyme est représenté par le rectangle et la flèche rouges à proximité du radical aldéhyde.

confirmé qu'il s'agit d'une nouvelle isoenzyme d'ALDH de classe I (séquence disponible dans GenBank au n° d'accès L42009). Cet ADNc comprend 2 315 pb qui codent pour 501 acides aminés. Une analyse com-

parative de la séquence en acides aminés déduite de l'ADNc de la RALDH et de celle de ALDH-PB a montré une analogie de 89 %. Malgré cette similitude, la séquence dont celle de RALDH se rapproche le plus est celle

de l'AHD-2 hépatique de souris, avec une analogie de 94%. Notons toutefois qu'AHD-2 n'est pas détectée dans le rein de souris [40]. L'ARNm de la RALDH est synthétisé en quantité dans les reins, les poumons, les testicules, l'intestin, l'estomac et la trachée; en revanche, sa synthèse dans le foie est très faible [39].

Spécificité de la RALDH

Nous avons mis en évidence l'importance fondamentale de la chaîne latérale dans le mécanisme de reconnaissance entre l'enzyme et son substrat. Des études cinétiques réalisées en utilisant comme substrats les stéréoisomères 9-*cis* (9-*c*), 11-*cis* (11-*c*), 13-*cis* (13-*c*) et *trans* (*t*) du rétinol [38] ont clairement démontré qu'il y a une stéréospécificité de la RALDH favorable à l'oxydation des rétinals 9-*c* et *t* (Tableau I). Le rétinol 11-*c* n'est pas catalysé très efficacement et l'oxydation du rétinol 13-*c* n'est que peu ou pas détectable. L'efficacité catalytique de la RALDH est deux fois plus élevée pour le rétinol 9-*c* que pour le rétinol *t*. Cette spécificité a permis d'établir un lien entre l'activité de la RALDH et la synthèse de l'AR 9-*c* qui est le ligand spécifique des RXR.

A l'aide de ces données cinétiques, on a pu déterminer quelles régions de la molécule de rétinol sont importantes pour obtenir une catalyse efficace. La chaîne latérale des molécules de vitamine A possède une structure relativement plane en raison des doubles liaisons conjuguées; elle peut toutefois se « tordre » dans certains cas lorsqu'elle se lie à une protéine spécifique. Par exemple, l'AR *t* adopte une structure en « fer à cheval » lorsqu'il se lie aux RAR [41]; au contraire, la molécule de rétinol *t* conserve sa conformation lorsqu'elle se lie au CRBP-I [42]. Il est tout de même possible de faire une analyse structurale en considérant un modèle simplifié. Ce modèle implique que le site de reconnaissance de la RALDH est le plus compatible avec le rétinol 9-*c*, mais que le rétinol *t* peut s'y insérer efficacement contrairement au rétinol 13-*c* (figure 3).

Inhibition par le rétinol

Les études préalables de notre laboratoire concernant la caractérisation

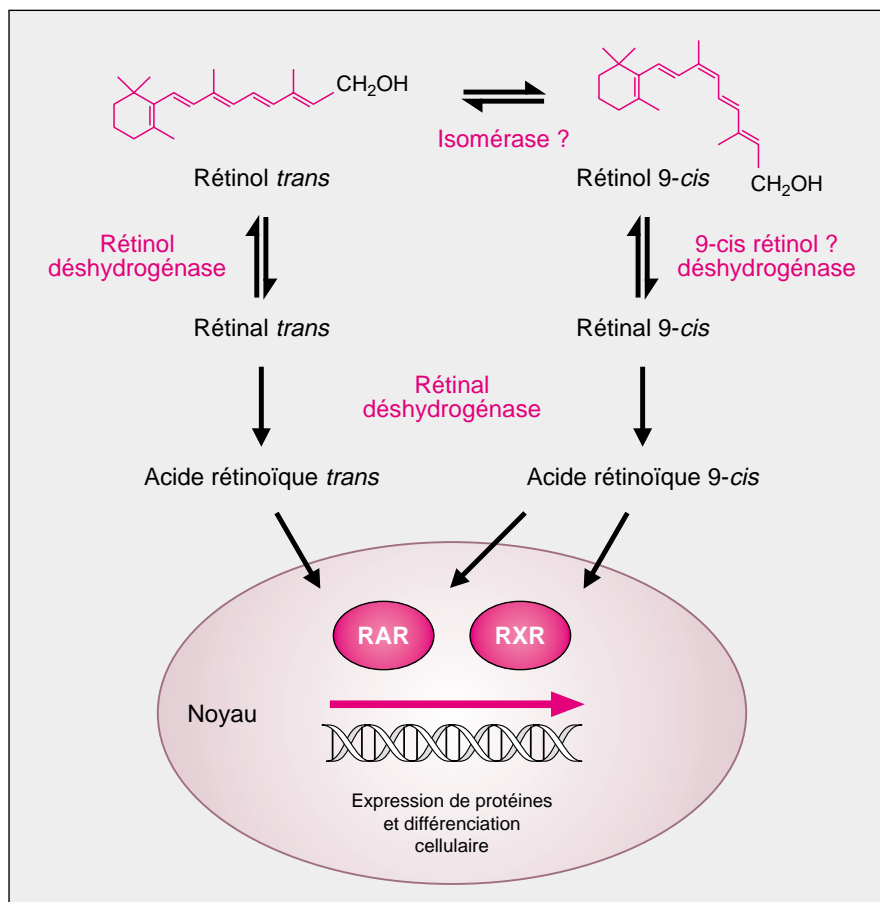


Figure 4. Voie métabolique pouvant mener à la formation de l'acide rétinoïque 9-*cis* à partir du rétinol. Le rétinol *trans* représente la forme majeure d'absorption cellulaire. La voie classique d'oxydation du rétinol *trans* en acide rétinoïque *trans* permet la modulation transcriptionnelle des RAR comme indiqué par la flèche sur l'ADN. Une autre voie métabolique pouvant mener à l'acide rétinoïque 9-*cis* est proposée. L'isomérisation se situerait au niveau du rétinol et le rétinol 9-*cis* ainsi produit serait oxydé pour produire de l'acide rétinoïque 9-*cis*. Certaines observations corroborent l'existence d'une telle voie. Ainsi, le rétinol déshydrogénase (RALDH) présente la plus grande stéréospécificité pour le rétinol 9-*cis*. De plus, du rétinol 9-*cis* est retrouvé en quantité significative dans le rein de rat [38].

de l'activité dans la fraction cytosolique du rein avaient démontré que le rétinol *t* était un inhibiteur puissant de l'oxydation du rétinol *t* [36]. Nous avons démontré que le rétinol *t* inhibe aussi l'activité de l'enzyme purifiée. Cette inhibition est de type compétitif et sa constante d'inhibition (K_i) est de 9,1 m M, une valeur semblable à celle du K_m de l'enzyme pour le rétinol *t* (9,8 m M). D'autre part, la constante d'inhibition obtenue avec le rétinol 9-*c* (5,4 m M) était aussi analogue au K_m de l'enzyme pour le rétinol 9-*c* (5,7 m M). Il semble donc que le rétinol entre directement en compétition avec le rétinol pour la liaison au site de

reconnaissance, ce qui confirme que ce site a une plus grande spécificité vis-à-vis de la chaîne latérale de structure 9-*c*.

Origine de l'acide 9-*cis* rétinoïque

Nous avons démontré que le rétinol 9-*c* est nettement le substrat le plus favorisé par la RALDH. Il est possible que cette spécificité reflète l'existence d'une voie métabolique qui permettrait la conversion du rétinol 9-*c* en AR 9-*c*. Notons que de l'acide rétinoïque 9-*c* est formé lorsque de l'AR *t* est ajouté à des cultures cellulaires pendant plus de 16 heures; cette iso-

mérisation n'est toutefois pas catalysée par voie enzymatique [43]. Eichele *et al.* [17] ont, par ailleurs, démontré que de l'AR 9-*c* marqué pouvait être formé dans des bourgeons de membres embryonnaires des ailes de poulet lorsqu'on y appliquait de l'AR *t* marqué. Il est donc possible que l'isomérisation (*trans* vers 9-*cis*) se produise au niveau de l'AR *in vivo*, mais la nature enzymatique de cette réaction reste à démontrer.

La seule réaction enzymatique d'isomérisation de la vitamine A qui ait été caractérisée (*trans* vers 11-*cis*) se situe dans l'épithélium pigmentaire de l'œil et s'effectue spécifiquement au niveau du rétinol sous forme estérifiée [44]. Une isomérisation de la forme *trans* de la vitamine A en 9-*cis* peut donc très bien se produire au niveau du rétinol. Dans ce contexte, nous avons recherché par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) du rétinol 9-*c* dans des extraits de rein de rat: environ 10 % du rétinol endogène s'est avéré être du rétinol 9-*c* [37].

Conclusions

Plusieurs éléments suggèrent la présence d'une voie métabolique qui permet la formation de l'AR 9-*c* dans le rein. (1) Le rein et le foie sont deux organes produisant le RXRα en grande quantité [15]. (2) L'AR 9-*c* endogène est présent dans le rein de souris [10]. (3) Nous avons démontré la présence de rétinol 9-*c* endogène dans le rein de rat [37]. (4) La RALDH oxyde spécifiquement le rétinol 9-*c* en AR 9-*c* *in vitro*. Nous proposons donc que le rétinol *t* serait, en premier lieu, isomérisé en rétinol 9-*c* puis transformé en AR 9-*c* selon un processus d'oxydation impliquant la

RALDH (figure 4).

L'activité de la RALDH dans d'autres tissus permet de penser à un rôle plus général de cette enzyme au niveau du métabolisme des rétinoïdes dans les tissus cibles. La double spécificité de la RALDH pour les rétinaux *t* et 9-*c* indique que cette enzyme est impliquée dans les systèmes de réponses spécifiques des RAR et des RXR. D'autre part, des éléments importants dans la transduction du signal pourraient être les divers récepteurs orphelins pouvant participer à la réponse à l'AR 9-*c*. Par exemple, le

LXR synthétisé dans le rein pourrait relayer une réponse spécifique de l'AR 9-*c* dans cet organe.

Les voies d'activation de la vitamine A, la réponse moléculaire et les effets physiologiques précis de nouveaux métabolites actifs alimentent toujours la recherche sur cette vitamine qui est loin d'avoir révélé tous ses secrets, après plus de 70 ans d'études ■

TIRÉS À PART

A. Lacroix.

Summary

Regulation of synthesis of all-*trans* and 9-*cis* retinoic acids: role of a new retinal dehydrogenase

Vitamin A is essential for the growth and differentiation of numerous tissues in the organism. This vitamin is absorbed from its nutritional sources and is delivered to the liver where it is stored. The liver secretes retinol which is transported to target tissues where it is oxidized into retinoic acid (RA), a major metabolite of this vitamin. Retinoic acid is obtained from retinol *via* two oxidative steps: (1) a retinol dehydrogenase activity catalyses the oxidation of retinol (ROL) to retinal (RAL); (2) a retinal dehydrogenase catalyses the oxidation of RAL to RA. Different stereoisomers of retinoic acid are found in the organism. Classically, it was believed that *trans*-retinoic acid (*t*RA) was the major metabolite exerting tissue effects of this vitamin. This metabolite activates the RAR, one of the two identified families of retinoic acid nuclear receptors. However the 9-*cis* retinoic acid (9-*c* RA), a newly found active metabolite, can activate the RARs and the RXRs, the two known retinoic receptors families. We have studied the metabolism of vitamin A in rat kidney, particularly the retinal dehydrogenase activity. We purified, characterized and cloned the cDNA of this enzyme from rat kidney. It is a new isozyme of aldehyde dehydrogenase which we named RALDH. Kinetic studies demonstrated the specificity of this enzyme particularly for the retinaldehydes 9-*cis* and *trans*, with a catalytic advantage of two times for 9-*cis* retinal. This stereospecificity, in conjunction with the presence of endogenous 9-*cis* retinol in rat kidney, indicates the possibility of a new metabolic pathway leading to 9-*cis* retinoic acid. It is proposed that *trans*-retinol would isomerize to 9-*cis* retinol, and then be oxidized successively to 9-*cis* retinal and 9-*cis* retinoic acid.

LE COMITÉ CONSULTATIF NATIONAL D'ÉTHIQUE POUR LES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

a été créé en 1983 par le président de la République et est désormais inscrit dans la loi. Il rassemble une quarantaine de membres venant d'horizons très variés, qui réfléchissent aux dangers que les avancées de la science peuvent susciter. Organisme purement consultatif, sa mission est de « donner des avis sur les problèmes éthiques soulevés par les progrès de la connaissance dans les domaines de la biologie, de la médecine et de la santé et de publier des recommandations sur ces sujets ».

- Le Comité souhaitant participer à l'information du public et de toutes les professions intéressées publie, chaque trimestre, « **Les Cahiers du Comité consultatif national d'éthique** ».
- Chaque numéro des « **Cahiers du Comité** » est centré sur un thème ayant fait l'objet d'un avis récent du Comité. Il diffuse le texte intégral de l'avis accompagné de son rapport. Il présente une bibliographie, une étude de la situation à l'étranger et de libres propos d'intervenants extérieurs au Comité. Cette présentation des travaux du Comité faisant place à des données internationales, à de libres opinions permet d'avoir une appréciation plus globale des problèmes abordés.

L'abonnement aux « Cahiers du Comité consultatif national d'éthique » (4 numéros par an) est de 185 F.

Pour tout renseignement, s'adresser à madame Anne Bernard au Comité consultatif national d'éthique pour les sciences de la vie et de la santé, 71, rue Saint-Dominique, 75007 Paris. Tél. : 01 44 42 48 52/53 - Fax : 01 44 42 48 48.