

## Coactivateurs et corépresseurs des récepteurs nucléaires

*Après le temps des interactions génétiques (phénomènes d'épistasie, d'empreinte, de variéation, etc.), voici celui des interactions protéiques, d'ailleurs éventuellement à l'origine des premières. Il apparaît que de très nombreuses protéines n'accomplissent leurs tâches que sous la forme d'assemblages supramoléculaires dont les partenaires peuvent être identifiés par des méthodes biochimiques ou génétiques (technique des doubles hybrides dans la levure). Ainsi, la fonction des différents membres de la superfamille des récepteurs nucléaires ne peut s'expliquer que par des interactions multiples avec des molécules homologues (formation d'homo et d'hétérodimères) ou hétérologues. Celles-ci peuvent être des modulateurs, des activateurs ou des inhibiteurs, ou encore des cibles de l'action des récepteurs nucléaires tels que, entre autres, NFκB.*

## A la recherche de modulateurs de l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires font partie d'une superfamille de facteurs transcriptionnels qui regroupe en particulier les récepteurs des hormones stéroïdes et thyroïdiennes, de la vitamine D3 et des rétinoïdes [1, 2]. Une fois activés après liaison du ligand, ces récepteurs se lient à des séquences d'ADN appelées éléments de réponse et contrôlent l'expression de gènes spécifiques grâce à deux fonctions activatrices de la transcription (AF) (figure 1). La fonction AF1, située dans la région amino-terminale, est constitutive, alors que AF2, située dans la région carboxy-terminale (également impliquée dans la fixation de l'hormone), n'est active qu'après liaison du ligand. Cette fonction AF2 requiert une courte région pouvant adopter une structure d'hélice  $\alpha$  amphipathique conservée entre les différents récepteurs (figure 1A). La mutation des résidus conservés abolit totalement l'activité transcriptionnelle du récepteur [3]. Plus récemment, le groupe de P. Chambon à Strasbourg, a identifié une autre région (AF2a) dans le domaine de liaison de l'hormone du récepteur aux œstrogènes qui semble responsable de son activité transcriptionnelle chez la levure [4]. Cependant, si la structure des domaines activateurs des récepteurs nucléaires commence à être dévoilée, on connaît peu de choses du mécanisme par lequel ils modulent le niveau de transcription des gènes cibles. Il est toutefois admis que la transmission du signal d'activation implique des contacts directs ou indi-

rects entre protéines [5] (figure 1B). Différents travaux ont révélé une interaction directe de plusieurs récepteurs nucléaires avec des composants de la machinerie transcriptionnelle de base tels que la TBP (*TATA-box-binding protein*) ou le facteur TFIIB [6, 7]. D'autres études ont démontré l'existence de facteurs intermédiaires (appelés coactivateurs, médiateurs ou adaptateurs) nécessaires à la transmission de l'effet activateur des récepteurs nucléaires [8]. En utilisant différentes approches, plusieurs ADN complémentaires (ADNc) ont récemment été isolés qui codent pour des protéines capables d'interagir directement avec les fonctions activatrices de ces récepteurs (Tableau 1). Cet article a pour but de faire la synthèse des résultats obtenus sur ces coactivateurs transcriptionnels potentiels.

### TAFII30

TAFII30 est l'un des facteurs (TAF pour *TBP-associated factors*) qui sont associés à la TBP pour former le complexe TFIID [5]. Des expériences de transcription *in vitro* ont dévoilé l'importance des TAF pour obtenir une stimulation transcriptionnelle efficace par différents facteurs activateurs dont le récepteur des œstrogènes (ER). La séquence en acides aminés de TAFII30, obtenue après purification et microséquençage de la protéine, a permis de préparer une sonde d'ADN spécifique utilisée pour isoler l'ADNc correspondant [9]. L'analyse de la séquence de

TAFII30 ainsi obtenue n'a pas révélé d'analogie significative avec des motifs protéiques connus.

*In vitro*, TAFII30 interagit directement, non seulement avec la TBP, mais aussi avec TAFII250, bien que la liaison soit de plus faible intensité. L'interaction de TAFII30 avec le récepteur des œstrogènes a été analysée par des expériences de précipitation dites de « GST-pull down » dans lesquelles différents mutants du domaine AF2 du ER fusionnés à la glutathion-S-transférase (GST) sont utilisés pour précipiter TAFII30 radiomarqué. Les résultats révèlent que l'association implique le domaine AF2a (situé dans la partie aminotermine du domaine de liaison de l'hormone [5]) et n'est pas modulée par la présence de ligand (œstradiol ou antioœstrogènes).

L'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-TAFII30 suggère que ce facteur pourrait jouer un rôle dans le relais de l'activité transcriptionnelle du ER, tout au moins *in vitro*. En effet, dans des expériences de transcription acellulaire, la préincubation des extraits cellulaires avec l'anticorps réduit spécifiquement d'environ trois fois l'activité transcriptionnelle d'une protéine chimère contenant le domaine de liaison de l'hormone du ER [9].

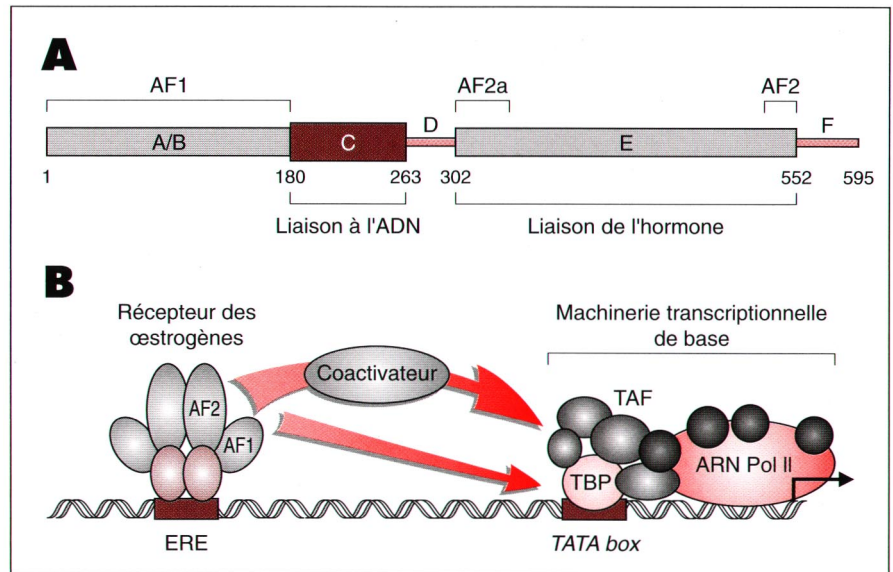


Figure 1. **A. Représentation de la structure du récepteur des œstrogènes (ER) humain.** Les différents domaines de la molécule sont représentés par des boîtes d'épaisseur variable (les nombres au début de chaque domaine indiquent les coordonnées en acides aminés). La subdivision en six domaines A-F est fondée sur le pourcentage de conservation entre les différents récepteurs. La position des fonctions activatrices de la transcription (AF, activating function) et des domaines de liaison à l'ADN et à l'hormone sont également reportées. **B. Schéma des interactions protéiques pouvant rendre compte de l'activation de la transcription par le ER.** Après liaison de l'hormone et dimérisation, le ER se lie à l'ADN au niveau d'éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) et stimule la transcription de gènes cibles en interagissant directement ou indirectement (via des facteurs intermédiaires ou coactivateurs) avec la machinerie transcriptionnelle de base qui comprend l'ARN polymérase II (ARN Pol II) et des facteurs généraux dont TFIID qui est formé de la TBP (TATA box-binding protein) et des TAF (TBP-associated factor) (en gris clair).

## TRIP1

En utilisant le système du double hybride dans la levure [10], Lee *et al.* (Boston, MA, USA) ont isolé plusieurs clones d'ADNc codant pour des protéines humaines capables d'interagir avec le récepteur de l'hormone thyroïdienne (TR) [11]. Un de ces clones, appelé TRIP1 (*thyroid receptor interacting protein*), présente des analogies significatives avec SUG1, un médiateur transcriptionnel de levure. Tous deux font partie d'une superfamille de molécules qui contiennent un domaine de 200 acides aminés associé à une activité ATPase.

Dans le système du double hybride, ainsi que lors des expériences de liaison *in vitro*, TRIP1 interagit avec TR

et avec le récepteur du 9-*cis* acide rétinoïque (RXR) mais pas avec le récepteur des glucocorticoïdes. De plus, il semble qu'il existe deux domaines d'interaction de TRIP1 sur TR, un situé dans la partie aminotermine du récepteur et l'autre dans le domaine de liaison de l'hormone. Cependant, *in vitro* et dans le contexte du récepteur entier, l'interaction de TRIP1 ne semble pas affectée par le ligand.

D'autre part, le rôle de TRIP1 dans l'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires a été abordé par des expériences de transfection transitoire visant à étudier l'effet de la surexpression de TRIP1 sur l'activité transcriptionnelle de TR et RXR.

Le seul effet obtenu a été une répression spécifique de la transactivation pouvant refléter, soit la séquestration d'un facteur cible en aval, soit la saturation des sites d'interaction à la fois sur le récepteur et sur le facteur cible.

## RIP140

En 1994, les groupes de Parker (Londres, Grande-Bretagne) [12] et de Brown (Boston, MA, USA) [13] décrivaient indépendamment deux protéines appelées RIP140 et RIP160 (pour *receptor interacting protein* ou ERAP pour *estrogen receptor-associated protein*) capables d'interagir *in vitro*

Tableau I  
RÉCAPITULATIF DES PROTÉINES INTERAGISSANT  
AVEC LES FONCTIONS ACTIVATRICES DE LA TRANSCRIPTION DES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES

Dénomination	Origine	Taille*	Structure	Site d'interaction	Activité	Référence
TAFII30	Humaine	203	Pas de domaine caractéristique	Domaine AF2a de ER	<i>In vitro</i> , l'anticorps anti-TAFII30 inhibe l'activité AF2 de ER	9
TRIP1	Humaine	406	Homologue de SUG1 Domaine ATPase	Domaines AF1 et AF2 de TR et RXR $\alpha$ Pas d'interaction avec GR	Expression de TRIP1 réprime l'activité de TR et RXR $\alpha$	11
RIP140	Humaine	1158	Riche en sérine	Domaine AF2 de ER	Modulation de l'activité de ER (effet biphasique)	14
TIF1	Murine	1017	<i>RING finger</i> <i>Bromodomain</i> Domaine <i>coiled-coil</i>	Domaine AF2 de RXR $\alpha$ , VDR PR, ER, RAR $\alpha$	Expression de TIF1 réprime RXR $\alpha$ , RAR et ER	15
SPT6	Levure	1451	Domaine acide en NH2-terminal	Domaine de liaison de l'hormone de ER	SPT6 stimule l'activité de ER	17

\* Donnée en nombre d'acides aminés.

Abréviations pour les récepteurs: ER (œstrogènes), TR (hormones thyroïdiennes), PR (progestérone), GR (glucocorticoïdes), VDR (vitamine D3), RXR (acide 9-cis rétinolique), RAR (acide rétinolique).

de manière hormono-dépendante avec le domaine AF2 du ER. Cette interaction nécessite un récepteur fonctionnel du point de vue transcriptionnel puisqu'elle est abolie lorsque la fonction AF2 est inactivée par des mutations ponctuelles ou en présence d'antiœstrogènes.

En utilisant une sonde protéique radiomarquée contenant le domaine de liaison à l'hormone du ER fusionné à la GST, l'ADNc correspondant à RIP140 a récemment été cloné [14]. RIP140 est une protéine nucléaire très hydrophile et riche en sérines qui ne présente pas de domaines caractéristiques, ni d'analogies avec les séquences provenant des banques de données.

RIP140 interagit également avec le récepteur dans des cellules intactes et est capable de moduler son activité transcriptionnelle. En effet, la transfection transitoire de quantités croissantes de vecteur d'expression pour RIP140 produit un effet biphasique sur la transactivation par le ER. A faibles concentrations, RIP140 aug-

mente de deux fois le niveau de transcription du gène témoin et la réprime à fortes doses, probablement à cause de la séquestration d'un facteur limitant qui n'est vraisemblablement pas la TBP ou TFIIB puisque, *in vitro*, RIP140 n'interagit pas avec ces facteurs de manière stable.

#### TIF1

TIF1 (*transcription intermediary factor 1*) est une protéine murine dont l'ADNc a été isolé par le groupe de Chambon [15] sur la base de sa capacité de stimuler, de manière hormono-dépendante, l'activité transcriptionnelle de la fonction AF2 du récepteur RXR $\gamma$  chez la levure.

La protéine TIF1 contient trois types de domaines remarquables: des séquences riches en résidus cystéines et histidines (dont un domaine *RING finger*), un domaine *coiled-coil* et une région appelée *bromodomain* en carboxy-terminal de la molécule. Le site d'interaction avec le récepteur, qui

ne semble pas impliquer ces domaines connus, a été localisé dans la région centrale de TIF1.

Dans le système du double hybride ainsi que *in vitro*, TIF1 interagit aussi avec d'autres récepteurs nucléaires (RXR $\alpha$ , RAR $\alpha$ , VDR, PR et ER) de manière hormono-dépendante. L'interaction avec RXR $\gamma$  ou RAR $\alpha$  est abolie par des mutations dans la région conservée de AF2 qui affectent son activité transcriptionnelle, et la liaison de TIF1 au récepteur des œstrogènes est bloquée en présence d'antiœstrogènes qui inhibent également l'activité AF2.

Par cotransfection transitoire de vecteurs d'expression pour TIF1 et RXR $\alpha$  dans des cellules COS-1, une répression spécifique de la transactivation de RXR $\alpha$  a pu être observée. Cette interférence qui existe également avec le ER résulterait encore une fois de la séquestration d'un facteur cible de TIF1. Comme pour RIP140, ce facteur présent en quantité limitante ne semble pas être la TBP, ni TFIIB.

## SPT6

SPT6 fait partie d'une classe de protéines, identifiées génétiquement chez la levure, qui contrôlent la transcription en affectant la structure chromatinienne [16]. Baniahmad *et al.* (Houston, Texas, USA) [17] ont montré que dans une souche de levure où le gène SPT6 est délété, l'activité du ER est diminuée par rapport à une souche sauvage. De même, la surexpression de SPT6 dans la levure ou dans les cellules de mammifère stimule d'environ trois fois la transactivation par le ER. Cet effet nécessite le domaine de liaison à l'hormone du récepteur et des expériences de précipitation par la GST confirment que SPT6 interagit *in vitro* avec cette région du ER.

## Conclusions

A ce jour et sans tenir compte des composants de la machinerie de base, cinq protéines (dont trois seulement d'origine humaine) présentent la capacité d'interagir avec les domaines activateurs de la transcription de récepteurs nucléaires et il est vraisemblable que d'autres facteurs viendront rapidement s'ajouter à cette liste de coactivateurs potentiels. Dans certains cas, il reste cependant à démontrer que l'interaction, observée *in vitro* ou dans la levure, existe aussi dans les cellules animales intactes.

Pour chacun des candidats, de nombreux arguments renforcent l'idée qu'ils sont des médiateurs de la transactivation des récepteurs nucléaires, mais la preuve formelle est difficile à obtenir pour plusieurs raisons. D'une part, ces facteurs présentant une expression quasi ubiquitaire, il n'est pas aisé de disposer de systèmes cellulaires dépourvus d'activité endogène qui permettraient d'obtenir des effets plus nets. D'autre part, dans certains cas, il est probable que le facteur associé au récepteur est complexé à d'autres protéines qu'il faudrait aussi surexprimer pour obtenir une stimulation efficace de la transcription. Enfin, il est possible que la nature du coactivateur varie selon le promoteur considéré (structure de

l'élément de réponse, nature des autres facteurs transcriptionnels pouvant agir en synergie avec le récepteur...). Les recherches vont donc continuer, avec comme objectifs, non seulement, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de régulation de l'expression génétique, mais aussi, des réponses à des problèmes de santé tels que l'insensibilité hormonale ou la résistance aux thérapies endocriniennes (résistance des cancers du sein aux antiœstrogènes par exemple) ■

### \* GLOSSAIRE \*

**AF**: fonction activatrice (activating function)

**TBP**: protéine liant la boîte TATA (TATA box-binding protein)

**TAF**: facteur associé à la TBP (TBP-associated factor)

**GST**: glutathion-S-transférase

**ER**: récepteur des œstrogènes (estrogen receptor)

**TR**: récepteur des hormones thyroïdiennes (thyroid hormone receptor)

**RAR**: récepteur de l'acide rétinoïque

**RXR**: récepteur de l'acide 9-cis rétinoïque

**VDR**: récepteur de la vitamine D (vitamin D receptor)

**PR**: récepteur de la progestérone (progesterone receptor)

**hélice amphipatique**: hélice  $\alpha$  présentant une face hydrophile (résidus chargés) et une face hydrophobe

**bromodomain**: motif potentiellement impliqué dans des interactions protéine-protéine (consensus:  $FX_{11-13}YX_2IX_{17}YX_{15}NX_3YN$ )

**RING finger**: motif protéique liant  $Zn^{2+}$  du type doigt de zinc (consensus:  $CX_2CX_{9,27}CXHX_2CX_2CX_{6-17}CX_2C$ )

**coiled-coil**: structure formée de plusieurs hélices  $\alpha$  amphipatiques parallèles repliées et emboîtées l'une dans l'autre

## RÉFÉRENCES

1. Parker MG. Steroid and related receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5:499-504.
2. Lavau C, Jansen J, Weis K, Lamond A, Dejean A. Leucémie aiguë promyélocytaire et acide rétinoïque : le paradoxe. *médecine/sciences* 1994; 10 : 817-24.
3. Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J* 1992; 11 : 1025-33.
4. Pierrat B, Heery DM, Chambon P, Losson R. A highly conserved region in the hormone binding domain of the human estrogen receptor functions as an efficient transactivation domain in yeast. *Gene* 1994; 143: 193-200.
5. Tanese N, Tjian R. Coactivators and TAFs: a new class of eukaryotic transcription factors that connect activators to the basal machinery. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 1993; 58: 179-85.
6. Ing NH, Beekman JM, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J Biol Chem* 1992; 267: 17617-23.
7. Blanco JCG, Wang I, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW, Jurutka PW, Haussler MR, Ozato K. Transcription factor TFIIB and the vitamin D receptor cooperatively activate ligand-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1535-9.
8. Tasset D, Tora L, Fromental C, Scheer E, Chambon P. Distinct classes of transcriptional activating domains function by different mechanisms. *Cell* 1990; 62: 1177-87.
9. Jacq X, Brou C, Lutz Y, Davidson I, Chambon P, Tora L. Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell* 1994; 79: 107-17.
10. Plessis A, Camonis JH. Le système double hybride, mode d'emploi. *médecine/sciences* 1994; 10: R1-R9.
11. Lee JW, Ryan F, Swaffield JC, Johnston SA, Moore DD. Interaction of thyroid hormone receptor with a conserved transcriptional mediator. *Nature* 1995; 374: 91-4.
12. Cavaillès V, Dauvois S, Danielian PS, Parker MG. Interaction of proteins with transcriptionally active estrogen receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10009-13.
13. Halachmi S, Marden E, Martin G, MacKay H, Abbondanza C, Brown M. Estrogen receptor-associated proteins - possible mediators of hormone-induced transcription. *Science* 1994; 264: 1455-8.