

Thèse présentée par

Aurélie ROSSIN

Pour obtenir le titre de

Docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg

Sciences du Vivant

Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**Etude des mécanismes d'induction de la différenciation et de l'apoptose par
les rétinoides et les rexinoïdes dans les cellules de leucémie myéloïde aiguë
(AML).**

Soutenue publiquement le 23 juin 2005

JURY :

Directeur de Thèse : **Dr Hinrich GRONEMEYER**, IGBMC, Illkirch

Rapporteur interne : **Dr Catherine TOMASETTO**, IGBMC, Illkirch

Rapporteur externe : **Pr Pier Giuseppe PELICCI**, EIO, Milan

Rapporteur externe : **Dr Patrick MEHLEN**, Centre Léon Bérard, Lyon

Examineur : **Pr Johan AUWERX**, IGBMC, Illkirch

Examineur : **Pr Lucia ALTUCCI**, Université de Naples, Naples

Sommaire

Liste des figures	1
Liste des abréviations	3
Avant-propos	5
Introduction	7
I. La vitamine A et ses dérivés « les rétinoïdes ».	7
1. La vitamine A est nécessaire à la vie.	7
2. Les rétinoïdes : dérivés actifs de la vitamine A.	7
3. Vitamine A et cancers : les premiers liens.	7
II. Les récepteurs de l'acide rétinoïque	8
1. Clonage des récepteurs de l'acide rétinoïque.	8
2. Description des récepteurs aux rétinoïdes.	9
3. Focus sur RXR.	10
4. Signalisation via les récepteurs de l'acide rétinoïque.	12
4.1. Régulation de la transcription par l'hétérodimère RXR-RAR.	13
4.2. Phosphorylation des récepteurs nucléaires.	16
4.3. Interférence avec d'autres voies de signalisation	18
5. Effet non génomiques	19
III. Rétinoïdes et cancers	21
1. la Leucémie Promyeloocytaire aiguë	21
1.1. Description	21
1.2. Potentiel oncogénique de la protéine de fusion PML-RAR α	22
1.2.1. RAR α dans la différenciation neutrophile normale	22
1.2.2. PML et ses fonctions biologiques normales	23
1.2.3. L'expression de PML-RAR α seule est insuffisante pour induire le phénotype APL	24
1.2.4. Expression de PML-RAR α et conséquences moléculaires	26
1.2.5. Cas particulier de PLZF-RAR α	27
1.3. Mécanismes de la réponse à l'AR et traitements alternatifs	27
2. Implication de RAR β dans le développement des cancers	30
2.1. Rôle suppresseur de tumeur	30
2.2. Mécanismes épigénétiques de la répression	31
3. Rétinoïdes et thérapie des cancers	32
3.1. Les rétinoïdes en thérapie	32
3.2. Les rétinoïdes et la prévention des cancers	33
3.3. Amélioration des traitements	34

IV. Effets anti-tumoraux des rétinoïdes : implication sur la prolifération, différenciation et apoptose des cellules	36
1. Arrêt de la prolifération et différenciation induits par les rétinoïdes	36
2. L'apoptose : modulation par les rétinoïdes	39
2.1. Description	39
2.2. Vue générale de l'apoptose : deux voies apoptotiques principales et de nombreux acteurs	40
2.2.1. Les caspases : exécuteurs de l'apoptose	40
2.2.2. Deux voies apoptotiques principales	40
2.2.3. Les verrous	41
2.2.4. Modulation de l'apoptose par des facteurs de transcription	42
2.3. L'apoptose induite par TRAIL	43
2.4. La voie apoptotique mitochondriale	45
- Hypothèse de PTP	
- La famille Bcl-2	
- Oxyde nitrique et dérivés d'oxygènes actifs	
2.4.2. Relargage des protéines pro-apoptotiques	49
- Voie dépendante des caspases	
- Voie indépendante des caspases	
2.5. Variation du modèle d'activation de l'apoptose	51
2.6. Quelles sont les cibles de l'AR parmi ces voies apoptotiques	53
3. Les rétinoïdes atypiques et l'induction de l'apoptose	54
4. Activités anti-tumorales des rétinoïdes	56
4.1. Effet synergique des rétinoïdes	56
4.2. Voies dépendantes des rétinoïdes	57

Résultats **60**

 But du travail 60
 Etude de l'apoptose induite par l'AR dans les cellules de leucémie promyélocytaire aiguë (APL)

 Etude de la différenciation et apoptose induite par les rétinoïdes dans les cellules myéloïdes PLB 985. Utilisation de mutagénèse par insertion rétrovirale

 Etude de la synergie entre un agoniste de la Protéine Kinase A (PKA) et un rétinoïde dans les cellules de Leucémie Myéloïde Aiguë (AML) résistantes aux rétinoïdes. Conséquences sur la différenciation et apoptose des cellules

 Etude de l'apoptose induite par les rétinoïdes dans les cellules AML

Discussion **71**

1. Différentes voies d'induction de l'apoptose des cellules APL en ciblant les récepteurs à L'AR	71
2. Cibler les récepteurs à l'AR dans les cellules AML	72
3. Rôle du récepteur RXR dans la différenciation et l'apoptose des cellules AML	75
3.1. Potentialisation de l'activation de l'hétérodimère RXR-RAR α	75
3.2. Désubordination de RXR par la PKA	77
3.3. Activation d'un hétérodimère permissif	78
4. Cibler les cellules AML par la différenciation ou l'apoptose	80
5. Rétinoïdes et différenciation : induction de programme de survie	82
5.1. Induction de programmes de survie	82
5.2. RAM : modulateur du signal rétinolde	84
6. Les rétinolde et l'apoptose	85
6.1. La connexion TRAIL-rétinolde	85
6.2. L'apoptose induite par les rétinolde	88
7. Implications thérapeutiques	92
Conclusion et perspectives	94
Références bibliographiques	95
Annexes	

Liste des figures

- Figure 1** : Les principaux membres de la superfamille des récepteurs nucléaires.
- Figure 2** : Illustration schématique de l'organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs nucléaires (Gronemeyer et al., 2004).
- Figure 3** : Mécanisme d'action en 3 étapes des récepteurs aux rétinoïdes (Bastien and Rochette-Egly, 2004).
- Figure 4** : Comparaison de la structure du domaine de liaison de l'ADN (LBD) de RXR α avec ou sans ligand (AR 9-cis) (Gronemeyer et al., 2004).
- Figure 5** : Modèle du fonctionnement de l'hétérodimère RXR-RAR en présence ou non d'agoniste : subordination et synergie (Clarke et al., 2004a).
- Figure 6** : Voies de signalisation et conséquences sur la transactivation médiée par les récepteurs nucléaires (Bastien and Rochette-Egly, 2004; Rochette-Egly, 2003).
- Figure 7** : Les récepteurs à l'acide rétinoïque sont des phosphoprotéines (Rochette-Egly, 2003).
- Figure 8** : La transrépression AP-1 (Altucci and Gronemeyer, 2001).
- Figure 9** : Représentation schématique des étapes de différenciation monocytaire et myélocytaire.
- Figure 10** : RAR α et les différentes protéines de fusion X-RAR α responsables de la leucémie APL (Mistry et al., 2003).
- Figure 11** : Modèle de la répression transcriptionnelle par PML-RAR α . (Villa et al., 2004).
- Figure 12** : Bases moléculaires de la réponse à l'AR dans les cellules APL (Altucci and Gronemeyer, 2001).
- Figure 13** : Représentation schématique des voies de dégradation de PML-RAR α (Zhu et al., 2001).
- Figure 14** : Machinerie régulant le cycle cellulaire. (Lundberg and Weinberg, 1999).
- Figure 15** : Les principales caspases chez les mammifères (Riedl and Shi, 2004).
- Figure 16** : Deux voies principales d'activation de l'apoptose.
- Figure 17** : Les super-familles du TNF et des récepteurs au TNF (Ashkenazi, 2002).
- Figure 18** : Activation de la voie mitochondriale apoptotique (Mattson and Kroemer, 2003).
- Figure 19** : Les membres de la famille de Bcl-2 (Scorrano and Korsmeyer, 2003).
- Figure 20** : Rôle des différents membres de la famille de bcl-2 dans l'apoptose (Chan and Yu, 2004)

Figure 21: Régulation de la concentration d'AMPc intracellulaire.

Figure 22 : Les différentes implications de RXR dans la différenciation et/ou l'apoptose induite par les rétinoïdes et les rexinoïdes dans les cellules AML.

Figure 23: Les rétinoïdes et la voie de TRAIL (Altucci and Gronemeyer, 2001).

Figure 24 : L'apoptose induite par les rexinoïdes : schéma final.

Liste des abréviations

8CPT-cAMP	8-(4-chlorophenylthio) adénosine 3'5'cyclic monophosphate
AIF	apoptosis inducing factor
AML	acute myeloid leukemia
ANT	adenine nucleotide translocator
AP-1	activating protein 1
APL	acute promyelocytic leukemia
AR	acide rétinoïque
BH	Bcl-2 homology
C/EBP	CAAT/enhancer binding protein
CAD	caspase-activated DNase
CAMP	cyclic AMP
CARD	caspase recrutement domain
CBP	CREB binding protein
CDK	cyclin dependent kinase
CRABP	cellular retinoic acid binding protein
DBD	DNA binding domain
DCC	deleted in colorectal cancer
DcR1,2	decoy receptor 1, 2
DD	death domain
DED	death effector domain
DISC	death inducing signalling complex
Dnmt	DNA methyl transferase
DR	direct repeat
DR4, 5	death receptor 4, 5
EGF	epidermal growth factor
ER	estrogen receptor
ERK	extracellular signal regulated kinase
FADD	fas adaptator-containing death domain
FLIP	FLICE-like inhibitory protein
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
GR	glucocorticoid receptor
HAT	histone acetyl transferase
HDAC	histone deacetylase
IAP	inhibitor of apoptosis
ICAD	inhibitor of CAD
IGF	insulin-like growth factor
IGFBP3	IGF binding protein 3
IRF-1	interferon response factor 1
IRF-E	interferon response factor element
ISRE	interferon stimulated response element
JNK	c-jun N-terminal kinase
LBD	ligand binding domain
LXR	liver X receptor
MAPK	mitogen activated protein kinase
MEF2	myocyte enhancer factor 2
MEK	MAP kinase ERK kinase

NcoR	nuclear receptor corepressor
NF-kB	nuclear factor kappa B
NGF	nerve growth factor
NK	natural killer
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
OPG	osteoprotegerin
PARP	poly (ADP ribose) polymerase
PI3K	phosphatidyl inositol 3 kinase
PID	p53-induced death domain
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PLZF	promyelocytic leukemia zinc finger
PML	promyelocytic leukemia
PPAR	peroxysome proliferator activated receptor
PPRE	peroxysome proliferator activated receptor response element
PR	progesterone receptor
PTP	permeability transition pore
RAIDD	receptor-interacting protein (RIP)-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with a death domain
RAM	retinoic acid modulator
RAR	Retinoic Acid Receptor
RARE	retinoic acid response element
RIP	receptor interacting protein
RN	récepteur nucléaire
ROS	reactive oxygen species
RXR	Retinoid X Receptor
SMCC	srb mediator protein containing complex
SMRT	silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor
TFIIH	transcription factor IIH
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TNFR	TNF receptor
TR	thyroid receptor
TR3	testis receptor 3
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing factor
TRAF	TNFR-associated factor
TRADD	TNFR-associated death domain
VAD	vitamin A deficiency
VDAC	voltage-dependant anion channel
VDR	vitamin D3 receptor

Avant-propos

Les organismes multicellulaires ont besoin d'une communication inter et intracellulaire finement régulée afin de garantir une organisation correcte des différents tissus et organes pendant le processus d'embryogenèse, et de maintenir les différentes fonctions cellulaires au cours de la vie adulte. Ces organismes ont donc développé des systèmes complexes afin d'intégrer différentes informations et permettre aux cellules de répondre de manière appropriée. Certains récepteurs membranaires sont capables d'activer des cascades intracellulaires de kinase en réponse à des facteurs de croissance ou des neurotransmetteurs et de transmettre ainsi le signal. Par contre, des petites molécules lipophiles telles que les hormones stéroïdes ou certaines vitamines synthétisées par des tissus de l'organisme ou absorbées par l'alimentation peuvent traverser la membrane des cellules cibles et se lier spécifiquement aux protéines de la superfamille des récepteurs nucléaires.

Les récepteurs nucléaires, suite à leur activation par leurs ligands et à l'intégration d'autres signaux extracellulaires se lient à l'ADN et régulent l'expression d'un grand nombre de gènes. Cette étape d'activation de la transcription nécessite une régulation très fine afin de permettre l'expression des protéines dans la cellule adéquate et au moment opportun. Les récepteurs à l'acide rétinoïque appartiennent à cette famille des récepteurs nucléaires et jouent un rôle fondamental au cours de l'embryogénèse et du développement adulte de part leur capacité à induire différents programmes de gènes influant sur la croissance, différenciation et apoptose des cellules.

Le lien entre l'acide rétinoïque et le cancer a été établi très tôt. Le processus de transformation tumorale conduisant au développement d'un cancer est fréquemment associé à une altération des voies de signalisation nécessaires au maintien des fonctions cellulaires normales, en particulier celles contrôlant la prolifération ou la mort cellulaire. Ainsi, une altération de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque peut conduire au développement de certains cancers. Un traitement par l'acide rétinoïque ou ses dérivés synthétiques, les rétinoïdes peut cependant restaurer une signalisation normale et éliminer les cellules cancéreuses en induisant leur différenciation ou leur apoptose sélective. Ils sont donc utilisés actuellement en prévention et thérapie de certains cancers, dont notamment la leucémie promyélocytaire aiguë (APL) pour lequel ils constituent le traitement standard. De

nombreuses équipes se sont focalisées ces dernières années sur la compréhension des mécanismes moléculaires à la base de l'action anti-tumorale des rétinoïdes.

Lors de mon travail de thèse, je me suis particulièrement intéressée à la différenciation et à l'apoptose induites par les rétinoïdes dans différents modèles cellulaires de leucémie myéloïde aiguë (AML). Je me suis focalisée en particulier sur l'identification des récepteurs nucléaires impliqués dans ces effets et sur l'élucidation des voies apoptotiques induites. Avant d'aborder les résultats obtenus au cours de cette étude, je développerai dans un premier temps la description et les modes d'actions des récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïque. Puis je détaillerai les différents liens existants entre la voie rétinoïde et le cancer pour terminer par une description des différents effets cellulaires des rétinoïdes impliqués dans leur fonction antitumorale dont l'apoptose. Enfin, je discuterai des résultats obtenus dans leur globalité en fonction des connaissances actuelles sur le sujet.

I . La vitamine A et ses dérivés les rétinoïdes.

1. La vitamine A est nécessaire à la vie.

La vitamine A et ses dérivés métaboliques sont nécessaires pour de nombreuses fonctions biologiques dans la vie pré et post-natale (Kastner et al., 1996; Niederreither et al., 1999; Sporn et al., 1994). En effet, dès les années 1930, il a été montré qu'une carence en vitamine A conduit à la mort de l'individu adulte et à l'arrêt du développement embryonnaire.

L'apport de vitamine A doit être finement régulé durant l'embryogenèse : une déficience en vitamine A cause des malformations sévères touchant pratiquement tous les organes (Lohnes et al., 1994; Mendelsohn et al., 1994) alors qu'une survitaminose a des effets tératogènes (Kastner et al., 1995).

Au cours du développement post-natal et de la vie adulte, la vitamine A est également indispensable à la survie, la croissance, la reproduction, la vision et la maintenance de nombreux tissus et organes (pour revue, voir (Kastner et al., 1995)).

2. Les rétinoïdes : dérivés actifs de la vitamine A.

Le terme de rétinoïde désigne les dérivés biologiquement actifs de la vitamine A ou rétinol. Les animaux n'étant pas capables de synthétiser la vitamine A, elle doit leur être apportée par l'alimentation pour être transformée par des réactions enzymatiques successives en métabolites actifs tels que l'acide rétinoïque (AR). Une faible proportion du rétinol présent dans le plasma et les tissus est convertie en acide rétinoïque *tout trans* (ATRA), le principal dérivé actif de la vitamine A. Certains autres métabolites ont également une activité de signalisation, tels que l'acide rétinoïque *9-cis* (AR *9-cis*) et l'acide rétinoïque *13-cis*.

3. Vitamine A et cancers : les premiers liens.

Dans les années 1950 /1960, il a été démontré qu'une déficience en Vitamine A augmente le nombre de tumeurs spontanées ou chimiquement induites chez l'animal (Lasnitzki, 1955; Saffiotti et al., 1967), phénomène qui peut être contrecarré par des concentrations pharmacologiques de vitamine A dans l'alimentation (Bollag, 1972; Harisiadis et al., 1978). De plus, des études épidémiologiques ont démontré que les individus ayant une

alimentation pauvre en vitamine A ont un risque plus élevé de développer un cancer (Sporn et al., 1994). Ces observations ont conduit à l'hypothèse selon laquelle une concentration physiologique en vitamine A protège l'organisme du développement de lésions malignes.

Plus tard, l'équipe de Lotan ainsi que d'autres groupes ont démontré que la prolifération de nombreuses tumeurs cultivées *in vitro* était réduite par l'addition d'AR dans le milieu de culture (Fraker et al., 1984; Lotan et al., 1980). L'AR est capable de restaurer la différenciation de certaines cellules tumorales telles que les neuroblastomes, mélanomes et les leucémies myéloïdes (Breitman et al., 1980; Chomienne et al., 1986; Ludwig et al., 1980; Sidell, 1982).

Toutes ces données expérimentales ont conduit à l'utilisation des rétinoïdes en tests cliniques et ainsi au succès des premiers essais thérapeutiques de la leucémie promyélocytaire aiguë (APL) (Huang et al., 1988) puis à l'utilisation de l'AR en traitement standard de l'APL.

II. Les récepteurs de l'acide rétinoïque.

Les rétinoïdes exercent un rôle fondamental dans le développement normal ou tumoral. Il était donc nécessaire de définir les voies de transduction utilisées par les rétinoïdes pour transmettre leur signal.

1. Clonage des récepteurs de l'Acide Rétinoïque.

La plupart des effets induits par l'AR reposent sur sa capacité à moduler la transcription des gènes. Une grande étape a été franchie dans l'élucidation de la complexité du signal rétinoïde avec le clonage en 1987 des gènes codant pour un récepteur nucléaire de l'AR (RAR) par les équipes de Pierre Chambon et Ron Evans (Giguere et al., 1987; Petkovich et al., 1987). Le clonage des gènes codant pour les Retinoid X Recepteurs (RXR), deuxième sous-famille des récepteurs à l'AR, a eu lieu en 1989/90 (Hamada et al., 1989; Mangelsdorf et al., 1990; Leid et al., 1992).

ATRA est le ligand physiologique principal des RARs mais il n'est pas capable de se lier aux RXRs. L'AR 9-cis est capable d'activer RAR et RXR *in vitro* (Mangelsdorf et al., 1992). Le terme de rétinoloïde est apparu pour définir les ligands sélectifs de RXR. L'existence et l'identité de ligands naturels de RXR est toujours très controversée. Il a été

RECEPTEURS NUCLEAIRES

LIGANDS

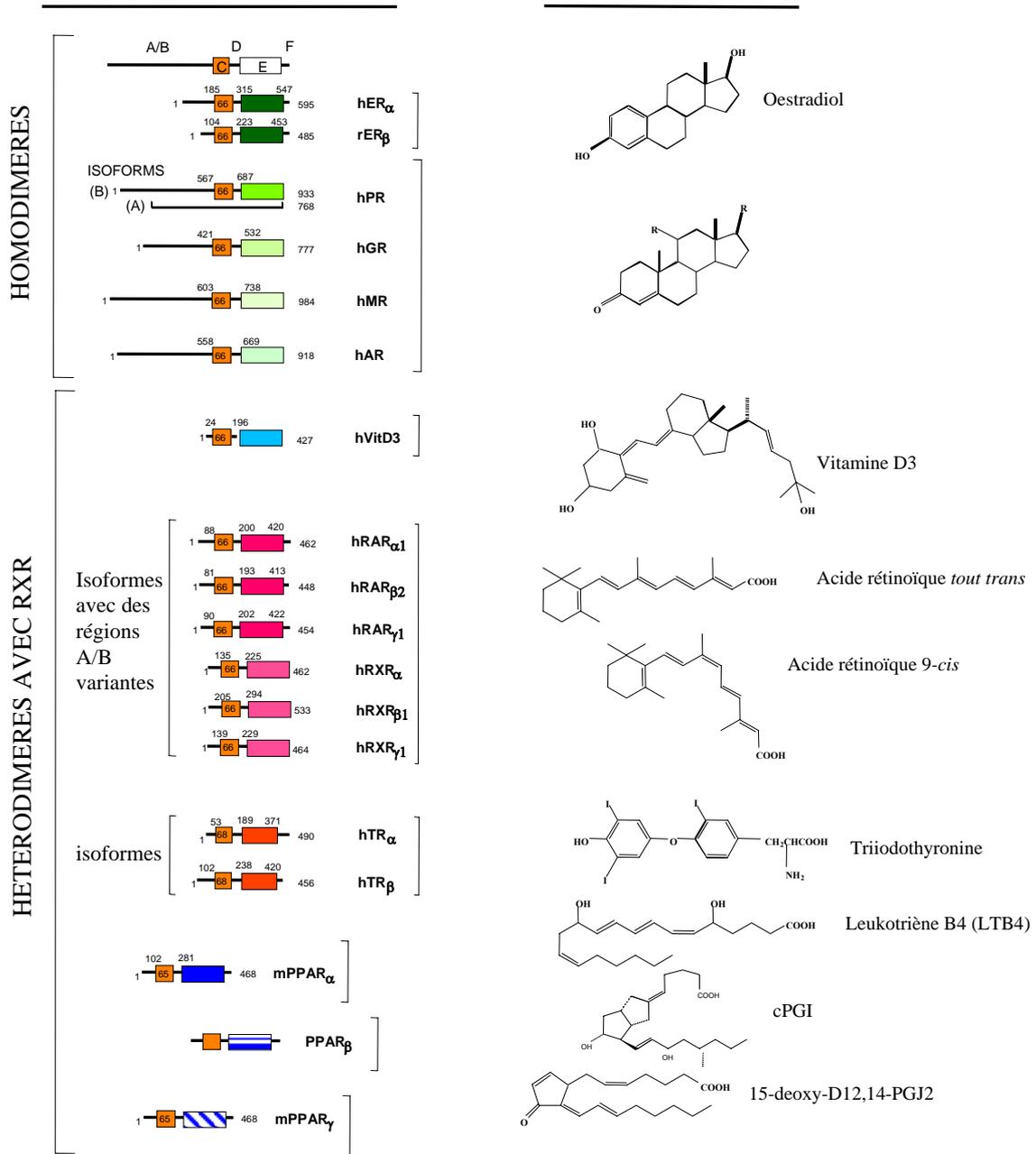


Figure 1 : Les principaux membres de la superfamille des récepteurs nucléaires

Les différents membres sont représentés ainsi que leurs ligands respectifs.

D'après Gronemeyer.

cependant démontré par des expériences utilisant des souris ou embryons de xénope transgéniques « rapporteur » que RXR est effectivement activé in vivo (Luria and Furlow, 2004; Solomin et al., 1998). Malgré sa très faible concentration dans le plasma, l'AR 9-cis a été détecté in vivo et des enzymes impliquées dans sa synthèse ont été également mises en évidence (Romert et al., 1998). Cependant, il n'a toujours pas été clairement prouvé qu'il soit un ligand physiologique de RXR. L'acide phytanique (Lemotte et al., 1996) puis l'acide docosahexaénoïque (de Urquiza et al., 2000) ont été décrits par certains groupes comme étant des ligands endogènes de RXR.

RAR et RXR appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes. Cette famille est subdivisée en 6 à 7 sous-familles phylogénétiques qui comprennent au total plus d'une centaine de membres (pour revue, voir (Laudet and Gronemeyer, 2002)) dont les plus étudiés sont le récepteur aux glucocorticoïdes (GR), aux oestrogènes (ER), à la vitamine D3 (VDR) ou encore aux proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) (**figure 1**). Il existe également de nombreux récepteurs orphelins (par exemple TR3) ainsi nommés de part l'absence de ligands connus ou de poches de liaison au ligand (Wang et al., 2003).

Les récepteurs nucléaires forment des homos ou hétérodimères qui agissent comme des facteurs de transcription inductibles par leur ligands, ce qui signifie qu'en réponse à la liaison de leur hormone ou vitamine respectives, ils ont la capacité d'induire la transcription de certains programmes de gènes et permettent à la cellule de répondre de manière adéquate aux stimuli reçus.

2. Description des récepteurs aux rétinoïdes.

Il existe au total 6 récepteurs à l'AR codés par des gènes différents et regroupés en deux sous familles : les RAR α , β et γ et les RXR α , β et γ (Chambon, 1996). Différentes isoformes de ces récepteurs peuvent être produites par des mécanismes d'épissage alternatif ou l'utilisation de promoteurs distincts. De nombreux rétinoïdes synthétiques ont été générés avec des sélectivités particulières pour les RARs et les RXRs ainsi que des activités agonistes ou antagonistes (Dawson, 2004). Ces ligands sont des outils très puissants pour disséquer les différentes fonctions des rétinoïdes naturels et de leurs récepteurs et peuvent également être

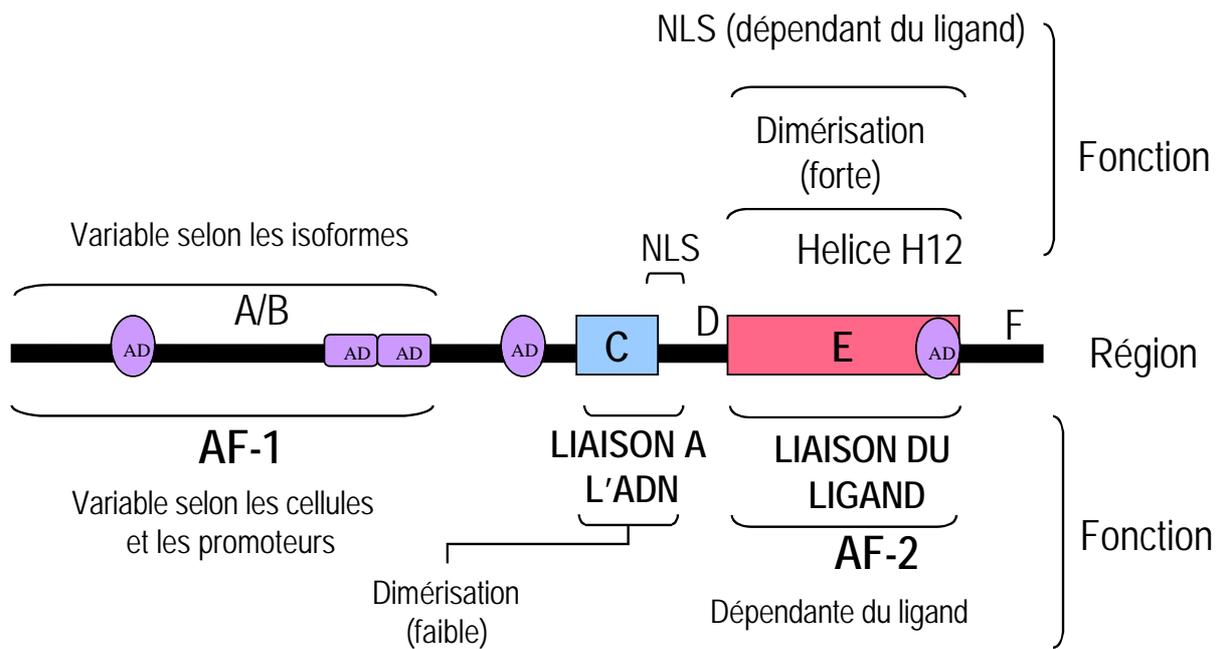


Figure 2 : Illustration schématique de l'organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs nucléaires.

Les 6 domaines de A à F sont représentés ainsi que les fonctions principales. AD : Activation Domain, AF : Activation fonction, NLS : nuclear localization signal.

D'après Gronemeyer et al 2004.

utilisés en thérapie.

Tout comme les autres récepteurs nucléaires, RAR et RXR sont des protéines modulaires qui partagent une organisation commune et contiennent 6 domaines distincts, (pour revue et référence, voir (Chambon, 1996; Laudet and Gronemeyer, 2002) dont 3 principaux qui leur permettent d'assurer leur fonction de facteur de transcription : une partie N-terminale (domaine A/B) comprend une fonction d'activation de la transcription (AF-1). La région C très conservée contient le domaine de liaison à l'ADN (DBD) qui permet une liaison sélective à des séquences conservées de l'ADN génomiques ou éléments de réponse à l'AR (RARE). Le domaine de liaison au ligand (LBD) est hautement structuré et contient une deuxième fonction d'activation de la transcription dépendante du ligand (AF-2) (pour revue, voir (Bourguet et al., 2000; Steinmetz et al., 2001)) (**figure 2**).

3. Focus sur RXR.

RXR est un membre très particulier de la famille des récepteurs nucléaires puisqu'en plus de sa capacité à former des homodimères, il fonctionne majoritairement en tant que partenaire d'hétérodimérisation avec de nombreux autres récepteurs nucléaires tels que RAR, VDR, TR, PPAR ou également des récepteurs orphelins comme TR3 (pour revue, voir (Laudet and Gronemeyer, 2002; Szanto et al., 2004).

Dans certains hétérodimères « non-permisifs », RXR est généralement incapable de répondre à son ligand sans une activation préalable de l'autre partenaire d'hétérodimérisation. C'est le cas des hétérodimères avec RAR, VDR, ou TR. Concrètement, si on prend l'exemple de l'hétérodimère RXR-RAR, un agoniste de RAR peut activer seul la transcription alors qu'un agoniste de RXR seul ne le peut pas. Ce phénomène est appelé « subordination » de RXR. Il a une signification biologique importante puisqu'il permet d'éviter la confusion des différents signaux induits par les rétinoïdes, les hormones thyroïdiennes ou la vitamine D3. Cependant, ceci ne signifie pas que le rôle de RXR dans de tels hétérodimères est limité. En effet, le rétinoloïde peut potentialiser l'activation de l'hétérodimère activé par un agoniste de RAR et ainsi induire une synergie (Chen et al., 1996; Roy et al., 1995). Déleter RXR α de sa fonction d'activation AF-2 représente une mutation létale au niveau pré-natal chez la souris, les embryons présentant des anomalies similaires mais moins sévères aux souris déficientes en RXR α (Mascrez et al., 1998). Ceci tend à démontrer que la fonction AF-2 de RXR est

nécessaire pour le développement et suggère que l'activation de RXR par son ligand est importante pour l'activité de l'hétérodimère RXR-RAR. Cependant, des études ultérieures ont démontré que la délétion de l'hélice H12 de RXR (fonction AF2) modifie ses capacités de liaison avec certains corégulateurs et transforme l'hétérodimère RXR-RAR en super-répresseur (Liu et al., 2004, Zhang, 1999 #371). Ceci nuance l'interprétation du phénotype du mutant et ne permet pas de conclure clairement sur la véritable fonction de AF-2 de RXR dans ce contexte.

Dans une autre catégorie d'hétérodimères qualifiés de « permissifs », RXR ainsi que son partenaire ont la même capacité d'activer la transcription. C'est le cas des hétérodimères formés par les PPAR, LXR ou TR3. En conséquence, les réxinoïdes ont un rôle important à jouer dans le contrôle des maladies métaboliques. En effet, l'activation par les réxinoïdes de l'hétérodimère RXR-PPAR γ peut induire la sensibilisation à l'insuline dans des modèles animaux de diabète de type 2 de la même façon que les ligands de PPAR γ (Lenhard et al., 1999; Mukherjee et al., 1997). De même, l'activation de l'hétérodimère RXR-LXR contribue aux effets bénéfiques des réxinoïdes sur le phénomène d'athérosclérose (Claudel et al., 2001). On peut cependant s'interroger sur la réelle permissivité de ces hétérodimères *in vivo* : en effet, les concentrations relativement élevées de ligands endogènes de ces récepteurs (ex : PPAR γ et les acides gras) pourraient permettre une activation synergique de l'hétérodimère avec RXR et de pas refléter une activation de cet hétérodimère par RXR seul.

Ainsi, la transduction du signal réxinoïde présente un degré très complexe de fonctionnement puisque RXR se retrouve au carrefour de nombreuses voies de signalisation. RXR peut jouer un rôle important *in vivo* via son implication dans les hétérodimères non permissifs tels que RXR-RAR ou permissifs tels que RXR-PPAR. Il n'y a cependant toujours pas de consensus concernant les voies de signalisation médiées par les réxinoïdes. RXR fonctionne-t-il seulement en tant que partenaire d'hétérodimérisation ou est-il capable d'induire des voies de signalisation de manière autonome, c'est-à-dire via un homodimère RXR-RXR? Il y a eu par le passé différentes tentatives pour identifier des voies médiées par les réxinoïdes, mais celles-ci n'ont abouti qu'à l'identification de nouveaux partenaires de RXR tels que Nurr1 ou LXR (Perlmann and Jansson, 1995; Willy et al., 1995).

Dans des expériences réalisées *in vitro*, RXR peut former des tétramères en absence de ligand. Ils se dissocient ensuite sous l'action du ligand pour former des homodimères capables de se lier à des éléments de réponse de type DR1 (Chen et al., 1998). Récemment il a été montré que des homodimères RXR-RXR étaient capables de se lier à un élément de réponse de type PPAR (PPRE) en réponse à l'AR 9-*cis in vitro* (Ijpenberg et al., 2004). Les auteurs ont ensuite démontré qu'un dimère formé par RXR était recruté *in vivo* sur des PPRE suite au traitement par l'AR 9-*cis* et en absence de PPARs. Même si certaines évidences vont dans le sens d'une implication d'un homodimère de RXR, il est impossible de conclure de manière formelle sur l'identité de ce dimère et d'exclure un hétérodimère avec un autre récepteur.

Ainsi, des études réalisées *in vitro* suggèreraient l'existence d'une voie de signalisation autonome de RXR. Il manque cependant des évidences concrètes obtenues *in vivo*. De plus, cette hypothèse n'a de sens que si un agoniste naturel de RXR existe effectivement dans les tissus testés, et ceci à des concentrations suffisantes pour induire la transcription.

La transduction du signal rexinoïde n'est pas encore totalement élucidée mais il représente une cible thérapeutique très puissante considérant les nombreux partenaires avec lesquels RXR peut interférer.

4. Signalisation via les récepteurs de l'Acide Rétinoïque.

Les récepteurs nucléaires ont évolué depuis les métazoaires à partir d'un ancêtre commun. Ils représentent un moyen très perfectionné et sensible pour la cellule d'intégrer différentes informations intra et extracellulaires. Pour ceci, ils vont agir selon différents mécanismes qui peuvent être modulés par la présence ou non de ligand mais également par leur localisation subcellulaire. Premièrement, ils peuvent répondre directement à des signaux hormonaux ou métaboliques en modulant la transcription d'un grand nombre de gènes cibles. Les récepteurs nucléaires étant eux-mêmes la cible de certaines modifications post-transcriptionnelles, ils peuvent également intégrer de cette façon différentes voies de signalisation. Ils peuvent à l'inverse interférer avec d'autres cascades de signalisation. Et enfin, une localisation non nucléaire peut leur permettre d'assurer des fonctions « non génomiques ». Ainsi, la signalisation par l'intermédiaire des récepteurs nucléaires permet d'établir un véritable réseau de communication intra et intercellulaire. Les différents aspects de la signalisation rétinolde seront détaillés dans les prochains paragraphes.

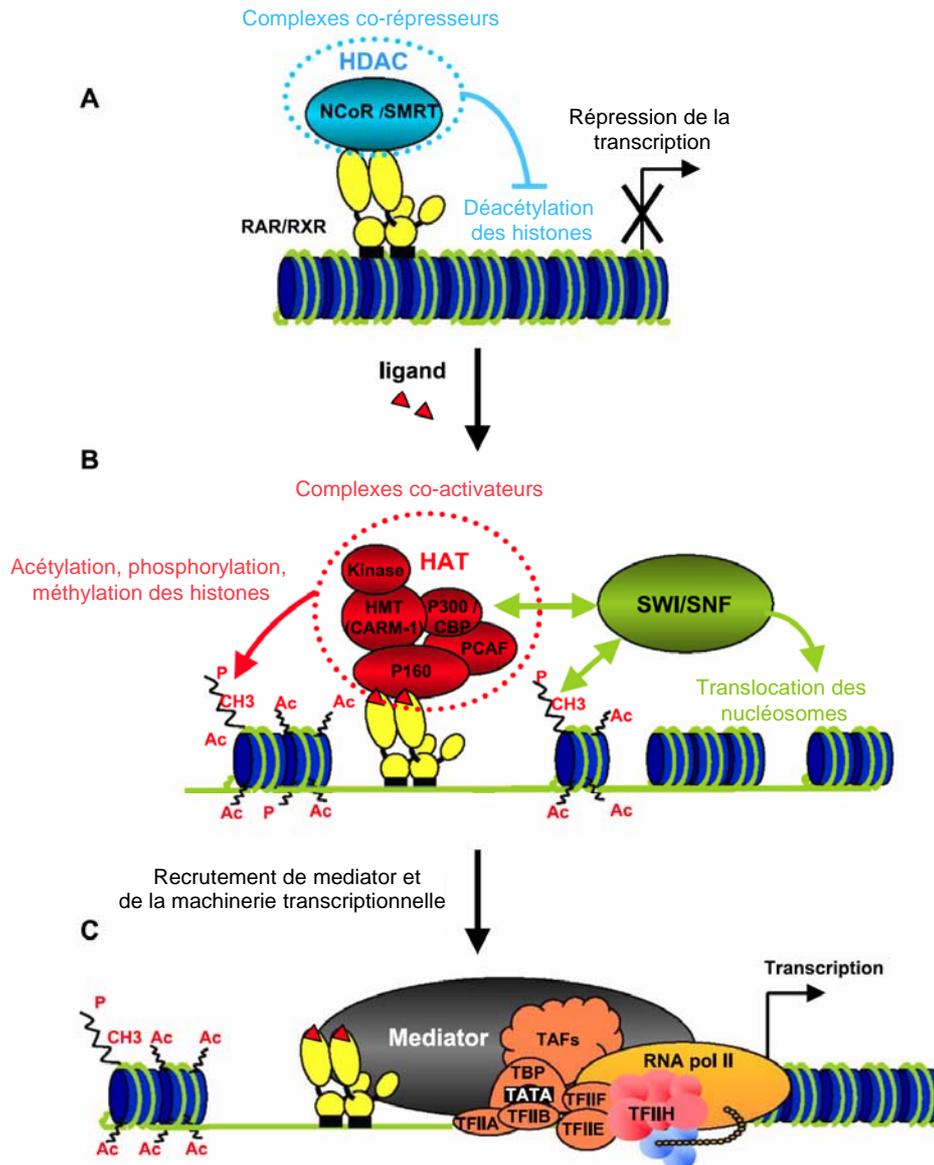


Figure 3 : Mécanisme d'action en 3 étapes des récepteurs aux rétinoïdes.

A : En absence de ligands, l'hétérodimère RXR-RAR est fixé sur son élément de réponse situé dans le promoteur des gènes cibles. Leur liaison à des complexes corépresseurs portant des activités histone déacétylase (HDAC) maintient un état de répression.

B : Après fixation du ligand, les complexes corépresseurs sont dissociés permettant le recrutement des complexes coactivateurs et des complexes de remodelage de la chromatine (SWI/SNF). Ils possèdent des activités enzymatiques (histone acétylase (HAT), méthyltransférase, kinase, etc...) permettant la décompaction de la chromatine.

C : Les coactivateurs sont dissociés et cèdent leur place au complexe médiateur SMCC. Celui-ci permet la fixation de l'ARN polymérase II et des facteurs généraux de transcription sur le promoteur, induisant l'initiation de la transcription.

D'après Bastien *et al* 2004

4.1. Régulation de la transcription par l'hétérodimère RXR-RAR

Chez les eucaryotes, l'ADN est compacté en une structure nucléoprotéique très organisée appelée chromatine. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome qui est formé par l'ADN enroulé autour d'un complexe de protéines appelées histones (histones H2A, H2B, H3 et H4). L'histone H1 sert de lien et stabilise l'assemblage des nucléosomes en une structure supérieure caractéristique de la chromatine. L'interaction des histones avec l'ADN définit le niveau de compaction de la chromatine. En effet, la partie N-terminale des histones est basique et est ainsi étroitement associée à l'ADN maintenant une structure très compacte généralement répressive pour l'activation de la transcription. L'interaction des histones avec l'ADN peut être modulée par des modifications covalentes de la partie N-terminale des histones (acétylation, phosphorylation, méthylation). L'hypothèse d'un « code histone » propose qu'un profil de modification défini des histones peut être reconnu par des facteurs spécifiques, induire le recrutement d'autres effecteurs et modifier ainsi l'état de condensation de la chromatine (pour revue, voir (Peterson and Laniel, 2004)). Ainsi, une acétylation des histones sur des résidus particuliers permet d'obtenir une forme décondensée de la chromatine et une accessibilité plus grande aux modulateurs de la transcription. Cependant, les règles de ce code histone n'ont pas encore été vraiment élucidées et il semble que certaines modifications puissent induire des effets opposés selon les cas.

L'hétérodimère RXR-RAR est lié à l'ADN au niveau des éléments de réponse situés dans la région promotrice des gènes cibles. Ces éléments de réponse à l'AR (RARE) sont composés typiquement de deux répétitions directes d'un motif hexamérique PuG(G/T)TCA (Kliwer et al., 1992; Mader et al., 1993; Mangelsdorf and Evans, 1995; Umesono et al., 1991). Dans le RARE classique, les 2 répétitions directes sont espacées de 5 pb et nommés DR5. RXR peut également se lier à des DR1 en tant qu'homodimères ou hétérodimères avec les PPAR. On parle alors de RXRE ou PPRE respectivement.

Le fonctionnement de l'hétérodimère RXR-RAR dans l'activation de la transcription repose sur un modèle en 3 étapes (pour revue récente, voir (Aranda and Pascual, 2001; Bastien and Rochette-Egly, 2004; Dilworth and Chambon, 2001) (**figure 3**) :

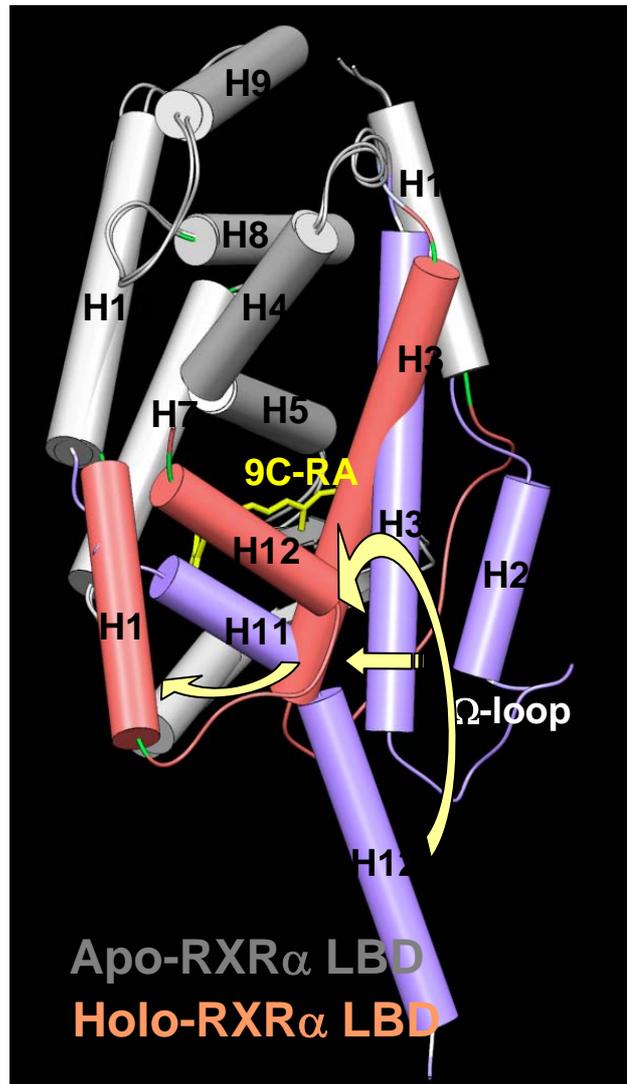


Figure 4 : Comparaison de la structure du domaine de liaison de l'ADN (LBD) de RXR α avec ou sans ligand (AR 9-cis).

Le ligand induit une modification conformationnelle du récepteur caractérisée par un mouvement des hélices H2, H3, H11 et H12 (en violet sans ligand et en rose avec ligand) selon le modèle du piège à souris.

D'après Gronemeyer *et al* 2004.

- En absence de ligand, l'hétérodimère RXR-RAR réprime la transcription du gène cible via le recrutement des corépresseurs NCoR (Horlein et al., 1995) et SMRT (Chen and Evans, 1995) qui recrutent à leur tour des complexes contenant des activités histone déacétylase (pour revue, voir (Glass and Rosenfeld, 2000; Hu and Lazar, 2000)). La déacétylation des histones augmente leur interaction avec l'ADN et compacte la chromatine en un état transcriptionnellement inactif.

- La liaison d'un agoniste de RAR provoque des changements conformationnels dans le LBD dont le mouvement de l'hélice H12 selon le modèle du « piège à souris » (Bourguet et al., 2000) (**figure 4**). Ceci engendre la déstabilisation de la liaison des complexes corépresseurs et crée une nouvelle surface d'interaction pour des complexes coactivateurs (ex : p300/CBP, la famille SRC/p160) qui possèdent notamment des activités Histone Acétyl-Transférase (HAT) (pour revue récente, voir (McKenna and O'Malley, 2002)). Ces complexes coactivateurs, en association avec des complexes de remodelage de la chromatine (Swi/Snf) vont décompacter la chromatine condensée afin de faciliter l'accès à la machinerie transcriptionnelle. Au contraire d'un agoniste de RAR, l'addition d'un rétinoloïde ne permet pas de dissocier les corepresseurs liés à RAR et les coactivateurs ne peuvent pas être recrutés (Germain, 2002), ceci élucidant au niveau moléculaire le phénomène de subordination de RXR (**figure 5**).

- Selon l'hypothèse actuelle, les coactivateurs se dissocient et font place aux complexes médiateurs tels que SMCC qui permettent le recrutement de la machinerie transcriptionnelle comprenant l'ARN polymérase II et les facteurs généraux de transcription (Dilworth and Chambon, 2001; Malik and Roeder, 2000).

Ainsi, la transcription est activée par l'hétérodimère RXR-RAR selon 2 mécanismes consécutifs : dérpression et décompaction de la chromatine ainsi qu'une augmentation de la fréquence d'initiation de la transcription. Ce modèle a été établi pour l'isotype RAR α . Il s'applique également aux hétérodimères RXR-TR ou RXR-VRD. Dans le cas des hétérodimères permissifs, et à moindre mesure pour RAR β , l'interaction du récepteur avec les corépresseurs est plus faible voire nulle comparé à RAR α . En conséquences, ces hétérodimères ont une capacité de répression de la transcription faible à inexistante en absence de ligands et les gènes cibles sont exprimés de manière continue à un niveau basal.

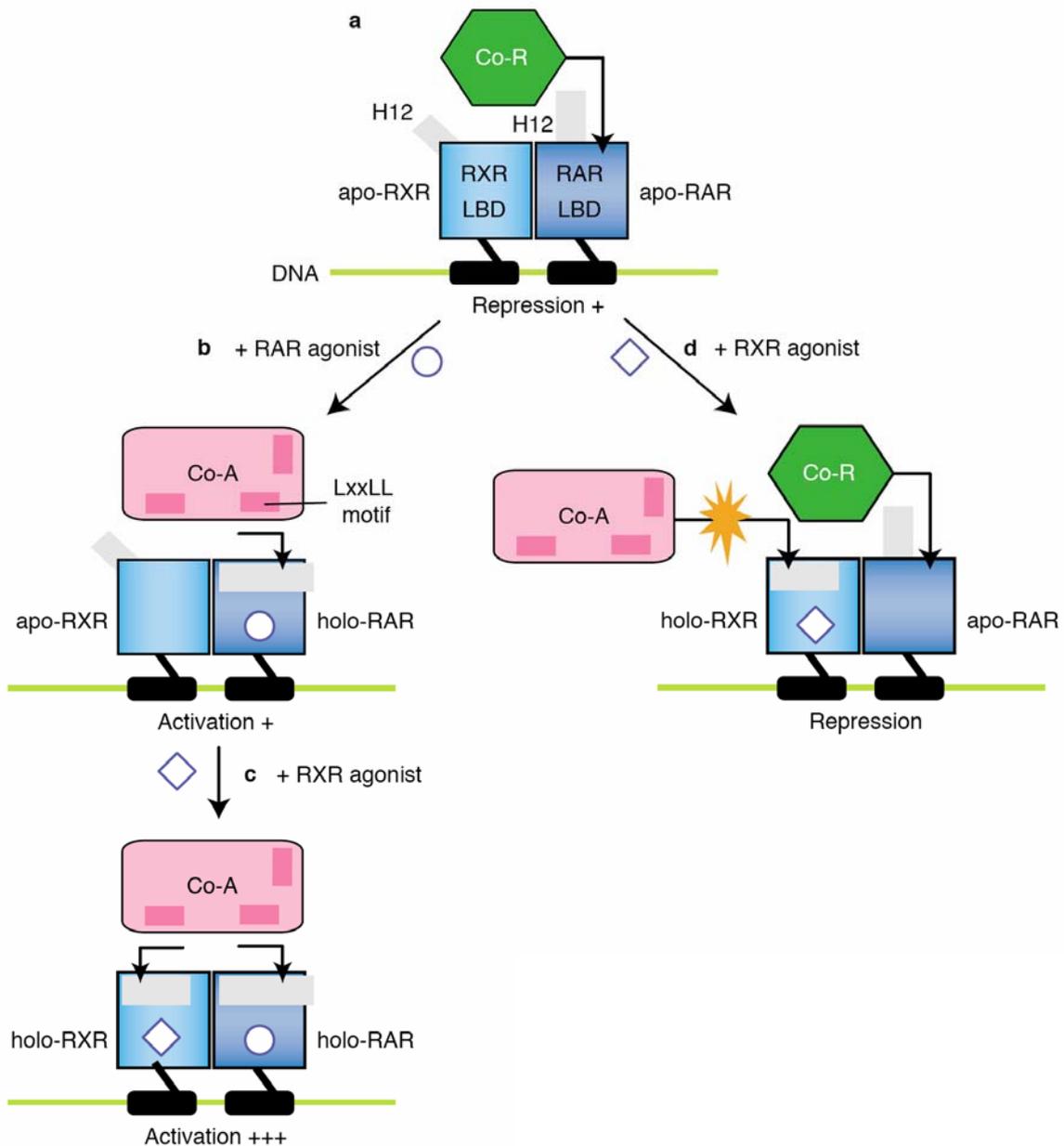


Figure 5 : Modèle du fonctionnement de l'hétérodimère RXR-RAR en présence ou non d'agonistes : subordination et synergie.

a: En absence de ligand, l'hétérodimère est associé aux corépresseurs.

b: La fixation d'un agoniste de RAR induit la dissociation des corépresseurs et la liaison des coactivateurs par leur motif LxxLL (où L est une leucine et X n'importe quel acide aminé).

c: En présence des 2 agonistes, on observe une liaison coopérative du coactivateur sur chaque partenaire de l'hétérodimère induisant une synergie dans l'activation de la transcription.

d: Un agoniste de RXR permet le recrutement des co-activateurs mais ne peut pas dissocier les co-répresseurs. La liaison de ces 2 complexes étant mutuellement exclusive, le coactivateur ne peut donc pas se lier, ceci expliquant la subordination de RXR

D'après Clarke *et al* 2004.

Cependant, la suite du modèle peut leur être appliquée et ce niveau basal de transcription est fortement augmenté en présence d'agoniste.

Enfin, il a été récemment montré que les 2 partenaires de l'hétérodimère RXR-RAR sont dégradés par le protéasome en réponse aux rétinoïdes (Gianni et al., 2003; Kopf et al., 2000; Osburn et al., 2001). Ceci repose sur l'ubiquitylation de RAR puis le recrutement du protéasome via la sous unité SUG-1. Cette étape de dégradation pourrait être un mécanisme de contrôle de la durée et de l'amplitude de la transcription médiée par les rétinoïdes.

Le modèle décrit ci-dessus repose en majorité sur des données obtenues *in vitro*. Cependant, la séquence des événements n'est déterminée que de manière approximative et l'ordre de recrutement des différents complexes de modification de la chromatine ou de remodelage pourrait dépendre de la nature des promoteurs et de la structure de la chromatine (Cosma, 2002; Fry and Peterson, 2001). De même, la composition exacte des complexes ainsi que leur dynamique est encore largement inconnue. Même si un tel modèle nous permet de mieux comprendre le mode d'action des rétinoïdes, l'activation de la transcription *in vivo* est certainement beaucoup plus complexe. Si on se réfère aux données récentes publiées sur la transcription activée par ER ou GR, la vue statique d'activation de la transcription par les récepteurs nucléaires est en révision et les interactions entre les différents complexes et l'ADN apparaissent comme très dynamiques (Metivier et al., 2003; Nagaich et al., 2004; Reid et al., 2003). D'après ces études, les récepteurs nucléaires ainsi que les autres protéines impliquées dans la transcription ont une mobilité très grande et le temps de résidence sur les gènes cibles pour une molécule donnée est de l'ordre de la seconde. En plus de la caractérisation dynamique en temps réel des récepteurs nucléaires, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine révèlent que la concentration effective de récepteurs nucléaires sur certains promoteurs varie d'une manière cyclique (de 20 à 40 minutes) en réponse aux hormones (Hager et al., 2004). Cependant, ces données sont récentes et ne peuvent pas encore être intégrées dans un modèle général. De nombreuses questions sont donc ouvertes notamment sur la généralisation de ce phénomène de cycling sur d'autres types de gènes.

Concernant les récepteurs à l'AR, ils ont également une mobilité très importante dans le noyau (Dong et al., 2004; Maruvada et al., 2003). Cependant, peu d'informations sont connues concernant l'occupation des promoteurs. On peut en effet se demander, de part la

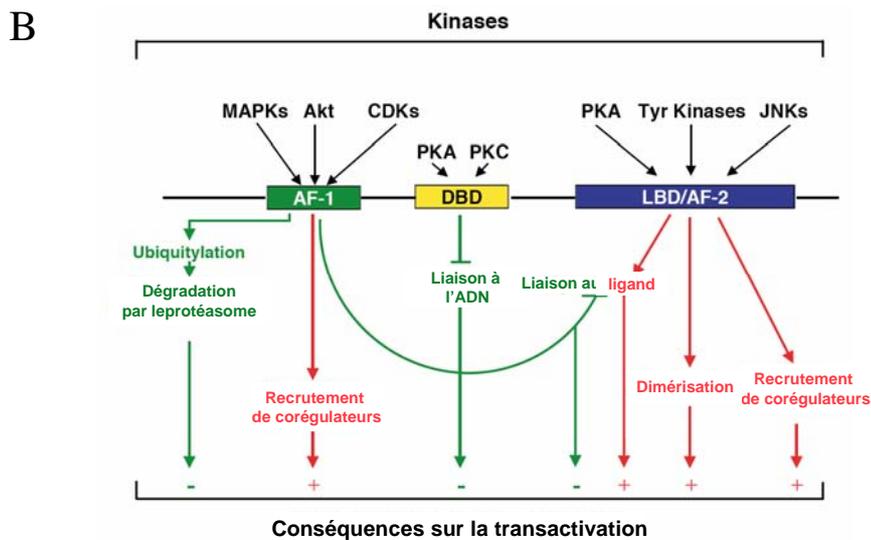
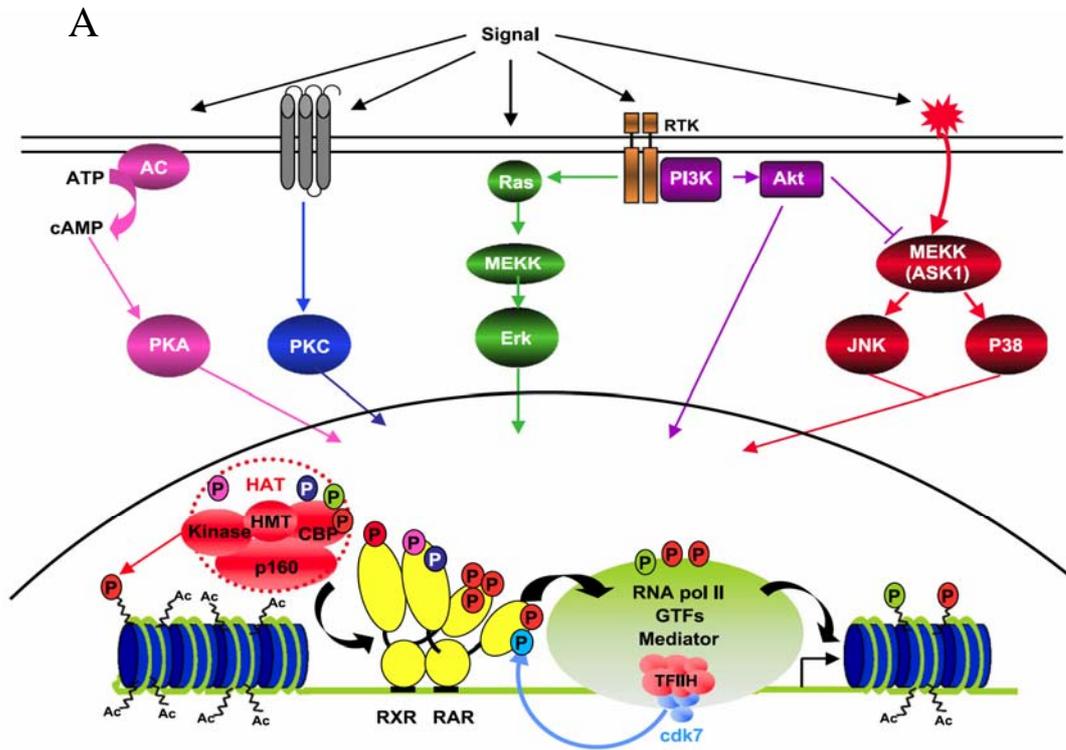


Figure 6 : Voies de signalisation et conséquences sur la transactivation médiée par les récepteurs nucléaires.

A : Différentes voies de signalisation sont impliquées dans la phosphorylation des récepteurs nucléaires mais aussi des corégulateurs et de la machinerie transcriptionnelle. L'activité des différents acteurs impliqués dans la transcription est ainsi modulée, positivement ou négativement. D'après Bastien *et al* 2004.

B: Représentation schématique des effets de la phosphorylation des récepteurs nucléaires sur la transactivation des gènes cibles. Les différentes kinases impliquées sont représentées. D'après Rochette-Egly 2003.

forte liaison de RAR aux corépresseurs, si les hétérodimères RXR-RAR sont constamment positionnés sur les gènes cibles pour réprimer leur expression ou s'ils sont recrutés au niveau du promoteur par la liaison du ligand. Il est fort probable que des différences doivent exister selon les promoteurs et la nécessité de la répression de l'expression du gène. Les outils modernes d'étude de la transcription (par exemple immunoprécipitation de la chromatine) devraient permettre de répondre à ces questions dans les prochaines années.

4.2. Phosphorylation des récepteurs nucléaires.

L'activité des récepteurs nucléaires n'est pas seulement modulée par la fixation du ligand mais aussi par l'intégration de différentes voies de signalisation par l'intermédiaire de modifications post-traductionnelles, dont la phosphorylation mais aussi l'acétylation et l'ubiquitylation (Fu et al., 2004). RAR et RXR ainsi que les autres récepteurs nucléaires sont les substrats d'une multitude de kinases notamment les CDK (cyclin dependent kinase), MAPK (mitogen activated protein kinase), PKA (protein kinase A) et PKC (protein kinase C) (pour revue, voir (Rochette-Egly, 2003)). Ils sont principalement phosphorylés au niveau des domaines de transactivation AF-1 et AF-2 et au niveau du domaine de liaison à l'ADN. Ces modifications vont ainsi pouvoir moduler très finement l'activité des récepteurs nucléaires, de manière positive ou négative via la régulation des phénomènes de liaison à l'ADN, de fixation du ligand, de dimérisation ou de recrutement des co-facteurs (**figure 6 et 7**).

RAR α et RAR γ sont phosphorylés au niveau de leur domaine A/B par la sous-unité CDK7 du facteur général de transcription TFIID (Bastien et al., 2000; Rochette-Egly et al., 1997). Il a été démontré que cette étape de phosphorylation joue un rôle important dans l'activation de la transcription médiée par ces récepteurs (Keriel et al., 2002). Dans le cas de RAR γ , la phosphorylation par TFIID n'est pas suffisante et un second résidu situé dans la même région A/B doit être phosphorylé en réponse à l'AR par la p38 MAPK pour que RAR γ soit transcriptionnellement actif (Gianni et al., 2002a; Gianni et al., 2002b). De manière intéressante, cette seconde phosphorylation constitue un signal de dégradation du récepteur par le protéasome et donc un moyen de régulation fine de la durée de la transcription. Ces phosphorylations semblent moduler l'activité du récepteur en contrôlant le recrutement et la dissociation de protéines et différents complexes (Bour et al., 2005).

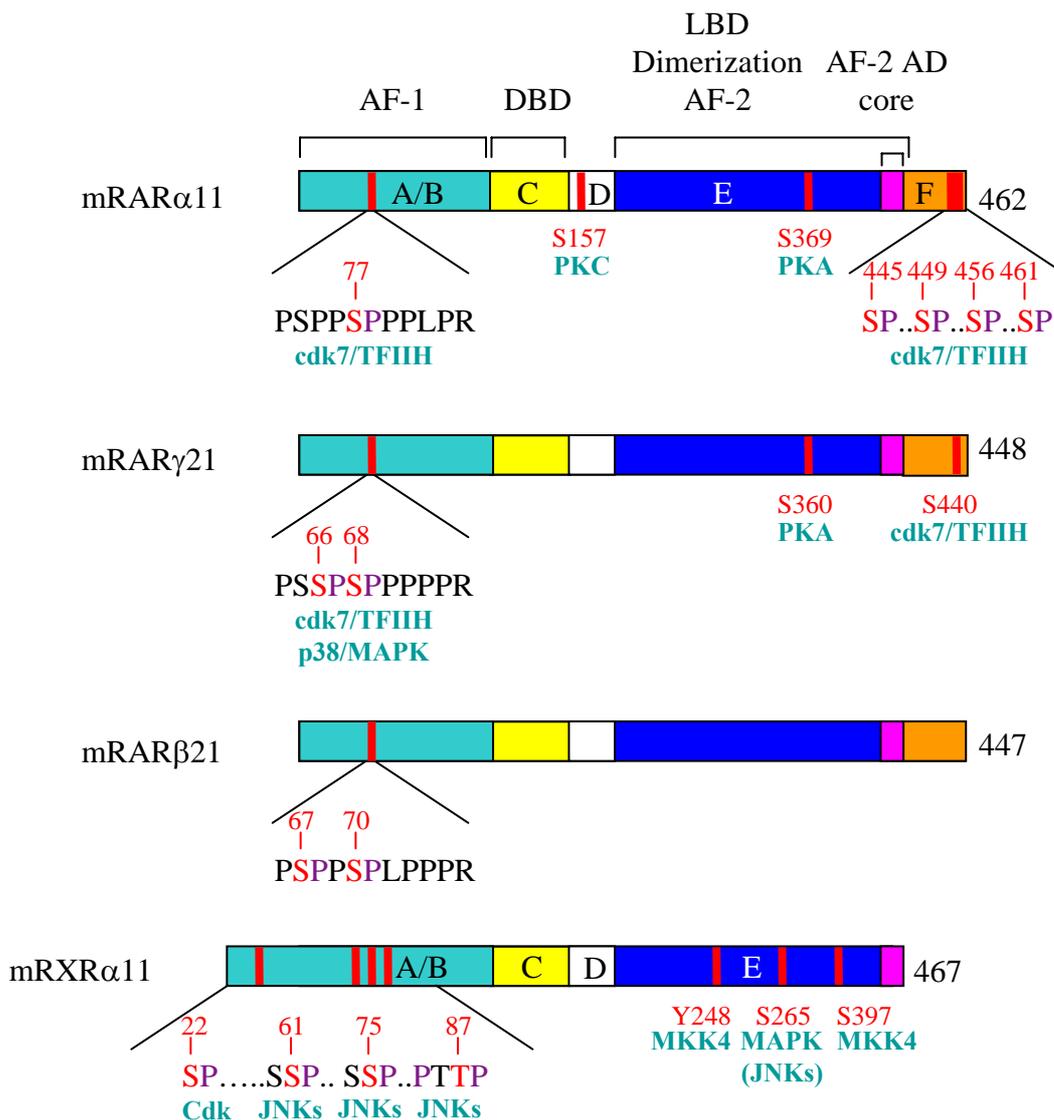


Figure 7 : Les récepteurs à l'acide rétinoïque sont des phosphoprotéines.

Représentation schématique des différents sites de phosphorylations identifiés sur les récepteurs. Les kinases responsables de ces phosphorylations sont représentées.

D'après Rochette-Egly 2003.

RAR α , quant à lui, peut également être phosphorylé par la PKA au niveau de la sérine 369 située dans le LBD. Cette phosphorylation module également de manière positive l'activité transcriptionnelle du récepteur (Huggenvik et al., 1993; Rochette-Egly et al., 1995).

Les RXRs sont également la cible de plusieurs kinases. Par exemple, RXR α est phosphorylé au niveau de son domaine A/B (sérine 22), phosphorylation nécessaire à l'effet anti-prolifératif des rétinoïdes (Bastien et al., 2002). Il est également hyperphosphorylés par les JNK en réponse à différents stress (Adam-Stitah et al., 1999; Tarrade et al., 2005).

La phosphorylation peut conduire au contraire à une inhibition de l'activation de certains récepteurs nucléaires, comme c'est le cas notamment de PPAR γ lorsqu'il est phosphorylé par les MAPK (Han et al., 2000). De même, il a été démontré que l'hyperphosphorylation de RXR α par les MAPK bloque l'activité transcriptionnelle de l'hétérodimère RXR-RAR (Lee et al., 2000; Matsushima-Nishiwaki et al., 2001).

Notons que toutes ces voies de signalisation peuvent également moduler l'activité transcriptionnelle des récepteurs via la phosphorylation des complexes coactivateurs ou corépresseurs (Hong and Privalsky, 2000).

Enfin, certains travaux indiquent que la phosphorylation des récepteurs pourrait jouer un rôle important dans le développement de certains cancers. En effet, dans la plupart des tumeurs, les voies de signalisation des MAPK et de Akt peuvent être constitutivement activées et conduire à la phosphorylation des récepteurs. Dans ce contexte, il a été effectivement démontré que la phosphorylation de ER et AR par les MAPK ou akt peut conduire à une transactivation des récepteurs de manière indépendante du ligand (Campbell et al., 2001; Wen et al., 2000). De même, l'hyperphosphorylation de RXR par les MAPK a été corrélée à une activation de la croissance de certains carcinomes hépatiques (Matsushima-Nishiwaki et al., 2001). On peut également postuler que l'acquisition de résistance aux rétinoïdes dans certains cancers résulte d'une dérégulation des voies de phosphorylation. En effet, une activation élevée et constante des JNK par la voie de Ras dans les cellules de cancer du poumon contribue à une signalisation rétinoïde aberrante via la phosphorylation puis la dégradation de RAR α (Srinivas et al., 2005). L'inhibition sélective des JNK permet dans ce cas de restorer l'effet anti-prolifératif des rétinoïdes.

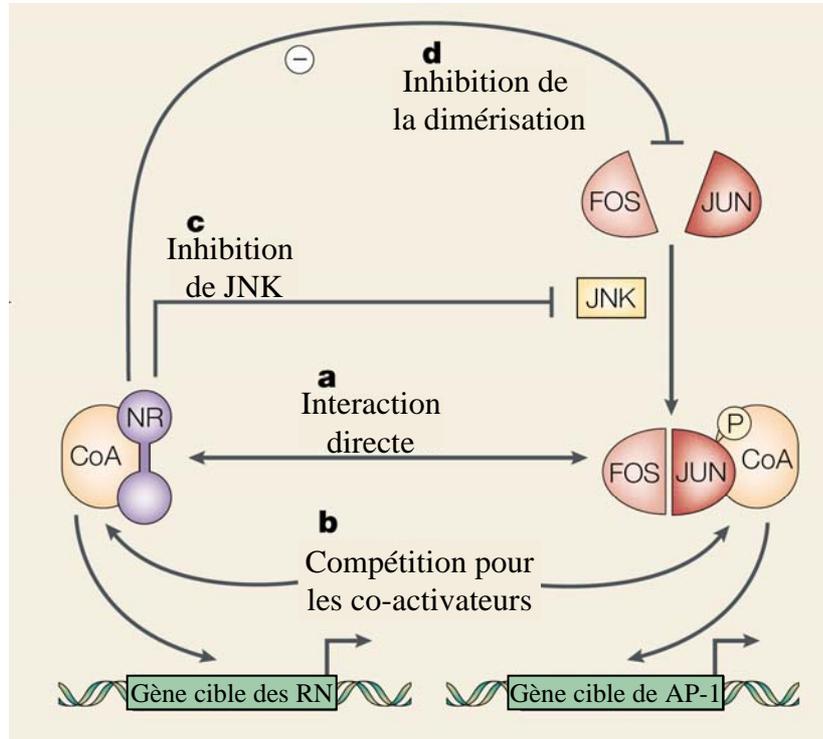


Figure 8 : La transrepression AP-1

Schéma représentant les différentes hypothèses pouvant expliquer la transrépression entre les dimères AP-1 et les récepteurs nucléaires. Les différents mécanismes proposés ne sont pas exclusifs et peuvent dépendre de la structure du promoteur, de la composition du dimère AP-1 mais aussi des types cellulaires.

D'après Altucci *et al* 2001.

4.3. Interférence avec d'autres voies de signalisation.

Les récepteurs nucléaires peuvent à l'inverse interférer sur d'autres voies de signalisation de manière positive ou négative.

L'exemple le mieux connu est la répression de la voie AP-1 (facteurs de transcription composés de protéines de la famille de Fos et Jun) par GR (pour revue, voir (Laudet and Gronemeyer, 2002)). Cette répression est également observée dans le cas de RXR-RAR: il a en effet été montré que comme avec les glucocorticoïdes, l'AR peut diminuer l'activation de la transcription induite par c-jun (Schule et al., 1991). Cet effet est mutuel et AP-1 peut également inhiber ou activer l'activité de RAR (Shemshedini et al., 1991; Yang-Yen et al., 1991). Les bases moléculaires de cet antagonisme réciproque n'ont pas été élucidées même si plusieurs hypothèses ont été proposées (pour références et revue, voir (Altucci and Gronemeyer, 2001)) (**figure 8**). De manière intéressante, il a été formellement démontré que certains effets antitumoraux des rétinoïdes reposent exclusivement sur leur activité anti AP-1. C'est notamment le cas dans certains modèles *in vivo* de carcinogenèses chimiquement induites (Huang et al., 1997). De nouveaux rétinoïdes synthétiques pouvant inhiber sélectivement l'activité AP-1 sans stimuler la transcription ont été caractérisés (Chen et al., 1995). Ils peuvent effectivement inhiber la prolifération de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (Fanjul et al., 1994). Cependant, l'action antitumorale des rétinoïdes n'est pas restreinte à leur activité anti AP-1 et de nombreux effets indépendants de cet antagonisme ont été rapportés (de Vos et al., 1997; Giannini et al., 1997).

Les récepteurs à l'AR peuvent également interférer avec d'autres voies de signalisation directement impliquées dans le développement de cancers. Il a été récemment démontré que les rétinoïdes peuvent antagoniser la transcription médiée par les protéines Smad 3 et 4 en réponse au TGF- β . Une interaction directe entre RAR α et smad 3 semble être responsable de cette interférence et cette interaction peut être modulée par les ligands de RAR (Pendaries et al., 2003). Un autre exemple de répression médiée par les récepteurs aux rétinoïdes est celui de la voie oncogénique de la β -caténine (Easwaran et al., 1999). Cependant dans ce cas, le mécanisme proposé pour expliquer la trans-répression implique une interaction indirecte avec le coactivateur p300 (Shah et al., 2003).

A l'inverse, les récepteurs aux rétinoïdes peuvent potentialiser l'activation de la transcription induite par d'autres voies de signalisation. C'est par exemple le cas du facteur de

transcription impliqué dans la différenciation myéloïde GATA-2, qui, par sa capacité à lier RAR α , permet à l'AR de réguler la transcription à partir d'éléments de réponse spécifiques de GATA (Tsuzuki et al., 2004).

Cependant, dans la plupart des cas observés, la potentialisation de la transcription par les récepteurs aux rétinoïdes repose sur la formation d'« enhanceosomes », c'est à dire de complexes multiprotéiques regroupant des facteurs de transcription, protéines coactivatrices et structurales et dont l'intégrité est nécessaire afin d'obtenir une réponse maximale. En effet, RAR est ainsi capable de coopérer avec SF-1 pour transactiver le promoteur de oct-3/4 (Barnea and Bergman, 2000) ou avec GABP et Sp1 dans le cas de la régulation du promoteur de CD18 dans les cellules myéloïdes (Bush et al., 2003). Ces effets synergiques résultent a priori d'un recrutement coopératif de corégulateurs, de complexes de remodelage de la chromatine ou de la machinerie transcriptionnelle au promoteur. Ainsi, différentes voies de signalisation peuvent coopérer pour aboutir à l'activation d'un même gène cible.

Une connaissance plus approfondie des différentes voies de signalisation et de leurs cibles transcriptionnelles pourrait permettre d'induire une activation synergique de gènes intéressants au point de vue thérapeutique.

5. Effets non génomiques.

La localisation subcellulaire de certains récepteurs nucléaires n'est pas exclusivement nucléaire. Elle leur permet d'agir selon un mécanisme « non-génomique », c'est-à-dire qui ne module pas la transcription.

Une partie des effets cellulaires des oestrogènes ou des corticoïdes est induite de manière beaucoup trop rapide pour être médiée par une activation de la synthèse d'ARN et de protéines. Or, les récepteurs ER, GR ou PR ayant également été localisés au niveau de la membrane cellulaire (Pietras and Szego, 1977), ils ont rapidement été suspectés d'être à l'origine de ces effets « non génomiques » des hormones. En effet, il a ensuite été prouvé que ER membranaire activé par son ligand est capable d'activer différentes voies de signalisation telles que les MAPK ou les récepteurs couplés aux protéines G (pour revue, voir (Simoncini et al., 2003)). De plus, les effets positifs des oestrogènes (par exemple la vasodilatation) et des corticoïdes (effets anti-inflammatoires ou anti athérogène) sur le système cardiovasculaire sont en partie médiés via l'activation de l'axe PI3K/akt/eNOS par ER (Simoncini et al., 2000)

ou GR (Hafezi-Moghadam et al., 2002) dans les cellules endothéliales vasculaires.

Dans le cas de RAR ou RXR aucun de ces effets n'a encore été décrit, pas plus qu'une possible localisation membranaire. Cependant, des résultats récents ont remis en cause la localisation exclusivement nucléaire de RXR et ont démontré qu'il était capable de faire la navette entre les compartiments nucléaire et cytoplasmique (Katagiri et al., 2000; Prufer and Barsony, 2002). En parallèle, l'équipe de Zhang en 2000 a démontré qu'en présence de stimuli apoptotiques, le récepteur orphelin TR3 était transloqué du noyau à la membrane mitochondriale pour induire l'apoptose en favorisant le relarguage du cytochrome c dans le cytoplasme (Li et al., 2000). Un mécanisme d'action a été proposé : TR3 est ainsi capable d'interagir au niveau de la membrane mitochondriale avec la protéine Bcl-2, et d'induire un changement conformationnel entraînant sa conversion en une protéine pro-apoptotique (Lin et al., 2004a). Ces effets apoptotiques non génomiques de TR3 ont été également observés dans de nombreuses cellules cancéreuses d'origine tissulaire diverse et notamment dans des cellules de carcinomes ovariens en réponse au pseudo-rétinoïde CD437 (Dawson et al., 2001; Holmes et al., 2003a; Jeong et al., 2003; Wilson et al., 2003) (voir chapitre IV 3).

Fin 2004, la même équipe a finalement montré que RXR via son hétérodimérisation avec TR3 est responsable de l'export nucléaire de TR3 et de son ciblage mitochondrial, phénomène non inductible par le ligand et qui peut au contraire être inhibé par un agoniste de RXR (Cao et al., 2004). Un autre article publié simultanément démontre que le traitement des cellules gastriques par l'AR *9-cis* induit la translocation de l'hétérodimère TR3-RXR à la mitochondrie et l'apoptose des cellules (Lin et al., 2004b). Dans ce cas, la translocation serait dépendante de l'activation de RXR par son ligand.

Ainsi RXR, via une activité non génomique, peut contribuer à l'induction de l'apoptose dans différents types cellulaires. Le rôle joué par l'agoniste de RXR reste encore à déterminer ainsi que les signaux potentiels qui induiraient cette translocation suite au signal pro-apoptotique.

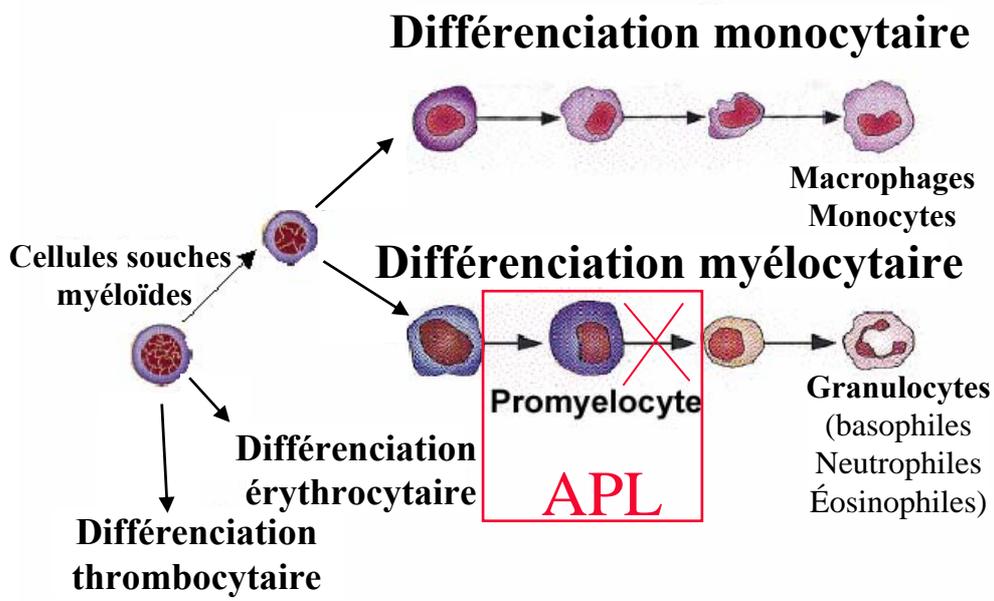


Figure 9 : Représentation schématique des étapes de différenciation monocytaire et myélocytaire.

Les cellules souches myéloïdes peuvent se différencier selon les différentes voies monocytaires, myélocytaires, érythrocytaire et thrombocytaire.

Un blocage de la différenciation conduit à l'accumulation dans le sang et la moelle de blastes promyélocytaires immatures caractéristiques de la leucémie promyélocytaire aiguë (APL).

III. Rétinoïdes et cancers.

Une relation forte entre le développement du cancer et la vitamine A et ses dérivés a été établie par de nombreux travaux ces dernières décennies (voir paragraphe I.3.). Ces observations ont conclu à l'hypothèse selon laquelle un niveau physiologique de rétinoïde protège l'organisme contre le développement de lésions pré-malignes et malignes. Les récepteurs nucléaires étant les médiateurs du signal rétinoïde, il n'est pas surprenant de constater que des défauts de leur niveau d'expression ou de leurs fonctions sont associés au processus de transformation tumoral. Deux exemples illustrent cette observation : le cas de la leucémie promyélocytaire aiguë (APL) dans laquelle le récepteur $RAR\alpha$ est fusionné à une autre protéine et dont la fonction est par ce biais altérée, et le cas de $RAR\beta$ dont la perte d'expression est rapportée dans de nombreux cas de cancers dès les premières étapes de la carcinogenèse. Enfin, de part leur activité anti-proliférative, différenciative ou apoptogénique, les rétinoïdes, seuls ou combinés à d'autres agents chimiothérapeutiques sont déjà utilisés en clinique ou sont actuellement en phase d'essais (<http://clinicaltrials.gov/>).

1. La Leucémie Promyélocytaire Aiguë.

Le cas de l'APL est un modèle dans le traitement des cancers : il représente un des cancers les mieux compris au niveau moléculaire et incarne un exemple de réussite de thérapie ciblée d'un cancer.

L'identification de l'APL en tant que sous-type particulier de leucémie myéloïde aiguë (AML) remonte en 1957. Les premiers traitements basés sur l'utilisation d'anthracyclines (Bernard et al., 1973) se sont révélés relativement inefficaces jusqu'en 1986, date à laquelle un groupe chinois a initié les premiers traitements par ATRA (Huang et al., 1988). Cependant, les bases moléculaires du développement de l'APL étaient encore inconnues à l'époque et c'est un peu par hasard que l'AR a ainsi connu ses premiers succès.

1.1.Description.

L'APL est caractérisée par une accumulation dans la moelle osseuse et dans le sang de précurseurs myéloïdes immatures bloqués au stade promyélocytaire (**figure 9**). Un traitement

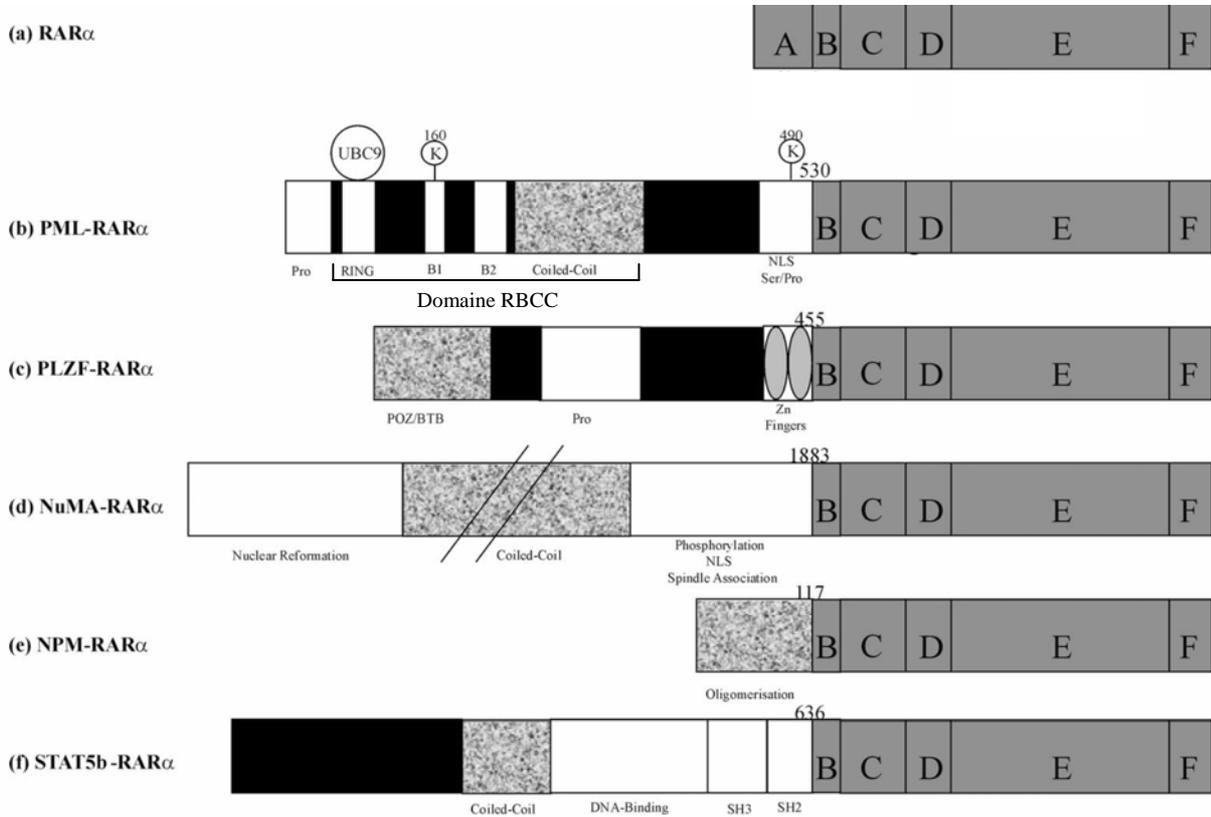


Figure 10 : RAR α et les différentes protéines de fusion X-RAR α responsables de la leucémie APL.

Les domaines d'homomérisation ou d'oligomérisation des partenaires de fusion de PML-RAR α sont représentés en gris marbré.

D'après Mistry *et al* 2003.

par l'AR combiné à une chimiothérapie classique permet de restaurer la différenciation de ces précurseurs immatures et d'induire ainsi une rémission complète chez plus de 70% des patients traités.

Au niveau moléculaire, l'APL est associée à une translocation chromosomique réciproque impliquant le gène codant pour RAR α situé sur le chromosome 17 qui peut être fusionné à 5 gènes partenaires répertoriés codant pour PML (promyelocytic leukemia), PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger), nucleophosmin, Numa (nuclear mitotic apparatus) ou Stat 5 (pour revue (Melnick and Licht, 1999)) (**figure 10**). Dans 95% des cas, le gène impliqué dans la translocation est celui codant pour la protéine PML générant ainsi une protéine PML-RAR α et sa réciproque RAR α -PML (de The et al., 1991).

1.2. Potentiel oncogénique de la protéine de fusion PML-RAR α .

La protéine PML-RAR α contient les principaux domaines fonctionnels de la protéine PML fusionnés à RAR α au niveau de son domaine B. La protéine réciproque RAR α -PML ne contient que la région A de RAR fusionné à la partie C-terminale de PML et son action semble plus limitée. Ainsi le potentiel oncogénique de la translocation t(15 ;17) provient en majorité de PML-RAR α . Différents points de rupture dans la séquence génomique de RAR α et PML et des phénomènes d'épissage alternatifs donnent lieu à des versions quelque peu différentes de la protéine de fusion. Elles conservent cependant toutes les mêmes fonctions principales (pour revue, voir (Zelent et al., 2001)). Deux caractéristiques principales sont nécessaires pour la génération d'une leucémie : un blocage dans la différenciation et une prolifération indéfinie des blastes associée à une résistance au stress. L'effet dominant négatif de PML-RAR α sur les fonctions de transactivation de RAR α mais aussi sur la fonction suppresseur de tumeur de PML permettent la coïncidence de ces 2 caractéristiques.

1.2.1. RAR α dans la différenciation neutrophile normale.

Le fait que RAR α soit altéré dans tous les cas observés d'APL suggère sa contribution potentielle dans le contrôle de la prolifération des promyélocytes ainsi que leur différenciation en neutrophiles. En fait, l'axe AR/RAR α semble jouer un rôle dans l'engagement des cellules souches dans cette voie de différenciation : l'AR a la capacité de diriger les précurseurs hématopoiétiques pluripotents dans la voie granulocytaire (Tsai and Collins, 1993) et de

reprogrammer des progéniteurs déjà engagés dans les voies érythroïdes et monocytaires vers une destinée neutrophile (Paul et al., 1995; Tocci et al., 1996). Or, les souris déficientes en RAR α présentent un nombre normal de neutrophiles démontrant de manière surprenante que RAR α n'est pas nécessaire pour la différenciation neutrophile (Kastner and Chan, 2001).

Cependant, d'autres observations indiquent que l'axe AR/RAR α serait capable de moduler cette différenciation. En effet, les précurseurs granulocytaires des souris RAR α -/- différencient plus rapidement que des précurseurs issus de souris sauvages lorsqu'ils sont cultivés *ex vivo*. En accord avec ces résultats, l'administration d'un antagoniste de RAR (BMS493) à des souris sauvages pendant 3 jours conduit à une accumulation de granulocytes immatures dans leur moelle osseuse (Kastner et al., 2001), phénomène également observé dans le syndrome de déficience en vitamine A (VAD). Ces observations suggèrent fortement que les rétinoïdes agissent sur la différenciation neutrophile *in vivo*. En parallèle, un effet inhibiteur de RAR α en absence de ligand a été démontré puisque la surexpression de RAR α bloque la différenciation de précurseurs hématopoiétiques immatures (Du et al., 1999; Onodera et al., 1995).

En conclusion, l'axe AR/RAR α n'est pas un régulateur essentiel de la différenciation neutrophile mais plutôt un modulateur. En accord avec le fonctionnement de RXR-RAR α au niveau transcriptionnel, RAR α inhibe la différenciation lorsqu'il n'est pas activé par des rétinoïdes (certainement en agissant en tant que répresseur transcriptionnel) alors qu'il induit cette même différenciation lorsque le ligand est présent. Ainsi, en présence d'antagoniste ou en absence d'agoniste (VAD), la fonction de répression est renforcée et la différenciation est bloquée. Il en est de même pour la protéine de fusion PML-RAR α qui inhibe la différenciation des cellules en amplifiant la fonction physiologique de répresseur de RAR α .

1.2.2. PML et ses fonctions biologiques normales.

PML est une protéine nucléaire localisée dans de grosses structures nucléaires multi protéiques nommés corps nucléaires PML. La fonction de ces corps nucléaires n'est pas encore totalement élucidée mais PML semble avoir un rôle crucial dans leur formation et leur stabilité (Jensen et al., 2001). Le domaine d'interaction protéine-protéine RBCC (RING, B boxes, Coiled-coil domain) et notamment sa sumoylation au niveau de la lysine 160 sont responsables de la localisation de PML dans ces corps nucléaires (Jensen et al., 2001).

Dans les cellules APL, la protéine de fusion PML-RAR α interagit avec la protéine PML, induit sa délocalisation et par conséquent la désorganisation des corps nucléaires PML (Koken et al., 1994). Ce phénomène est réversé lors d'un traitement par l'AR (Weis et al., 1994). Cependant, la contribution de cette désorganisation des corps PML dans le phénomène d'oncogénèse est encore inconnue.

Différents travaux incluant l'étude de souris et cellules PML $^{-/-}$ ont démontré un rôle de suppresseur de tumeur pour PML de part ses fonctions dans l'apoptose, la prolifération et la senescence (pour revue, voir (Salomoni and Pandolfi, 2002; Takahashi et al., 2004). Ainsi, l'effet dominant négatif de PML-RAR α sur PML représente certainement une étape cruciale dans le développement de la leucémie en conférant aux blastes exprimant la protéine de fusion un avantage prolifératif.

Notamment, il a été démontré qu'en réponse à l'expression d'oncogènes, PML forme un complexe ternaire avec CBP et p53, ceci permettant l'acétylation de p53 par CBP. P53 acétylée est stabilisée, son activité est augmentée et on observe une induction de l'apoptose suite à la transactivation des gènes cibles de p53 (Pearson et al., 2000). Les avis divergent sur la restriction de la localisation de ce complexe dans les corps PML (Bischof et al., 2002). PML interagit également avec Daxx, une protéine impliquée dans différentes voies de signalisation apoptotiques. Daxx est un répresseur transcriptionnel puissant et sa séquestration dans les corps PML via sa liaison à PML pourrait être une manière très efficace de moduler la transcription en réponse à des signaux induisant la régulation de la formation des corps PML. Ces 2 voies impliquant p53 et Daxx sont altérées dans des cellules PML $^{-/-}$ ainsi que dans des cellules APL par la formation de la protéine de fusion PML-RAR α .

1.2.3. L'expression de PML-RAR α seule est insuffisante pour induire le phénotype APL.

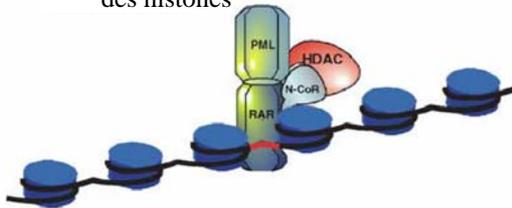
L'expression de PML-RAR α est-elle suffisante pour induire le phénotype APL ? Pour répondre à cette question, des modèles cellulaires et murins ont été utilisés. Grignani *et al.* ont démontré que l'expression de la protéine de fusion dans les cellules U937 induit une diminution de la capacité de ces cellules à différencier sous l'action de différents stimuli (Grignani et al., 1993). Ils ont ensuite prouvé que l'expression de PML-RAR α dans des cellules progéniteurs hématopoïétiques humains via une infection rétrovirale induit le développement d'un phénotype APL (Grignani et al., 2000).

Différents modèles de souris ont été produits utilisant la stratégie transgénique classique ou la stratégie « knock-in ». Les résultats obtenus suggèrent que le développement de l'APL requiert un ciblage de PML-RAR α dans le compartiment progéniteur approprié en utilisant l'expression dirigée de la protéine de fusion par des promoteurs adéquats (Brown et al., 1997a; Grisolano et al., 1997; He et al., 1997; Westervelt et al., 2003). Ces souris développent des leucémies avec une pénétrance variable en fonction du promoteur utilisé (de 10 à 90 %) mais seulement après une période de latence variant de 6 mois à 1 an, suggérant qu'un autre événement est nécessaire pour le développement de la leucémie. Minucci *et al.* ont utilisé une technique de transduction rétrovirale de PML-RAR α dans des progéniteurs hématopoïétiques purifiés. Une injection de ces cellules dans des souris syngéniques irradiées conduit au développement de leucémie assez rapidement (4 mois) avec une pénétrance élevée (Minucci et al., 2002). Cependant l'origine monoclonale des leucémies obtenues est également en faveur d'un modèle à 2 événements, où l'expression de PML-RAR α seule n'est pas suffisante mais requiert l'accumulation d'une autre altération génétique pour permettre le développement de la leucémie.

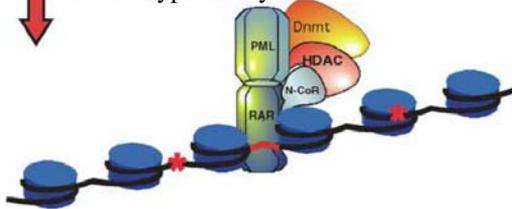
Différents « deuxièmes événements » potentiels ont été proposés pour conduire au phénotype APL, parmi lesquels la protéine de fusion réciproque RAR α -PML dont l'expression concomitante à celle de PML-RAR α augmente la pénétrance de l'APL dans les souris (Pollock et al., 1999). Des anomalies cytogénétiques additionnelles ont également été invoquées (Le Beau et al., 2002) ainsi que l'expression d'une version mutée (constitutivement active) du récepteur à activité tyrosine kinase FLT3. Ces mutations ont été observées dans plus d'un tiers des cas humains d'APL (Kiyoi et al., 1997) (Kottaridis et al., 2001). Des modèles murins ont confirmés l'obtention d'un phénotype APL dans 100% des cas avec un temps de latence très court lorsque la version mutée de FLT3 est coexprimée avec PML-RAR α . Une réponse plus efficace de ATRA lorsqu'il est combiné à un inhibiteur d'activité tyrosine kinase a d'ailleurs été observée (Kelly et al., 2002; Sohal et al., 2003).

En conclusion, l'expression de la protéine de fusion seule ne permet pas d'induire une leucémie APL et une seconde altération est nécessaire. De plus, un ciblage très précis du compartiment cellulaire, du stade de différenciation et du niveau d'expression détermine le développement du phénotype APL.

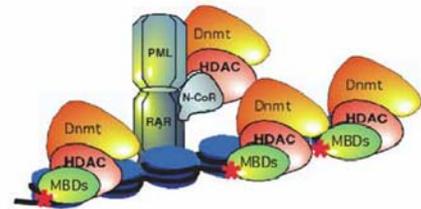
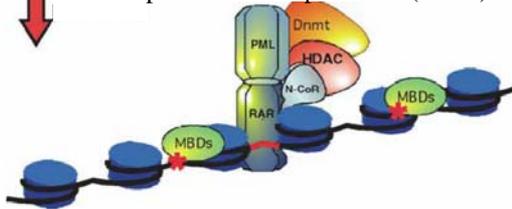
Le recrutement des HDACs induit l'hypoacétylation des histones



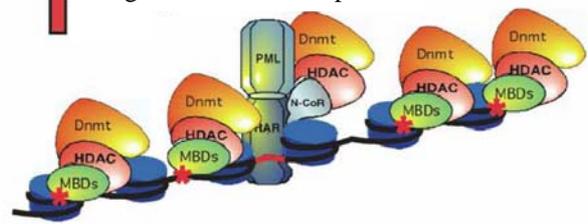
Le recrutement des DNMTs induit l'hyperméthylation de l'ADN



Les CpGs méthylés sont des sites de liaison pour certaines protéines (MBD)



La chromatine est compactée et les gènes cibles sont réprimés



Les protéines MBD recrutent à leur tour des complexes corépresseur

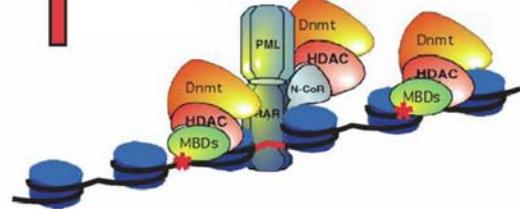


Figure 11 : Modèle de la répression transcriptionnelle par PML-RAR α .

La protéine de fusion PML-RAR α reconnaît une séquence cible sur l'ADN (en rouge) et recrute différentes enzymes telles que les histones déacétylases (HDAC) ou les DNA méthyl transférase (Dnmt) dont l'activité induit l'hypoacétylation des histones, la méthylation de l'ADN sur des sites CpG et en conséquence, la répression de la transcription. Les CpGs méthylés sont des sites de liaisons de protéines MBD (Methyl-CpG binding protein), qui peuvent à leur tour recruter d'autres enzymes. La chromatine est alors compactée et les gènes cibles réprimés. La propagation de ce mécanisme pourrait même affecter les gènes voisins.

D'après Villa *et al* 2004.

1.2.4. Expression de PML-RAR α et conséquences moléculaires.

Il est très étonnant de réaliser le nombre de voies de signalisation ou processus moléculaires modifiés par l'expression de cette protéine. Premièrement, PML-RAR α interfère avec les fonctions de RAR α via sa liaison sur les éléments de réponse de RAR α et la répression des gènes cibles. PML-RAR α , par sa capacité d'oligomérisation, forme des complexes stables avec les co-represseurs NCoR et SMRT qui recrutent à leur tour des complexes contenant des activités HDAC (Grignani et al., 1998; Lin and Evans, 2000; Lin et al., 1998; Minucci et al., 2000). PML-RAR α recrute également des enzymes de méthylation de l'ADN (DNMT) qui agissent sur les îlots CpGs des promoteurs (Di Croce et al., 2002; Fazi et al., 2005). Donc en l'absence de ligands, la présence des HDAC et de DNMT maintient la chromatine dans un état répressif pour la transcription (**figure 11**). Seule l'addition d'une concentration élevée d'AR va permettre la dissociation des corépresseurs puis le recrutement des complexes coactivateurs (Redner et al., 2000 ; Shao et al., 2000) (**figure 12 a**). Ceci conduit à l'activation de la transcription, la différenciation des cellules myéloïdes et la rémission clinique. Récemment, Kamashev *et al.* ont démontré que la protéine de fusion peut se lier à un spectre d'élément de réponse beaucoup plus large que RAR α . Ainsi, elle serait capable de réprimer la transcription d'un grand nombre de gènes, sans se limiter aux gènes cibles de l'AR (Kamashev et al., 2004).

D'autres effets sont induits par l'expression de la protéine de fusion PML-RAR α . Il a été notamment suggéré qu'elle pourrait séquestrer RXR et le rendre indisponible pour ses autres partenaires (Dong et al., 2004; Perez et al., 1993; Weis et al., 1994). Segalla *et al.* démontrent qu'elle possède des capacités de répression additionnelles indépendantes des HDAC et que ses fonctions de remodelage de la chromatine et de recrutement des coactivateurs sont altérées (Segalla et al., 2003).

Cependant, l'altération d'autres voies de signalisation est également impliquée dans le développement du phénotype APL. En effet, la protéine de fusion par sa liaison à PML recrute également p53. Les complexes HDACs associés à PML-RAR α , en plus de déacétyler les histones, vont également déacétyler p53 qui est ensuite dégradée par le protéasome. P53 contrôle la stabilité du génome. Son inhibition par PML-RAR α augmente la survie des blastes en réponse au stress et favorise ainsi l'apparition d'une deuxième altération ou mutation génétique nécessaire pour le développement du phénotype APL (Insinga et al., 2004). Ainsi, un traitement par des inhibiteurs de HDAC peut agir à 2 niveaux : inhiber le phénomène

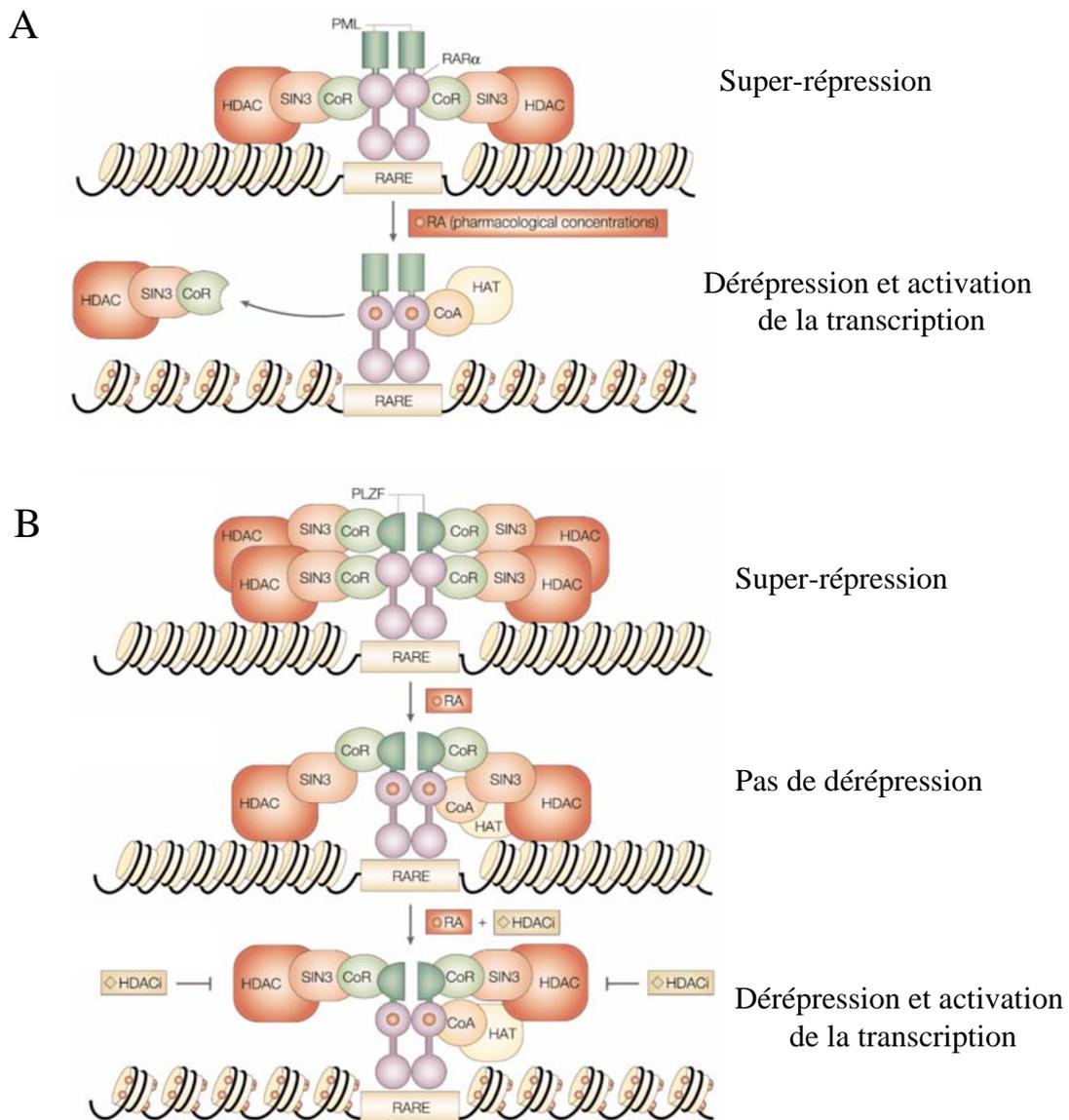


Figure 12 : Bases moléculaires de la réponse à l'AR dans les cellules APL

A: La protéine PML-RAR α , contrairement à RAR α , dimérise ou oligomérisse et recrute plusieurs complexes HDAC induisant un état réprimé de la chromatine. Des concentrations pharmacologiques d'AR sont nécessaires pour induire la dissociation des complexes corépresseur, le recrutement des complexes coactivateur et l'activation de la transcription.

B: La protéine de fusion PLZF-RAR α contient 2 domaines d'interaction avec les corépresseurs. L'addition d'AR ne parvient à dissocier que les complexes liés à la partie RAR α de la protéine de fusion. Cependant, la combinaison avec un inhibiteur de HDAC (HDACi) bloque l'activité de l'enzyme et réverse l'état de répression de la chromatine, permettant la transcription des gènes cibles.

D'après Altucci *et al* 2001.

d'acétylation des histones mais également de p53, permettant une stabilisation de la protéine. Zhu *et al.* ont démontré que la sumoylation de PML-RAR α (lysine 160) contribue à la répression de PML-RAR α certainement via le recrutement du répresseur Daxx à la partie PML de la protéine de fusion. De manière surprenante, une mutation de PML-RAR α sur son site de sumoylation altère sa capacité d'induire un blocage dans la différenciation granulocytaire et d'induire ainsi une leucémie APL (Zhu et al., 2005).

Ces données récentes démontrent que l'étiologie d'APL est très complexe et implique l'altération de différentes fonctions et voies de signalisation. En plus du recrutement aberrant des HDAC et DNMT, l'interférence avec la signalisation de p53, le phénomène de sumoylation ainsi que l'expression de la protéine de fusion réciproque semblent nécessaires dans le développement de la leucémie.

1.2.5. Cas particulier de PLZF-RAR α .

Quatre protéines de fusion alternatives représentant des cas très sporadiques d'APL ont été identifiées. Les cellules exprimant Stat5-RAR α , NMP-RAR α et NuMA-RAR α ont également la capacité de répondre à l'AR mais sont extrêmement rares. Cependant, les patients exprimant la protéine PLZF-RAR α sont réfractaires au traitement par l'AR. Au niveau moléculaire, cette protéine est capable de recruter les co-represseurs via la partie RAR α mais aussi via la partie PLZF (Grignani et al., 1998; Guidez et al., 1998; He et al., 1998; Lin et al., 1998). Le traitement par ATRA même aux doses pharmacologiques est alors incapable d'induire la dissociation des corepresseurs liés à la partie PLZF. Cependant l'inhibition pharmacologique des HDAC par des inhibiteurs sélectifs va permettre de restaurer une réponse à l'AR et d'induire la différenciation des cellules myéloïdes (**figure 12 b**).

1.3. Mécanismes de la réponse à l'AR et traitements alternatifs.

ATRA induit la rémission des patients atteints d'APL selon plusieurs mécanismes. Dans un premier temps, il se lie à PML-RAR α , induit la dissociation des corépresseurs conduisant à l'activation de la transcription des gènes cibles de RAR α . Il a été récemment démontré qu'un traitement par ATRA induit également une diminution d'expression des différentes DNMT et une diminution de leur recrutement aux promoteurs des gènes cibles (Fazi et al., 2005). De plus ATRA induit la dégradation de PML-RAR α par l'action des caspases (Nervi et al., 1998)

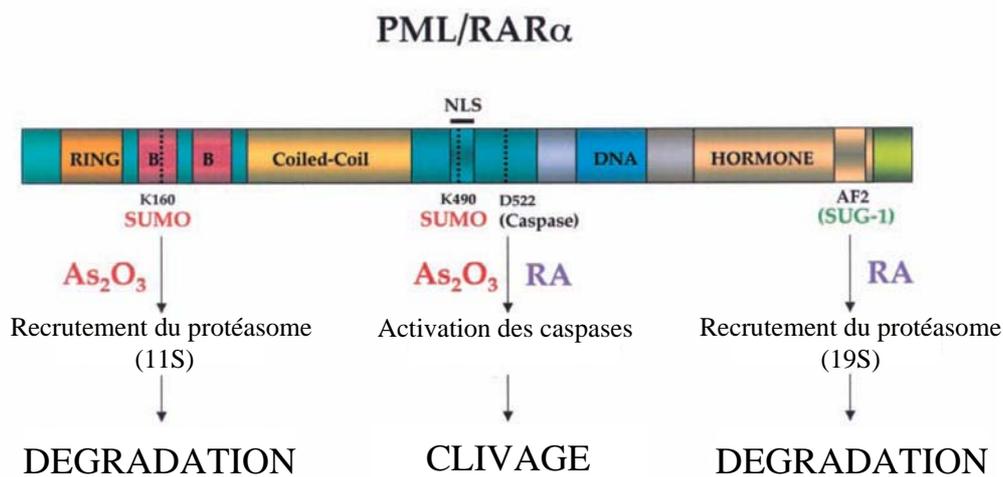


Figure 13 : Représentation schématique des voies de dégradation de PML-RAR α

L'arsenic et l'AR ciblent des voies différentes induisant la dégradation de la protéine oncogénique. L'arsenic induit la modification covalente de la partie PML de la protéine par le peptide SUMO et recrute ainsi le protéasome. Le signal de dégradation de la protéine de fusion par l'AR implique le recrutement du protéasome par sa sous-unité SUG-1. Un clivage spécifique de la protéine par les caspases a été également rapporté suite au traitement par l'AR.

D'après Zhu *et al* 2001.

et par l'activation de la voie ubiquitin/protéasome (Kopf et al., 2000; Zhu et al., 1999). PML est ainsi libérée et elle va permettre la reformation des corps PML. En outre, la dégradation de PML-RAR α va mettre fin à la séquestration de RXR qui pourra interagir à nouveau avec les autres récepteurs nucléaires (Koken et al., 1994 ; Weis et al., 1994).

Cependant, la phase de rémission est de courte durée (environ 6 mois) de part l'acquisition progressive d'une résistance à l'AR. Pour y remédier, le traitement actuel des patients consiste à combiner des antracyclines (agents chimiothérapeutiques classiques) avec ATRA, et le taux de survie après 5 ans dépasse les 70 % (pour revue, voir (Degos and Wang, 2001)). Cependant, dans près de 30% des cas, le phénomène de résistante est à nouveau constaté et provient majoritairement d'une augmentation du catabolisme de l'AR via le système P450 ou la séquestration de l'AR par les protéine cytoplasmiques CRABP II (pour revue, voir (Freemantle et al., 2003)). Dans tous les cas, ceci conduit à une diminution de la disponibilité de l'AR dans les cellules APL. Dans certains cas, la présence d'une mutation dans le domaine de liaison du ligand de PML-RAR α a été constatée. Des efforts sont réalisés pour diminuer les phénomènes d'acquisition de résistance.

Dans les cas où le traitement est malgré tout insuffisant, d'autres perspectives thérapeutiques existent. En effet, en parallèle à la découverte de l'effet thérapeutique de l'AR, le trioxyde d'arsenic a également été approuvé pour le traitement des cas d'APL résistants à l'AR (pour revue, voir (Zhu et al., 2002a)). En effet, le trioxyde d'arsenic est capable d'induire la différenciation et l'apoptose des cellules APL dans des modèles murins (Kinjo et al., 2000), et des effets synergiques ont été décrits avec l'AR (Lallemand-Breitenbach et al., 1999). De manière intéressante, il a été démontré que le trioxyde d'arsenic induit également la dégradation de la protéine de fusion PML-RAR α mais en ciblant la partie PML de la protéine alors que l'AR cible la partie RAR α (Lallemand-Breitenbach et al., 2001; Shao et al., 1998) (**figure 13**). Ainsi, il semble que la dégradation de la protéine de fusion oncogénique PML-RAR α contribue effectivement à l'effet thérapeutique des 2 molécules même si des effets parallèles propres à chacune entrent également en ligne de compte.

Il est également possible d'améliorer l'efficacité de ces traitements en les combinant avec d'autres molécules comme par exemple les inhibiteurs de HDAC ou de DNMT mais également des molécules capables d'induire la différenciation telles que le GM-CSF ou encore des analogues de l'AMP cyclique (pour revue, voir (Benoit et al., 2001a)). Il est

maintenant clairement établi que l'AMPC peut synergiser avec l'AR via l'activation de la PKA pour induire la différenciation des cellules NB4, seul modèle cellulaire d'APL (Lanotte et al., 1991) et des cellules NB4-R1, sous-clone résistant à l'AR (Ruchaud et al., 1994, Duprez, 1996 #327). Dans les cellules NB4, une concentration pharmacologique d'AR est nécessaire pour induire la différenciation des cellules. Cependant, une augmentation du niveau d'AMPC endogène permet leur différenciation par une dose physiologique cent fois plus faible d'AR (Quenech'Du et al., 1998). La combinaison entre un analogue de l'AMPC et un agoniste de RXR est également capable d'induire la différenciation des cellules APL sensibles et résistantes à ATRA (Benoit et al., 1999). Cette partie est développée dans le chapitre IV.4. Un effet synergique a été également rapporté entre l'AMPC et le trioxide d'arsenic dans ces mêmes cellules NB4 ainsi que dans des cellules de patients (Zhu et al., 2002b).

De manière intéressante, Guillemain *et al.* ont démontré l'existence de ces différentes signalisations croisées *in vivo* dans des modèles de souris APL. Mais surtout, ils ont rapporté un cas de rémission d'un patient résistant aux thérapies AR/arsenic en combinant à ces 2 premiers traitements un inhibiteur de phosphodiesterase qui induit une augmentation de la concentration endogène d'AMPC (Guillemain et al., 2002). Ces résultats démontrent clairement que l'AMPC peut sensibiliser des cellules résistantes à l'action de l'AR et donner de nouveaux espoirs de thérapie.

Au niveau moléculaire la synergie AMPC/AR n'est toujours pas complètement élucidée. Cependant, Kamashev *et al.* ont démontré que l'AMPC induit une augmentation de la transcription des gènes cibles de PML-RAR α . Ils suggèrent qu'une phosphorylation de la protéine de fusion par la PKA pourrait induire un changement conformationnel conduisant à cette augmentation de la transcription (Kamashev et al., 2004). Selon leur modèle, l'AMPC ainsi que les autres agents différenciatifs tels que l'arsenic, agirait alors de concert avec l'AR pour déréguler les gènes cibles de PML-RAR α et permettre la différenciation spontanée des cellules.

La compréhension des bases moléculaires de la leucémie APL a énormément progressé ces dernières années et on est en mesure à présent d'analyser les modifications induites par l'expression de la protéine de fusion PML-RAR α . Cependant, tous les mystères ne sont pas élucidés. On peut par exemple se demander pourquoi la protéine PML est le partenaire de

RAR α impliqué dans 95% des cas. De même, la désorganisation des corps nucléaires PML joue-telle un rôle dans le phénotype APL ou n'en est-elle qu'une conséquence ? Quoi qu'il en soit, les corps PML renferment de nombreuses autres protéines dont la délocalisation a certainement des effets sur d'autres voies de signalisation. Pourquoi cette translocation n'est jamais observée dans d'autres cancers comme des tumeurs solides ? Si les mécanismes de répression de la transcription sont élucidés, la liste des gènes cibles dont l'expression est réprimée n'est pas vraiment connue. Il semble en effet que PML-RAR α ne réprime pas seulement les gènes cibles de RAR α mais possède un spectre plus large d'éléments de réponse *in vivo*. De plus, même si différents mécanismes ont été mis en évidence concernant les fonctions de PML-RAR α , il est difficile de déterminer la contribution réelle de chacun dans le processus d'oncogenèse *in vivo*. Néanmoins, la connaissance de ces mécanismes va permettre de d'améliorer les traitements utilisés pour traiter les patients APL avec notamment l'utilisation des inhibiteurs de HDACs ou de DNMT.

2. Implication de RAR β dans le développement des cancers.

2.1. Rôle suppresseur de tumeur .

De nombreuses études ont montré que l'expression de RAR β 2 diminue dramatiquement au cours du processus de carcinogenèse dans différents types de tumeurs solides dont les cancers du sein, du poumon, de la tête et du cou (Wan et al., 1999; Widschwendter et al., 1997; Xu et al., 1997a ; Xu et al., 1997b). La réexpression de RAR β dans ces cellules cancéreuses altère leur capacité tumorigénique (Houle et al., 1993). De plus des souris transgéniques exprimant une séquence antisens de RAR β développent un grand nombre de tumeurs comparé aux souris contrôle (Berard et al., 1996).

RAR β est un gène cible direct de l'AR et possède un élément de réponse au niveau de son promoteur (Hoffmann et al., 1990). L'induction de RAR β par un traitement à l'AR pourrait donc représenter un élément clé dans la thérapie par l'AR. D'ailleurs, la réexpression de RAR β dans des cellules résistantes aux rétinoïdes permet de restaurer leur sensibilité suggérant qu'il est le médiateur de l'activité antiproliférative des rétinoïdes (Wan et al., 1999; Xu et al., 1999).

2.2. Mécanismes épigénétiques de la répression.

De nombreuses études ont essayé de déterminer le mécanisme responsable de la perte d'expression de RAR β dans les cellules tumorales. Aucun changement dans la structure du gène tel qu'une mutation ou un réarrangement n'a pu être observé (Bartsch et al., 1992; Hu et al., 1991).

Par contre, des phénomènes épigénétiques ont été mis en cause. Une méthylation aberrante du promoteur de RAR β semble être le mécanisme majoritaire conduisant à l'extinction du gène. En effet, des études effectuées sur des biopsies de patients ou des cellules cancéreuses ont révélé la présence de différents résidus 5-méthyl-cytosine dans la région -46 à +251 pb du promoteur et ceci dans un grand nombre de tumeurs (Kim et al., 2004; Widschwendter et al., 2001; Youssef et al., 2004). L'hypoacétylation de l'histone H3 a également été démontrée (Suh et al., 2002).

La restauration de l'expression de RAR β endogène peut donc être une stratégie puissante pour traiter certaines lésions malignes. L'utilisation d'agents déméthylant tel que le 5-aza-2'-deoxycytidine ou également des inhibiteurs de HDAC sensibilisent les cellules à l'AR en permettant la réexpression de RAR β (Sirchia et al., 2002; Yang et al., 2002). Ainsi, l'utilisation de traitements épigénétique combiné à l'AR pourrait être envisagée, certains inhibiteurs de HDAC étant actuellement en cours d'essais cliniques. En outre, la méthylation du promoteur de RAR β pourrait représenter un marqueur moléculaire très fiable pour détecter au plus tôt les premiers stades de cancers et adapter ainsi le traitement (Lotan and Lotan, 2004).

Cependant, de nombreuses questions restent en suspens concernant RAR β et son rôle suppresseur de tumeur. Pourquoi est-il le seul des récepteurs à l'AR dont l'expression est ainsi modifiée ? De plus, la plupart des cellules cancéreuses qui n'expriment plus RAR β expriment les autres isotopes de RAR ainsi que RXR mais ceux-ci ne semblent pas capable de compenser la perte de RAR β et d'induire la réponse à l'AR. Certaines hypothèses peuvent être avancées et reposent sur des particularités structurales de RAR β comparé à RAR α . En effet, RAR β , de part une conformation différente de son hélice H12, se lie très faiblement aux corépresseurs (Farboud et al., 2003; Hauksdottir et al., 2003). Ainsi, alors que RAR α agit en tant que répresseur sur ses gènes cibles en absence de ligand, RAR β n'a pas cette fonction : il existe au contraire un niveau basal de transcription sans activation préalable par le ligand. Ainsi, l'hétérodimère RXR-RAR β serait plus ou moins permissif et activable aussi par un

agoniste de RXR (Germain et al., 2004). Ceci pourrait expliquer la raison pour laquelle RAR α ne peut pas substituer RAR β lorsque celui-ci est réprimé.

Une autre question majeure reste sans réponse : par quel mécanisme la perte de RAR β permet-elle le développement des tumeurs ? L'activité basale transcriptionnelle de RAR β permet certainement l'expression de gènes cibles impliqués dans la suppression de la carcinogénèse. Ainsi, l'inhibition de ces gènes suppresseur pourrait permettre le développement des tumeurs. De même, il semble que l'action anti-AP-1 du récepteur soit particulièrement forte dans le cas de RAR β (Lin et al., 2000a).

La résolution de la structure de RAR β a mis en évidence certaines particularités de son LBD, ce qui devrait permettre de générer des molécules agonistes ou antagonistes sélectives de cet isotype (Germain et al., 2004). L'utilisation de ces ligands pourra permettre de lever certaines interrogations.

3. Rétinoïdes et thérapie des cancers.

Un nombre impressionnant d'études réalisées sur des modèles cellulaires ou animaux ont conclu à des effets thérapeutiques potentiels des rétinoïdes. Ainsi de nombreuses études cliniques ont déjà été réalisées sur différents types de cancer. De manière très intéressante, elles ont démontré que les effets des rétinoïdes ne se limitent pas au traitement de ces cancers mais ont également une capacité à prévenir leur développement.

3.1. Les rétinoïdes en thérapie.

Différentes formes d'AR, de rétinoïdes ou rétinoides sont utilisées en clinique : L'AR *tout trans* (tretinoïn), l'AR *9-cis* (alitretinoïn), l'AR *13-cis* (isotretinoïn), le LG1069 (targretin) mais également les rétinoïdes atypiques (fenretinide). Les rétinoïdes atypiques sont des analogues synthétiques de l'AR mais dont le mécanisme d'action est largement inconnu : leur activité est en effet médiée en partie par des voies indépendantes des récepteurs à l'AR (voir chapitre IV.4.).

L'exemple type de l'utilisation des rétinoïdes en thérapie est bien entendu l'APL (voir chapitre III.1.5). Dans 3 autres cas de lésions malignes, les rétinoïdes sont également utilisés en thérapie. L'AR 9-cis a été approuvé pour le traitement du sarcome de Kaposi et l'AR 13-

cis est utilisé dans les cas de neuroblastomes de type IV suite à l'ablation de la tumeur (Reynolds et al., 2003). Le rexinoïde LG1069 est utilisé actuellement en second traitement des formes cutanées des lymphomes T (Zhang and Duvic, 2003).

De nombreux essais cliniques sont en cours actuellement pour étendre l'utilisation des rétinoïdes à d'autres types de cancers. Cependant, bien que de nombreuses cellules tumorales soient sensibles *in vitro* aux rétinoïdes, les succès ont été plutôt limités pour le traitement des tumeurs solides. De plus, la forte toxicité observée aux doses nécessaires pour une efficacité optimale limitent leur utilisation.

Une manière de diminuer cette toxicité tout en maintenant les effets positifs des rétinoïdes consiste à diminuer les doses utilisées et combiner les rétinoïdes avec d'autres traitement anti-cancéreux. Dans ces conditions, des résultats encourageants ont été obtenus dans un grand nombre d'essais cliniques. En particulier, la combinaison des agonistes de RAR (ATRA ou AR 9-cis) avec l'interféron, très étudiée *in vitro* et dans des modèles animaux (Lindner et al., 1997), fait l'objet de nombreux d'essais cliniques (pour revue, (Clarke et al., 2004a; Ortiz et al., 2002)). Récemment, cette combinaison a démontré son efficacité dans le cas de tumeurs lymphoïdes (Tsimberidou et al., 2004) et de leucémies myéloïdes chroniques (Egyed et al., 2003). De nombreux autres agents chimiothérapeutiques tels que le taxol ou le cisplatine peuvent également synergiser avec les rétinoïdes dans des cellules de cancers du sein ou de la peau (Shin et al., 2002; Vivat-Hannah et al., 2001).

Les rétinoïdes atypiques ont également montré un grand potentiel antiprolifératif en combinaison avec ces agents chimiothérapeutiques et des essais cliniques dans des cas de neuroblastomes, cancers ovariens ou de la prostate sont en cours (Ortiz et al., 2002).

Enfin, de grands espoirs sont portés par le LG1069. En effet, les rexinoïdes montrent une toxicité réduite comparé aux rétinoïdes et différentes études ont démontré qu'il pourrait traiter certains cancers du poumons en association avec les agents chimiothérapeutiques (Rigas and Dragnev, 2005).

3.2. Les rétinoïdes et la prévention des cancers.

La déficience en vitamine A a été associée à une incidence plus élevée de cancers dans différents tissus, ceci suggérant un rôle des rétinoïdes dans la prévention du développement des cancers. Des études réalisées sur les animaux et les premiers essais cliniques ont effectivement conclu à un rôle chimiopréventif. L'AR inhibe le processus de carcinogenèse en

interférant avec la phase de progression de la lésion plutôt qu'avec la phase d'initiation. Actuellement, la plupart des essais cliniques ciblent 2 types de population : les patients présentant des lésions pré-malignes ou les patients traités une première fois contre un cancer et qui présentent un risque élevé de rechute (pour revue, voir (Sun and Lotan, 2002)).

Dans la première catégorie, les rétinoïdes classiques ont effectivement démontré leur efficacité pour induire la régression de la leucoplasie (une lésion de la cavité buccale et oesophagienne), la kératose actinique cutanée (lésion de la peau suite aux dommages du soleil) et la dysplasie utérine, et sont effectivement utilisés en clinique pour ces différents cas (Sun and Lotan, 2002).

Les rétinoïdes sont également très efficaces pour prévenir le développement de deuxième tumeurs primaires. Ils sont actuellement utilisés pour traiter les patients atteints de Xeroderma pigmentosum (maladie génétique rare affectant la réparation de l'ADN) qui ont 1000 fois plus de risque de développer un cancer de la peau. Des résultats prometteurs ont été obtenus concernant le cancer du sein. Il semble en effet que le fenretinide diminue l'incidence de tumeurs du sein contralatérales chez les femmes pré-ménopausées (Veronesi et al., 1999). De plus, des études sur les animaux indiquent que le LG1069 combiné au tamoxifène inhibe le développement des tumeurs (Bischoff et al., 1998). Des essais cliniques sont en cours pour valider son utilisation potentielle. Un rétinoïde atypique, l'acide polyprénique, est capable de prévenir l'apparition d'un deuxième hépatocarcinome primaire d'environ 50% comparé aux sujets non traités (Muto et al., 1996). Enfin, deux études ont démontré que la combinaison de l'AR 13cis avec l'interféron- α et l' α -tocophérol aurait une incidence positive dans le développement de lésions secondaires ou tertiaires de la tête et du cou. Par contre, dans le cas du cancer des poumons, les rétinoïdes n'ont pour le moment pas encore prouvé leur efficacité mais des essais cliniques combinant d'autres molécules sont en cours (Tsao et al., 2004).

3.3. Amélioration des traitements .

Les rétinoïdes sont des molécules très prometteuses tant en thérapie qu'en prévention des cancers. Cependant il reste de nombreuses barrières à franchir pour généraliser leur utilisation, en commençant par les problèmes de toxicité et de résistance. Ainsi, pour limiter cette toxicité, de nouveaux rétinoïdes synthétiques avec des sélectivités plus réduites pour les récepteurs ont été développés et doivent être testés. Des résultats encourageants ont d'ailleurs

été obtenus avec le LG1069, un ligand sélectif de RXR qui présente une toxicité faible et une capacité antitumorale prouvée dans différents types de cancer. Il est également possible de combiner les rétinoïdes à d'autres molécules anticancer et cette stratégie a pour le moment démontré une grande efficacité. Enfin la possibilité de cibler l'apport des molécules de rétinoïdes dans les tissus à traiter permettrait de délivrer la dose appropriée dans ces tissus et d'épargner les autres, diminuant ainsi la toxicité globale de la molécule. Des études réalisées sur le rat ont démontré que l'inhalation de l'AR 13-cis pourrait être efficace dans la prévention des cancers du poumon (Dahl et al., 2000). L'encapsulation des rétinoïdes en liposomes est également en cours d'essai et semble conférer aux ligands une plus grande stabilité et une toxicité plus faible. L'idée de cibler sélectivement un tissu en utilisant des immunoliposomes portant des anticorps dirigés contre des marqueurs de surface cellulaires est également testée. Une première étude ciblant le traitement de mélanomes par le fenretinide est prometteuse (Pagnan et al., 1999).

Le second problème à résoudre concerne la résistance des cellules tumorales à l'AR. Chez certains patients, cette acquisition de résistance provient d'une accélération du catabolisme de l'AR par des enzymes P450 rétinol acide hydroxylase dont Cyp26 dont l'expression est directement induite par l'AR. L'utilisation d'inhibiteurs de ces enzymes capables de bloquer le métabolisme de l'AR tels que le liarozole ont été développés (Njar, 2002). Les résultats encourageants obtenus *in vitro* n'ont pas été confirmés *in vivo* au cours des premiers tests cliniques mais la synthèse de nouvelles molécules plus sélectives pourrait résoudre ce problème (Patel et al., 2004). Enfin, dans le cas d'un grand nombre de tumeurs solides, l'expression de RAR β est réprimée, causant une résistance ou plutôt une absence de réponse à l'AR. Cette répression met en jeu des mécanismes épigénétiques tels que la méthylation ou l'hyperacétylation du promoteur de RAR β (voir paragraphe III.2.2). L'utilisation d'inhibiteurs de méthyltransférase ou de HDAC permet de restaurer l'expression de RAR β et la sensibilité des cellules à l'AR. On peut donc imaginer que la combinaison de ces molécules avec l'AR en thérapie pourrait sensibiliser certains cancers à l'action antitumorale de l'AR (Freemantle et al., 2003).

IV. Effets anti-tumoraux des rétinoïdes : implication sur la prolifération, différenciation et apoptose des cellules.

L'action anti-tumorale des rétinoïdes ne se limite pas aux cellules APL : ils peuvent en effet réguler la prolifération, différenciation et apoptose de différentes cellules cancéreuses incluant notamment les neuroblastomes, cancer du sein, des poumons et leucémies AML non-APL (Bruel et al., 1995; Liu et al., 1996c; Melino et al., 1997; Nagy et al., 1995; Spanjaard et al., 1997). L'un des grands enjeux qui restent à explorer dans le domaine des rétinoïdes concerne les mécanismes par lesquels ils parviennent à réguler ces différents phénomènes cellulaires. En d'autres termes, quels sont les gènes cibles induits de manière directe ou indirecte par le traitement des rétinoïdes et quels sont leurs effets sur les cellules ? Ce chapitre traitera dans un premier temps les aspects de prolifération ou différenciation. L'apoptose ayant été un sujet majeur d'étude dans mon travail de thèse, un sous-chapitre plus détaillé lui sera consacré.

1. Arrêt de la prolifération et différenciation induits par les rétinoïdes.

De nombreuses études se sont donc focalisées sur la régulation de l'expression des gènes connus pour être impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et de la différenciation. Plus récemment, la technologie des puces à ADN a permis d'analyser à plus grande échelle les catégories de gènes surexprimés ou au contraire réprimés lors d'un traitement par les rétinoïdes. Un grand nombre de données est donc à présent disponible mais nécessite de plus amples analyses et des confirmations fonctionnelles. Ainsi, Meani *et al.* ont récemment démontré que plus de 1000 gènes sont dérégulés dans des blastes de patients APL suite au traitement par ATRA (Meani et al., 2005). Parmi ces gènes, une grande partie sont impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse (telles que les voies Notch et Wnt) et de fonctions spécialisées des neutrophiles matures (inflammation, réponse immunitaire). On observe également la modulation de l'expression de 32 gènes impliqués dans les modifications de la chromatine. De manière très intéressante, l'utilisation d'une lignée stable de cellules U937 exprimant la protéine de fusion PML-RAR α de manière inductible démontre que la grande majorité des gènes identifiés sont modulés par ATRA seulement en présence de la protéine de fusion (Meani et al., 2005). Ceci prouve sans équivoque que PML-RAR α régule la transcription en réponse à ATRA par un mécanisme différent de RAR α et cible un plus grand

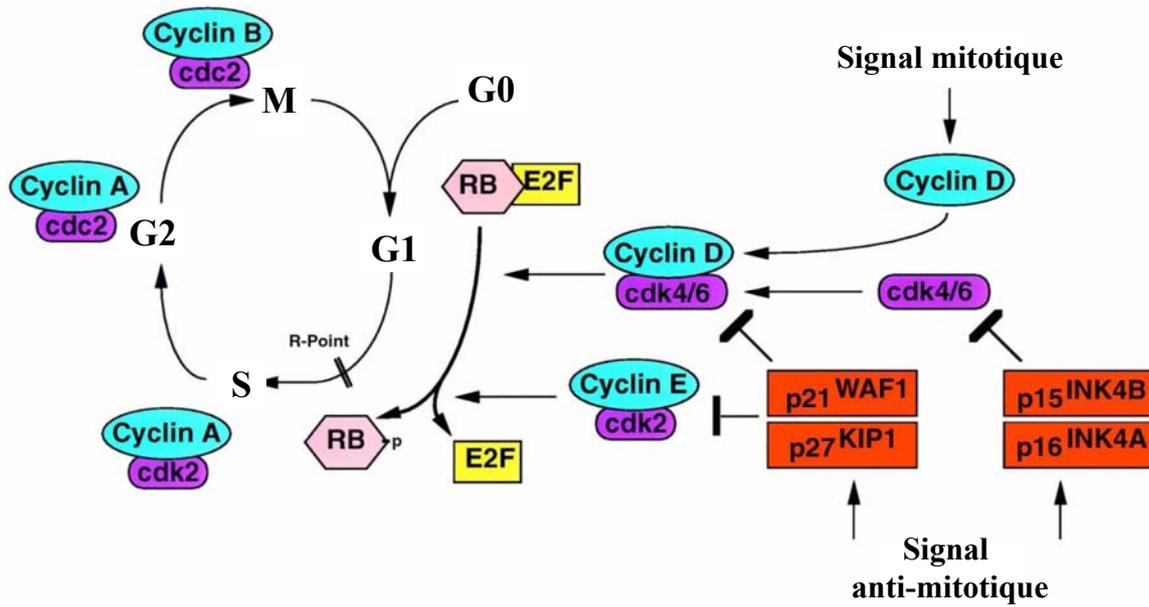


Figure 14 : Machinerie régulant le cycle cellulaire.

Schéma représentant les différentes familles de protéines impliquées dans le contrôle de la progression des cellules dans le cycle cellulaire.

D'après Lundberg *et al* 1999.

nombre de gènes comme il avait été proposé par d'autres équipes (Kamashev et al., 2004; Segalla et al., 2003). Une étude comparative réalisée dans des cellules NB4 et HL-60 (lignée myéloïde dépourvue de la protéine de fusion) confirme ces déductions : elle démontre en effet que certains gènes sont régulés dans les deux lignées mais qu'un nombre bien supérieur de gènes sont modulés en présence de PML-RAR α (Lee et al., 2002). Ces études ont permis l'identification de facteurs clé impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation.

Dans les 2 lignées myéloïdes NB4 et HL-60, on observe une induction de l'expression des gènes de la famille C/EBP (CCAAT/Enhancer-Binding Protein) par un traitement à l'AR (Gery et al., 2004; Park et al., 1999). Ces protéines sont des facteurs de transcription impliqués dans la prolifération et différenciation de différents types cellulaires dont les neutrophiles. Les membres C/EBP β et C/EBP ϵ sont des cibles directes de PML-RAR α . Elles sont induites lors du traitement par l'AR et sont nécessaires à l'induction de la différenciation (Duprez et al., 2003; Truong et al., 2003). De plus, la réexpression de C/EBP β et C/EBP ϵ peut réverser le phénotype APL de souris transgéniques. Ceci démontre l'importance de la répression de ces protéine par PML-RAR α dans le processus d'oncogénèse. Peu d'informations sont disponibles concernant les gènes impliqués dans la différenciation induite par les rétinoïdes dans les cellules issues de tumeurs solides. L'induction de l'expression de Wnt-5a par les rétinoïdes dans les cellules de neuroblastome a été corrélée avec l'induction de la différenciation mais sa contribution exacte reste à déterminer (Blanc et al., 2005).

Le contrôle du cycle cellulaire est assuré par plusieurs familles de protéines dont les cyclines et leurs kinases associées (CDK) ainsi que 2 familles d'inhibiteurs de CDK : la famille Cip/Kip qui comprend notamment p21 et p27 et la famille INK dont les membres les plus fréquents sont p15, p16 et p19 (voir **figure 14** et pour revue (Lundberg and Weinberg, 1999). Des modifications d'expression ou d'activité de ces différentes protéines influent sur la progression dans le cycle cellulaire. Il n'est donc pas surprenant de constater qu'elles peuvent être la cible d'un traitement à l'AR.

Dans le cas de l'APL, un traitement par l'AR restaure la différenciation des cellules dans la voie myélocytaire et induit de manière concomitante un arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire. Au niveau moléculaire, Casini *et al.* associent ces effets biologiques à une augmentation de p21 qui aurait 2 activités indépendantes : il induirait en effet un arrêt dans le

cycle par son activité d'inhibition des CDK mais il serait également impliqué dans l'induction de la différenciation. En effet, l'expression d'un ADN antisens à p21 inhibe la différenciation des cellules (Casini and Pelicci, 1999). D'autres études ont également recensé cette induction de p21 et ont identifié un élément de réponse à l'AR dans son promoteur, impliquant une régulation transcriptionnelle directe (Liu et al., 1996a).

L'expression de l'inhibiteur de CDK p27 est augmentée suite au traitement rétinolique dans des neuroblastomes, cancers du poumons ou cellules myéloïdes (Borriello et al., 2000; Dimberg et al., 2003; Hsu et al., 2000). Cette augmentation d'expression intervient via une induction de la transcription (Matsuo et al., 2001) mais plus souvent via une stabilisation de la protéine due à une inhibition de la voie de dégradation du protéasome (Borriello et al., 2000). L'expression d'autres effecteurs tels que les oncogènes c-Myc ou n-Myc sont également fréquemment altérées (Dimberg et al., 2003; Matsuo et al., 2001). Il en est de même pour les couples cyclines/CDK dont l'expression et activité est modulée au cours du traitement par l'AR (pour revue, voir (Niles, 2004)). Il est cependant difficile de discriminer parmi ces effets si ils représentent plutôt les causes ou les conséquences de l'arrêt de la prolifération.

Enfin, les effets antiprolifératifs et différenciatifs des rétinoïdes peuvent être médiés par différentes voies de signalisation telles que les MAPK ou Akt. Par exemple, une diminution de la phosphorylation de Erk est responsable en partie de l'effet antiprolifératif de l'AR dans des lignées de cancer du sein (Nakagawa et al., 2003) alors qu'une augmentation de cette phosphorylation est au contraire nécessaire à la différenciation myéloïde ou neuronale induite par l'AR (Singh et al., 2003; Yen et al., 1998). La même dualité est observée pour la voie PI3K/akt. Cette voie est en effet altérée lors des traitements rétinoliques dans les cellules de cancer du sein (del Rincon et al., 2003). Au contraire, la différenciation des cellules HL-60 s'accompagne d'une induction de l'expression et de l'activité de l'isoforme PI3K C2b (Visnjic et al., 2002). L'activation de la voie PI3K/akt est également nécessaire à la différenciation des cellules de neuroblastomes SH-SY5Y (Lopez-Carballo et al., 2002).

Ceci résume de manière non exhaustive les différents gènes ou voies de signalisation ciblés par les traitements rétinoliques et impliqués dans la prolifération et/ou différenciation des cellules traitées. Il apparaît clairement qu'aucun schéma type ne peut être déduit de ces études. Chaque type cellulaire semble en effet utiliser des mécanismes différents mais qui aboutissent au même résultat, c'est-à-dire l'inhibition de croissance des cellules tumorales

traitées (pour revue, (Niles, 2004)). De nombreuses études sont en cours et l'analyse des puces à ADN réalisées sur des tissus différents devrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires induits par l'AR.

2. L'apoptose : modulation par les rétinoïdes.

L'arrêt de la prolifération et/ou la différenciation induit par l'AR peuvent être suivis par la mort par apoptose des cellules traitées. L'AR peut en effet moduler l'expression ou l'activité de différents composants de la machinerie apoptotique. Cependant, cette machinerie est très complexe et fait intervenir un grand nombre de participants. Les prochains paragraphes font un état des lieux de ce qui est connu à l'heure actuelle sur l'apoptose au niveau mécanistique en insistant sur les voies impliquées dans l'apoptose induite par les rétinoïdes.

2.1. Description.

L'apoptose est par définition une mort cellulaire programmée et s'oppose au phénomène de mort par nécrose. C'est un processus actif qui conduit à la destruction d'une cellule en suivant un programme moléculaire coordonné bien déterminé. Elle se traduit au niveau morphologique par une vésicularisation de la membrane plasmique, un rapetissement de la cellule, une fragmentation des protéines, la condensation de la chromatine et la dégradation de l'ADN. Au niveau physiologique, les débris cellulaires sont rapidement éliminés par phagocytose.

L'apoptose représente un moyen pour l'organisme de contrôler l'homéostasie tissulaire mais également de se débarrasser des cellules potentiellement dangereuses comme les cellules cancéreuses. Ainsi, une dérégulation du processus apoptotique, par excès ou par défaut, peut conduire à des pathologies telles que les maladies neurodégénératives ou les cancers, respectivement. Les cellules cancéreuses, par différents mécanismes, échappent au processus apoptotique et prolifèrent de manière incontrôlée. Une stratégie de traitement des cancers consiste à induire l'apoptose de ces cellules en utilisant des agents chimiothérapeutiques.

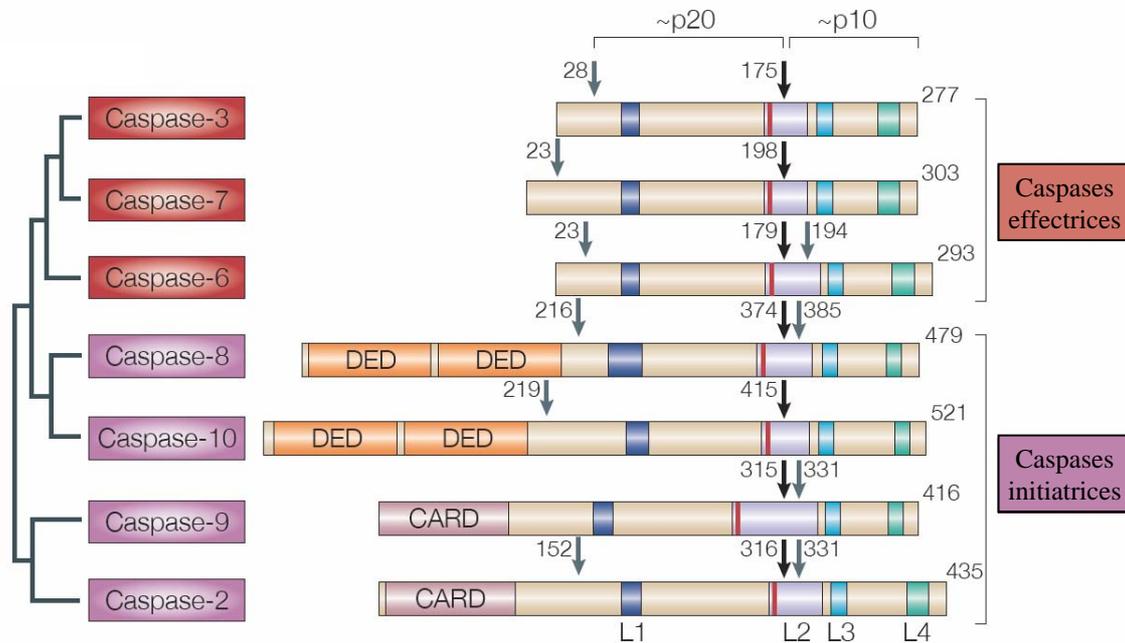


Figure 15 : Les principales caspases chez les mammifères.

Les caspases sont divisées en 2 groupes : les caspases initiatrices qui sont activées directement en réponse au stimulus apoptotique et les caspases effectrices qui sont activées par les caspase initiatrices. Les caspases initiatrices contiennent des domaines d'interaction nécessaires à leur recrutement dans des complexes d'activation : DED pour death effector domain et CARD pour caspase recruitment domain. Les flèches indiquent les différents sites de clivage. Les sites de clivages sont représentés ainsi que les 4 hélices qui forment le sillon catalytique(L1-L4).

D'après Riedl *et al* 2004.

2.2. Vue générale de l'apoptose : deux voies apoptotiques principales et de nombreux acteurs.

L'apoptose est un processus fondamental qui nécessite une régulation et une coordination très fines de différents programmes. Deux voies principales qui agissent en tant que capteur de signaux apoptotiques sont capables de transmettre le signal de mort cellulaire. La voie intrinsèque est activée suite aux dommages intracellulaires et la voie extrinsèque est activée en réponse à des cytokines et signaux extracellulaires.

2.2.1. Les caspases : exécuteurs de l'apoptose.

Ces deux voies d'apoptose contrôlent l'activation des caspases, protéines qui ont un rôle essentiel dans la propagation et l'exécution du signal apoptotique (pour revue, voir (Riedl and Shi, 2004)). Les caspases sont une famille conservée de protéase à cystéine qui clivent spécifiquement leurs substrats après un aspartate (d'où leur nom). Il existe 2 familles de caspase : les caspases initiatrices (caspases 8, 10, 9 et 2) qui sont activées au sein de complexes protéiques suite au stimulus apoptotique et les caspases effectrices chargées du clivage protéolytique d'un grand nombre de cibles cellulaires (caspases 3, 6 et 7) (**figure 15**). Toutes les caspases sont produites en tant que zymogène inactif et doivent être activées par clivage protéolytique. Lorsque les caspases initiatrices sont activées, elles induisent l'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7 qui induisent le clivage de nombreuses protéines cibles, résultant dans le démantèlement complet de la cellule. Parmi ces cibles, on trouve entre autres PARP (poly ADP-ribose polymérase) dont le clivage est souvent utilisé en tant que marqueur apoptotique et ICAD dont la destruction permet l'activation de CAD (Caspase-activated DNase) responsable de la fragmentation de l'ADN.

2.2.2. Deux voies apoptotiques principales.

(La **figure 16** illustre le contenu de ce paragraphe)

La voie apoptotique extrinsèque est induite au niveau de la membrane cytoplasmique par les ligands de mort de la famille du $TNF\alpha$ comprenant le $TNF\alpha$ lui-même, Fas/Apo1 ligand (FASL) ou Apo2L/TRAIL (TNF α -Related Apoptosis-Inducing Ligand). La liaison de ces ligands à leurs récepteurs respectifs induit leur oligomérisation, le recrutement de molécules adaptatrices qui elles-même recrutent les procaspases initiatrices 8 et 10. Le

Voie extrinsèque

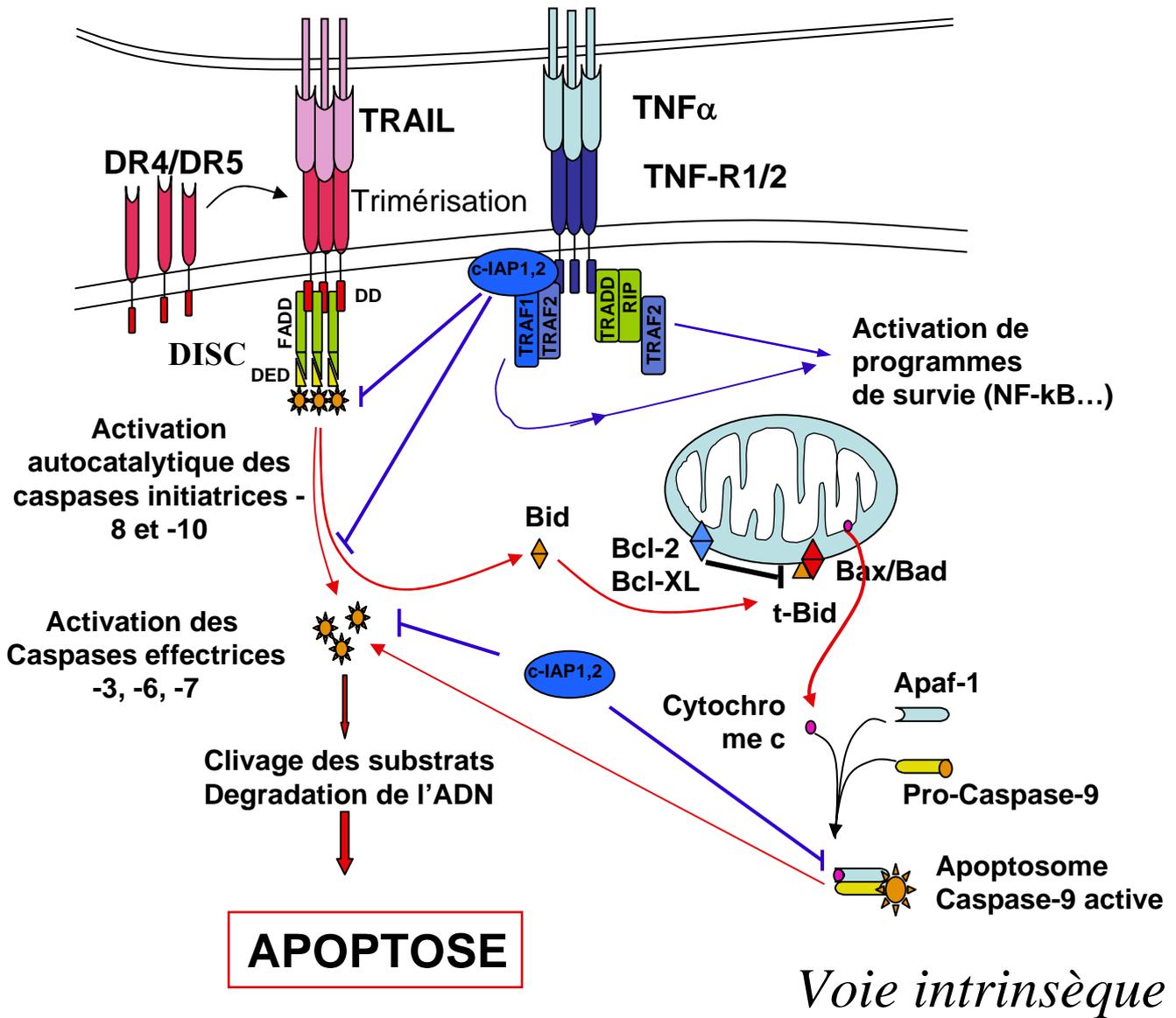


Figure 16 : Deux voies principales d'activation de l'apoptose.

La voie extrinsèque est initiée à la surface cellulaire par des ligands de la famille du TNF α et se propage à travers l'activation d'un complexe DISC (Death inducing signalling complex). La voie intrinsèque est initiée au niveau de la mitochondrie par la perméabilisation de la membrane mitochondriale, le relargage de protéines pro-apoptotiques et l'activation d'un complexe apoptosome. Dans ces 2 complexes, les caspases initiatrices (caspases 8, 9, et 10) sont activées et activent à leur tour les caspases effectrices responsables du clivage des différents substrats cellulaires conduisant à l'apoptose.

D'après E. Wilhelm.

complexe ainsi formé est appelé le DISC pour Death Inducing Signalling Complex. A l'intérieur du DISC, les caspase 8 et 10 sont activées et déclenchent la cascade apoptotique en clivant les caspases effectrices.

La deuxième voie apoptotique, ou voie intrinsèque est activée en réponse à des dommages intracellulaires tels que des atteintes au niveau de l'ADN, l'activation de voies de stress ou encore l'irradiation par les UV. Tous ces différents stimuli convergent au niveau de la mitochondrie, conduisent à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et au relargage dans le cytoplasme de certaines protéines proapoptotiques dont le cytochrome c. Le cytochrome c se lie à Apaf1 et à une autre caspase initiatrice, la procaspase 9 pour former l'apoptosome. Celui-ci permet l'activation de la caspase 9 qui ensuite induit le clivage des caspases effectrices. Une famille de protéines, la famille de Bcl-2, comprend des membres anti et proapoptotiques qui vont moduler positivement ou négativement le signal de mort au niveau de la mitochondrie.

Dans certaines cellules, l'activation de la caspase 8 est faible et insuffisante pour induire le clivage de la caspase 3. Dans ce cas, afin de propager le signal apoptotique, la caspase 8 activée clive la protéine Bid, un membre pro-apoptotique de la famille de Bcl-2 qui, une fois tronquée, est transloquée à la membrane mitochondriale et active la voie intrinsèque. Bid fait ainsi le lien entre les 2 voies d'induction de l'apoptose et permet l'amplification du signal apoptotique initié par la caspase 8.

2.2.3. Les verrous.

La survie cellulaire dépend d'un équilibre fragile entre les facteurs qui induisent l'apoptose et ceux qui l'inhibent. Différentes voies et familles de protéines vont ensemble assurer un seuil pour l'induction de l'apoptose et permettre ainsi qu'elle ne soit induite qu'en réponse à des signaux appropriés. Deux familles de régulateurs de l'apoptose, FLIP et IAP constituent une sorte de verrous de sécurité et ont pour rôle d'inhiber la mort cellulaire en inhibant l'activation des caspases.

Les protéines FLIPs (FLIPL et FLIPS) sont des homologues de la caspase 8 dépourvues d'activité catalytique (Scaffidi et al., 1997). Elles agissent comme dominant négatif de la

caspase 8 et sont recrutées par FADD au niveau du DISC. Elles représentent ainsi des inhibiteurs puissants de l'action apoptotique de TRAIL (Irmeler et al., 1997). Cependant, de part cette activité anti-apoptotique, elles représentent un moyen pour les cellules cancéreuses d'échapper à l'apoptose et la surexpression des protéines FLIP a compte pour la résistance de nombreuses cellules cancéreuses à l'action apoptotique de TRAIL (pour revue : (Roth and Reed, 2004)).

Les protéines de la famille des IAPs, parmi lesquelles cIAP1, cIAP2, XIAP ou la survivin sont des pan-inhibiteurs des caspases et peuvent ainsi agir sur les 2 voies mitochondriales ou extrinsèques (pour revue, voir (Deveraux and Reed, 1999)). Elles se lient aux caspases via leur domaine BIR et inhibent ainsi leur homodimérisation comme dans le cas de la caspase 9 ou leur liaison aux substrats dans le cas des caspases effectrices. Leur expression ou activité peut être régulée à différents niveaux. Elles peuvent en effet être inhibées par Smac/Diablo, une protéine pro-apoptotique séquestrée dans la mitochondrie, ou dégradées par le protéasome suite à un signal apoptotique. cIAP-1 et cIAP-2 interagissent également avec les protéines TRAF au niveau de la partie cytoplasmique du récepteur au TNF et participent à l'activation de la voie NF- κ B suite à des signaux de survie. NF- κ B induit ensuite la transcription des gènes anti-apoptotiques dont ceux codant pour les IAPs (de Graaf et al., 2004). Ceci établit l'existence d'une boucle de régulation positive où l'induction des IAPs amplifie le signal antiapoptotique par l'induction de gènes de survie additionnels.

2.2.4. Modulation de l'apoptose par des facteurs de transcription.

L'apoptose peut être régulée par l'activation transcriptionnelle de certains acteurs impliqués dans les différentes voies citées précédemment. Des signaux intra ou extracellulaires vont activer des voies de signalisation et aboutir à l'activation de facteurs de transcription. Ceux-ci vont répondre par la transactivation de gènes pro ou anti-apoptotiques selon la nature du signal reçu. Deux exemples, NF- κ B et p53 seront développés dans ce paragraphe.

NF κ B a de nombreuses activités dans la cellule parmi lesquelles l'inhibition de l'apoptose. NF κ B est composé de dimères de protéines de la famille NF κ B/Rel. Il est

séquestré dans le cytoplasme des cellules par son interaction avec I κ B. Suite à une stimulation, I κ B est phosphorylé et NF κ B est transloqué dans le noyau où il se lie à ses éléments de réponse situés dans la région promotrice de ses gènes cibles. Ces gènes cibles incluent de nombreuses protéines anti-apoptotiques telles que cIAP 1 et 2, TRAF 1 et 2, Bfl1, Bcl-Xl et FLIP. Cependant, NF κ B contrôle également l'activation de certains gènes pro-apoptotiques tels que Fas, FasL et les 2 récepteurs de TRAIL DR4 et DR5. NF κ B peut être recruté au niveau du DISC par RIP qui sert ainsi d'adaptateur entre le récepteur au TNF et la voie de survie de NF κ B (pour revue générale sur NF κ B, voir (Shishodia and Aggarwal, 2004)).

P53 est un suppresseur de tumeur très fréquemment muté dans les cancers. Il agit en inhibant la progression dans le cycle cellulaire ou en induisant l'apoptose lorsque la cellule reçoit un signal de stress tel qu'un oncogène ou un dommage à l'ADN. P53 est normalement située dans le cytoplasme où elle est ubiquitylée par MDM2 et ciblée vers le protéasome. Lorsqu'un signal de stress survient, l'ubiquitylation est supprimée et p53 ainsi stabilisée est accumulée dans le noyau. Elle peut alors réguler la transcription de nombreux gènes pro-apoptotiques tels que DR5, bax, Apaf-1 ou PUMA et ainsi conduire la cellule vers l'apoptose. P53 est ainsi souvent activée par les agents chimiothérapeutiques (pour revue générale sur p53 (Bode and Dong, 2004; Slee et al., 2004)).

Les prochains paragraphes vont détailler de manière plus précise les deux voies d'apoptose et pour commencer, la voie apoptotique extrinsèque. Comme nous avons démontré un rôle fondamental de TRAIL dans l'apoptose induite par les rétinoïdes cette voie sera détaillée dans le contexte particulier de TRAIL et ses récepteurs.

2.3. L'apoptose induite par TRAIL.

TRAIL est un des membres de la superfamille du TNF α et a été cloné en 1995 par 2 groupes différents de part son homologie de séquence avec FasL et TNF α (**figure 17**) (Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995). Comme les autres récepteurs de mort, TRAIL est une protéine membranaire de type 2 qui existe aussi sous forme soluble suite à un clivage protéolytique.

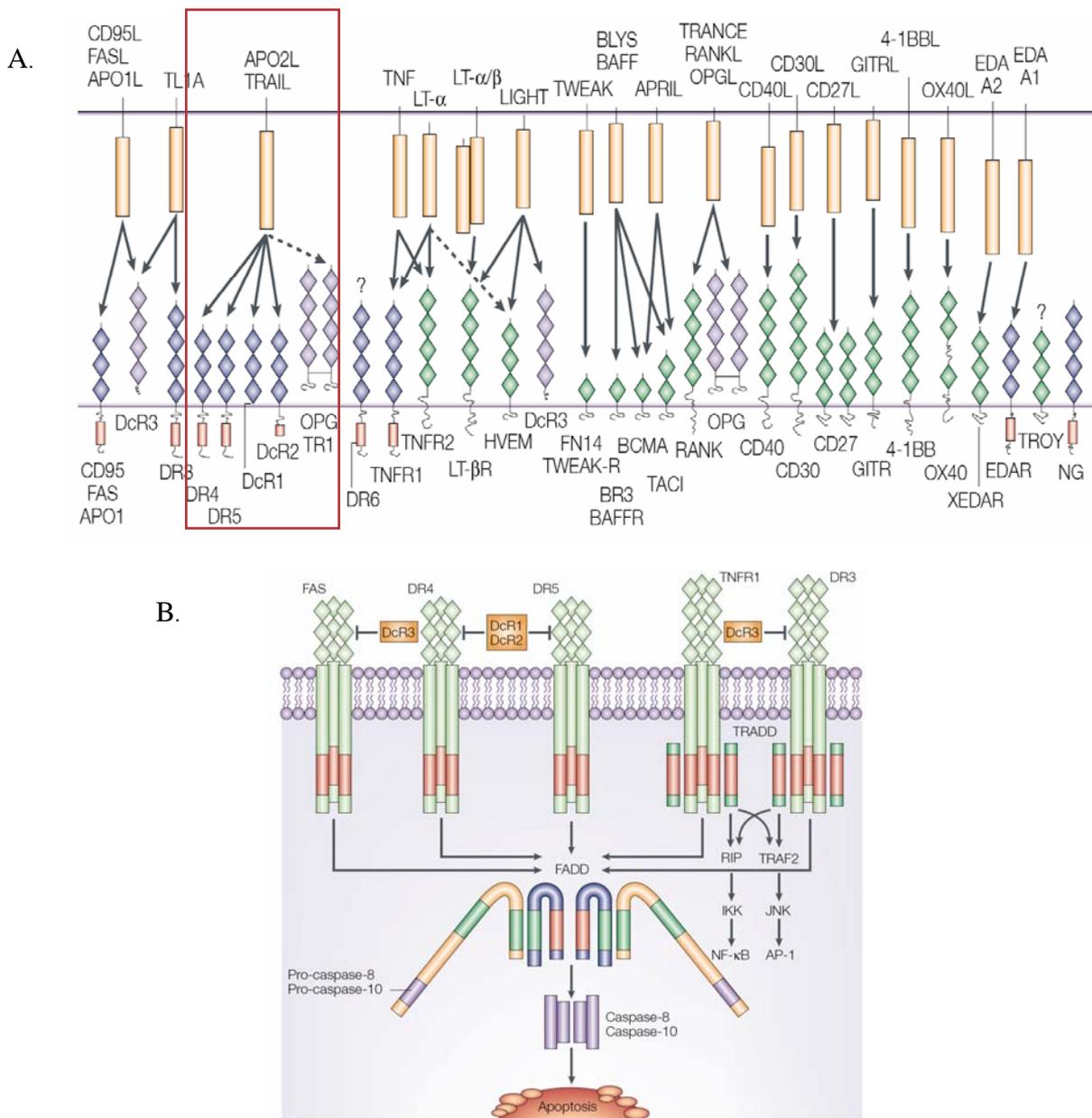


Figure 17 : Les super-familles du TNF et des récepteurs au TNF.

- A. Les ligands sont représentés dans leur version transmembranaire. Les flèches pleines indiquent les interactions fortes ligands/récepteurs alors que les flèches en pointillé représentent des interactions plus faibles. Les losanges représentent les domaines riches en cystéines des récepteurs et les rectangles rouges leur domaine de mort (DD= death Domain). Le système de TRAIL et ses récepteurs est encadré en rouge.
- B. Zoom sur la zone du DISC et transduction du signal par les récepteurs de mort. Le DD est représenté en rouge et le DED (death effector domain) en vert.

D'après Ashkenazi 2002

Chez l'homme, TRAIL peut interagir avec 5 récepteurs appartenant tous à la superfamille des récepteurs au TNF (**figure 17**). Les récepteurs DR4 (TRAIL-R1) (Pan et al., 1997b) ou DR5 (TRAIL-R2) (Walczak et al., 1997) contiennent tous les deux dans leur partie cytoplasmique un domaine protéique particulier appelé domaine de mort (DD pour death domain) capable de transmettre le signal apoptotique. Les autres récepteurs sont des récepteurs leurre, c'est-à-dire qu'ils peuvent lier TRAIL mais ne peuvent pas transmettre le signal apoptotique. DcR1 (TRAIL-R3) est ancré à la membrane par une molécule phospholipidique et ne possède pas de DD (Degli-Esposti et al., 1997b; MacFarlane et al., 1997; Pan et al., 1997a; Sheridan et al., 1997). DcR2 possède un DD tronqué et incapable de transmettre le signal apoptotique (Degli-Esposti et al., 1997a; Marsters et al., 1997). La surexpression de ces 2 récepteurs leurre inhibe l'apoptose induite par TRAIL (Marsters et al., 1997). Le dernier récepteur appelé osteoprotégerin (OPG) est un récepteur soluble qui a d'abord été identifié comme récepteur de RANKL, un autre membre de la superfamille du TNF, puis de TRAIL (Emery et al., 1998). Cependant, l'affinité de l'OPG pour TRAIL est très faible et la connection physiologique entre les 2 protéine n'a pas été clairement établie (Truneh et al., 2000).

De la même manière que les autres membres de la famille du TNF, TRAIL forme un homotrimer et se lie à 3 molécules de récepteur (Hymowitz et al., 1999). Un atome de Zinc lié par des cystéines au niveau du trimère est essentiel pour la stabilité et l'activité de TRAIL (Bodmer et al., 2000b; Hymowitz et al., 2000).

La liaison de TRAIL à ses récepteurs DR4 et DR5 induit le recrutement de protéines adaptatrices contenant également un DD telle que FADD. FADD contient un deuxième domaine protéique important, le DED (Death effector domain) nécessaire au recrutement des procaspases 8 et 10 et donc à la formation du DISC (Bodmer et al., 2000a; Kischkel et al., 2000; Sprick et al., 2000) (**figure 17 B**). La grande proximité des molécules de procaspase initiateur à l'intérieur du DISC permet leur activation par autoclivage ou clivage catalytique mutuel (Muzio, 1998). Le clivage de la caspase 8 est effectué en deux étapes consécutives produisant les sous-unités actives p10 et p18 (pour revue, voir (Riedl and Shi, 2004)) qui sont ensuite relarguées dans le cytosol où elles activent les caspases effectrices. La Caspase 10 a une structure homologue à la caspase 8 et sa présence au niveau du DISC a été longtemps controversée. Des études récentes suggèrent qu'elle y est effectivement recrutée (Sprick et al., 2002; Xiao et al., 2002). Elle peut transmettre le signal apoptotique dans des cellules casp 8^{-/-} mais ne compense cependant pas totalement cette perte de fonction de la caspase 8 (Xiao et al., 2002).

Des versions alternatives du DISC ont été décrites et sont responsables de la transmission de signaux de survie. En effet, la liaison des récepteurs DR4 et DR5 à RIP (Receptor Interacting Protein) au sein du DISC active la voie de NF- κ B (Chaudhary et al., 1997) responsable d'un effet prolifératif induit par TRAIL (Ehrhardt et al., 2003).

L'intérêt porté à TRAIL ces dernières années a été renforcée par le fait que son action apoptotique semble cibler les cellules cancéreuses tout en épargnant les cellules saines (Ashkenazi and Dixit, 1999; Walczak et al., 1999)(pour revue, voir (Yagita et al., 2004)) De plus, de nombreuses données incluant des résultats obtenus par l'invalidation de TRAIL dans les souris vont dans le sens d'un rôle physiologique de TRAIL dans la surveillance des tumeurs (Cretney et al., 2002; Sedger et al., 2002; Takeda et al., 2001; Takeda et al., 2002). De manière importante, le traitement par TRAIL recombinant induit la régression des tumeurs sans effets cytotoxiques majeurs dans des modèles animaux de cancer (Ashkenazi et al., 1999; Walczak et al., 1999). Une synergie entre TRAIL et de nombreuses molécules anti-cancer a été également démontrée dans ces mêmes modèles. Il semble donc que TRAIL soit un candidat idéal pour le traitement des cancers. Dans ce contexte, différentes formes de TRAIL recombinant ou des molécules ciblant les récepteurs de TRAIL (anticorps anti-DR5) sont actuellement en cours d'essais cliniques.

2.4. La voie apoptotique mitochondriale.

Dans la plupart des cas d'apoptose observés, la mitochondrie joue un rôle central, que ce soit en initiant le processus d'apoptose ou pour l'amplifier.

Une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe est en effet observée de manière précoce dans le processus d'apoptose. En conséquence, le potentiel transmembranaire ($\Delta\Psi_m$) nécessaire à la production d'ATP est dissipé. Ainsi, cette perméabilisation va participer au processus d'apoptose par au moins 3 mécanismes : la perte des fonctions mitochondriales comme la production d'énergie, le relargage de protéines stockées dans l'espace intermembranaire et impliquées dans l'activation des caspases telles que le cytochrome c, mais aussi le relargage de protéines capables d'induire l'apoptose indépendamment des caspases telles que AIF (**figure 18**).

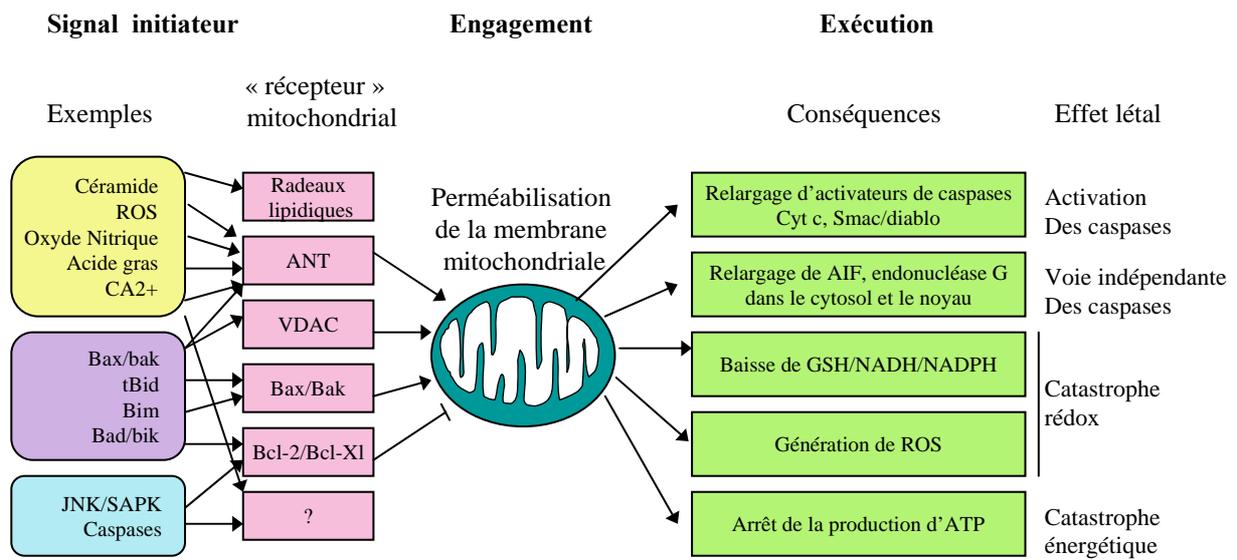


Figure 18 : Activation de la voie mitochondriale apoptotique.

Différentes molécules pro-apoptotiques (à gauche) agissent sur différents « récepteurs » mitochondriaux, ceci conduisant à la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Cette perméabilisation induit ensuite différents événements résultant à la mort cellulaire par apoptose.

D'après Mattson *et al* 2003.

2.4.1. Mécanisme de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe.

La perméabilisation de la membrane mitochondriale représente un « point de non retour » dans l'induction de l'apoptose. Cependant, le mécanisme précis responsable de cette perméabilisation n'est toujours pas clairement établi. Certaines observations ont conclu à l'implication de différents mécanismes qui peuvent varier selon le type cellulaire et le stimulus reçu (ex : messagers lipidiques, le Ca²⁺ ou l'oxide nitrique).

- **Hypothèse du PTP.**

L'un des mécanismes mis en jeu lors de la perméabilisation repose sur la formation d'un pore ou canal au niveau de la membrane interne nommé PTP (permeability transition pore). Ce modèle est hypothétique mais le PTP serait composé entre autres de l'ANT (Adenine Nucleotide Transporter) localisé sur la membrane interne mis en relation avec le VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) localisé sur la membrane externe (pour revue. (Desagher and Martinou, 2000, Mattson, 2003 #250)). L'ouverture de ce pore par différents stimuli permettrait le passage d'eau ainsi que des molécules inférieures à 1,5 KD. Ceci conduit à la perte du potentiel $\Delta\Psi_m$ en conséquence d'un équilibre des ions de chaque côté de la membrane. De plus, l'entrée d'eau va induire la dilatation et ainsi la rupture de la membrane interne. Cependant, des données récentes suggèrent que le cytochrome c et d'autres protéines apoptotiques pourraient être relarguées par un mécanisme indépendant du PTP (Shinohara et al., 2002).

- **La famille de Bcl-2.**

La perméabilisation de la membrane mitochondriale est également régulée par les membres de la famille de Bcl-2. Les membres de cette famille sont caractérisés par la présence de motifs conservés appelés domaines d'homologie à Bcl-2 (domaines BH) allant de 1 à 4 (voir **figure 19**, et pour revue (Desagher and Martinou, 2000, Scorrano, 2003 #254)).

Une première sous-famille comprenant Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 ou encore A1 (Bfl1) expriment les 4 domaines BH et possèdent une activité anti-apoptotique. En effet, la

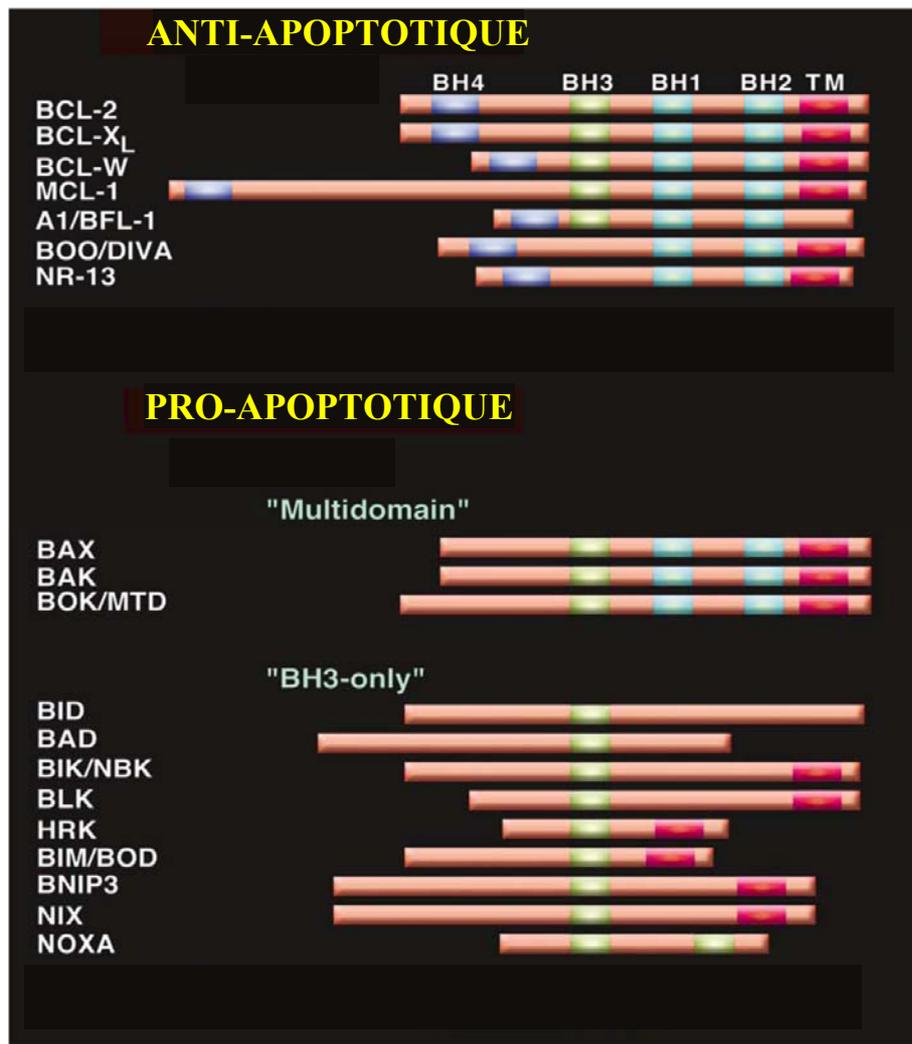


Figure 19 : les membres de la famille de Bcl-2.

Représentation schématique des différents membres de la famille de Bcl-2 regroupés en différentes sous-famille : les membres anti-apoptotiques et les membres pro-apoptotiques. Ces derniers sont divisés en 2 catégories : ceux qui possèdent plusieurs domaines BH (Bcl-2 Homology) et ceux qui ne possèdent que le domaine BH3 (appelés BH3 only).

D'après Scorrano *et al* 2003.

surexpression de ces protéines dans un grand nombre de cellules permet d'inhiber l'apoptose induite par différents stimuli, et ceci en bloquant le relargage du cytochrome c (Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997).

La deuxième sous-famille comprend les membres pro-apoptotiques de la famille et sont caractérisés par l'absence du domaine BH4. Elle peut être sous-divisée entre les membres qui contiennent les domaines BH1 à BH3 (ex : Bax, Bak) et ceux qui ne contiennent que le domaine BH3 appelés « BH3 only » (Ex : Bid, Bim, Bad, Puma). Les cellules déficientes en bax et bak sont résistantes à un grand nombre de stimuli apoptotiques, indiquant que ces 2 protéines sont essentielles pour l'apoptose (Cheng et al., 2001; Wei et al., 2001). Le domaine BH3 de Bax et Bak est essentiel pour leur fonction pro-apoptotique et leur permet également d'oligomériser (Suzuki et al., 2000). Dans des cellules saines, Bax est localisé dans le cytoplasme. Suite à un stimulus apoptotique, il opère un changement conformationnel et s'insère dans la membrane mitochondriale où il oligomériser (Wolter et al., 1997). Cette étape conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale certainement par la formation de pores lipidiques (Kuwana et al., 2002) et conduit au relargage du cytochrome c. Bak est quant à lui constamment inséré dans la membrane mitochondriale mais observe aussi un changement conformationnel suite au stimulus apoptotique (Griffiths et al., 1999).

Les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 ont la capacité d'hétérodimériser avec les membres pro-apoptotiques et ceci représenterait leur principal moyen d'inhiber l'apoptose (Oltvai et al., 1993; Sedlak et al., 1995; Yin et al., 1994).

Les stimuli apoptotiques qui vont ainsi modifier les protéines Bax et Bak sont transmis par les membres proapoptotiques « BH3 only ». Ces protéines sont en fait des capteurs qui intègrent le message apoptotique provenant de différentes voies pour le connecter à la machinerie mitochondriale (figure 20). Par exemple, un dommage au niveau de l'ADN active p53 qui induit la transcription des gènes de Noxa et Puma (Villunger et al., 2003). C'est également ainsi que la voie extrinsèque induite par les récepteurs de mort (dont TRAIL) est connectée à la voie mitochondriale. En effet, suite à son activation au sein du DISC, la caspase 8 induit le clivage de Bid sous une forme tronquée (tBid) qui est alors transloquée à la mitochondrie (Luo et al., 1998). tBid est ensuite capable, par un mécanisme encore mal défini, d'induire le changement conformationnel de Bax et sa translocation à la mitochondrie ainsi que l'oligomérisation de Bak (Korsmeyer et al., 2000; Wei et al., 2000). Les autres membres

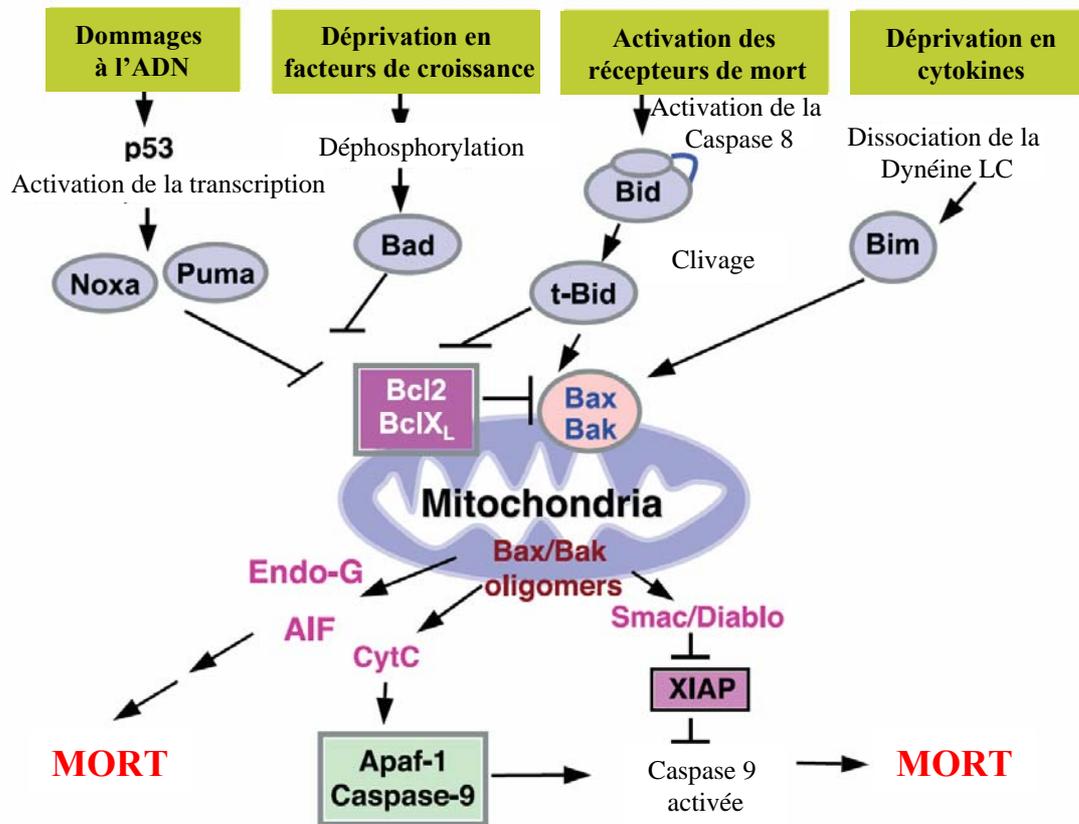


Figure 20 : Rôle des différents membres de la famille de bcl-2 dans l'apoptose.

Les membres « BH3-only » sont des capteurs qui servent de relai entre les signaux apoptotiques et la mitochondrie. Ils agissent soit directement sur les membres pro-apoptotiques bax et bak soit en antagonisant les fonctions des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 ou Bcl-XL. Suite à l'intégration de ces signaux apoptotiques, Bax et Bak oligomérisent pour faciliter le relargage dans le cytoplasme des protéines pro-apoptotiques telles que le cytochrome c (cyt c), l'endonucléase G (endo-G), apoptosis-inducing factor (AIF) ou smac/Diablo. Ces facteurs exécutent ensuite l'apoptose de la cellule par des phénomènes dépendants ou indépendants des caspases.

D'après Chan *et al* 2004.

« BH3 only » telles que bad ou bik ne peuvent pas activer directement bax et bad mais se lient à Bcl-2 ou à d'autres membres anti-apoptotiques afin d'y déplacer les membres « BH3 only » (Letai et al., 2002). Ainsi, le tBid séquestré par Bcl-2 est libéré et peut activer Bax et Bad.

Dans une vue d'ensemble, les membres « BH3 only » sont disséminés dans la cellule et captent les moindres signaux apoptotiques ou de stress (**figure 20**). Ils servent ainsi de relai et transmettent ensuite ces signaux aux autres membres pro et antiapoptotiques de la famille de Bcl-2, et l'intégrité de la membrane mitochondriale n'est plus assurée. De part leur rôle central dans l'apoptose, ces protéines peuvent être la cible de nombreuses régulations au niveau de leur activité ou de leur niveau d'expression. Ceci induit ainsi une rupture de l'équilibre entre les membres pro et anti apoptotique et conduit à l'induction de l'apoptose ou au contraire la survie des cellules.

- **Oxide nitrique et dérivés d'oxygènes actifs.**

La perméabilisation de la membrane mitochondriale peut être également régulée par un grand nombre de voies de stress et de seconds messagers apoptotiques. Parmi ces molécules, on trouve l'Oxide Nitrique (NO) et les dérivés d'oxygène actifs nommés ROS (Reactive Oxygen Species) qui ont été impliqués dans l'apoptose induite par les rétinoïdes.

Les ROS (ex : les anions superoxide, les peroxides d'hydrogen) sont majoritairement produits au niveau de la mitochondrie par la chaîne de respiration. Un excès de ROS conduit à un stress oxydatif qui peut induire l'apoptose de la cellule. L'implication des ROS en tant que molécules signalisantes est un concept plutôt récent et le mécanisme ou les mécanismes par lesquels ils conduisent à l'apoptose ne sont pas clairement définis. Cependant, il est clair qu'ils agissent en amont du relargage du cytochrome c en favorisant la perméabilisation de la membrane mitochondriale (pour revue (Fleury et al., 2002)).

Le NO est synthétisé à partir de l'arginine par une famille d'enzymes nommées NO Synthase. Deux d'entre elles, la eNOS (endothéliale) ou la nNOS (neuronale) sont constitutivement exprimées alors qu'il existe une forme inductible, la iNOS. L'existence d'une NOS mitochondriale (mtNOS) potentielle est très controversée (pour revue (Moncada and Erusalimsky, 2002)). La formation de NO peut influencer la transcription de gènes, moduler la réponse immunitaire et également induire l'apoptose des cellules productrices. De

la même façon que pour les ROS, les mécanismes impliqués dans l'apoptose induite par le NO sont peu connus mais permettent d'affirmer qu'ils impliquent en partie la mitochondrie. D'une part, la combinaison du NO avec les radicaux d'oxygène conduit à la formation de peroxynitrite, un oxydant puissant qui peut agir sur la mitochondrie comme les autres ROS. NO peut également se lier et ainsi inhiber une enzyme de la chaîne respiratoire, la cytochrome c oxydase. De nombreuses évidences montrent qu'une inhibition prolongée de la respiration pourrait causer une diminution du $\Delta\Psi_m$, donc de la production d'ATP et ainsi causer l'apoptose (Beltran, 2000 #271). D'un autre côté, il a été montré que l'activité de certaines enzymes était inhibée par le NO selon un mécanisme impliquant la s-nitrosylation. Il a été proposé que l'inhibition d'enzymes participant à la défense antioxydante des cellules pourrait faciliter l'ouverture du PTP (Halestrap et al., 1997).

En plus de sa fonction d'induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale, le NO peut activer certaines voies de kinases impliquées dans la réponse au stress. Ainsi, le NO active une voie conduisant à l'accumulation d'une forme phosphorylée, nucléaire et transcriptionnellement active de p53 (Brune and Schneiderhan, 2003; Schneiderhan et al., 2003) et induit ainsi la transcription de gènes tels que p21 ou bax (Ishida et al., 1999).

2.4.2. Relargage des protéines pro-apoptotiques.

Lorsque la membrane mitochondriale est perméabilisée, elle permet le relargage dans le cytoplasme de protéines proapoptotiques agissant ou non sur l'activation des caspases (pour revue (van Gurp et al., 2003). Le prochain paragraphe ne traitera que certaines d'entre elles (**figure 18**).

- **Voie dépendante des caspases.**

Le cytochrome c

Dans les années 1990, il est apparu clairement que le cytochrome c était relargué de la mitochondrie dans le cytoplasme et ainsi capable d'activer l'apoptose (Liu et al., 1996b). Il induit la formation d'un complexe nommé « apoptosome ». Le cytochrome c se lie à Apaf-1 en présence d'ATP. Il convertit Apaf-1 d'une structure monomérique inactive en un heptamère capable de lier et d'activer 7 dimères de procaspase 9, ceci formant l'apoptosome (Acehan et al., 2002). La caspase 9 comme les caspases 8 et 10 est une caspase initiateur. Son

activation conduit à un clivage protéolytique et les fragments actifs vont ensuite permettre l'activation des caspases effectrices telle que la caspase 3 (pour revue (Riedl and Shi, 2004)). De manière surprenante, Marsden *et al.* ont démontré que des cellules hématopoïétiques de souris déficientes pour Apaf-1 ou pour la caspase 9 ont la même capacité à entrer en apoptose que les cellules sauvages. Ils ont conclu que la mitochondrie agirait comme amplificateur de la cascade d'activation des caspases plutôt que comme initiateur (Marsden et al., 2002).

Smac/Diablo

La protéine murine Smac et son orthologue humain Diablo sont également relargués de la mitochondrie au cytoplasme suite à la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Ils agissent sous forme de dimère et contribuent à l'activation des caspases en séquestrant une famille de protéines, les IAP (Inhibitor of Apoptosis) qui sont des inhibiteurs des caspases (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000). Smac/Diablo induit donc l'apoptose en libérant les caspases de l'action inhibitrice des IAPs.

Deng *et al.* ont démontré que le relargage de Smac/Diablo suite à l'activation de Bax est nécessaire à l'apoptose induite par TRAIL alors que l'inhibition de la caspase 9 n'a aucun effet dans ce contexte (Deng et al., 2002). Ceci a démontré pour la première fois un mécanisme par lequel la voie apoptotique mitochondriale pouvait être impliquée dans l'apoptose induite par TRAIL et ceci de manière indépendante de la caspase 9.

D'autres protéines telles que Omi/HtrA2 semblent avoir le même profil d'action que Smac/Diablo concernant l'inhibition des IAP et cumulent également d'autres fonctions pour le moment mal connues (van Gurp et al., 2003).

- **Voie indépendante des caspases.**

Certaines protéines telles que AIF (apoptosis inducing factor) ou l'endonucléase G sont elles aussi relarguées de la mitochondrie suite à un signal apoptotique. Elles sont capable de propager ce signal sans intervenir sur l'activation des caspases (pour revue (van Gurp et al., 2003)).

2.5. Variation du modèle d'activation de l'apoptose.

L'activation de la voie apoptotique intrinsèque au niveau de la mitochondrie est le modèle couramment admis. Cependant certaines publications ont rapporté ces dernières

années un rôle de la caspase 2 dans l'activation de cette voie intrinsèque. La caspase 2 est une caspase initiatrice qui contient un domaine CARD dont le rôle dans la cascade apoptotique était jusqu'à présent énigmatique et controversé. Lassus *et al.* ont démontré qu'un stress cytotoxique induit l'activation de la caspase 2 et surtout, que cette activation est nécessaire pour la perméabilisation en aval de la mitochondrie (Lassus et al., 2002). La caspase 2 est incapable d'activer les caspases effectrices par clivage. Les avis sont partagés sur les moyens qu'elle utilise pour induire la perméabilisation de la mitochondrie : certains ont démontré qu'elle serait capable de cliver Bid ou encore d'induire la translocation de Bax et ainsi induire le relargage du cytochrome c (Guo et al., 2002). Elle pourrait également induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale en agissant directement sur cette membrane sans l'intermédiaire d'autres protéines par un mécanisme encore mal compris (Enoksson et al., 2004; Robertson et al., 2004). Son mécanisme d'activation était largement inconnu jusqu'à l'identification récente d'un complexe comprenant entre autres la caspase 2, la protéine adaptatrice RAIDD et la protéine PIDD (p53-induced protein with a death domain) (Lin et al., 2000b; Tinel and Tschopp, 2004). La présence de PIDD dans ce complexe ferait le lien entre le signal génotoxique, l'activation de p53 et l'activation de la caspase 2 suivie de la perméabilisation de la mitochondrie.

Au niveau conceptuel, ceci indiquerait que l'apoptose induite par le stress pourrait être exécutée par une voie qui fonctionnerait de manière similaire à celle des récepteurs de mort, c'est-à-dire où l'activation de la voie par le signal apoptotique induit l'activation d'une caspase initiatrice au sein d'un complexe et qui utilise ensuite la mitochondrie pour amplifier et propager ce signal. L'implication de la caspase 2 dans l'apoptose induite par certains stress a été confirmée par différentes études mais son importance est encore controversée. La voie exacte d'activation de cette caspase ainsi que celle qu'elle utilise pour perméabiliser la membrane mitochondriale reste à déterminer. En particulier, le rôle exacte et la composition du complexe formé avec PIDD demande des études supplémentaires. La compréhension du mécanisme d'induction de cette voie d'apoptose pourra avoir des implications sur la compréhension des mécanismes de progression des cancers puisque des déficiences dans la machinerie apoptotique sont souvent corrélées avec la carcinogénèse. Un meilleur ciblage thérapeutique par l'utilisation des drogues génotoxiques en chimiothérapie sera également possible.

Le modèle d'induction de l'apoptose selon 2 voies intrinsèque et extrinsèque est certainement un modèle simpliste et le reflet de nos connaissances actuelles des mécanismes d'induction de l'apoptose.

La découverte du concept de récepteurs à dépendance a mis à jour une troisième voie d'induction de l'apoptose dissociable des 2 premières (pour revue, voir (Mehlen and Bredesen, 2004)). Ces récepteurs à dépendance sont impliqués à la fois dans le développement du système nerveux mais également dans la tumorigénèse (Mazelin et al., 2004). Ils sont caractérisés par leur capacité à induire une double signalisation : en présence de leur ligand, ils activent un signal de prolifération ou de différenciation alors qu'ils transduisent un signal apoptotique lorsque ce ligand est absent. La présence de ces récepteurs génère un état de dépendance de la cellule vis-à-vis du ligand puisque la rupture de la liaison du ligand sur son récepteur induit l'apoptose de la cellule. L'expression de tels récepteurs est fréquemment perdue lors de la tumorigénèse, la perte de cette dépendance conférant aux cellules un avantage prolifératif dans un environnement dépourvu du ligand. A présent, plus de 10 récepteurs remplissent ces critères de récepteur à dépendance parmi lesquels p75^{NTR} (récepteur du NGF), les récepteurs de la nétrine 1 DCC, UNC5H1-2 et-3, le récepteur des androgènes (AR) ou encore patched, le récepteur de sonic hedgehog. Le mécanisme d'induction de l'apoptose repose sur le clivage des récepteurs par les caspases actives générant ainsi un fragment proapoptotique ou l'exposition de domaines proapoptotiques préalablement masqués. Dans un cas comme dans l'autre, ils induisent l'activation des caspases et l'apoptose des cellules. Récemment, il a été démontré que le récepteur UNC5H2 lorsqu'il est clivé par les caspases, recrute et active la kinase DAP qui est en partie responsable de la transduction du signal apoptotique (Llambi et al., 2005). Comment les caspases sont-elles activées pour assurer le clivage des récepteurs à dépendance et comment la liaison du ligand bloque-t-elle cette apoptose restent à déterminer.

La compréhension des mécanismes de l'apoptose a réalisé des progrès fulgurants au cours de la dernière décennie. Cependant, la multiplicité des voies et familles de protéine engagées, l'implication de nombreuses signalisations capables de moduler ces voies rends difficile l'obtention d'une vision globale de la transduction du signal apoptotique.

Cependant, les progrès réalisés permettent déjà d'envisager de cibler les molécules impliquées dans les voies apoptotiques en traitement des cancers. Ainsi, le ligand de mort TRAIL est actuellement en phase d'essai clinique. D'autres stratégies envisagent l'utilisation

de molécules chimiques inhibant l'action de Bcl-2 ou de molécules d'ADN antisens capables d'éteindre son expression. En parallèle, ces études ont permis de montrer que de nombreux agents chimiothérapeutiques induisent la régression des tumeurs en induisant l'apoptose des cellules touchées. La compréhension des voies apoptotiques utilisées par ces agents permettra d'optimiser les traitements par exemple en cumulant l'utilisation d'agents induisant des effets différents mais synergiques.

2.6. Quelles sont les cibles de l'AR parmi ces voies apoptotiques ?

De nombreux travaux ont conclu à un effet apoptogénique de l'AR dans les cellules cancéreuses telles que les leucémies, cancer du sein, neuroblastomes, des mélanomes, ou encore le cancer des poumons (Bruel et al., 1995; Liu et al., 1996c; Melino et al., 1997; Nagy et al., 1995; Spanjaard et al., 1997). Cependant, peu d'informations sont connues sur les voies apoptotiques utilisées par l'AR.

La plupart des études consacrées à l'identification de ces voies ont rapporté des modifications du niveau d'expression des membres de la famille de Bcl-2. Dans le cas des cellules myéloïdes HL-60, l'expression de Bcl-2 est diminuée par le traitement à l'AR pendant la phase de différenciation qui précède l'apoptose des cellules (Nagy et al., 1996; Naumovski and Cleary, 1994). La surexpression de Bcl-2 dans ces cellules ne modifie pas la phase de différenciation mais prolonge leur survie en inhibant la phase d'apoptose (Park et al., 1994). Des travaux récents ont démontré que l'AR induit la diminution de la nucléolin, une protéine impliquée dans la stabilisation de l'ARNm de Bcl-2. Ceci résulte dans la diminution de la demi-vie de l'ARNm de Bcl-2 et l'induction de l'apoptose des cellules (Otake et al., 2005). Cette diminution de l'expression de Bcl-2 a été également décrite dans d'autres lignées, comme par exemple des lignées de cancer du sein de pancréas, de mélanomes (Christine Pratt et al., 2003; Pettersson et al., 2002; Zhang and Rosdahl, 2004).

Une étude réalisée dans les cellules NB4 traitées par l'AR rapporte une diminution de l'expression de Bcl-2 concomitante avec une induction de la protéine pro-apoptotique Bax. De manière intéressante, les auteurs ont noté une augmentation d'expression de certaines caspases (caspases 1, 7, 8 et 9) et une activation de l'activité des caspases 8 et 3 suggérant que la voie extrinsèque pourrait en partie être impliquée (Gianni et al., 2000).

C'est dans ce contexte que nous avons initié au laboratoire une étude des différents programmes génétiques induits par un traitement par l'AR et responsables de ses effets

apoptotiques. Nous avons utilisé différents modèles cellulaires tels que les cellules issues de cancers du sein, les cellules NB4 et les cellules myéloïdes PLB985 dépourvues de la protéine de fusion PML-RAR α . Nous avons mis en évidence une implication majeure de TRAIL dans l'apoptose induite par les rétinoïdes. Les détails seront traités dans la partie résultat de ce manuscrit.

3. Les rétinoïdes atypiques et l'induction de l'apoptose.

Les rétinoïdes atypiques dont le CD437 ou le fenretinide (4-HPR) sont des analogues synthétiques de l'AR qui sont actuellement très étudiés pour leur activité anti-tumorale.

Ces molécules sont des rétinoïdes au sens propre du terme puisqu'ils peuvent se lier et activer les récepteurs à l'AR (principalement RAR γ). Cependant cette activité n'est pas ou pas totalement responsable de leur activité antitumorale puisqu'ils peuvent induire l'apoptose de cellules résistantes à l'AR et qu'ils conservent leur activité apoptogénique en présence d'antagonistes de RAR (Wu et al., 2001). Contrairement aux autres classes de rétinoïdes, ils ont un faible effet différenciatif sur les cellules traitées et induisent directement l'apoptose d'un grand nombre de types cellulaires dont certains étant résistants aux rétinoïdes classiques (pour revue (Wu et al., 2001)). Pour cette raison, de nombreuses équipes ont tenté d'élucider les mécanismes par lesquels ces molécules induisent l'apoptose de leurs cellules cibles.

Sun *et al.* ont démontré que le CD437 est capable d'induire l'expression des récepteurs de mort Fas, DR4 et DR5 dans des lignées de cancer de la prostate et également des cancers du poumon (Sun et al., 2000b; Sun et al., 2000c). Ainsi, une combinaison d'un traitement par le CD437 et TRAIL résulte dans l'induction synergique de l'apoptose des cellules traitées (Sun et al., 2000a). De manière très intéressante, ils ont montré que le CD437 possède une activité sélective des tumeurs puisque des cellules épithéliales de poumon normales ne sont pas touchées par le traitement, soulignant ainsi une caractéristique de l'apoptose induite par TRAIL (Sun et al., 2002).

De manière générale, les rétinoïdes atypiques semblent cibler la voie apoptotique mitochondriale et induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (Holmes et al., 2004). Cependant différents mécanismes semblent impliqués selon le type cellulaire étudié et la classe de rétinoïde atypique utilisé.

L'effet apoptogénique du fenretinide peut être en partie médié via la production de ROS (Boya et al., 2003; Goto et al., 2003; Lovat et al., 2004a). Boya *et al.* montrent que les ROS produits suite au traitement sont nécessaire à un changement conformationnel de bax et bak responsable de la perméabilisation de la mitochondrie (Boya et al., 2003). Lovat *et al.* suggèrent un mécanisme différent dans les neuroblastomes. Le fenretinide induirait la formation de ROS par un mécanisme impliquant une augmentation de la production de céramide (Lovat et al., 2004a; Lovat et al., 2004b). Le stress oxydatif ainsi généré induit la transcription des gènes codant pour bak et pour GADD153 (aussi appelé CHOP), un facteur de transcription membre de la famille de C/EBP inductible par différentes formes de stress (Lovat et al., 2003). L'induction de ces 2 protéines serait responsable de l'apoptose des cellules. L'activation des voies de la p38 et de JNK par les ROS a également été incriminée dans l'apoptose induite par le fenretinide dans les neuroblastomes (Osone et al., 2004).

Dans des cellules de cancer du sein, le fenretinide induit la production de NO par la surexpression des NOS endothéliales et inductibles (Simeone et al., 2002). Ceci a pour conséquence un arrêt de prolifération suivi de l'apoptose des cellules, effets potentiellement inhibés par l'oncogène HER2/neu (Simeone and Tari, 2004).

Un autre mécanisme d'induction de l'apoptose par le CD437 a été décrit par Holmes *et al.*. Dans les cellules de carcinomes ovariens, le CD437 induit l'activation de MEK (MAP kinase ayant ERK pour cible dans la voie de transduction) qui induit ensuite une cascade d'événement dont l'activation de p38 et de MEF2. MEF2 active ensuite la transcription de TR3 qui est transloqué à la mitochondrie où il induit le relargage du cytochrome c (Holmes et al., 2003b). Ils ont démontré que le fenretinide cible également la mitochondrie dans ces mêmes cellules mais dans un mécanisme indépendant de TR3 (Holmes et al., 2003a).

D'autres molécules de rétinoïdes atypiques dont les « hétéroarétinoïdes » ont également une activité anti-tumorale très prononcée via l'induction d'apoptose des cellules traitées (pour revue (Ortiz et al., 2002)).

4. Activités anti-tumorales des rétinoïdes.

Les rétinoïdes peuvent induire un arrêt de prolifération, la différenciation et l'apoptose de nombreux types de cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo*. Il y a beaucoup moins de données concernant les rétinoïdes et leurs potentiels effets anti-tumoraux. Cependant,

certaines activités ont été répertoriées. Les RXRs peuvent en effet coopérer avec RAR ou d'autres récepteurs nucléaires et potentialiser leurs effets. Mais sont-ils capables d'induire ces mêmes effets de manière indépendante ?

4.1. Effet synergique des rétinoides.

Si l'on se réfère au fonctionnement de l'hétérodimère RXR/RAR, un rétinol seul ne permet pas le recrutement des coactivateurs. L'addition d'un agoniste de RAR permet ce recrutement qui peut être potentialisé par un agoniste de RXR et conduit donc à une synergie dans l'activation de la transcription. De manière générale, ces effets sur la transcription sont répercutés au niveau cellulaire. C'est à dire que le traitement par un rétinol n'induit aucun phénotype particulier. Cependant, il renforce les effets anti-prolifératifs, différenciatifs et apoptogéniques des rétinoides dans la majorité des systèmes étudiés tels que les leucémies myéloïdes ou monocytaires, les neuroblastomes ou cancer du poumon (Brown et al., 1997b; Nguyen et al., 2003; Shiohara et al., 1999; Sun et al., 1999).

La même relation de subordination existe entre RXR et VDR. L'addition de vitamine D3 induit la différenciation monocyttaire des précurseurs myélomonocytaires et le cotraitement avec un rétinol potentialise cet effet (Brown et al., 1997b; Defacque et al., 1997).

Enfin, une synergie entre les rétinoides et les agonistes de PPAR γ est également observée : l'activation de l'hétérodimère RXR/PPAR γ par les 2 ligands peut en effet induire un arrêt de la prolifération suivi de l'apoptose des cellules de cancer du sein, de myélomes, et adénocarcinomes gastrointestinal, biliaire ou pancréatique (Crowe and Chandraratna, 2004; Ray et al., 2004; Tsujie et al., 2003).

4.2. Voies dépendantes des rétinoides.

Les rétinoides ont-ils des effets anti-tumoraux ? Des données très convaincantes ont été fournies dans ce sens par différentes études réalisées sur des modèles murins de tumeurs mammaires chimiquement induites. En effet, un agoniste sélectif de RXR, le LG1069

(targretin) est très efficace à la fois pour la prévention et le traitement de ces carcinomes mammaires pouvant induire jusqu'à 72 % de régression complète des tumeurs (Bischoff et al., 1998; Gottardis et al., 1996; Wu et al., 2002). Le même groupe a ensuite démontré que cette inhibition de croissance des cellules tumorales par le LG1069 provient d'une induction de la différenciation des cellules dans la voie adipocytaire (Agarwal et al., 2000). Ces résultats sont de première importance puisqu'ils démontrent une grande efficacité antitumorale des rexinoïdes associée à une faible toxicité et des effets secondaires réduits comparés aux rétinoïdes.

Le rôle de RXR dans la différenciation a été également démontré dans les cellules de carcinomes embryonnaires F9, un modèle bien établi pour étudier la différenciation induite par l'AR. Une invalidation des gènes codant pour RXR α induit une résistance des cellules à l'effet différenciatif de l'AR (Clifford et al., 1996). De plus, l'expression ciblée d'un dominant négatif de RXR β dans les cellules myéloïdes de souris conduit à un défaut de la myélopoïèse confirmant son implication dans la différenciation myéloïde (Sunaga et al., 1997).

Au cours d'une collaboration entre le laboratoire et l'équipe du professeur Lanotte, il a été démontré que si les rexinoïdes sont inefficaces dans l'induction de la différenciation des cellules NB4, un cotraitement avec un agoniste de la PKA (un analogue d'AMPC) permet d'induire cette différenciation (Benoit et al., 1999). La maturation observée est indépendante de RAR et est également induite dans les cellules NB4-R2 résistantes aux rétinoïdes. De manière intéressante, la différenciation n'est pas accompagnée par la dégradation de PML-RAR α ni la reformation des corps PML. Ceci démontre l'existence d'un crosstalk entre la PKA et RXR et prouve que des agonistes de RXR pourraient être utilisés dans des cas de résistance au traitement par l'AR.

RXR et les rexinoïdes sont également impliqués dans l'induction de l'apoptose. Dans le cas des cellules myéloïdes HL-60, Nagy *et al.* ont démontré qu'un agoniste de RAR α induit la différenciation des cellules dans la voie granulocytaire alors qu'une activation subséquente de RXR est nécessaire pour l'induction de l'apoptose (Nagy et al., 1995). Une induction de l'apoptose par les rexinoïdes a été également rapportée dans les cellules de carcinomes de la tête et du cou ainsi que dans des lignées de lymphomes B et T (Wan et al., 1998; Zhao et al., 2004). Dans ces différents cas, aucune différenciation préalable n'est nécessaire et l'effet

apoptotique est direct. Cependant, si les résultats sont probants dans ces systèmes, on peut s'interroger sur leur signification physiologique, ceux-ci ayant été obtenus seulement lors d'une surexpression de RXR alors que son niveau endogène est détectable.

Toujours dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du professeur Lanotte, nous avons mis en évidence l'existence d'une voie d'induction de l'apoptose des cellules NB4 par différents rexinoïdes dans des conditions de culture pauvres en sérum afin d'éviter toutes contributions des rétinoïdes sériques et des facteurs de croissance (Benoit et al., 2001b). Dans ce cas, l'apoptose est induite de manière directe sans maturation préalable et ne requiert pas la contribution de RAR. Au contraire, l'activation simultanée de RAR par un agoniste inhibe l'apoptose en rétablissant une étape de différenciation. Cette apoptose induite de manière autonome par les rexinoïdes est également obtenue dans des cellules myéloïdes dépourvues de la protéine de fusion PML-RAR α . L'étude des voies apoptotiques induites par ce traitement a été l'objet d'une partie de mon travail de thèse et sera décrite dans la partie résultat.

D'autres travaux ont établi un rôle proapoptotique de RXR via son interaction avec d'autres voies de signalisation. En effet, RXR activé par son ligand peut physiquement interagir avec la β -caténine, ou encore l'IGFBP3 et ainsi induire l'apoptose des cellules sans activer la transcription (Liu et al., 2000; Xiao et al., 2003). L'effet proapoptotique de l'hétérodimère TR3-RXR via sa translocation à la mitochondrie est également modulé positivement ou négativement par un agoniste de RXR (voir paragraphe II.5.).

L'ensemble de ces données démontre que les rexinoïdes ont également des effets antitumoraux avérés de part leur capacité à induire un arrêt de croissance, la différenciation ou l'apoptose des cellules cancéreuses. Des tests cliniques ont démontré une toxicité réduite du LG1069 et validé son utilisation dans le traitement des lymphomes T cutanés. Ces résultats démontrent que son utilisation pourrait être étendue à d'autres cas de cancer.

Cependant, de nombreuses questions restent en suspens. Dans ces cas d'apoptose ou de différenciation induites par les rexinoïdes, l'identité du partenaire de RXR n'est pas toujours établie. A-t-on toujours à faire à un hétérodimère avec un membre de la famille des récepteurs nucléaires et si oui lequel ? L'action d'un homodimère RXR/RXR est-elle envisagée ? Cette dernière suggestion est difficile à confirmer expérimentalement. Dans un autre registre, il serait également intéressant de déterminer les voies apoptotiques induites par les traitement

rexinoïdes pour pouvoir ainsi optimiser les traitements des cellules cancéreuses. Par exemple, peut-on également étendre le lien TRAIL/retinoïde aux réxinoïdes ? Cette possibilité reste à envisager. En effet, une publication récente démontre qu'une molécule anti-inflammatoire capable de se lier à RXR induit ainsi l'apoptose des cellules de cancer de la prostate et non des cellules normales, ceci rappelant le caractère sélectif des tumeurs de TRAIL (Kolluri et al., 2005).

But du travail

Bases de l'étude: Le traitement des cellules NB4, seul modèle cellulaire de la pathologie d'APL, par ATRA (agoniste de RAR) induit la différenciation des cellules dans la voie granulocytaire puis leur apoptose. Les agonistes de RXR, généralement silencieux dans ces cellules peuvent (i) induire la différenciation et l'apoptose des cellules NB4 lorsque la concentration intracellulaire en AMPc est élevée, (ii) induire l'apoptose directe des cellules NB4 immature en absence de signaux de survie antagonistes.

L'objectif de mon travail a consisté à étudier l'effet de ces différents traitements rétinoïdes et rexinoïdes sur d'autres sous-types de leucémie myéloïde aiguë (AML) et à définir les bases moléculaires de l'apoptose induite dans ces cellules AML (APL comprises).

Etude n°1 : Etude de la différenciation et de l'apoptose induites par ATRA dans les cellules APL.

Le but de cette étude a été de déterminer les programmes de gènes induits par ATRA dans les cellules NB4 et identifier parmi eux les facteurs clé responsables des effets différenciatifs et apoptogéniques.

Nous avons choisi d'utiliser la technique de RPA (RNAse protection assay) pour l'identification des gènes induits puis nous avons utilisé différents tests fonctionnels afin de vérifier leur implication dans les effets induits par ATRA.

Etude n°2 : Etude de la différenciation et apoptose induite par les rétinoïdes dans les cellules AML non-APL PLB985.

Le premier objectif de cette étude a consisté à déterminer les effets des rétinoïdes dans une lignée AML n'exprimant pas la protéine de fusion PML-RAR α . Pour ceci, nous avons utilisé des agonistes sélectifs des récepteurs RAR et RXR. Nous avons ensuite également étudié les programmes de gènes induits par ces traitements de la même manière que dans l'étude précédente.

Le deuxième objectif était d'identifier des facteurs nécessaires à l'apoptose induite par les rétinoïdes sans se limiter aux protéines déjà connues. Nous avons utilisé la technologie de mutagenèse par insertion rétrovirale et sélectionné ainsi un clone de cellules résistant à l'AR que nous avons ensuite analysé.

Etude n°3 : Etude de la synergie entre un agoniste de la Protéine Kinase A (PKA) et un rexinoïde dans les cellules de Leucémie Myéloïde Aiguë (AML).

L'objectif de cette étude consistait à tester l'efficacité éventuelle du co-traitement rexinoïde/agoniste de la PKA dans les autres cellules AML non-APL qui sont réfractaires au traitement rétinoloïde puis d'identifier les bases moléculaires des effets induits.

Nous avons donc utilisé différentes lignées cellulaires myéloïdes puis transposé cette étude aux blastes de patients AML cultivés ex vivo.

Etude n°4 : Etude de l'apoptose induite par les rexinoïdes dans les cellules AML en condition de culture pauvre en sérum.

L'objectif de cette étude était également de valider l'utilisation de ce traitement dans des cellules AML non-APL. Nous voulions disséquer les voies d'apoptose induites, identifier les voies de survie antagonistes induites par les facteurs présents dans le sérum puis déterminer l'identité de l'hétérodimère responsable de la transduction de ce signal rexinoïde.

Etude de l'apoptose induite par l'AR dans les cellules de leucémie promyélocytaire aiguë (APL)

Le laboratoire d'Hinrich Gronemeyer a été centré ces dernières années sur l'étude des récepteurs nucléaires, notamment RXR et RAR, et les bases moléculaires de leur fonctionnement au niveau de l'activation de la transcription. Lorsque je suis arrivée au laboratoire, l'équipe commençait à développer un nouvel axe de recherche au sein de la thématique des rétinoïdes en s'intéressant à leur action apoptogénique.

L'activité anti-tumorale des rétinoïdes est liée à leur capacité de moduler la prolifération, différenciation et apoptose des cellules de différents tissus. Les aspects de croissance et différenciation ont été majoritairement étudiés, parmi tous les effets cellulaires induits par les rétinoïdes. Leur capacité à induire l'apoptose des cellules cancéreuses a été quant à elle l'objet de moins d'attention. De nombreux rapports ont en effet été publiés sur les effets antiprolifératifs et différenciatifs des rétinoïdes dans différentes lignées cancéreuses, et notamment dans les lignées myéloïdes telles que les cellules NB4, HL-60. Les cellules HL-60 sont bloquées au stade myélocytaire et répondent à un traitement par l'AR en suivant la voie de maturation granulocytaire. Un co-traitement par un agoniste de RXR est nécessaire pour obtenir l'apoptose des cellules après la phase de différenciation.

Les cellules promyélocytaires NB4 représentent le seul modèle cellulaire de la pathologie d'APL et expriment la protéine de fusion PML-RAR α . Sous l'action de l'AR *tout trans*, elles différencient dans la voie granulocytaire et l'on observe de manière concomitante un arrêt dans le cycle cellulaire dans la phases G1. Au niveau moléculaire, l'expression entre autres des gènes de la famille C/EBP et de p21 respectivement est impliquée dans les effets décrits. Après la phase de maturation, les cellules meurent par apoptose sans besoin d'activer le récepteur RXR. On observe donc dans cette lignée cellulaire la récapitulation des évènements induits par ATRA sur les cellules promyélocytaires leucémiques des patients APL. Il existe également un clone mutant de ces cellules NB4 (NB4-R2) qui portent une mutation dans le domaine de liaison du ligand de PML-RAR α et par conséquent, ne répondent pas à un traitement par ATRA.

Il était primordial de comprendre les mécanismes impliqués dans l'induction de l'apoptose par les rétinoïdes dans le but de pouvoir améliorer et potentialiser l'action anti-tumorale de l'AR dans le cas d'APL mais également d'autres types de cancer.

Les cellules NB4 et NB4-R2 ont donc été choisies pour étudier les effets apoptogéniques des rétinoïdes dans la pathologie d'APL. D'autres types de cancer tels que les cancers du sein ont été également étudiés au laboratoire. L'une des approches expérimentales a consisté en l'utilisation de la technique de RPA (RNase protection assay) afin de déterminer les programmes génétiques induits par ATRA dans ces cellules. Ceci a permis d'étudier la modulation de l'expression de nombreux gènes connus pour participer à l'apoptose et de se focaliser par la suite sur les candidats intéressants.

Lorsque je suis arrivée au laboratoire, j'ai donc rejoint ce projet et participé aux travaux effectués sur les modèles leucémiques. Les résultats obtenus sont décrits dans la publication suivante.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL

Lucia Altucci, **Aurélie Rossin**, Wolfgang Raffelsberger, Armin Reitmair, Christine Chomienne & Hinrich Gronemeyer

Nature Medicine, 2001, Vol. 7, Pages 680-686

Pages 680 à 686 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
http://www.nature.com/nm/journal/v7/n6/full/nm0601_680.html

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Etude de la différenciation et apoptose induite par les rétinoïdes dans les cellules myéloïdes PLB985. Utilisation de mutagénèse par insertion rétrovirale.

D'autres études ont été initiées au laboratoire toujours dans l'optique de mieux caractériser l'apoptose induite par les rétinoïdes. En parallèle avec les études menées sur les cellules APL NB4, d'autres systèmes cellulaires ont également été étudiés, et parmi lesquels les cellules myéloïdes PLB985. Ces cellules sont bloquées à un stade de différenciation précédant les cellules NB4 et n'expriment pas la protéine de fusion PML-RAR α . Récemment, elles ont cependant été décrites comme étant un sous-clone des cellules HL-60. Leur utilisation peut permettre de discriminer si les gènes induits dans les cellules NB4 en présence d'AR sont influencés par la protéine de fusion PML-RAR α ou si les mêmes gènes vont être induits en absence de cette protéine.

Certaines publications concernant ces cellules avaient déjà rapporté leur sensibilité à l'AR (Tucker et al., 1987). La première partie du travail a donc consisté à caractériser plus en détail les effets induits par les rétinoïdes au niveau de la prolifération, différenciation et apoptose. De plus, nous avons utilisé des ligands sélectifs de RAR et de RXR afin de déterminer l'implication de chacun des récepteurs dans les effets cellulaires observés. La même approche de caractérisation des gènes régulés par un traitement par les rétinoïdes en utilisant la technique de RPA a été ensuite réalisée.

Cependant, une autre approche a été tentée sur ces cellules afin de déterminer quels gènes étaient réellement nécessaires dans l'apoptose induite par les rétinoïdes. Nous avons réalisé sur les cellules PLB985 une mutagénèse par insertion en utilisant un rétrovirus comme vecteur. Les cellules PLB985 ont donc été infectées par le rétrovirus et premièrement sélectionnées pour leur insertion en utilisant la résistance à la néomycine. Ensuite, elles ont également été sélectionnées pour leur éventuelle résistance à l'AR 9-cis. Ainsi, seront conservées les cellules ayant incorporé le virus à proximité ou dans un gène impliqué dans l'apoptose induite par l'AR. Il suffit ensuite, par PCR, de déterminer à quel locus le virus s'est intégré. Cette approche avait pour but d'identifier les molécules clé nécessaires à l'induction de l'apoptose par les rétinoïdes sans se limiter aux protéines connues pour leur implication dans l'apoptose.

J'ai collaboré à cette étude tout au long de sa réalisation. Les résultats obtenus sont rassemblés dans la publication suivante.

Co-resistance to retinoic acid and TRAIL by insertional mutagenesis into *RAM*

Weihong Yin¹ Aurélie Rossin, Hinrich Gronemeyer *

Department of Cell Biology and Signal Transduction
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
(IGBMC)/CNRS/INSERM/ULP, BP 10142
F-67404 ILLKIRCH CEDEX, C. U. de STRASBOURG, FRANCE

Running title: Co-resistance to 9-*cis* RA and TRAIL

Keywords:

Retinoic acid, rexinoid, apoptosis, TRAIL, insertion mutagenesis, retrovirus

***Corresponding author**

IGBMC, B.P. 10142, 67404 Illkirch-Cedex, France

¹ Present address: Dept. of Biochemistry & Molecular Biology; LSUHSC; 1501 Kings Highway; P.O Box 33932; Shreveport, LA 71130-3932; USA

Tel.: +(33) 3 88 65 34 73
Fax: +(33) 3 88 65 34 37
e-mail: hg@igbmc.u-strasbg.fr

Abstract

Retinoic acid (RA), used as first line therapy for acute promyelocytic leukemia (APL), exerts its anti-leukemic activity by inducing blast differentiation and activating tumor-selective TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) signaling. To identify downstream mediators of RA signaling we used retrovirus-mediated insertion mutagenesis in PLB985 leukemia cells and established the RA-resistant cell line WY-1. In PLB985 but not WY-1 cells RA induces TRAIL and its DR4 and DR5 receptors. Knocking down TRAIL expression by RNA interference blocked RA-induced apoptosis. WY-1 cells are defective for RA-induced differentiation, G1 arrest and exhibit co-resistance to TRAIL. In WY-1 cells, a single virus copy integrated in a novel RA-regulated gene termed *RAM* (Retinoic Acid Modulator). *RAM*, which spans 328,546 bp at chromosome 8q24.21 but can encode only 109 residues, is expressed in the myelomonocytic lineage and extinguished by RA in PLB985 but not WY-1 cells. Surprisingly, over-expression of RAM did not alter RA-induced differentiation, growth inhibition or apoptosis in PLB985 indicating that *RAM* functions, distinct from the predicted protein, are impaired by the retroviral insertion. Our study demonstrates that RA induction of the TRAIL pathway is also operative in non-APL leukemia cells and identifies *RAM* as a possible novel RA-dependent modulator of myeloid differentiation and death.

Introduction

Retinoids, generally referring to the entire set of compounds including both naturally occurring and synthetic vitamin A (retinol) metabolites and analogs, exert their cellular effects via interactions with six nuclear receptors, the retinoic acid receptors (RARs) and the retinoid X receptors (RXRs; each containing α , β , and γ subtypes) (Laudet & Gronemeyer, 2002). Retinoids are physiological regulators of essential biological processes that include cell growth, differentiation and apoptosis (Altucci & Gronemeyer, 2001; Clagett-Dame & DeLuca, 2002; Gavalas, 2002). The strong cell differentiation potential of retinoids has led to their use in both chemotherapy and chemoprevention of human cancers (Altucci & Gronemeyer, 2001; Hansen et al., 2000; Hong & Sporn, 1997; Sun & Lotan, 2002). The prototype of successful “cancer differentiation therapy” is the all-*trans* RA (ATRA) therapy of acute promyelocytic leukemia (APL) caused by a leukemogenic RAR fusion protein (PML-RAR α) (de The et al., 1991; Kakizuka et al., 1991; Pandolfi et al., 1991). In addition to inducing differentiation, ATRA and all RAR α -selective agonists also trigger apoptosis in the human APL cell line, NB4 and in leukemic blasts of patients by activating the TRAIL (TNFSF10) death signaling pathway (Altucci & Gronemeyer, 2004; Altucci et al., 2001; Clarke et al., 2004). So far it has remained unclear, if death induction by RAR α agonist is a specific feature of PML-RAR α positive APL cells, or there is any requirement for RXR agonists, for example in non-APL cells, to activate differentiation and/or apoptosis programs.

TRAIL initiates apoptosis through DR4 (TNFRSF10A) (Pan et al., 1997) and DR5 (TNFRSF10B) (MacFarlane et al., 1997; Walczak et al., 1997) which contain a cytoplasmic death-domain (DD). Upon ligation by TRAIL, its receptors form trimers and recruit to their death domains Fas-associated death domain (FADD), which in turn recruits procaspase-8 through its death effector domain (DED), and result in the formation of a death-inducing signalling complex (DISC) (Kischkel et al., 2000; Muzio et al., 1998; Sprick et al., 2002)

Two cell types have been identified based on differences in signal propagation downstream of the DISC formation (Scaffidi et al., 1998; Suliman et al., 2001). In type I cells, FADD-recruited procaspase-8 auto-processes itself through self-oligomerization to the active protease (Muzio et al., 1998; Salvesen & Dixit, 1999), leading to rapid cleavage of downstream effector caspases prior to the loss of mitochondrial membrane potential. In type II cells, where DISC formation is poor, activated caspase-8 truncates the pro-apoptotic *bcl-2* family member, Bid (Wang et al., 1996), which then translocates to mitochondria, resulting in the loss of mitochondrial membrane potential. In this case, the mitochondria function as 'amplifiers' to initiate the caspase cascade via release of cytochrome *c* (Luo et al., 1998) which binds to Apaf-1 (Zou et al., 1997), followed by the recruitment and oligomerization of procaspase-9 (Srinivasula et al., 1998). In the resulting complex, termed "apoptosome" (Zou et al., 1999), oligomerized procaspase-9 auto-activates itself (Shiozaki et al., 2002; Srinivasula et al., 1998) and triggers cleavage of the downstream executioner caspase-3 (Li et al., 1997).

In the present study we have investigated first the implications of RAR and RXR in leukemia cell differentiation and apoptosis to reveal possible differences

between leukemia cells containing the leukemogenic PML-RAR α fusion protein (NB4 cells, APL blasts) and those devoid of the fusion protein. For this we chose PLB985 myelomonoblastic cells (Tucker et al., 1987) which have normal diploid karyotype and can differentiate into granulocytes or monocytes. We observed that, in contrast to NB4 cells, the RARs and RXRs of PLB985 display distinct functionalities in regulating cell growth, maturation and apoptosis. Subsequently, in an attempt to identify master switches downstream of RAR/RXR-dependent apoptosis signaling we used a retrovirus-mediated insertional mutagenesis gene trap approach and generated a mutant cell line (WY-1) that is defective in RA-induced differentiation and apoptosis, and notably, also in TRAIL-induced apoptosis. Tracking the inserted virus led to the identification of a poorly annotated gene, *RAM*, which is selectively expressed in the myelomonocytic lineage and is negatively regulated by RA. Surprisingly, over-expression of the 109 amino acid-coding region of RAM did not alter differentiation or apoptosis of the parental cells, suggesting that *RAM* RNA may have functions unrelated to its hypothetical translation product.

Results Sections

Distinct roles of RAR and RXR on PLB985 cell proliferation, differentiation and apoptosis.

RAR α -selective retinoids are sufficient to induce differentiation and apoptosis of NB4 cells and APL patients' blasts (Altucci et al., 2001; Chen et al., 1996). In PLB985 myelomonoblastic cells, RAR α agonists (BMS753) alone decrease cell proliferation (Figure 1A) due to G1 arrest (data not shown) and induces

differentiation (Figure 1B) but not cell death (Figure 1C). The co-treatment with a RXR agonist (SR11237, "SR"), which itself had no effect, induces a synergistic differentiation which is followed by a post-maturation apoptosis (Figure 1A, B and C). These results demonstrate that PLB985 cell differentiation can be triggered by just RAR activation, while apoptosis requires the actions of both RAR and RXR. In the subsequent studies we used 9-*cis* RA, which is a pan-RAR and pan-RXR agonist (Allenby et al., 1993) and induces both PLB985 differentiation and death (Figure 1D).

Retrovirus insertional mutation of RAM generates 9-cis RA-resistant PLB985 cells.

To identify key mediators of 9-*cis* RA-induced apoptosis we used a mutational approach and infected PLB985 cells with an amphotropic retrovirus (LXSN) (Miller & Rosman, 1989). We established a 9-*cis* RA-resistant PLB985 mutant cell-line (WY-1) (Figure 2A), which is defective for RA-induced differentiation as revealed by NBT reduction (Figure 2B) and CD11c expression (the intensity of the signal in WY-1 cells was only 25% of that seen with WT cells, Figure 2C). The impaired differentiation of WY-1 cells correlated with the absence of the G1 arrest seen in the WT cells treated with 9-*cis* RA (Figure 2D). Note that no alteration of RAR or RXR expression or integrity was observed in WY-1 cells (data not shown).

Southern blotting with a PCR-amplified retrovirus fragment as probe indicated that a single LXSN retrovirus (schematically illustrated in Figure 3A) copy is present in the WY-1 genome (Figure 3C, left). Ligation-mediated PCR-based genome walking localised the virus at position 130,629,014 (Figure 3B) at the

chromosomal locus 8q24.21, about 200kb downstream of the closest known gene, melanoma-derived leucine zipper extra-nuclear factor (MLZE). Southern blotting with Ase I-restricted DNA confirmed the single copy integration at this locus, as a PCR-generated genomic fragment of PLB985 DNA (Figure 3B) hybridised to 1.4 kb and 4.9 kb fragments of WT and WY-1 DNA, respectively, corresponding to the addition of the 3.5 kb virus sequence in WY-1 DNA (Figure 3C, right panel).

The insertion occurred in the putative first intron of a gene (gene ID: 137196) whose function is unknown and subsequently referred to as *RAM* (Retinoic Acid Modulator). *RAM* is a hypothetical 328,546bp-spanning gene comprising 4 exons that encode a 1,718bp transcript (Figure 4A). EST data confirmed *RAM* expression, which is highly restricted (bone marrow, spleen, testis, eye, heart, kidney, skin); during development *RAM* is predominantly expressed in the embryo. Surprisingly, *RAM* has a short open reading frame (ORF) encoding a peptide of only 109 amino acids, which does not exhibit any predictable motifs, domains or features (Figure 4B). There is yet no evidence supporting the expression of the predicted *RAM* protein.

While no known gene in the vicinity of the insertion site (up to 1 Mb) is found controlled by RA or involved in RA signalling or apoptosis, *RAM* itself is negatively regulated by RA in both PLB985 (Figure 4C, "WT") and NB4 cells (Figure 4D). Interestingly, WY-1 cells expressed higher basal level of *RAM* mRNA than PLB985 cells (compare the "0" lanes in Figure 4C), suggesting that the inserted retrovirus enhanced *RAM* transcription. Indeed, *RAM* expression in PLB985 cells is extinguished after 10 days of 9-*cis* RA-exposure, while WY-1 cells show a reduction but retain a significant *RAM* mRNA level even after 14 days of treatment

(Figure 4C, lane "14"). The enhanced and sustained expression of *RAM* is probably responsible for the altered RA responsiveness of WY-1 cells. Interestingly, *RAM* expression pattern is apparently restricted to cells of the myelocyte-monocyte lineage as no expression was detected in a panel of breast or prostate cancer or Jurkat T cells (Figure 4E). Thus, *RAM* may constitute a marker for this lineage or even play a role in myelopoiesis.

9-cis RA activates TRAIL death pathway in PLB985 but not in WY-1 cells.

9-*cis* RA, similar to TRAIL which is used as a positive control, triggered the extrinsic death pathway, as shown by the caspase-8 active pattern (p43, p41, p18) (Sprick et al., 2002)(Figure 5A, top panel). Not surprisingly, both 9-*cis* RA and TRAIL cleave PARP, one of the downstream targets of the caspase cascade (Figure 5A, bottom panel).

As the extrinsic death pathway is activated by several death receptors, we used RNase protection assay to study potential effects of 9-*cis* RA on the expression profiles of TNF α , FasL, TRAIL and their receptors (Figure 5B). In PLB985 ("WT") cells, the expression of FasL and Fas was barely detectable, which largely excludes their involvement in the 9-*cis* RA apoptotic signalling. In contrast the mRNA levels of both TNF α (data not shown) and TRAIL were strongly induced. TRAIL mRNA level started to increase at day 4 and peaked at day 8 (Figure 5B, lanes 6-10), correlating with the kinetics of apoptosis. Moreover, also the expression of the cognate receptors DR4 and DR5 was upregulated, while DcR1 mRNA levels increased only transiently upon treatment. In keeping with the mRNA

data immunoblotting confirmed strongly increased TRAIL protein expression (Figure 5C).

In WY-1 cells hardly any effects of 9-*cis* RA on the expression of TRAIL, DR4, DR5 and DcR1 were discernible (Figure 5B, lanes 1–5). Together these data support an implication of the TRAIL or TNF α , but not FasL, death pathways in 9-*cis* RA induced apoptosis.

WY-1 cells are co-resistant to TRAIL.

While TNF α did not induce PLB985 apoptosis (data not shown), recombinant TRAIL caused massive cell death within 12 hours (Figure 6A). Most interestingly, the 9-*cis* RA-resistant WY-1 cells exhibited co-resistance to TRAIL (Figure 6B). We have previously established that PLB985 are type II cells (see introduction) in which TRAIL activates also the mitochondrial death pathway (our unpublished observations). In keeping with the above TRAIL resistance, no alteration in the mitochondrial membrane potential could be observed in WY-1 cells upon exposure to RA, while there was an obvious loss of mitochondrial membrane potential in WT cells (Figure 6C). This data suggest that *RAM* is involved not only in 9-*cis* RA-induced differentiation and post-maturation apoptosis but also in TRAIL-induced cell death.

TRAIL siRNA inhibits 9-cis RA-induced apoptosis.

To confirm the critical requirement of TRAIL in 9-*cis* RA-induced PLB985 cells apoptosis, we used a 21-nt small interfering RNA (siRNA) to knock down TRAIL expression. While the scrambled siRNA showed little effect, the TRAIL-specific

siRNA inhibited about 45% of 9-*cis* RA-induced apoptosis (Figure 6D, top). This corresponds to 75% in the transfected cells, as the transfection efficiency was about 60% with a FITC-conjugated oligonucleotide (data not shown). Western blots confirmed that TRAIL siRNA indeed diminished TRAIL protein expression (Figure 6D, bottom). We conclude from this data that TRAIL induction is critically involved in 9-*cis* RA-induced post-maturation PLB985 cell apoptosis.

Over-expression of RAM does not alter 9-cis RA-induced differentiation or apoptosis in PLB985 cells.

To assess a possible role of the putative RAM protein on cell differentiation and apoptosis induced by 9-*cis* RA, we stably expressed a B10 epitope-tagged *RAM* ORF into H3396 breast cancer cells and confirmed B10-RAM protein expression by immunoblotting (data not shown). However, using the identical construct with PLB985 cells, we were able to detect *RAM* mRNA but not the corresponding protein, suggesting decreased RAM protein stability in PLB985 cells. The same result was obtained when using a lentivirus system in which RAM was tagged with the V5-epitope, indicating that the protein instability is inherent to RAM and not due to a particular tag. Over-expression of RAM did not exert any notable effects on the 9-*cis* RA-induced differentiation and apoptosis in PLB985 cells (Figure 7) and did not affect the growth or apoptosis of H3396 cells (data not shown). These results indicate that RAM is either highly unstable in PLB985 cells and may not be expressed at significant levels, or the huge gene and/or its transcript may function independently of its 109 amino acid peptide-coding capacity.

Discussion

We have previously provided evidence that the induction of TRAIL contributes to the chemotherapeutic efficacy of retinoids in the treatment of APL (Altucci et al., 2001). To study whether retinoids can induce TRAIL also in cells devoid of PML-RAR α , we chose the myelomonoblastic PLB985 (Tucker et al., 1987) cell model to define the individual actions of RAR isotype and RXR-selective (“rexinoids”) retinoids on differentiation, proliferation and apoptosis. Our results fully confirm that both retinoids and rexinoids are required to induce apoptosis in these cells (Monczak et al., 1997), which differs fundamentally from promyelocytic NB4 cells that require only RAR α -selective agonists for both maturation and apoptosis (Chen et al., 1996), suggesting that PML-RAR α expression may obliterate the additional requirement for RXR activation. However, also in PLB985 cells RAR α -dependent maturation is prerequisite for RXR selective ligands to induce cell death. Together with earlier data on HL60 (Nagy et al., 1995) these results exclude very clearly that apoptosis is by default a consequence of RAR α -dependent cell differentiation along the granulocyte lineage. Indeed, we have previously provided evidence for distinct activities of RAR and RXR (Chen et al., 1996) and it is tempting to speculate that different RXR heterodimer(s) may trigger maturation (e.g. retinoid-activated RAR α -RXR) and post-differentiation apoptosis (e.g. one or more permissive RXR heterodimers, such as PPAR-RXR or alike).

To identify factor(s) critically involved in differentiation and/or apoptosis induced by the retinoid-rexinoid combination, we employed a retrovirus insertion

mutagenesis-mediated gene trap approach, established and characterized in detail one mutant PLB985 cell-line (WY-1) that is resistant to the dual RAR, RXR agonist 9-*cis* RA. The mutant cells are partially defective for differentiation as RA-induced CD11 marker expression is strongly decreased and NBT reduction, a classical test for efficient maturation is virtually negative. Importantly, WY-1 is not only resistant to 9-*cis* RA but also to TRAIL apoptogenicity, suggesting that the virus integration has activated a survival pathway or, inactivated a factor that is required for both 9-*cis* RA and TRAIL-induced apoptosis.

Mapping the LXS_N integration site resulted in the identification of a poorly annotated gene, *RAM*, whose function(s) were entirely unknown. Several arguments support that virus integration in *RAM* is the cause of the altered differentiation and apoptosis characteristics of PLB985, (i) our expression analyses show that *RAM* is a RA-regulated gene (ii) that is expressed in immature cells of the myeloid lineage and silenced by RA in PLB985 cells but (iii) due to viral LTR enhancer WY-1 cells retain considerable *RAM* expression even after long term exposure to RA. It is highly unlikely that selection of the retrovirus-infected cells resulted in the isolation of a cell that is resistant to 9-*cis* RA and just fortuitously carried a single virus inserted in a RA-regulated myeloid-specific gene. It is similarly unlikely that the insertion has affected the expression of another gene, as the next hypothetical gene downstream of *RAM* is nearly 1Mb away and the first exon of the closest downstream gene, *MLZE* (Watabe et al., 2001), which is expressed primarily in human trachea and spleen, is more than 200kb away from the retrovirus insertion (see Fig. 4A). A scan of 60kb around the first exon of *RAM* identified only three putative retinoic acid response elements (1,124bp upstream

DR2: AGGTCAggAGTTTCG; 6,207bp upstream DR2: AGGTCAggAGTTCA; 12,965bp upstream DR5: AGTTCAactccAGGTCA on the positive strand), which may mediate the RA response. Interestingly all three elements are of the G/T type which displays anisotropic RAR-RXR binding (Mader et al., 1993). It will be interesting to study if this type of response element architecture mediates negative regulation by RA.

Expression of the 1,718bp *RAM* transcript, covering all four exons is confirmed by EST data. Unexpectedly in view of its size, *RAM* can only encode a 109-residue basic peptide (13.192Da, theoretical pI 9.51), which displays no predictable motifs other than a 17-residue signal peptide (InterProScan, EBI). Over-expression of the epitope-tagged reconstructed coding region generated the corresponding mRNA, but the protein was not stable in PLB985 cells albeit it could be detected in breast cancer cells. However, despite significant mRNA expression levels, no effects on PLB985 differentiation or apoptosis were observed using two different expression strategies. It is thus possible that the coding capacity of the mature *RAM* transcript is functionally irrelevant and that the full-length transcript exerts as yet undefined functions involved in the regulation of differentiation and apoptosis.

Together with our previous work the present study further emphasizes the central role of TRAIL-mediated tumor selective death signaling in the anti-cancer action of retinoid, rexinoids and even novel epigenetic drugs (Altucci et al., 2001; Clarke et al., 2004; Nebbioso et al., 2004). Our data reveal a link between cell maturation, apoptosis and TRAIL signaling which is at first sight puzzling in view of the well-established apoptogenic action of TRAIL. However, it is becoming

increasingly documented that TRAIL has signaling capacity beyond the mere induction of apoptosis. Indeed, TRAIL itself is a regulator of cell differentiation and has been reported to promote NF κ B-dependent maturation of myeloid cells (Secchiero et al., 2003). Moreover the crosstalk between TRAIL and NF κ B signaling pathways is well established (Altucci et al., 2001; Baetu et al., 2001; Bernard et al., 2001; Ravi et al., 2001). Interestingly, we have observed that NF κ B signalling is dramatically de-regulated in WY-1 cells (our unpublished data) which could suggest that *RAM* may be a key regulator at the node of multiple signaling crosstalks that impact on cell survival, differentiation and death.

Materials and Methods

Reagents.

Recombinant human TRAIL and anti-TRAIL antibody were from R&D (Minneapolis, MN); antibodies against caspase-8 and cleaved PARP were from Cell Signalling Technology (Beverly, MA); phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD11c and FITC-conjugated anti-CD14 antibodies were from PharMingen (San Diego, CA); antibody for β -actin was from Santa Cruz (Santa Cruz, CA); FITC-conjugated Annexin V was from CALTAG Laboratories (Burlingame, CA); BMS753, SR11237 and 9-*cis* RA were provided by Bristol-Myers Squibb (Princeton, NJ) and used at 10^{-6} M.

Cell culture, retinoic acid treatment and retroviral infection.

PLB985 and NB4 cells were grown in RPMI 1640 medium containing 10% FCS. For LXSNS retrovirus production, the amphotropic packaging PA317 cells were

transfected with pLXSN by calcium phosphate co-precipitation. PLB985 cells were infected with the retrovirus-containing supernatant at MOI of 1:1 and subjected to 800 µg/ml of neomycin selection for 2 weeks. The neomycin-resistant cells were then exposed to 1 µM 9-*cis* RA for 3 weeks. From the double resistant cells, one cell-line (termed as WY-1) was established

LM-PCR, Southern blot and sequence analysis.

Ligation-mediated PCR was performed using the TOPO Walker Kit (Invitrogen). Briefly, the genomic DNA was first digested with Pst I, then primed by a LXSN LTR primer (5'-CCGCCAGATACAGAGCTAGTTAGC-3') to create double-stranded molecules with 3' A-overhangs, which were later ligated to a TOPO Linker. These linked molecules were amplified by PCR using another LTR primer (5'-GACGCAGTCTATCGGAAGACTGGC-3') and a linker primer (provided with kit). Taking the PCR products as templates, a nested PCR was performed using a nested LTR primer (5'-TCACTCAGCTGTCTCATCTGTTCT-3') and a nested linker primer (provided with kit), which yielded an 800bp fragment containing part of LTR of LXSN and 508 bp of PLB985 genomic DNA. Localization of the retrovirus insertion site was done by analysis of the 508bp sequence by BLAST (blast@ncbi.nlm.nih.gov). For Southern blot, Ase I digested DNA was electrophoresed on 0.7% agarose gel and blotted onto Hybond-N+ membrane (Amersham Pharmacia). A fragment of pLXSN amplified by PCR using P-1 and P-2 (see Figure 3A; P-1, 5'-CTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAG-3'; P-2, 5'-CAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGC-3') and a PCR-amplified genomic fragment encompassing the retrovirus insertion site (using P-3 and P-4 depicted in

Figure 3B; P-3, 5'-GGCCACTTTTGGAGAGTCCGACTA-3'; P-4, 5'-GCAGAGGCCAAGGCTAGTTGTCTT-3') were labelled with digoxigenin and used as probes for Southern blots (DIG Easyhyb system; Roche Mol Biochem, Indianapolis, IN).

Semi-quantitative RT-PCR and RNase Protection Assay.

In RT-PCR, 2 µg of total RNA (extracted using TRIzol (GIBCO)) was used to synthesize cDNA using oligo(dT)₁₅ as primer. Identical quantities of cDNA were used for PCR [RAM specific primers, sense: 5'-ATGGAAAGATTGTGCCTGCAG-3', anti-sense, 5'-TTATTTTCAGCTCTCTTCTCTC-3'; V5 primer, anti-sense: 5'-ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT-3'. PCR was performed for 25 to 30 amplification cycles at an annealing temperature of 60°C. As control, either β-actin or L32 cDNA were simultaneously amplified with the following primers: β-actin, sense, 5'-CCTCGCCTTTGCCGATCCGCC-3' and anti-sense, 5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3'; L32, sense, 5'-GCTGCCTACGGAGGTGGCAGCCATCTCCTT-3', anti-sense, 5'-GAAGGAAGATGCCAGATGGCAGTTTTTAC-3'.

RNase Protection Assays were performed with RiboQuant RPA template sets (BD PharMingen, Franklin Lakes, NJ) according to the provided instructions.

Western blot analysis.

Total cellular protein was prepared using RIPA lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 1 mM DTT, 20 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin, 10 µg/ml aprotinin, 1 mM PMSF). Proteins were separated by SDS

acrylamide gel electrophoresis and transferred to BA85 nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) and probed by antibodies as indicated. ECL detection kit (Amersham) was used for visualization.

Flow cytometry.

For Annexin V-staining 2.5×10^5 cells were resuspended in 50 μ l HEPES buffer (10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM KCl, 1.8 mM $CaCl_2$) containing 1 μ l Annexin V-FITC and kept for 15 min in dark at room temperature. HEPES buffer containing 0.25 μ g/ml propidium iodide (PI) was added before analysis by FACScan. For cell cycle analysis, 2.5×10^5 cells were resuspended in 500 μ l hypotonic buffer (0.1% Triton X100, 0.1% sodium citrate, 50 μ g/ml PI), incubated in dark over night at 4°C and subjected to FACScan analysis. In differentiation assays, 2.5×10^5 cells were incubated with 10 μ l PE-conjugated anti-CD11c antibody in dark on ice for 30 minutes. Cells were washed, resuspended in PBS with 0.25 μ g/ml PI and subjected to flow cytometry. Mitochondrial membrane potential was assayed by incubating 2.5×10^5 cells with 50 nM DiOC6(3) for 30 min in the dark and subsequent examination by flow cytometry.

NBT reduction assay.

500 μ l medium containing 1×10^6 cells was mixed with 500 μ l solution containing 0.2% nitroblue tetrazolium (NBT) and 200 ng 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA; SIGMA), after incubation for 30 minutes at 37°C, 500 μ l lysis buffer

(50% Dimethylformamide, 20% SDS, pH 7.4) was added and OD was measured at 570 nm.

RNA interference.

TRAIL siRNA kindly designed and provided by Ana Jimenez-Lara, was synthesized at Dharmacon Research, Inc. (Lafayette, CO). The sequences are for sense siRNA, 5'-AACGAGCUGAAGCAGAUGCAGdTdT-3' and for anti-sense siRNA, 5'-CUGCAUCUGCUUCAGCUCGUUdTdT-3'. siRNA transfection was performed with Oligofectamine (Life Technologies). The siRNAs were applied daily to the PLB985 cultures at final concentration of 200 nM after 4 days of treatment with 9-*cis* RA. At day 8, the cells were harvested for FACS analysis or Western blot experiments.

Lentiviral expression of exogenous RAM ORF in PLB985 cells

The Virapower lentiviral expression system (Invitrogen) was used to produce the lentivirus coding for RAM/V5 protein following the provided instructions using the pLenti6-RAM/V5 construct. Once collected, the lentivirus was concentrated by ultracentrifugation (25000 rpm, 90 min, 4°C). PLB985 cells were infected with the virus at a concentration of $2 \cdot 10^6$ IU/ml. corresponding to a MOI of 20:1 and selected for stable integration with 10mg/ml blasticidin.,

Acknowledgements

We thank Lucia Altucci for inspiring this work and critical discussions, Ana Jimenez-Lara for TRAIL siRNA, Fengjun Li and Michèle Lieb for technical assistance, Jean-Marie Garnier for the pSG5-RAM/B10 and pLenti6-RAM/V5 construction, Michel Koenig (IGBMC) for PLB985 and WY-1 genotyping, M. Lazar (Univ. of Pennsylvania, Philadelphia) for pLXSN, P.G. Pelicci (IEO, Milano) for the PA317 packaging cell-line, Yvon Cayre (Paris) for PLB985 cells, and Chris Zusi and Marco Gottardis (Bristol-Myers Squibb) for synthetic retinoids. This work was supported by funds from the Association for International Cancer Research (AICR grant 00-108), the Association pour la Recherche sur le Cancer, the European Community (QLG1-CT2000-01935 and QLK3-CT2002-O2029), the Hôpital Universitaire de Strasbourg (HUS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Ligue contre le Cancer.

References

- Allenby, G., Bocquel, M.T., Saunders, M., Kazmer, S., Speck, J., Rosenberger, M., Lovey, A., Kastner, P., Grippo, J.F.a. & Chambon, P. (1993). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 30-4.
- Altucci, L. & Gronemeyer, H. (2001). *Nat Rev Cancer*, **1**, 181-93.
- Altucci, L. & Gronemeyer, H. (2004). *Vitamins and Hormones, Vol. 67*. Litwack, G. (ed.). Academic Press, Elsevier, pp 319-345.
- Altucci, L., Rossin, A., Raffelsberger, W., Reitmair, A., Chomienne, C. & Gronemeyer, H. (2001). *Nat Med*, **7**, 680-6.
- Baetu, T.M., Kwon, H., Sharma, S., Grandvaux, N. & Hiscott, J. (2001). *J Immunol*, **167**, 3164-73.
- Bernard, D., Quatannens, B., Vandebunder, B. & Abbadie, C. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 27322-8.
- Chen, J.Y., Clifford, J., Zusi, C., Starrett, J., Tortolani, D., Ostrowski, J., Reczek, P.R., Chambon, P. & Gronemeyer, H. (1996). *Nature*, **382**, 819-22.
- Clagett-Dame, M. & DeLuca, H.F. (2002). *Annu Rev Nutr*, **22**, 347-81.
- Clarke, N., Jimenez-Lara, A.M., Voltz, E. & Gronemeyer, H. (2004). *EMBO J*, **23**, 3051-60.
- de The, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L. & Dejean, A. (1991). *Cell*, **66**, 675-84.
- Gavalas, A. (2002). *Trends Neurosci*, **25**, 61-4.
- Hansen, L.A., Sigman, C.C., Andreola, F., Ross, S.A., Kelloff, G.J. & De Luca, L.M. (2000). *Carcinogenesis*, **21**, 1271-9.
- Hong, W.K. & Sporn, M.B. (1997). *Science*, **278**, 1073-7.

- Kakizuka, A., Miller, W.H., Jr., Umesono, K., Warrell, R.P., Jr., Frankel, S.R., Murty, V.V., Dmitrovsky, E. & Evans, R.M. (1991). *Cell*, **66**, 663-74.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K.J. & Ashkenazi, A. (2000). *Immunity*, **12**, 611-20.
- Laudet, V. & Gronemeyer, H. *The Nuclear Receptor FactsBook*. Academic press.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. & Wang, X. (1997). *Cell*, **91**, 479-89.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. (1998). *Cell*, **94**, 481-90.
- MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S.M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G.M. & Alnemri, E.S. (1997). *J Biol Chem*, **272**, 25417-20.
- Mader, S., Chen, J.Y., Chen, Z., White, J., Chambon, P. & Gronemeyer, H. (1993). *Embo J*, **12**, 5029-41.
- Miller, A.D. & Rosman, G.J. (1989). *Biotechniques*, **7**, 980-2, 984-6, 989-90.
- Monczak, Y., Trudel, M., Lamph, W.W. & Miller, W.H., Jr. (1997). *Blood*, **90**, 3345-55.
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. (1998). *J Biol Chem*, **273**, 2926-30.
- Nagy, L., Thomazy, V.A., Shipley, G.L., Fesus, L., Lamph, W., Heyman, R.A., Chandraratna, R.A. & Davies, P.J. (1995). *Mol Cell Biol*, **15**, 3540-51.
- Nebbio, A., Clarke, N., Voltz, E., Germain, E., Ambrosino, C., Bontempo, P., Alvarez, R., Schiavone, E.M., Ferrara, F., Bresciani, F., Weisz, A., de Lera, A.R., Gronemeyer, H. & Altucci, L. (2004). *Nat Med*.
- Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J. & Dixit, V.M. (1997). *Science*, **276**, 111-3.

-
- Pandolfi, P.P., Grignani, F., Alcalay, M., Mencarelli, A., Biondi, A., LoCoco, F. & Pelicci, P.G. (1991). *Oncogene*, **6**, 1285-92.
- Ravi, R., Bedi, G.C., Engstrom, L.W., Zeng, Q., Mookerjee, B., Gelinas, C., Fuchs, E.J. & Bedi, A. (2001). *Nat Cell Biol*, **3**, 409-16.
- Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 10964-7.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. & Peter, M.E. (1998). *EMBO J*, **17**, 1675-87.
- Secchiero, P., Milani, D., Gonelli, A., Melloni, E., Campioni, D., Gibellini, D., Capitani, S. & Zauli, G. (2003). *J Leukoc Biol*, **74**, 223-32.
- Shiozaki, E.N., Chai, J. & Shi, Y. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4197-202.
- Sprick, M.R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M.A. & Walczak, H. (2002). *EMBO J*, **21**, 4520-30.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E.S. (1998). *Mol Cell*, **1**, 949-57.
- Suliman, A., Lam, A., Datta, R. & Srivastava, R.K. (2001). *Oncogene*, **20**, 2122-33.
- Sun, S.Y. & Lotan, R. (2002). *Crit Rev Oncol Hematol*, **41**, 41-55.
- Tucker, K.A., Lilly, M.B., Heck, L., Jr. & Rado, T.A. (1987). *Blood*, **70**, 372-8.
- Walczak, H., Degli-Esposti, M.A., Johnson, R.S., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Timour, M.S., Gerhart, M.J., Schooley, K.A., Smith, C.A., Goodwin, R.G. & Rauch, C.T. (1997). *EMBO J*, **16**, 5386-97.
- Wang, K., Yin, X.M., Chao, D.T., Milliman, C.L. & Korsmeyer, S.J. (1996). *Genes Dev*, **10**, 2859-69.

- Watabe, K., Ito, A., Asada, H., Endo, Y., Kobayashi, T., Nakamoto, K., Itami, S., Takao, S., Shinomura, Y., Aikou, T., Yoshikawa, K., Matsuzawa, Y., Kitamura, Y. & Nojima, H. (2001). *Jpn J Cancer Res*, **92**, 140-51.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. & Wang, X. (1997). *Cell*, **90**, 405-13.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. (1999). *J Biol Chem*, **274**, 11549-56.

Legends to Figures

Figure 1 Retinoids and rexinoids synergistically induce growth arrest, differentiation and apoptosis of PLB985. **(A)** Proliferation of PLB985 cells grown in the presence of BMS753 (753), SR11237 (SR) or both ligands. **(B)** Expression of CD11c on PLB985 cells treated for 7 days with 753 and/or SR. The mean fluorescence intensity represents CD11c abundance on cell surface. **(C)** Quantification of PLB985 cell apoptosis by Annexin V-propidium iodide (PI) co-staining of cells exposed for 10 days to the indicated ligands. **(D)** PLB985 cells grown in presence of 9-*cis* RA for 4 and 10 days were double-stained with PE-labelled anti-CD11c antibody and Annexin V-FITC. The data shown in A, B and D are representative, similar results have been obtained in at least three independent experiments.

Figure 2 WY-1 mutant PLB985 cells are resistant to the differentiative, anti-proliferative and apoptogenic actions of 9-*cis* RA. **(A)** Growth curve of wild-type (circle) and WY-1 (triangle) PLB985 grown in the presence (solid) or not (open) of 9-*cis* RA. **(B)** NBT reduction assays performed with wild-type (WT) and WY-1 PLB985 cells before and after a 7-day exposure to 9-*cis* RA. **(C)** Expression of differentiation markers CD11c and CD14 on WT and WY-1 PLB985 cells untreated (D0) or treated for 7 days (D7) with 9-*cis* RA. The mean CD11c fluorescence intensity (I) is indicated. **(D)** FACS analysis of the cell cycle repartition of WT (top panel) and WY-1 (bottom panel) cells untreated (left lane) or treated for 7 days with 9-*cis* RA (right lane) and stained using PI. The % of cells in G₀-G₁ is indicated. Results are representative of three independent experiments.

Figure 3 A single LXS_N integrated in the genome of 9-*cis* RA-resistant (WY-1) mutant PLB985 cells. **(A)** Schematic structure of pLXS_N which integrated (marked *) between position 130,629,014 and 130,629,015 in chromosome 8q24.21 (Build 35.1 of Oct. 1, 2004). **(B)** Localization of the LXS_N integration in the PLB985 genome by genome walking based on ligation-mediated PCR. The sequence of 200 nucleotides flanking the integration site is shown; genomic and viral sequences are in capital and small lettering, respectively. The insertion site is about 200 kb downstream of the closest known gene, MLZE. **(C)** Verification of the LXS_N integration site by Southern blotting. A fragment of LXS_N amplified by PCR (using P-1 and P-2 as primers) and a genomic DNA fragment (PCR with P-3 and P-4 as primers on wild-type PLB985 DNA) encompassing the LXS_N insertion site were used as probes for Southern blot; linearized pLXS_N (L, 10 pg; H, 100 pg probe) was used as the positive control; the depicted markers correspond to sizes of 10, 8, 6, 5, 4, 3.5, 3, 2, 1.5, and 1 kb.

Figure 4 Sequence of RAM and its regulation by 9-*cis* RA. **(A)** Genes map around the LXS_N insertion site. **(B)** The predicted amino acid sequence of RAM does not reveal any known motif. **(C)** Negative regulation of RAM expression by RA in WT and WY-1. **(D)** 9-*cis* RA down-regulates and extinguishes RAM expression in NB4 cells. **(E)** The RAM mRNA expression in different human tissue cell-lines.

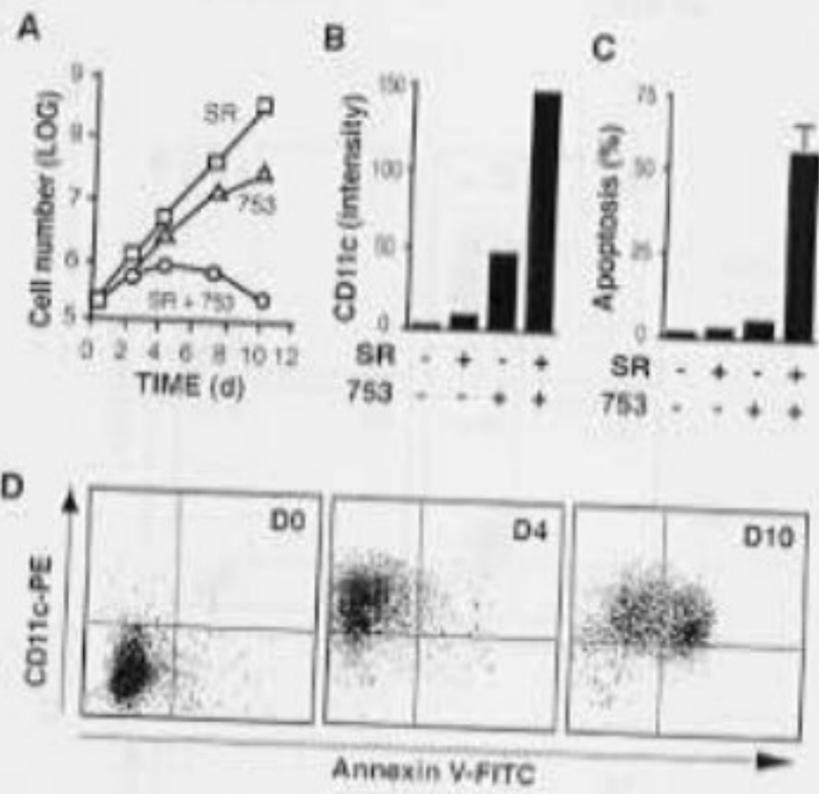
Figure 5 9-*cis* RA induces TRAIL signalling pathway in PLB985 cells. **(A)** Western blot analysis of caspase-8 activation and PARP cleavage in PLB985 cells treated for 8 days with 9-*cis* RA. The solid triangle indicates full-length

caspase-8, the open triangles the cleaved fragments of caspase-8 and PARP. PLB985 cells treated with TRAIL (100 ng/ml, 8h) were used as positive control. **(B)** Multiplex RNase protection assay revealing gene expression profiles of PLB985 (WT) and WY-1 cells grown in presence of 9-*cis* RA for 2, 4, 6, and 8 days. **(C)** Western blot analysis of TRAIL induction in PLB985 cells (WT) treated for 8 days with 9-*cis* RA. Cell lysate from COS cells transfected with a TRAIL expression plasmid was used as positive control (lane "C"). The non-specific band ("NS") and actin reveal equal loading of protein in the "-" and "+" lanes.

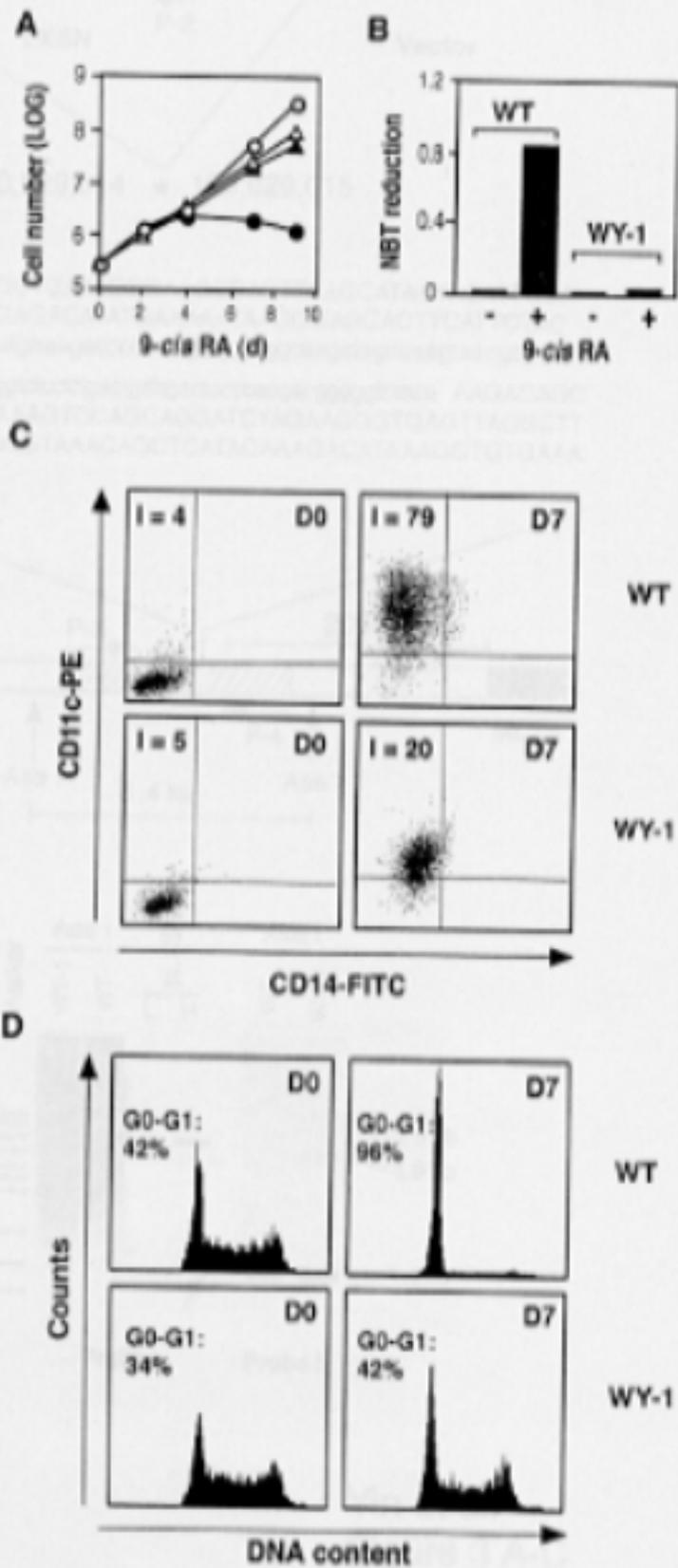
Figure 6 TRAIL is critically involved in 9-*cis* RA-induced apoptosis. **(A)**. Sub-G1 profile of PLB985 cells treated (right) or not (left) with exogenous recombinant TRAIL (50 ng/ml, 12h). **(B)** PLB985 (WT) and WY-1 cells were exposed to recombinant TRAIL (50 ng/ml, 24h) and assayed as in (A). **(C)** TRAIL (50 ng/ml, 24h) induces mitochondrial membrane potential loss in WT PLB985 but not WY-1 cells. **(D)** Annexin V staining and Western blot detection of TRAIL in PLB985 cells treated for 8 days with vehicle (lane1), 9-*cis* RA (lane 2), 9-*cis* RA and TRAIL-specific siRNA (200 nM, lane 3) or 9-*cis* RA and scrambled control siRNA (200 nM, lane 4). TRAIL transfected COS cells were used as positive control (lane 5).

Figure 7 9-*cis* RA signalling is not altered in PLB985 cells infected by a lentivirus encoding RAM/V5 protein **(A)**. RT-PCR analysis of RAM or RAM/V5 using RNA from PLB985 cells infected or not with a lentivirus encoding RAM/V5 protein. **(B)**. Expression of CD11c differentiation marker on PLB985 cells overexpressing or not RAM/V5 protein after a 5 days treatment with 9-*cis* RA.

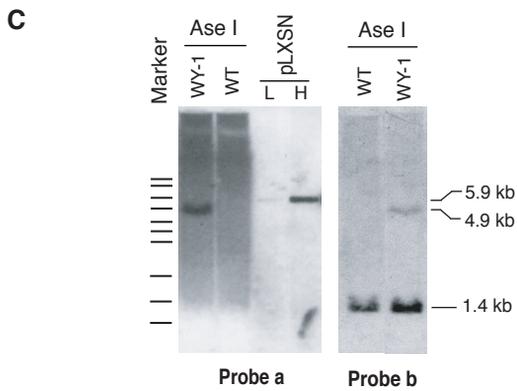
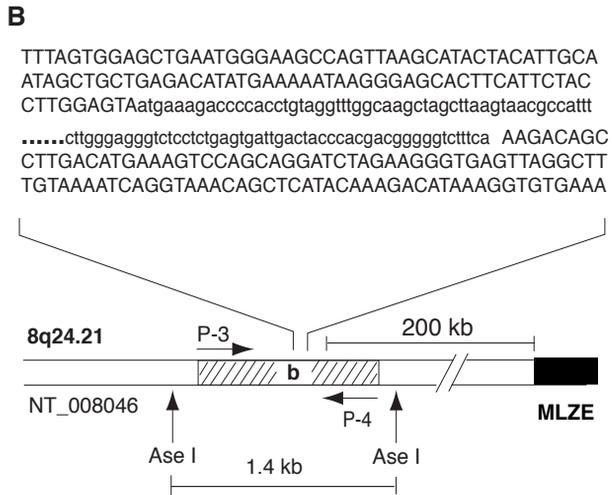
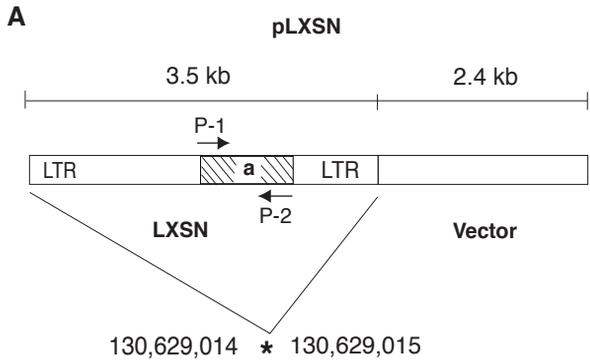
(C) Annexin-V staining of PLB985 cells overexpressing or not RAM/V5 protein and submitted to 9-*cis* RA. for 8 days.



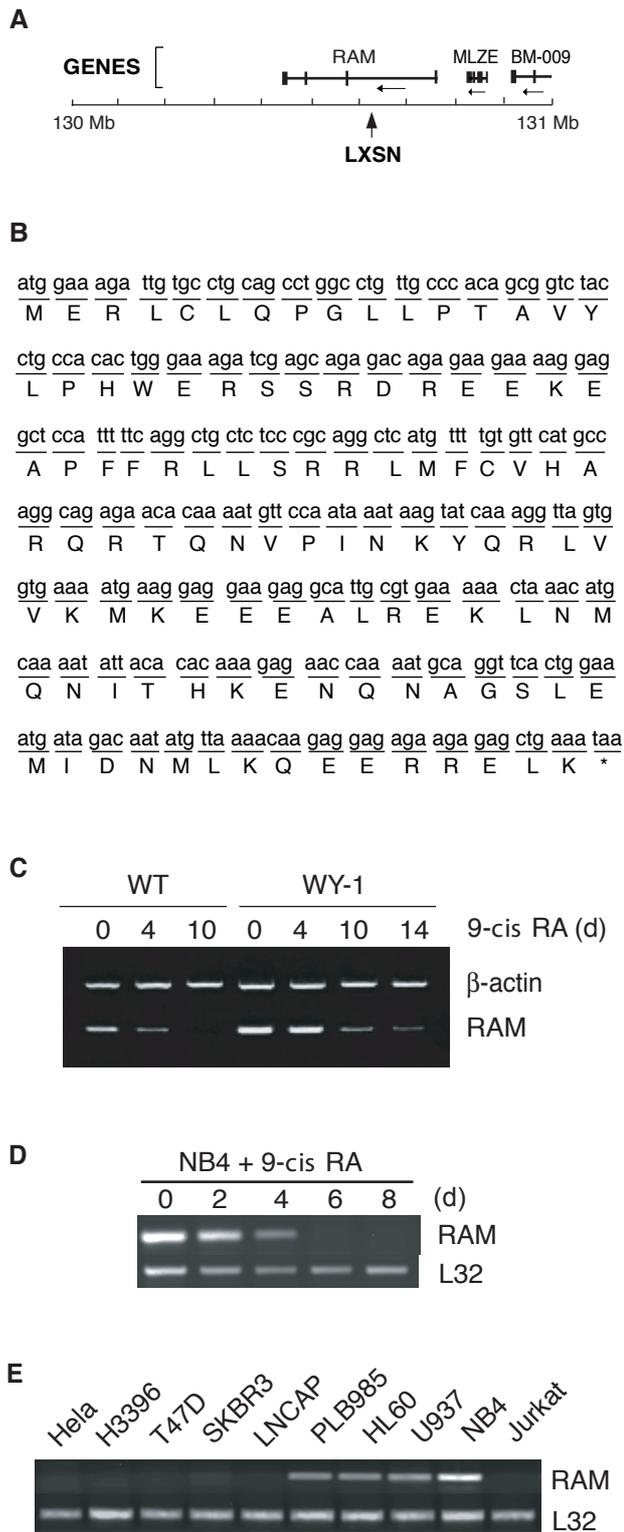
Yin et al.
Figure 1 A-D



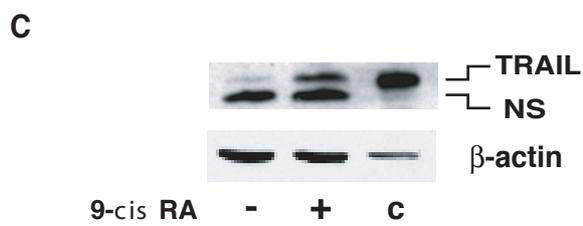
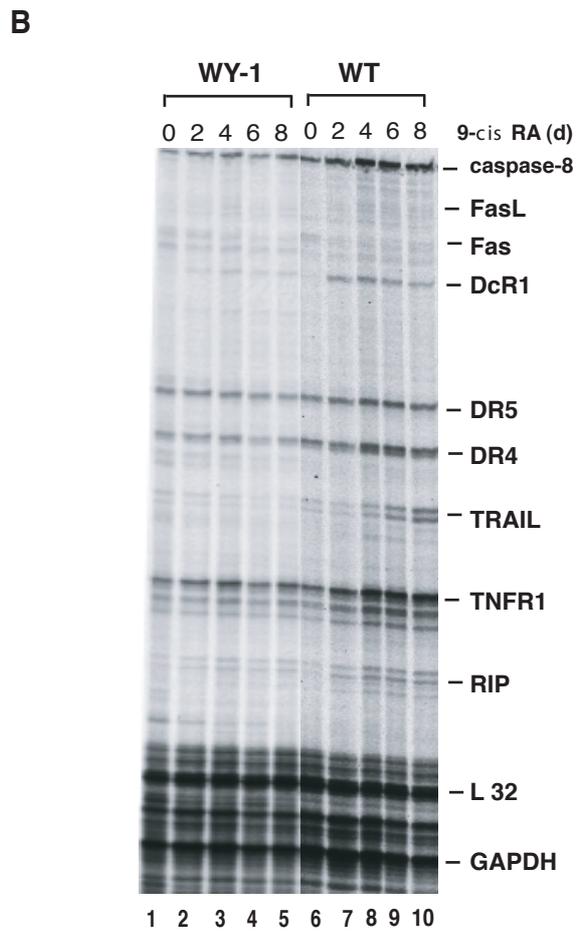
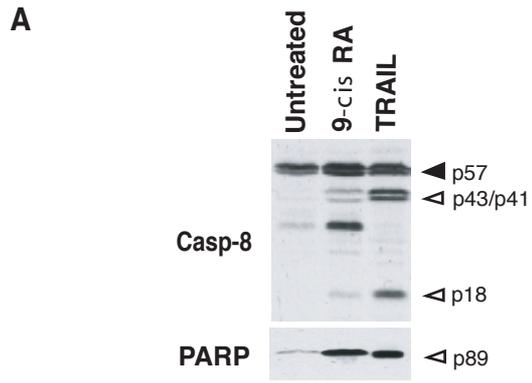
Yin et al.
Figure 2 A-D

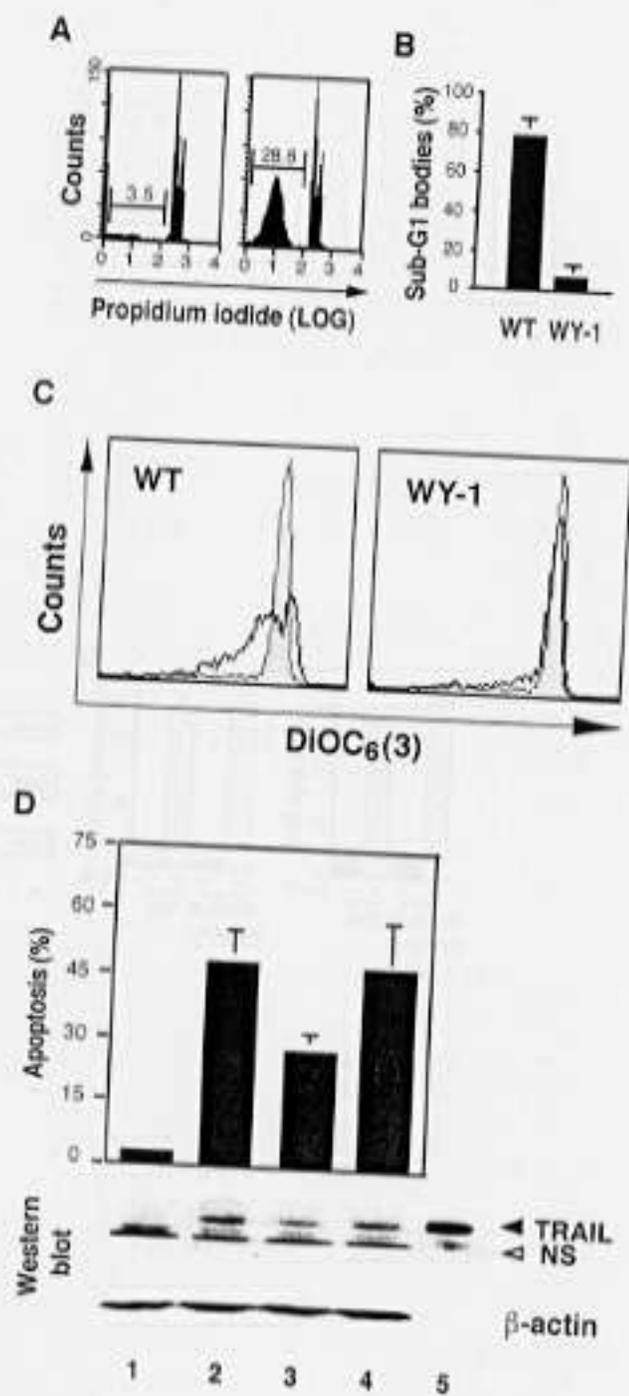


Yin et al.
Figure 3 A-C

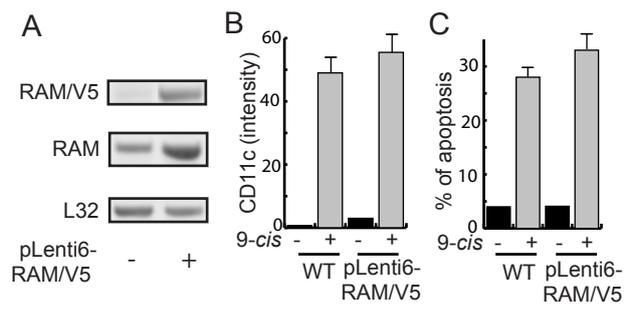


Yin et al.
Figure 4 A-E





Yin et al.
Figure 6 A-D



Yin et al.
Figure 7 A-C

Etude de la synergie entre un agoniste de la Protéine Kinase A (PKA) et un rexinoïde dans les cellules de Leucémie Myéloïde Aiguë (AML) résistantes aux rétinoïdes. Conséquences sur la différenciation et apoptose des cellules.

➤ Rappel sur l'axe AMPc/PKA

La PKA est une protéine cytoplasmique composée de 2 sous-unités régulatrices et 2 sous-unités catalytiques. La liaison d'un second messager, l'AMP cyclique (AMPc), sur les sous-unités régulatrices induit la dissociation de la protéine et l'activation des sous-unités catalytiques ainsi capables de phosphoryler leurs protéines cibles au niveau de sérines ou thréonines particulières. Au niveau cellulaire, la concentration d'AMPc est finement régulée par différentes enzymes. L'AMPc est produit par l'adényl cyclase généralement en réponse à l'activation des récepteurs à protéine G. La dégradation de cet AMPc en AMP (incapable d'induire une signalisation) est contrôlée par une famille d'enzymes appelées phosphodiésterases (pour revue, (Fimia and Sassone-Corsi, 2001)) (**figure n°21**).

L'activation de l'axe AMPc/PKA est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que le contrôle du métabolisme, la prolifération ou la différenciation. La PKA peut en effet agir directement sur la transcription de gènes cibles en phosphorylant et activant les facteurs de transcription CREB (cAMP response element-binding protein). Elle peut également moduler l'activité de nombreuses protéines et voies de signalisation. Dans ce contexte, il a été démontré que l'AMPc ou ses analogues synthétiques, via l'activation de la PKA, sont capables de synergiser avec l'AR et d'induire la différenciation des cellules APL NB4 par un mécanisme encore non élucidé (Duprez et al., 1996; Ruchaud et al., 1994).

En collaboration avec l'équipe du professeur Lanotte, il a été prouvé au laboratoire qu'il existe également un « crosstalk » entre RXR et la PKA (Benoit et al., 1999). En effet, un cotraitement avec un analogue de l'AMPc et un agoniste de RXR induit la différenciation des cellules NB4 dans la voie granulocytaire et ceci de manière indépendante de l'activation de RAR. Il faut noter que l'activation de RXR seul par son ligand n'induit aucun phénotype dans ces cellules. Cette voie est totalement dissociable de celle activée par l'AMPc et un agoniste de RAR car elle n'induit ni la dégradation de la protéine de fusion PML-RAR α ni la reformation des corps nucléaires PML. De plus, ce co-traitement est capable d'induire la

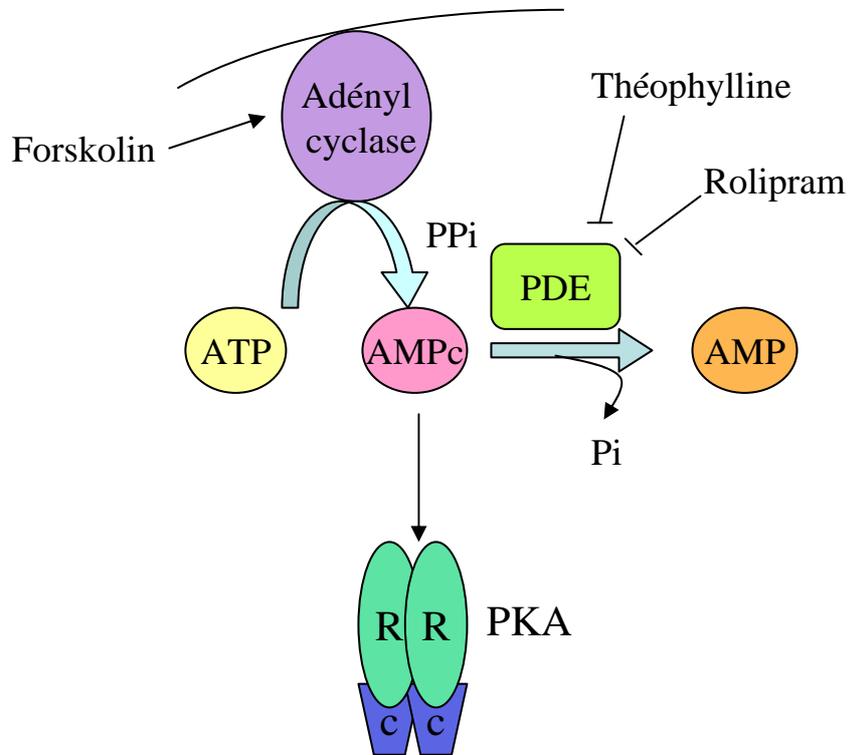


Figure 21: Régulation de la concentration d'AMPc intracellulaire.

L'Adényl cyclase produit l'AMPc suite à différentes stimulations (dont les récepteurs couplés aux protéines G). Pharmacologiquement, l'adényl cyclase peut être activée par la forskolin. L'AMPc est dégradé par une famille d'enzymes : les phosphodiesterase (PDE) qui peuvent elles-même être inhibées par des inhibiteurs sélectifs tels que la théophylline ou le rolipram.

différenciation des cellules NB4-R2 résistantes à l'AR (de part la présence d'une mutation dans domaine de liaison au ligand de PML-RAR α). Les bases moléculaires de cette synergie n'ont également pas été élucidées.

➤ **La leucémie myéloïde aiguë ou AML**

Les AML sont caractérisées par un blocage de la différenciation de précurseurs hématopoiétiques myéloïdes. Ceci induit l'accumulation de ces précurseurs immatures dans le sang et la suppression de la croissance et maturation des cellules impliquées dans l'hématopoïèse normale (John et al., 2004). Différentes classifications de ces AML existent et la plus utilisée est la classification FAB (French-American-British) qui utilise comme critère le stade de maturation des cellules leucémiques (voir **figure 9**).

AML-M0 : AML montrant peu d'évidence de différenciation

AML-M1 : Leucémie myéloblastique aiguë sans maturation

AML-M2 : Leucémie myéloblastique aiguë avec maturation

AML-M3 : Leucémie promyélocytaire aiguë = APL

AML-M4 : Leucémie myélomonocytaire aiguë

AML-M5 : Leucémie monocytaire aiguë

AML-M6 : Leucémie érythrocytaire aiguë

AML-M7 : Leucémie mégacariocytaire aiguë

Ainsi, sous le terme d'AML sont regroupés des leucémies très hétérogènes. Excepté pour le cas de l'APL, il n'y a pas de traitement très efficace et les traitements chimiothérapeutiques classiques utilisés actuellement ne permettent qu'un taux de survie faible. De plus, l'incidence de l'AML est en constante évolution certainement à cause de facteurs environnementaux mais également en conséquence à des thérapies administrées lors d'un premier cas de cancer.

40% des patients AML présentent des anomalies chromosomiques telles que des translocations et des délétions tandis que les autres cas présentent des mutations plus ponctuelles (Ferrara, 2004). Un modèle simple de cette maladie consiste à regrouper les mutations en 2 catégories : celles qui confèrent à la cellule un avantage prolifératif et celles qui affectent les facteurs de transcription et bloquent la différenciation (Gilliland, 2004).

Les mutations qui confèrent un avantage prolifératif ont un impact très minime sur la différenciation des cellules. Elles affectent en général les voies de signalisations impliquées dans la survie des cellules et incluent les mutations de Ras, FLT3, Kit et les autres récepteurs à activité tyrosine kinase.

Les mutations affectant les facteurs de transcription ou les coactivateurs sont en général des translocations chromosomiques. Les plus fréquentes concernent le récepteur RAR α dans le cas d'APL. D'autres peuvent également affecter les gènes Hox ou générer une protéine de fusion entre AML-1 (facteur de transcription également appelé RUNX1) et ETO (répresseur de transcription) (Croce, 2005). Des mutations ponctuelles dans les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation myéloïde, tels que les membres de la famille C/EBP ont également été rapportées.

Les données actuelles convergent toutes vers la nécessité de deux événements, une de chaque classe de mutation pour induire le développement de l'AML (Gilliland, 2004).

Les RARs sont impliqués dans la différenciation myéloïde et il a été démontré qu'un agoniste de RAR α est capable d'accélérer le processus de granulopoïèse. Cependant, excepté dans le cas de l'APL, la majorité des patients AML ne répond pas à un traitement à l'AR. Or, il a été démontré que le co-traitement entre un agoniste de la PKA et un rétinoloïde est capable d'induire la différenciation des cellules NB4-R2 résistantes aux rétinoloïdes. Nous avons donc décidé de tester l'efficacité de ce traitement sur les lignées leucémiques AML puis sur des blastes de patients AML cultivés ex-vivo. Les résultats obtenus sont présentés dans la publication suivante.

Rexinoid-triggered differentiation and tumor-selective apoptosis of AML by protein kinase A-mediated de-subordination of RXR

Lucia Altucci,^{1,2,3*} Aurélie Rossin,^{1*} Oliver Hirsch,¹ Angela Nebbioso,²
Dominique Vitoux,⁴ Emmanuelle Wilhelm,¹ Fabien Guidez,⁵ Mariacarla De Simone,⁶ Ettore
Mariano Schiavone,⁶ David Grimwade,⁷ Arthur Zelent⁵, Hugues de Thé,⁴
and Hinrich Gronemeyer^{1‡}

¹Department of Cell Biology and Signal Transduction, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), BP 10142, 67404 ILLKIRCH CEDEX, C. U. de Strasbourg, FRANCE

²Dipartimento di Patologia Generale, Seconda Università degli Studi di Napoli, Via L. De Crecchio 7, 80138, Napoli, ITALY

³Centro di Oncogenomica AIRC, CEINGE Biotecnologia avanzata, Napoli, ITALY

⁴CNRS UMR 7151, Centre Hayem, Hôpital St. Louis, 1 av. C. Vellefaux, 75475 Paris Cedex 10, FRANCE

⁵LRF Centre at the Institute of Cancer Research, London, UK

⁶Ematologia con Trapianto di Cellule Staminali, Ospedale Cardarelli, Napoli

⁷Division of Medical and Molecular Genetics, GKT School of Medicine, London, UK.

Running title: Mechanism of rexinoid-cAMP induced AML blast apoptosis

Key words: acute myeloid leukemia / retinoid and rexinoid signaling / apoptosis / phosphodiesterase inhibitor / protein kinase A

* Equal first authors

‡ Corresponding author

Hinrich Gronemeyer

IGBMC, B.P. 10142, 67404 Illkirch-Cedex, France

Tel.: +(33) 3 88 65 34 73

Fax: +(33) 3 88 65 34 37

e-mail: hg@igbmc.u-strasbg.fr

Abstract

Apart from PML-RAR α acute promyelocytic leukemia (APL) all other acute myeloid leukemias (AML) are unresponsive to retinoid differentiation therapy. However, elevating the levels of cAMP confers onto retinoid X receptor (RXR)-selective agonists (“rexinoids”) the ability to induce terminal granulocyte differentiation and apoptosis of ATRA-resistant and insensitive AML cells and patients’ blasts. Protein kinase A activation leads to co-repressor release from the RAR subunit of the RAR-RXR heterodimer, resulting in “de-subordination” of otherwise silent RXR, which acquires transcriptional competence in response to cognate ligands. Rexinoid-cAMP induction of endogenous RAR β is blunted in mouse embryo fibroblasts lacking RARs but re-introduction of exogenous RAR α re-establishes responsiveness, thus confirming that the RAR α -RXR heterodimer is the rexinoid mediator. The apoptogenic effect of this treatment involves enhanced expression of the death receptor DR5 and its cognate ligand TRAIL, both of which are known to induce apoptosis in a tumor cell-selective manner and lead to the activation of initiator caspases. Immunohistochemistry confirmed induction of TRAIL and DR5 in AML patient blasts cultured *ex vivo*. AML patients’ blasts responded to rexinoid-cAMP combination treatment with induction of maturation and apoptosis, independent of karyotype, immunophenotype and FAB status. Clonogenic assays revealed complete inhibition of blast clonogenicity in four out of five tested samples. Our results suggest that despite the genetic, morphological and clinical variability of this disease the combination of rexinoids and cAMP elevating drugs, such as phosphodiesterase inhibitors, may lead to a novel therapeutic option for AML patients by inducing a tumor-selective death pathway.

Introduction

Acute myeloid leukemia (AML)(1) is characterized by an accumulation of granulocyte or monocyte precursors in bone marrow and blood. Despite improved therapies the survival rate among patients who are less than 65 years old is only 40%. AML is a heterogeneous disease that originates from differentiation blocks at various stages of commitment and maturation within the myeloid lineage. This heterogeneity is reflected by morphological differences of the blasts, which is at the origin of the French-American-British (FAB) classification into 9 distinct subtypes that differ with respect to the myeloid lineage involved and the degree of cell maturation (2). Recent studies have supported the concept that aberrant expression or mutation lineage-specific transcription factors, or the formation of abnormal transcription factor hybrids due to chromosome translocation cause this heterogeneous disease and correlate with specific FAB subtypes (3).

Acute promyelocytic leukemia (APL, classified as FAB M3) accounts for ~5-10% of AML cases (1). APL has received particular attention not only as the prototype of successful cancer differentiation therapy which leads to overall survival rates of approximately 70% at 5 years (4, 5), but also because the cause of this leukemia and the success of the all-*trans* retinoic acid (ATRA) therapy are understood in molecular detail. In 98% of cases APL originates from a t(15;17)(q22;q21) chromosomal translocation, which generates a fusion protein (PML-RAR α) that causes the disease. At the molecular level the PML fusion with RAR α results in an enhanced recruitment of histone deacetylase (HDAC) complexes that epigenetically silence cognate gene programs; apparently this silencing cannot be relieved at physiological concentrations of ATRA (for reviews and references see 6, 7-11). In addition to the formation of heterochromatin over RAR target genes the formation of the PML-RAR α fusion protein results in a variety of signaling aberrations that affect also blast survival and self-renewal of stem cells (12-17). Supra-

physiological ATRA levels, however, induce dissociation of the silencing complex, activate the differentiation program and, furthermore, activate tumor-selective death signaling (18, 19).

Unfortunately, >90% of AML patients that do not present with the t(15;17) translocation are refractory to ATRA-based differentiation therapy. In addition, APL with the alternative translocation t(11;17)(q23;q21) leading to the formation of the PLZF-RAR α fusion, which is the second commonest molecular subgroup of the disease, is generally resistant to classical retinoid therapy (20). Moreover, relapse of APL patients is frequently associated with mutations in the ligand-binding domain of the PML-RAR α fusion protein resulting in abrogation of ligand-binding capacity (21). Thus, there is serious need for additional therapeutic tools to treat AML patients.

Retinoids are ligands for retinoic acid receptors (RARs) that heterodimerize with retinoid X receptors (RXRs); the corresponding RAR-RXR heterodimers are thought to mediate the retinoid signal. RXRs can, in addition to forming heterodimers with RARs, heterodimerize with a great number of other nuclear receptors (for a general review see reference 22). While all-*trans* retinoic acid is well accepted to correspond to the endogenous ligand for RARs, the nature, origin and signaling function of endogenous RXR ligand(s) is still a matter of debate (23). Several synthetic RXR selective ligands have been generated and their analysis revealed that these rexinoids are transcriptionally silent when binding to RXR in heterodimers with non-liganded partners. However, together with retinoids, rexinoids can act synergistically (24). Mechanistic analyses revealed that RAR-bound corepressors do not dissociate from the heterodimer in the absence of a RAR ligand, thus preventing rexinoid-induced recruitment of coactivators - this phenomenon is usually referred to a "RXR subordination" - while synergy between retinoid and rexinoid agonists is due to the cooperative recruitment of a single coactivator to the heterodimer (23, 25).

There is ample evidence that retinoids are chemotherapeutic and chemopreventive drugs that are active also in non-APL malignancies (6, 26-28). Also rexinoids on their own, despite their

subordination in some heterodimers, can exert cancer-preventive activity, although the mechanistic basis has remained elusive (29, for review see reference 30). We have previously shown a further paradigm by which pure rexinoids can spring into action when combined with drugs that elevate cAMP levels. Importantly, such a drug combination exerts anti-leukemic action even in APL cells that have become resistant to retinoic acid treatment (31), revealing that the signaling is clearly distinct from that induced by retinoic acid. Here we reveal the mechanistic basis of the so-called “cAMP-rexinoid crosstalk”, demonstrate that it is mechanistically distinct from the synergy observed between protein kinase A agonists and RAR ligands, and report that pure rexinoids, when used together with agents that increase intracellular cAMP levels, induce post-differentiation apoptosis in *ex vivo* cultures of AML patient blasts. We show that apoptosis targets the clonogenic blasts and involves activation of the TRAIL-DR5 signaling pathway. The analysis of multiple blast cultures reveals that the combinatorial treatment is effective irrespective of the karyotype, immunophenotype or morphological features.

Materials and Methods

Ligands and chemicals. Retinoid and rexinoid agonists and antagonists have been described (25, 32) and were used at 1 μ M unless stated otherwise; 8CPT-cAMP, theophylline, IBMX, rolipram and forskolin were from Sigma.

Cell culture, transfections and differentiation assays. All leukemia cell lines were cultured in RPMI, 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 10mM HEPES and 2mM glutamine. MEF cells were cultured in DMEM, 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 2mM glutamine. For the PLZF-RAR α APL case (N $^{\circ}$ 7, table 1), bone marrow was subject to Ficoll separation (blasts >90%) and cells were cultured as described (33). For the remaining AML samples (table 1), peripheral blood containing 80-90% leukemic

blasts was purified over Ficoll and processed as described (34). This study has been approved by the Ethical Committee of the Second University of Naples. Cell morphology was analyzed after May-Grünwald staining. At least 300 cells were analyzed for each treated culture. Each treatment was repeated at least three times, with each experiment performed in triplicates. Transient transfections for transactivation assays were done according to routine procedures using luciferase or CAT reporter genes, the corresponding constructions have been described previously (25). For 2-hybrid assays, HeLa cells were transiently transfected with 20ng of RAR α -VP16 or RAR α _{S369A}-VP16, 40ng of Gal-SMRT and 200ng *PRKACA* per well of a 24 well plate using the calcium phosphate method. Primary mouse embryo fibroblasts (MEFs) were generated from triple RAR “floxed” (RAR α ^{L2/L2}RAR β ^{L2/L2}RAR γ ^{L2/L2}) mouse embryo’s (35-37), generously provided by N. Ghyselinck, immortalized by transfection of an expression vector encoding SV40 Tag. Immortalized cells were infected with CRE-expressing adenovirus (a kind gift of M. Giovanini) at a multiplicity of 100 PFU/cell and cloned by limiting dilution. Excision was verified by both PCR on the 3 RAR loci and failure to induce the transcription of two retinoic acid target genes, RAR β and cytochrome P450 26A1 (CYP26A1). RAR α cDNA was reintroduced into excised cells by retroviral transfer followed by G418 selection. Quantitative PCR on the engineered MEFs or U937 hematopoietic cells was performed using Taq-man assays for mouse or human RAR β and CYP26A1. β 2microglobulin and TBP were used as internal controls. Cells were treated with the indicated compounds at a concentration of 10⁻⁶ M for 12 hours. Induction was calculated over the pre-induction level of expression, assuming a 100% yield of the PCR assay. Details on the verification of the triple RAR knockouts, re-introduction of the RAR α expression cassette and primers used for RAR β expression analysis are available on request.

Colony forming assays. 1 x 10⁶ Ficoll-purified blasts were re-suspended in 0.3ml of RPMI1640, added to 3ml MethoCult GF (Stem Cell Laboratories, Vancouver, Canada) and vehicle or ligands (1 μ M BMS retinoids or SR11237, 200 μ M 8CPT-cAMP, 1mM theophylline,

100 μ M rolipram, 500 μ M IBMX) were added. After complete re-suspension 1.1 ml of the mixture was plated into the wells of a 6 multiwell plate (Falcon, BD, Franklin Lakes, NJ); at least 2 wells of the same plate were filled with sterile water. Cultures were placed in a 37°C humidified incubator at 5% CO₂.

Differentiation analysis. Cells were harvested and re-suspended in 10 μ l phycoerythrin-conjugated murine anti-human CD11c (CD11c-PE; IgG1) and 10 μ l fluorescein isothiocyanate-coupled murine anti-human CD14 (CD14-FITC; IgG2a; Pharmingen, San Diego, CA). As isotopic controls FITC-conjugated mouse IgG2a and PE conjugated mouse IgG1 were used. *Ex vivo* cultured blasts of patient N° 7 (table 1) were exposed to PE-conjugated murine anti-human CD56 and anti-human CD11b FITC-conjugated mouse monoclonal antibodies (DAKO Corp, Carpinteria, CA), using murine IgG1 antibody (DAKO Corp) as a negative control. Samples were incubated for 30 min at 4°C in the dark, washed in phosphate buffered saline (PBS) and resuspended in 500 μ l PBS containing propidium iodide (PI; 0.25 μ g/ml). Differentiation was determined exclusively for viable PI-negative cells. Cell surface expression of DR5 was measured after rexinoid-PKA agonist exposure (1 μ M SR11237; 200 μ M 8CPT-cAMP) for 4 days using monoclonal anti-DR5 antibodies (IgG1; Alexis, San Diego, CA) and FITC-coupled secondary antibody. Mouse IgG1 was used as isotopic control.

NBT staining. 1 x 10⁶ cells re-suspended in 500 μ l of culture medium was mixed with 500 μ l solution containing 0.2% nitroblue tetrazolium (NBT) and 200ng 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA; SIGMA). After incubation for 30 minutes at 37°C, the formazan deposits were dissolved by 500 μ l lysis buffer (50% Dimethylformamide, 20% SDS, pH 7.4). The degree of NBT reduction was quantified by measuring OD₅₇₀.

Apoptosis and cell cycle analyses. Sensitization of PLB985 cells to near sub-lethal doses of TRAIL by rexinoid-PKA pre-treatment was as follows. PLB985 cells were treated for 4 days with 1 μ M SR11237 and 200 μ M 8CPT-cAMP. Cells were spun down and resuspended in fresh

medium, before TRAIL, SR11237 and 8CPT-cAMP were added to final concentrations of, respectively, 25ng/ml, 1 μ M and 200 μ M. Apoptosis was determined after another 4 days by Annexin V staining (Boehringer Mannheim, Germany). Briefly, cells were incubated in buffer (10mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl₂) containing Annexin V-FITC (1 μ g/ml) for 10 min in the dark, and resuspended in HEPES buffer containing 0.25 μ g/ml PI for FACS analysis. Apoptosis was quantitated from the Annexin V-positive PI-negative fraction. The quantification of PLB985 cells apoptosis after PDEi/rexinoid treatment was done by detection of the 7A6 mitochondrial antigen (which is selectively exposed in cells undergoing apoptosis) using the Apo2.7 antibody (Immunotech). 2.10⁵ cells were permeabilized for 20 min with 100 μ l of cold (4°C) solution of 100 μ g/ml digitonin (Sigma) in PBS-2.5% FCS. The cells were washed with cold PBS, incubated for 15 min in the dark with 30 μ l of a 1/5 dilution of APO2.7 PE conjugated antibody in PBS-2.5% FCS at room temperature, and analysed by flow cytometry.

For cell cycle analysis, the AML blasts were re-suspended in 500 μ l hypotonic buffer (0.1% Triton X100, 0.1% sodium citrate, 50 μ g/ml PI), incubated in 1 hour at room temperature and subjected to FACScalibur acquisition and analysis with ModFit version 3 software (Verity). The percentage of cell death in these patient blasts was measured by FACScan analysis of the PI positive cells after their incubation with 1ml of PBS solution containing 1 μ g/ml PI.

To quantify caspase activity, pellets of 2x10⁶ NB4 cells were lysed in 50 μ l of ice-cold lysis buffer, incubated for 10 min on ice, and centrifuged for 1min at 10,000xg. Casp-8, and casp-10 colorimetric assays were performed according to the supplier's instructions (R&D; Alexis, San Diego, CA). Briefly, after adding reaction buffer and specific substrates (IETD-pNA for casp-8 and AEVD-pNA for casp-10) samples were incubated for 1h at 37°C and the OD₄₀₅ was determined on a microplate reader.

To block caspase activity after rexinoid-cAMP treatment, pan-caspase (Z-VAD-fmk; R&D, San Diego, CA) inhibitor was added to the culture media to a final concentration of 100 μ M.

RPA assays. To check the expression of rexinoid-cAMP induced mRNAs, multiplex RNase mapping was performed. Total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen-Gibco BRL, Carlsbad, CA) and RNase protection assays were performed according to the supplier's instructions (Pharmingen, San Diego, CA). Briefly, 4 μ g total RNA and 6-8x10⁵ cpm of α -[³²P]-uridine triphosphate-labelled template sets were used; after RNase treatment protected probes were resolved on 5% urea-polyacrylamide-bis-acrylamide gels.

Immunoblots and immunohistochemistry. To analyze the expression of the DR5, immunoblots were performed. Pellets from 5x10⁷ NB4 cells were lysed in RIPA buffer and proteins were separated on 12% acrylamide gels. After blotting nitrocellulose filters were probed with anti-DR5 antibodies (Sigma). As positive control Cos cell-expressed recombinant human DR5 cDNA (provided by Immunex/Genentech, Seattle, WA) was used. For normalization blots were re-probed with anti-actin antibodies (Santa Cruz Biotechnologies, Santa-Cruz, CA).

To detect DR5 and TRAIL by immunohistochemistry, *ex vivo* treated or non-treated patient blasts were spun onto glass slides, fixed for 10 min in 4% formalin, washed in PBS and incubated in 1% H₂O₂ to inactivate endogenous peroxidase. The slides were washed 3 times in PBS, incubated for 1h in 4% BSA-2% fetal calf serum, washed in PBS, and incubated overnight in PBS-0.2% BSA containing goat anti-DR5 or anti-TRAIL (R&D; Alexis, San Diego, CA) antibodies. After 3 washes in PBS the slides were incubated for 20 min with the appropriate biotinylated secondary antibody [anti-goat polyvalent biotinylated IgG (Lab Vision Corp., Fremont, CA)] washed in PBS, incubated for 20 min with streptavidine peroxidase (Lab Vision), washed in PBS and processed with DAB (Lab Vision). After washing in double distilled H₂O, nuclei were stained with hematoxin (30 min). Finally the slides were washed for 5 min each with H₂O, 50%, 70%, 80%, 90%, 100% ethanol and xylene.

Results

Initial experiments with established AML cell lines (HL60, PLB985, U937, NB4, NB4R2) demonstrated that the combination of retinoid X receptor and protein kinase A (PKA) agonists efficiently induced differentiation, growth arrest and apoptosis in all tested myeloid cells, while it was without effect on several other cell types, such as epithelial HeLa cells. In contrast ATRA or other synthetic retinoids alone or in combination with rexinoids resulted in differentiation and/or apoptosis of only some but not all cell lines (data not shown).

Maturation of PLZF-RAR α APL blasts. To extend these observations to the blasts of ATRA-insensitive APL patients we assessed the efficacy of the combined treatment to induce maturation of PLZF-RAR α -positive blasts carrying the t(11;17) chromosomal translocation. We used the novel rexinoid BMS749 (38), a potent RXR agonist and simultaneous antagonist of RAR, to exclude the possible effects of serum-borne traces of retinoic acid. Notably, PLZF-RAR α blasts responded with differentiation after 3 days of the treatment as shown by nuclear morphology (Fig. 1A), NBT reduction and CD11b expression (Figs. 1B, C), as well as by down regulation of CD56 (Fig. 1C), which is expressed in PLZF-RAR α positive APL (39).

Differentiation and apoptosis of non-APL AML patient blasts. The induction of differentiation and apoptosis in established AML cell lines prompted us to investigate whether rexinoid-cAMP treatment would also be effective for the blasts of AML patients. Indeed, in *ex vivo* cultures, acute myeloid leukemia blasts of a patient (N° 5 in table 1) classified as FAB-M2 with no apparent karyotype abnormality, differentiated and displayed morphological changes reminiscent of cell death following 4 days of rexinoid-cAMP treatment. Notably, various stages of induced myeloid maturation could be identified (metamyelocyte, band and polymorphonuclear neutrophil) and nuclear fragmentation indicated apoptosis (Fig. 1D, lower panel). FACS analysis of Annexin V-PI-stained cells confirmed severe apoptosis (data not shown; for % of apoptosis

see table 1). In contrast, morphological analysis or Annexin V-PI staining after exposing the blasts to ATRA for 7 days did not reveal any sign of differentiation or apoptosis (top panel). FACS analyses of another blasts sample clearly revealed the synergistic effects of cAMP and SR11237; only a marginal increase of apoptosis was seen after 6 days *ex vivo* culture with cAMP alone and no effect for the rexinoid. However, nearly 40% of the blasts died upon treating them with the cAMP and rexinoid together (Fig. 1E).

To assess the clonogenic potential of AML blasts upon treatment we used fresh blasts and measured colony formation in semisolid medium. While colonies were readily seen in non-treated condition, the presence of rexinoid and cAMP occluded colony formation completely (table 1 and see below), indicating that these compounds affected the actively proliferating fraction of blasts. Similar results have been obtained with the blasts of 11 other non-APL AML patients, irrespective of FAB subtype, karyotype or immunophenotype. Generally, rexinoid and cAMP induced maturation and subsequent apoptosis (Table 1).

Mechanism of death induction. We have previously observed that ATRA induces in APL cells the expression of the tumor-selective death ligand TRAIL (18), which is the cause of retinoid-dependent apoptosis, and defined the molecular basis of TRAIL induction (19). To study the possible implication of this tumor cell-selective death-signaling pathway in rexinoid-induced apoptosis in presence of elevated cAMP levels we used initially multi-probe RNase mapping to compare in established NB4 APL cells death signaling programs induced by ATRA with those induced by rexinoid-cAMP treatment. Both treatments enhanced TRAIL mRNA levels concomitantly with the onset of apoptosis albeit ATRA was more efficient (Fig. 2A, lanes 6, 13). Conversely, there was a very strong induction of the TRAIL receptor DR5 mRNA upon rexinoid-cAMP treatment; in fact the induction was more than one magnitude higher than that seen with ATRA. The same stimulation was also observed at the protein level by immunoblot analysis, which indicated a major stimulation of both DR5 receptor and its splice variant (“DR5 sv”)

relative to the actin control (Fig. 2B). Increased expression of TRAIL and DR5 was also seen with HL60 and U937 cells (data not shown).

FACS analysis with anti-DR5 antibodies confirmed that the newly produced TRAIL receptor protein is correctly sorted, as it leads to enhanced cell surface expression of DR5 in both NB4 and PLB985 cells (Fig. 3A). Importantly, the overexpressed DR5 is functional, as rexinoid-cAMP pre-treated cells became highly susceptible to low doses of exogenous TRAIL, which on their own were hardly apoptogenic (Fig. 3B, compare the extent of death in lanes 2 and 4 with that in lane 5). Moreover, the rexinoid-cAMP treatment led to activation of the initiator caspases 8 and 10, which are known downstream mediators of the TRAIL-DR5 complex (40, 41) (Fig. 3C). Consistent with these results the pan-caspase inhibitor Z-VAD abrogated rexinoid-cAMP induced death (Fig. 3D). These results show that rexinoid-cAMP-induced expression of DR5 sensitizes myeloid leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis and indicates that the amount of endogenous TRAIL induced by this program is limiting.

We studied several other pro- and anti-apoptogenic signaling pathways but no major differences were observed between ATRA and rexinoid-cAMP treatment for programs that are mediated by IAPs, TRAFs and NF κ B, and only minor effects were noted for *bcl2* family members, such as *bcl2*, *bfl1/bcl2A1*, *mcl1*, *bik*, *bax* and *bak*. With respect to cyclin-dependent kinase inhibitors the rexinoid-PKA crosstalk resulted in a stimulation of *p21* in all cell lines tested, while ATRA stimulated predominantly *p19* (particularly in PLB985) and to a lesser extent *p21* gene expression (18) (data not shown). Thus, as far as the induction of pro-apoptotic factors is concerned, there is a consistent super-induction of DR5 concomitantly with a moderate increase of TRAIL mRNA levels in all cell lines that undergo post-maturation apoptosis in response to the rexinoid-cAMP treatment.

TRAIL-DR5 activation in AML blasts. As the above data were derived from experiments with established cell lines we investigated if the expression of TRAIL and its cognate receptor

would also be enhanced in AML blasts. Several non-t(15;17) AML blasts were cultured *ex vivo* and exposed to 8CPT-cAMP and SR11237. In all cases a strong induction of DR5 expression was apparent from immunohistochemical analysis (Fig. 2C, left panels; DR5 staining appears in brown). The nuclear morphology of the positively staining cells is indicative of terminal differentiation. Rexinoid-cAMP treatment induced also TRAIL expression in the differentiated blasts (Fig. 2C, right panels). Remarkably, no TRAIL or DR5 expression was seen in cells exhibiting a non-differentiated phenotype (arrows in Fig. 2C). We conclude from this data that differentiation is requisite for apoptosis.

Rexinoid crosstalk with phosphodiesterase inhibitors suppresses clonogenic growth of leukemic blasts. While protein kinase A agonists are not available for clinical use, phosphodiesterase inhibitors (PDEi's), which increase intracellular cAMP by blocking its degradation, are available for therapeutic indications other than leukemia. Theophylline, a pan-PDEi, is used as bronchodilator and rolipram, a PDE4-selective inhibitor, is currently studied in a phase II clinical trial for the treatment of multiple sclerosis (NIH clinical research studies, protocol N° 01-N-0089). As far as rexinoids are concerned, Targretin[®] (bexarotene, LG1069) has been approved for treating cutaneous T-cell lymphoma in patients that are refractory to prior systemic therapy.

To investigate whether the PDEi's could be as efficient as cAMP, we first exposed PLB985 cells to LG1069 or SR11237 together with one of two pan-PDEi's, theophylline or IBMX, or together with the PDE4-selective inhibitor rolipram. All three drug combinations induced differentiation of PLB985 cells, as revealed by CD11c expression (Fig. 4A) and NBT reduction assay, which indicates the production of superoxide, a functional marker for granulocyte differentiation (Fig. 4B). At equal retinoid/rexinoid concentration the rexinoid – PDEi induced differentiation of PLB985 cells was even superior to that seen by 100 nM TTNPB alone and comparable to the TTNPB – PDEi crosstalk (Fig. 4C). Apoptosis was induced with similar efficacies by either rexinoid or the retinoid, but required in both cases the presence of the PDEi

(Fig. 4D). Note the very strong synergy between the PDEi and rexinoid for the induction of differentiation/apoptosis of PLB985 (Fig. 4) and other AML (data not shown) cells, as no differentiation was seen with the phosphodiesterase inhibitors alone, and LG1069 alone induced only a low level of differentiation.

To study if the combination of these drugs could have the potential to be active on patients' blasts, we treated primary blasts from several AML patients *ex vivo* with combinations of PDEi's and LG1069 and focused on the proliferative fraction of the blasts. For this we used the particularly aggressively growing blasts of one patient (N° 9; Table 1) for clonogenic assays. Strong inhibition of colony cell growth was observed in presence of LG1069 and either of the three PDEi's (Fig. 4E). Similar results were obtained in clonogenic assays with the blasts of several other AML patients (Table 1). These data suggest that a combination of rexinoids and phosphodiesterase inhibitors could limit blast growth in AML patients.

De-subordination of RXR in RAR-RXR heterodimers by protein kinase A. To assess the molecular basis of the rexinoid-cAMP crosstalk we first studied whether RAR-RXR or other RXR heterodimers would mediate this signaling pathway. We reasoned that strong antagonists selectively targeting the RAR subunit in the RAR-RXR heterodimer should have no effect if RXR heterodimers with other nuclear receptors were the signaling species. We took advantage of a well characterized RAR antagonist, BMS493 and BMS614 (25 and Germain et al., manuscript in preparation), which do not at all interact with RXRs, and tested if these antagonists would affect PLB985 differentiation induced by LG1069 in presence of the PDEi theophylline (Fig. 5A). As expected a strong induction of differentiation, which was inhibited by an excess of the RXR-selective antagonist UVI3003 (32) (lane 7), was observed by the rexinoid-theophylline combination, while no effect was seen with either of the two agents alone (lanes 2-4). Importantly, however, the pure RAR α antagonist BMS614, as well as BMS493, an inverse pan-RAR inverse agonist that enforces RAR-corepressor interaction (25), fully blocked the differentiation induced by the rexinoid-PDEi combination (lanes 5, 6), thus indicating that it is

indeed the RAR α -RXR heterodimer that responds to the rexinoid in presence of elevated cAMP levels. In keeping with previous reports (42 and refs. therein) also RAR agonists synergize efficiently with agents that increase intracellular cAMP levels, as the combination of ATRA and theophylline at concentrations which alone do not yield significant effects, strongly induce differentiation of PLB985 cells (lanes 2, 8, 9). This synergy can be blocked by RAR antagonists (lanes 10, 11) but not by the RXR antagonist UVI3003 (lane 12; note that a weak inhibition is due to contamination of ATRA by 9-*cis* retinoic acid; no such inhibition was seen with pure RAR ligands), demonstrating that it operates exclusively through the RAR subunit of the heterodimer.

To study if the observed differentiation effect reflected gene regulation by the RAR-RXR heterodimer, a DR5 reporter gene was transfected into U937 cells and the response of the endogenous receptors to the various compounds was determined (Fig. 5B). Importantly, in the presence (but not absence) of theophylline or a synthetic cAMP analogue (8CPT-cAMP) the rexinoid LG1069 strongly induced transactivation of the DR5 reporter (lanes 8, 12), which was blocked by the RAR inverse agonist BMS493 (lane 10, 14). As expected, the RAR-selective agonist TTNPB activated reporter gene transcription on its own (lane 2) and synergized with 8CPT-cAMP (lane 7), and less pronounced with theophylline (lane 11), in a BMS493 antagonized manner (lanes 9, 13).

Our previous work indicated that RXR subordination results from the inability of RXR ligands to displace the corepressor from the heterodimer (25) and evidence has been presented suggesting that synergy between RXR and cAMP may also result from RXR de-subordination (43). To assess if corepressor release from apoRAR could be induced or facilitated by increased cAMP levels we used 2-hybrid experiments in HeLa cells (Fig. 5C left panel). Importantly, while RAR-VP16 interacted strongly with Gal-SMRT (lane 7), co-expression of the cDNA of the catalytic subunit of the human cAMP-dependent protein kinase gene *PRKACA* blocked this interaction (lane 15) nearly as efficiently as the RAR agonist TTNPB (lane 8). Thus, with respect to corepressor dissociation from the RAR-RXR heterodimer, activation of protein kinase A is an

apparent functional equivalent of RAR agonist binding. In parallel experiments in identical experimental conditions also NCoR dissociated from RAR, albeit less efficiently than in the case of SMRT (data not shown). Two-hybrid experiments with the heterodimer composed of RAR α and RXR α -VP16 confirmed that, in principle, the heterodimer recapitulates the results obtained with RAR α -VP16 (Fig. 5C right panel, compare lanes 9 and 19). Thus, PKA activation destabilizes also the interaction between the RAR α -RXR heterodimer and cognate co-repressors.

We predicted that RXR de-subordination should result in activation of endogenous retinoic acid target genes. Indeed, RAR β expression was 53-fold induced by rexinoids in presence of cAMP (Fig. 5D lane 4), while no significant induction was observed with each agent alone (lanes 2, 3). Moreover, induction of RAR β by either rexinoid-cAMP or ATRA is blunted (Fig. 5E lanes 3, 5) in mouse embryo fibroblasts in which all three RARs have been deleted by using the Cre-lox technology (see materials and methods and refs. 35, 36, 37). This is in perfect agreement with the antagonistic affect of the inverse agonists BMS493 (25) on ATRA and rexinoid-cAMP inductions of RAR β (lanes 4, 6). Most importantly, re-introduction of the RAR α cDNA re-established RAR β responsiveness to both rexinoid-cAMP and ATRA (Fig. 5F lanes 4, 5). Note that relative to its induction by ATRA the induction of RAR β by rexinoid-cAMP exposure is significantly enhanced upon RAR α re-expression, indicating that the RAR α -RXR heterodimer is particularly prone to RXR de-subordination.

Upstream activation of the protein kinase A signaling pathway leads to rexinoid-dependent myeloid cell differentiation and apoptosis. Given that upon the addition of exogenous cAMP analogues or blocking PDE-mediated cAMP degradation rexinoids could induce differentiation and apoptosis, we wondered if upstream activation of the signaling cascade would replicate the observed events. Indeed, while activation of adenylyl cyclase by the diterpene forskolin did not significantly affect PLB985 cell differentiation or apoptosis, addition of the rexinoids SR11237 or LG1069, which alone were without effect, dramatically induced cell differentiation and subsequent apoptosis in a dose- and time-dependent manner (Fig. 5G, H).

Discussion

The precise regulation of multiple signaling pathways that accurately control cellular decisions to proliferate, differentiate, arrest growth, or initiate programmed cell death (apoptosis) is essential for normal life. Cancer arises when cells escape this balance and proliferate inappropriately without compensatory apoptosis. As differentiation generally limits the proliferative capacity and life span of a cell, agents able to restore normal differentiation pathways in cancer cells and/or induce post-maturation apoptosis are promising tools for cancer therapy (6, 8, 19, 44). Here we show that the recently identified novel APL differentiation pathway that relies on rexinoid-PKA crosstalk (31) is a powerful inducer of maturation and death of several established AML cell lines *in vitro*. Most importantly, primary AML blasts studied in *ex vivo* cultures responded to this treatment by induction of maturation, apoptosis and loss of clonogenic potential in all cases tested, irrespective of FAB subtype, karyotype and immunophenotype. In contrast, no response was observed with ATRA, suggesting that in the presence of elevated levels of cAMP, rexinoid agonists may extend the repertoire for differentiative and/or apoptogenic treatment of AML.

Our mechanistic analysis demonstrates that it is the RAR α -RXR heterodimer, which mediates the differentiative and apoptogenic effect of the rexinoid – cAMP crosstalk. This is most obvious from the observation that (i) the endogenous retinoic acid target gene, RAR β , is activated by rexinoid-cAMP as by ATRA, albeit less efficient, (ii) pure RAR α antagonists or pan-RAR inverse agonists blocked this crosstalk, (iii) knockout of all three RARs blunted both the ATRA and rexinoid-cAMP response, which (iv) could be restored by re-expression of RAR α . We thus show that the RAR-RXR heterodimer has two distinct options to activate its target program, either through the classical route using RAR agonists or through the combination of rexinoids and agents that increase intracellular cAMP levels (cAMP analogues or phosphodiesterase

inhibitors). Note also that in keeping with previous observations (42, 45, 46) the signaling induced by RAR agonists (ATRA or TTNPB) is significantly enhanced in presence of increased cAMP levels. However, in contrast to the rexinoid – cAMP crosstalk the retinoid – cAMP crosstalk is insensitive to RXR antagonists, clearly demonstrating that the two mechanisms are fundamentally distinct (see also below).

How to explain the ability of RXR to signal in view of the well-documented RXR-subordination in heterodimers with apoRAR? Having previously identified persistent co-repressor binding to the heterodimer as the cause of RXR subordination (25) we assessed by 2-hybrid experiments the fate of SMRT and NCoR in the presence of elevated cAMP level. Importantly, RAR α , the signaling receptor in myeloid cells, dissociates from the co-repressor upon activation of protein kinase A. Thus protein kinase A is a functional mimic of an RAR agonist with respect to co-regulator binding. We asked if the known phosphorylation of RAR α at Ser369 by protein kinase A (47) could be responsible for this dissociation. However, our preliminary data reveal that activation of protein kinase A still induced the dissociation of co-repressors from RAR α _{S369A} (data not shown). Together, our results suggest a mechanism (Fig. 6) in which signaling events that increase cAMP levels, thereby inducing activation of protein kinase A and entry of its catalytic subunit (“c”) into the nuclear compartment leads to dissociation of the co-repressor complex from RAR α . This results in a “de-subordination of RXR allowing RXR agonists to induce co-activator complex recruitment (for mechanistic details see ref. 25), thus initiating the RAR α -RXR heterodimer-dependent gene programs. If phosphorylation of RAR α _{S369} contributes at all to co-repressor dissociation (option 1 in Fig. 6) remains to be established but certainly other targets are involved. This could be phosphorylation of the co-repressor itself (option 2) or of presently unidentified factors (option 3) that acquire upon phosphorylation the ability to interfere with RAR α – co-repressor interaction.

Importantly, there is a fundamental difference between the retinoid and rexinoid – cAMP induced signaling pathways, even though both activate similarly the RAR α -RXR heterodimer.

Acute myeloid leukemia cells are not differentiated by retinoids but we show here that the differentiation and apoptosis program is fully activated by the rexinoid – PKA crosstalk. Thus, in addition to “RXR de-subordination” further protein kinase A-dependent gene programs facilitate RAR α -RXR-mediated cell differentiation and apoptosis. Our results indicate that the crosstalk between retinoids and PKA should result in the activation of similar differentiation and apoptosis pathways. The precise “master switches” which in response to coordinate activation of the RAR α -RXR heterodimer and PKA induce differentiation and TRAIL/DR5 dependent apoptosis remain to be identified.

In addition to revealing the mechanistic basis of RXR de-subordination our study provides important information about the apoptogenic program induced by rexinoid-cAMP synergy and the factors involved. We show that the combination of RXR and PKA agonists consistently leads to strongly enhanced expression of the TRAIL receptor DR5 in all myeloid cells tested. In contrast to retinoic acid treatment (18), TRAIL expression is only moderately enhanced and exogenous TRAIL can dramatically increase cell death in PKA-rexinoid pre-treated cells. Notably, the induction of DR5 and TRAIL was observed by immunohistochemical staining of several AML patient blast cultures treated in *ex vivo* and staining correlated with a nuclear morphology indicative of cell differentiation. Therefore, it is likely that rexinoid-cAMP signaling induces post-maturation apoptosis through TRAIL-DR5 ligand-receptor activation. However, we do not exclude TRAIL-independent death induction due to highly expressed DR5, because the death domains present in DR5 function as oligomerization interfaces and mere DR5 overexpression leads to TRAIL-independent apoptosis (48). Interestingly, DR5 activation in the absence of TRAIL also induces apoptosis in a tumor cell-selective manner as shown with anti-DR5 antibodies that induce receptor oligomerization (49). Thus, up-regulation of DR5 by rexinoid-cAMP may be sufficient to induce AML blast apoptosis. While our results provide compelling evidence for a contribution of the TRAIL-DR5 signaling to rexinoid-cAMP-induced apoptosis, we do not exclude the additional implication of other death receptors (DR3, DR4),

which we see induced in some, but not consistently in all, cell lines tested. The block of apoptosis by the pan-caspase inhibitor Z-VAD excludes a significant contribution of caspase-independent death signaling pathways.

We report here for the first time that in the presence of elevated cAMP levels RXR-selective agonists differentiate and kill blasts derived from AML patients with retinoic acid-insensitive disease. Not only did PLZF-RAR α positive blasts fully differentiate upon this treatment, but also non-APL AML blasts that are normally unresponsive to retinoids underwent differentiation and apoptosis upon RXR-PKA treatment. The possible importance of the signaling option for AML therapy prompted us to look for alternative ways to increase cAMP level, as to our knowledge no synthetic cAMP analogue is presently in clinical use. Indeed, it is known that cAMP levels can be elevated also by treating cells with 3',5'-cAMP phosphodiesterase inhibitors (PDEi's) and the corresponding drugs are already in clinical use for the treatment of neurologic, cardiovascular or inflammatory disorders (50). Moreover, PDEi's, such as the pan-specific theophylline or the PDE4-selective rolipram, can induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia concomitantly with elevated cAMP levels. These effects were reported to be cell-type dependent, as interleukin-2-cultured whole mononuclear cells and anti-Ig stimulated CD19 (+) B cells were resistant to the induction of apoptosis by rolipram while unstimulated CD19 (+) B cells were more sensitive (51). Furthermore, the PDE4-selective inhibitor rolipram suppressed growth of acute lymphoblastic leukemia cells (52). As far as rexinoids are concerned we used LG1069 (53), a rexinoid used for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. Studying initially PLB985 cells, we saw a dramatic synergy between each of the three PDEi's, theophylline, IBMX and rolipram, and LG1069 for induction of differentiation. Most importantly, the clonogenic growth potential of AML blasts in *ex vivo* cultures was completely suppressed by PDEi-rexinoid treatment.

Our observations may provide additional options for the treatment of ATRA-resistant or ATRA-insensitive acute myeloid leukemia. We note in this respect that in a retinoic acid and arsenic trioxide-resistant APL patient the addition of theophylline to the therapeutic protocol

yielded a complete clinical remission (46). In view of our results it is possible that the RXR ligand 9-*cis* retinoic acid formed from, or present in, the all-*trans* retinoic acid given to the patient contributed to this response. In view of the low toxicity of rexinoids (6) these observations and the clinical availability of the corresponding drugs provides a rationale for initiating clinical studies addressing the efficacy of combinatorial PDEi-rexinoid therapy in AML patients. Together with our recent finding that a very promising class of epigenetic anti-tumor drugs operates through activation of TRAIL expression (54, 55) the possibility to target both the ligand (TRAIL) by HDAC inhibitors and the cognate receptors (DR4, DR5) by the above described rexinoid crosstalk may present a promising therapeutic option to limit, or even substitute, chemotherapeutic drugs with non-genotoxic signaling compounds.

Acknowledgements

We are particularly grateful to Norbert Ghyselinck for providing $RAR\alpha^{L2/L2}RAR\beta^{L2/L2}RAR\gamma^{L2/L2}$ mouse embryos, Michèle Lieb for cell culture, FACS analysis, MEF establishment and PCR analysis of “floxed” and excised alleles of the three RAR isotypes, Stéphanie Duffort for Real Time PCR analysis, Audrey Bindler for transfections, M. Giovanni for the CRE-expressing adenovirus, Angel de Lera for UVI3003, C. Zusi of Bristol-Myers Squibb for synthetic retinoids, Genentech/Immunex for the TRAIL and TRAIL receptor cDNAs, Yvon Cayre for PLB985 cells and Dominic Culligan for providing some patient blasts. LA was supported by INSERM, AR by a MRT fellowship, OH and AN by European Community grants, AZ and DG by the Leukaemia Research Fund of Great Britain and FG by the Kay Kendall Leukaemia Fund. This work was supported by funds from the Association for International Cancer Research, the Association pour le Recherche sur le Cancer, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Hôpital Universitaire de Strasbourg, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, PRIN 2004055579_003,

Ministero della Salute R.F. 02/184, the French-Italian GALILEO program and the European Community (HPRN-CT2002-00268, QLK3-CT2002-02029).

References

1. Lowenberg, B., Downing, J. R., and Burnett, A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341(14): 1051-1062.
2. Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., *et al.* Proposals for the classification of the acute leukaemias. French- American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 1976; 33(4): 451-458.
3. Tenen, D. G. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(2): 89-101.
4. Wang, Z., Sun, G., Shen, Z., Chen, S., and Chen, Z. Differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid: 10-year experience of its clinical application. *Chin Med J (Engl)* 1999; 112(11): 963-967.
5. Fenaux, P., Chomienne, C., and Degos, L. Treatment of acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001; 14(1): 153-174.
6. Altucci, L. and Gronemeyer, H. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nature Reviews Cancer* 2001; 1(181-193).
7. Piazza, F., Gurrieri, C., and Pandolfi, P. P. The theory of APL. *Oncogene* 2001; 20(49): 7216-7222.
8. Degos, L. and Wang, Z. Y. All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 2001; 20(49): 7140-7145.
9. Minucci, S., Nervi, C., Lo Coco, F., and Pelicci, P. G. Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias? *Oncogene* 2001; 20(24): 3110-3115.
10. de The, H. and Chelbi-Alix, M. K. APL, a model disease for cancer therapies? *Oncogene* 2001; 20(49): 7136-7139.
11. Lin, R. J., Sternsdorf, T., Tini, M., and Evans, R. M. Transcriptional regulation in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 2001; 20(49): 7204-7215.
12. Lin, H. K., Bergmann, S., and Pandolfi, P. P. Cytoplasmic PML function in TGF-beta signalling. *Nature* 2004; 431(7005): 205-211.
13. Alcalay, M., Meani, N., Gelmetti, V., *et al.* Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. *J Clin Invest* 2003; 112(11): 1751-1761.
14. Minucci, S., Cioce, M., Maccarana, M., and Pelicci, P. G. The APL-associated fusion proteins. *Haematologica* 1999; 84(70-71).
15. de Stanchina, E., Querido, E., Narita, M., *et al.* PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell* 2004; 13(4): 523-535.
16. Bernardi, R., Scaglioni, P. P., Bergmann, S., Horn, H. F., Vousden, K. H., and Pandolfi, P. P. PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol* 2004; 6(7): 665-672.

17. Wang, S. and El-Deiry, W. S. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 2003; 22(53): 8628-8633.
18. Altucci, L., Rossin, A., Raffelsberger, W., Reitmair, A., Chomienne, C., and Gronemeyer, H. Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. *Nature Medicine* 2001; 7(6): 680-686.
19. Clarke, N., Jimenez-Lara, A. M., Voltz, E., and Gronemeyer, H. Tumor suppressor IRF-1 mediates retinoid and interferon anticancer signaling to death ligand TRAIL. *EMBO J* 2004; 23(15): 3051-3060.
20. Grimwade, D., Biondi, A., Mozziconacci, M. J., *et al.* Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. *Blood* 2000; 96(4): 1297-1308.
21. Zhou, D. C., Kim, S. H., Ding, W., Schultz, C., Warrell, R. P., Jr., and Gallagher, R. E. Frequent mutations in the ligand-binding domain of PML-RARalpha after multiple relapses of acute promyelocytic leukemia: analysis for functional relationship to response to all-trans retinoic acid and histone deacetylase inhibitors in vitro and in vivo. *Blood* 2002; 99(4): 1356-1363.
22. Laudet, V. and Gronemeyer, H. The Nuclear receptor Facts Book. San Diego: Academic Press, 2002.
23. Gronemeyer, H., Gustafsson, J. A., and Laudet, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Design* 2004; 3(11): 950-964.
24. Chen, J. Y., Clifford, J., Zusi, C., *et al.* Two distinct actions of retinoid-receptor ligands. *Nature* 1996; 382(6594): 819-822.
25. Germain, P., Iyer, J., Zechel, C., and Gronemeyer, H. Coregulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy. *Nature* 2002; 415(187-192).
26. Zusi, F. C., Lorenzi, M. V., and Vivat-Hannah, V. Selective retinoids and rexinoids in cancer therapy and chemoprevention. *Drug Discov Today* 2002; 7(23): 1165-1174.
27. Sun, S. Y. and Lotan, R. Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 41(1): 41-55.
28. Altucci, L., Wilhelm, E., and Gronemeyer, H. Leukemia: beneficial actions of retinoids and rexinoids. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(2): 178-182.
29. Gottardis, M. M., Bischoff, E. D., Shirley, M. A., Wagoner, M. A., Lamph, W. W., and Heyman, R. A. Chemoprevention of mammary carcinoma by LGD1069 (Targretin): an RXR-selective ligand. *Cancer Res* 1996; 56(24): 5566-5570.
30. Sporn, M. B. and Suh, N. Opinion: Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(7): 537-543.
31. Benoit, G., Altucci, L., Flexor, M., *et al.* RAR-independent RXR signaling induces t(15;17) leukemia cell maturation. *EMBO J* 1999; 18(24): 7011-7018.
32. Pogenberg, V., Guichou, J. F., Vivat-Hannah, V., *et al.* Characterization of the interaction between retinoic acid receptor/retinoid X receptor (RAR/RXR) heterodimers and transcriptional coactivators through structural and fluorescence anisotropy studies. *J Biol Chem* 2005; 280(2): 1625-1633.
33. Lanotte, M., Martin-Thouvenin, V., Najman, S., Balerini, P., Valensi, F., and Berger, R. NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood* 1991; 77(5): 1080-1086.
34. Chomienne, C., Ballerini, P., Balitrand, N., *et al.* All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemias. II. In vitro studies: structure-function relationship. *Blood* 1990; 76(9): 1710-1717.

35. Chapellier, B., Mark, M., Garnier, J. M., Dierich, A., Chambon, P., and Ghyselinck, N. B. A conditional floxed (loxP-flanked) allele for the retinoic acid receptor gamma (RARgamma) gene. *Genesis* 2002; 32(2): 95-98.
36. Chapellier, B., Mark, M., Bastien, J., *et al.* A conditional floxed (loxP-flanked) allele for the retinoic acid receptor beta (RARbeta) gene. *Genesis* 2002; 32(2): 91-94.
37. Chapellier, B., Mark, M., Garnier, J. M., LeMeur, M., Chambon, P., and Ghyselinck, N. B. A conditional floxed (loxP-flanked) allele for the retinoic acid receptor alpha (RARalpha) gene. *Genesis* 2002; 32(2): 87-90.
38. Benoit, G. R., Flexor, M., Besancon, F., *et al.* Autonomous rexinoid death signaling is suppressed by converging signaling pathways in immature leukemia cells. *Mol Endocrinol* 2001; 15(7): 1154-1169.
39. Sainty, D., Liso, V., Cantu-Rajoldi, A., *et al.* A new morphologic classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying *PLZF/RARA* gene rearrangements. *Blood* 2000; 96(4): 1287-1296.
40. Sprick, M. R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M. A., and Walczak, H. Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J* 2002; 21(17): 4520-4530.
41. Bodmer, J. L., Holler, N., Reynard, S., *et al.* TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol* 2000; 2(4): 241-243.
42. Zhao, Q., Tao, J., Zhu, Q., *et al.* Rapid induction of cAMP/PKA pathway during retinoic acid-induced acute promyelocytic leukemia cell differentiation. *Leukemia* 2004; 18(2): 285-292.
43. Kamashev, D., Vitoux, D., and De The, H. PML-RARA-RXR oligomers mediate retinoid and rexinoid/cAMP cross-talk in acute promyelocytic leukemia cell differentiation. *J Exp Med* 2004; 199(8): 1163-1174.
44. Waxman, S. Differentiation therapy in acute myelogenous leukemia (non-APL). *Leukemia* 2000; 14(3): 491-496.
45. Parrella, E., Gianni, M., Cecconi, V., *et al.* Phosphodiesterase IV inhibition by piclamilast potentiates the cytodifferentiating action of retinoids in myeloid leukemia cells. Cross-talk between the cAMP and the retinoic acid signaling pathways. *J Biol Chem* 2004; 279(40): 42026-42040.
46. Guillemain, M. C., Raffoux, E., Vitoux, D., *et al.* In Vivo Activation of cAMP Signaling Induces Growth Arrest and Differentiation in Acute Promyelocytic Leukemia. *J Exp Med* 2002; 196(10): 1373-1380.
47. Rochette-Egly, C., Oulad-Abdelghani, M., Staub, A., *et al.* Phosphorylation of the retinoic acid receptor-alpha by protein kinase A. *Mol Endocrinol* 1995; 9(7): 860-871.
48. Sheridan, J. P., Marsters, S. A., Pitti, R. M., *et al.* Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors *Science* 1997; 277(5327): 818-821.
49. Ichikawa, K., Liu, W., Zhao, L., *et al.* Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nat Med* 2001; 7(8): 954-960.
50. Manganiello, V. C., Murata, T., Taira, M., Belfrage, P., and Degerman, E. Diversity in cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme families. *Arch Biochem Biophys* 1995; 322(1): 1-13.
51. Kim, D. H. and Lerner, A. Type 4 cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase as a therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1998; 92(7): 2484-2494.

52. Ogawa, R., Streiff, M. B., Bugayenko, A., and Kato, G. J. Inhibition of PDE4 phosphodiesterase activity induces growth suppression, apoptosis, glucocorticoid sensitivity, p53, and p21(WAF1/CIP1) proteins in human acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 2002; 99(9): 3390-3397.
53. Boehm, M. F., Zhang, L., Zhi, L., *et al.* Design and synthesis of potent retinoid X receptor selective ligands that induce apoptosis in leukemia cells. *J Med Chem* 1995; 38(16): 3146-3155.
54. Nebbioso, A., Clarke, N., Voltz, E., *et al.* Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat Med* 2005; 11(1): 77-84.
55. Insinga, A., Monestiroli, S., Ronzoni, S., *et al.* Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med* 2005; 11(1): 71-76.

Legends to figures

Figure 1: Induction of maturation and apoptosis of AML patients' blasts. (A to C) ATRA-resistant t(11;17) APL blasts differentiate in response to a 3 day treatment with rexinoid (BMS749) and PKA (8CPT-cAMP) agonists as revealed by nuclear morphology (A), NBT reduction assays (B), and expression of CD56 and CD11b cell surface markers (C). (D) Morphology of blasts of patient N° 5 (FAB-M2; table 1) cultured *ex vivo* for 7 days in vehicle ("untreated") or 1 μ M ATRA (top panel), or treated for 4 days with 1 μ M SR11237 plus 200 μ M 8CPT-cAMP (bottom panel; three different views illustrate cell maturation and apoptosis). Similar results were obtained in *ex vivo* cultures of blasts of all other patients described in table 1. (E) Synergistic induction of apoptosis with rexinoid and PKA agonist in blasts of patient 71. Cells were treated for 6 days with 1 μ M SR11237, 200 μ M 8CPT-cAMP or both of them and submitted to FACS analysis (cell cycle and PI staining).

Figure 2: Activation of the TRAIL receptor DR5 and its ligand by rexinoid-cAMP treatment revealed by multiplex RNase protection (A), immunoblotting (B) and immunohistology (C). Comparative RNase protection in (A) shows strong up-regulation upon combined treatment with rexinoid (SR) and PKA (cAMP) agonists of the death receptors DR4, DR5, the cognate ligand TRAIL, and the death receptor DR3 in NB4 cells. ATRA treatment was for 0, 4, 18, 24, 48 or 96 h (lanes 1-6); cAMP exposure was for 0, 24 or 48 h (lanes 7-9); SR and combined cAMP+SR

treatments were for 24 or 48 h (lanes 10-13). ATRA, all-*trans* retinoic acid; SR, SR11237; cAMP, 8CPT-cAMP. The immunoblot analysis in (B) demonstrates a major increase in DR5 protein levels upon exposure to PKA (8CPT-cAMP, “cAMP”) and rexinoid (SR11237, “SR”) agonists in NB4 cells. The identity of the DR5 signal was verified by comparison with recombinant DR5 transiently expressed in Cos cells (not shown). (C) Post-maturation induction of the TRAIL signaling pathway by rexinoid-PKA agonists in AML patient blasts. Immunohistochemical analysis of TRAIL receptor DR5 (left panels) and TRAIL (right panels) expression upon exposure of blasts of patient N° 8 (FAB M4; table 1) in *ex vivo* cultures to vehicle (top panels) or 1 μ M SR11237 plus 200 μ M 8CPT-cAMP (bottom panels). To assess differentiation nuclei were counter-stained with May-Grünwald-Giemsa; the arrows point to residual immature blasts (which do not express DR5 or TRAIL) in the pool of differentiated cells

Figure 3: Rexinoid-PKA induces cell surface expression of TRAIL receptor DR5 and caspase-dependent cell death, which is super-induced by TRAIL. (A) FACS analysis of DR5 expression on NB4 and PLB985 cell surfaces in absence and presence of rexinoid and PKA agonists (4 days exposure) as depicted. (B) PLB985 cells were pre-treated for 4 days (lanes 3-5) [or left untreated (lanes 1, 2)] with rexinoid and PKA agonists and subsequently exposed for another 4 days to exogenous TRAIL, SR11237, or 8CPT-cAMP. Apoptosis was determined by Annexin V-PI staining. (C) The initiator caspases, casp-8 and casp-10, are activated by the crosstalk (lanes 4) and, less pronounced, by cAMP alone (lanes 2), while no significant induction is seen by the rexinoid alone (lanes 3). (D) Rexinoid-cAMP (“SR+cAMP”)-induced apoptosis (lane 2) is nearly completely blocked by a pan-caspase inhibitor (“Z-VAD”, Z-VAD-FMK; lane 4).

Figure 4: Phosphodiesterase inhibitors (PDEi's) functionally substitute PKA agonists in the crosstalk with rexinoid agonists. (A) PLB985 cells were exposed for 7 days to two rexinoids (1 μ M SR11237, 1 μ M LG1069), the pan-PDEi's theophylline (2mM) or IBMX (500 μ M), or the PDE4-selective PDEi rolipram (100 μ M) alone or to combinations of rexinoid and PDEi as

indicated. Differentiation was assessed by FACS analysis of CD11c cell surface marker expression. (B) Similar treatment of PLB985 cells as in A. As a functional marker for differentiation, superoxide production was determined using the NBT reduction method. (C, D) PLB985 were treated for the indicated time with 2mM theophylline, 100nM LG1069 or 100nM of the RAR-selective pan-agonist TTNPB. The cells were assayed for NBT reduction (C) or apoptosis (D). (E). Inhibition of the clonogenic growth of AML blasts in presence of PDEi's and the rexinoid LG1069. The left panels show colony formation after 16 days in presence of vehicle; no colonies form under identical conditions in presence of the indicated combinations of LG1069 and PDEi's (right panels). Similar results were obtained with *ex vivo* cultures of blasts of three other AML patients.

Figure 5. The rexinoid-cAMP crosstalk involves signaling through the RAR α -RXR heterodimer. (A) PLB985 cells were exposed for 4 days to pan-PDEi's theophylline (2 mM), the rexinoid LG1069 (30nM), the RAR pan agonist TTNPB (30nM), in combination with the selective RAR α antagonist BMS614 (1 μ M), the pan-RAR inverse agonist BMS493 and the RXR antagonist UVI3003 (5 μ M) as indicated. Differentiation was checked by NBT reduction assay. (B) Luciferase assay on electroporated U937 submitted to 100nM TTNPB, 1 μ M BMS493, 1 μ M LG1069, 200 μ M 8CPT-cAMP, 2mM theophylline alone or in combination as indicated. (C) Two-hybrid experiment to assess RAR α VP16 – co-repressor (left panel) or RXR α VP16-RAR α - corepressor (right panel) interaction, as schematically depicted. Cells were co-transfected with a luciferase reporter gene and the indicated vectors. *PRKACA* encodes the catalytic subunit of protein kinase A. (D). In presence of elevated cAMP levels rexinoids induces expression of the endogenous RAR β gene in U937 cells. Cells were exposed for 12h to 200 μ M 8CPT-cAMP and/or 1 μ M SR11237 as indicate and RAR β expression was quantitated by real time PCR. (E). MEFs with “floxed” RAR genes (RAR α ^{L2/L2}RAR β ^{L2/L2}RAR γ ^{L2/L2}; black columns) or their triple RAR knockout derivatives (RAR α ^{L-/L-}RAR β ^{L-/L-}RAR γ ^{L-/L-}; grey columns) were treated as indicated and the expression of RAR β (primers are upstream of the deletion) was monitored by

real-time PCR. Similar results were obtained with CYP26A1 (not shown). Note that the inverse agonist BMS493 (5 μ M) is a good pharmacological mimic of RAR deletion. ATRA, 1 μ M. (F). Retinoid-cAMP and ATRA responsiveness is re-established in the triple RAR knockout MEFs by expressing retrovirally transduced RAR α cDNA. Cells were treated and analyzed as described in (E). (G, H) The adenylate cyclase activating agent forskolin synergizes with retinoids to induce cell differentiation and death. The PLB985 cells were treated with the indicated concentration of forskolin in combination with 1 μ M SR11237 or 100 nM LG1069. After the indicated time, differentiation (D) and apoptosis (E) were assessed.

Figure 6. Mechanism of retinoid – cAMP crosstalk. (Top). Subordination of RXR by apoRAR is due to persistent co-repressor (complex) interaction with RAR not allowing, possibly for steric reasons, binding of the co-activator (complex) to agonist-bound RXR (for details see 25). (Bottom). Signaling that leads to activation of protein kinase A and nuclear compartmentalisation of its catalytic subunit leads to dissociation of the co-repressor complex from RAR α due to three non-exclusive signaling options, (1) phosphorylation of RAR α _{S369}, which is insufficient on its own but may contribute to RXR de-subordination, (2) phosphorylation of the co-activator or (3) phosphorylation of an unknown factor that acquires the ability to interfere with RAR α – co-repressor interaction. For differentiation and apoptosis to occur in acute myeloid cells additional cAMP-inducible gene programs need to be activated in addition to the RAR-RXR heterodimer-dependent gene regulation.

Table 1 Comparison between ATRA and rexinoid-PKA responsiveness of AML patients' blasts

N°	FAB	Ctrl	ATRA	RXR-PKA	Karyotype	Immunophenotype*
1	M1	13 (5)	14 (5)	61 (5)	46, XX	CD11b+/-, CD11c+, CD13+/-, CD14-, CD33+, CD34-, CD56+/-, CD117+, DR-, MPO+
2	M1	10 (3)	8 (3)	31 (3)	46, XX	CD11b+, CD11c+, CD13+, CD14+, CD33+, CD34-, CD36+, CD56+, CD117+, DR+, MPO+
3	M1	19 (4)	18 (4)	49 (4)	complex	CD11b+, CD11c+, CD13+, CD33+, CD34-, CD56+, CD117+, DR+, MPO+
4	M2	13 (4)	12(4)	35 (4)	46, XX	CD11b+, CD11c+, CD13+, CD33+, CD34+, CD56-, CD117+, DR+, MPO+
5	M2	11 (5)	9 (5)	60 (5)	46, XX	CD10+, CD11b+, CD11c+, CD13+, CD14+/-, CD33+, CD34+/-, CD56+, CD117+, DR+, MPO+
6	M3 (PML-RAR α positive)	13 (5)	49 (5)	58 (5) ¹	46, XX, t(15;17)	CD2+, CD11b-, CD11c-, CD13+, CD14+, CD33+, CD34-, CD56-, CD117+, DR-, MPO+
7	M3 (PLZF-RAR α / RAR α -PLZF positive)		NO	YES	46, XY, t(11;17) (q23;q12-21)[12] /46, XY[3]	CD2-, CD3-, CD5-, CD7-, CD10-, CD11c-, CD13+, CD14-, CD19-, CD22-, CD33-, CD34-, CD56+, MPO+, IgM-, Tdt-
8	M4	16 (5)	15 (5)	40 (5)	46, XX, t(9;11) (p22;q23)	CD11b+, CD11c+, CD13+, CD14+, CD33+, CD34-, CD36+, CD56+, CD117-, DR+, MPO+
9	M5	10 (6)	7 (6)	39 (6) ^{1,2}	46, XX	CD11c+, CD13+, CD33+, CD117+, DR+, MPO+
10	M4	12 (3)	10 (3)	31 (3) ^{1,2}	46, XY	CD11c+, CD13+, CD14+, CD33+, CD36+, CD56+, DR+
11	M2	12 (3)	12 (3)	31 (3) ^{1,2}	46, XY	CD33+, CD117+, MPO+
12	M4	10 (4)	8 (4)	21 (4) ^{1,2}	46, XY	DR+, CD14+, CD33+, DR+, MPO+
13	M2	14 (4)	15 (4)	49 (4) ^{1,2}	46, XX	CD11c+, CD13+, CD33+, CD117+, DR+, MPO+

The blasts of 13 AML patients were cultured *ex vivo* and exposed to 1 μ M ATRA or 1 μ M SR11237 plus 200 μ M 8CPT-cAMP. Numbers in the 'Ctrl', 'ATRA' and 'RXR-PKA' columns refer to % apoptosis determined by Annexin V staining and FACS analysis; the number in parenthesis is the day of analysis and corresponds to the length of *ex vivo* treatment (apoptosis was not quantitated in case N° 7 but was obvious in the RXR-PKA case ('YES') from morphological inspection). (¹), blasts tested also in colony forming assays with SR11237 and 8CPT-cAMP; (²), clonogenic assays done in presence of LG1069 and PDEis (theophylline, rolipram, or IBMX). In general blasts that responded to SR11237-8CPT-cAMP also responded to LG1069-PDEi and, when tested, induction of differentiation/apoptosis corresponded to reduction

of clonogenicity. Blasts of patient 12 (who died the same day) responded in *ex vivo* cultures only partially. Case N° 8 corresponds to a secondary myeloid leukemia occurring in a patient that was in complete molecular remission from APL and was under maintenance treatment with ATRA; the second primary leukemia was diagnosed one year after the onset of APL. Blasts showed a complete resistance to conventional chemotherapy and the patient died within twenty days. FAB, French-American-British classification of AML (2). Unless stated otherwise karyotypes were established from 20 readable mitoses. *Surface antigen positivity was defined on the basis of expression in <20% (“-“), ≥20%-40% (“+/-“) and >40% (“+”) of the gated blast cell population.

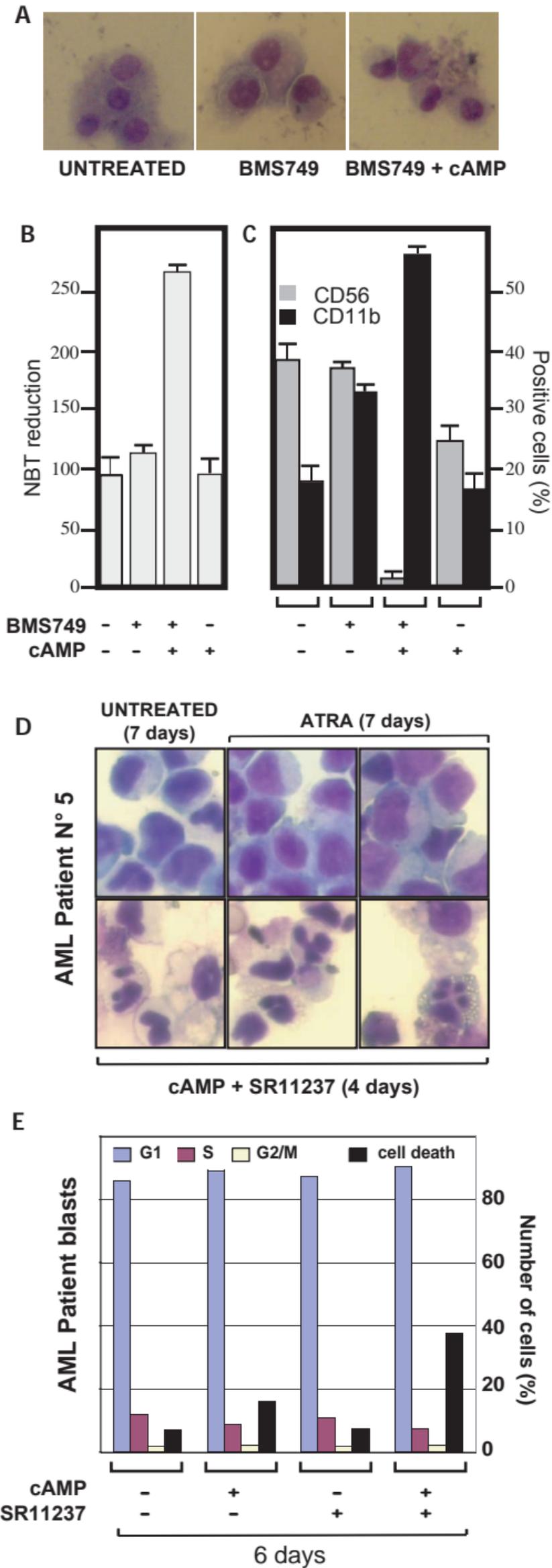


Figure 1
Altucci et al.

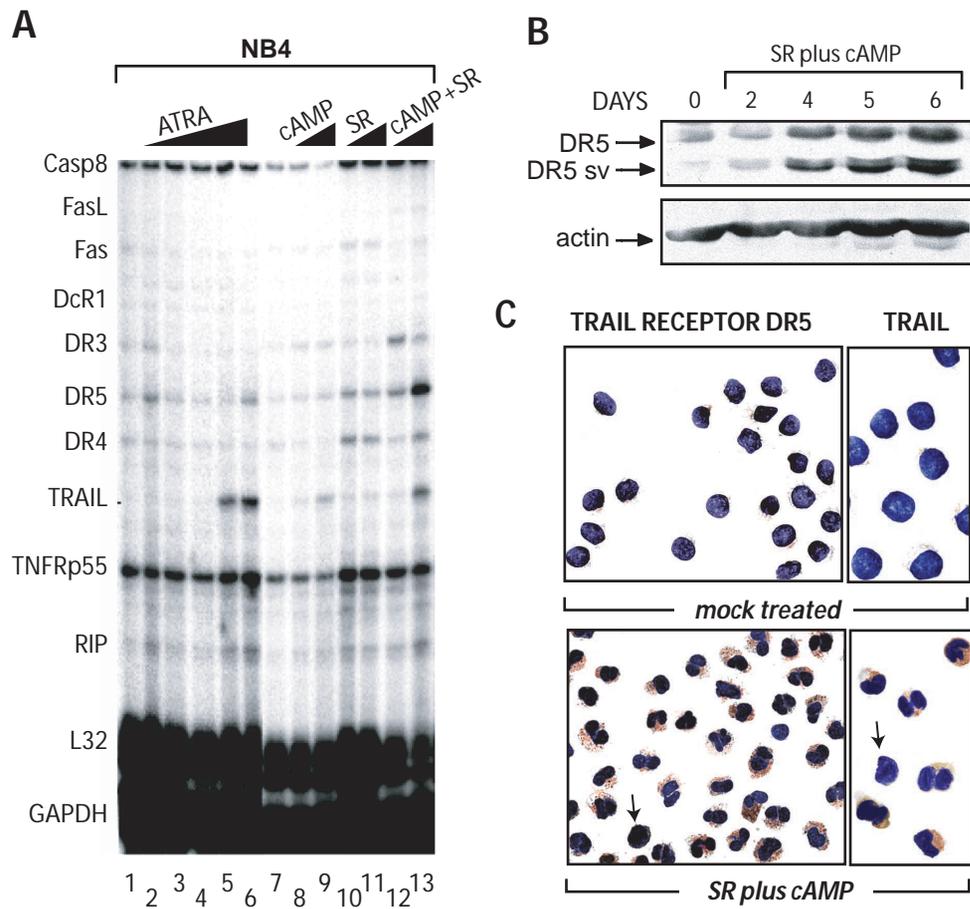


Figure 2
Altucci et al.

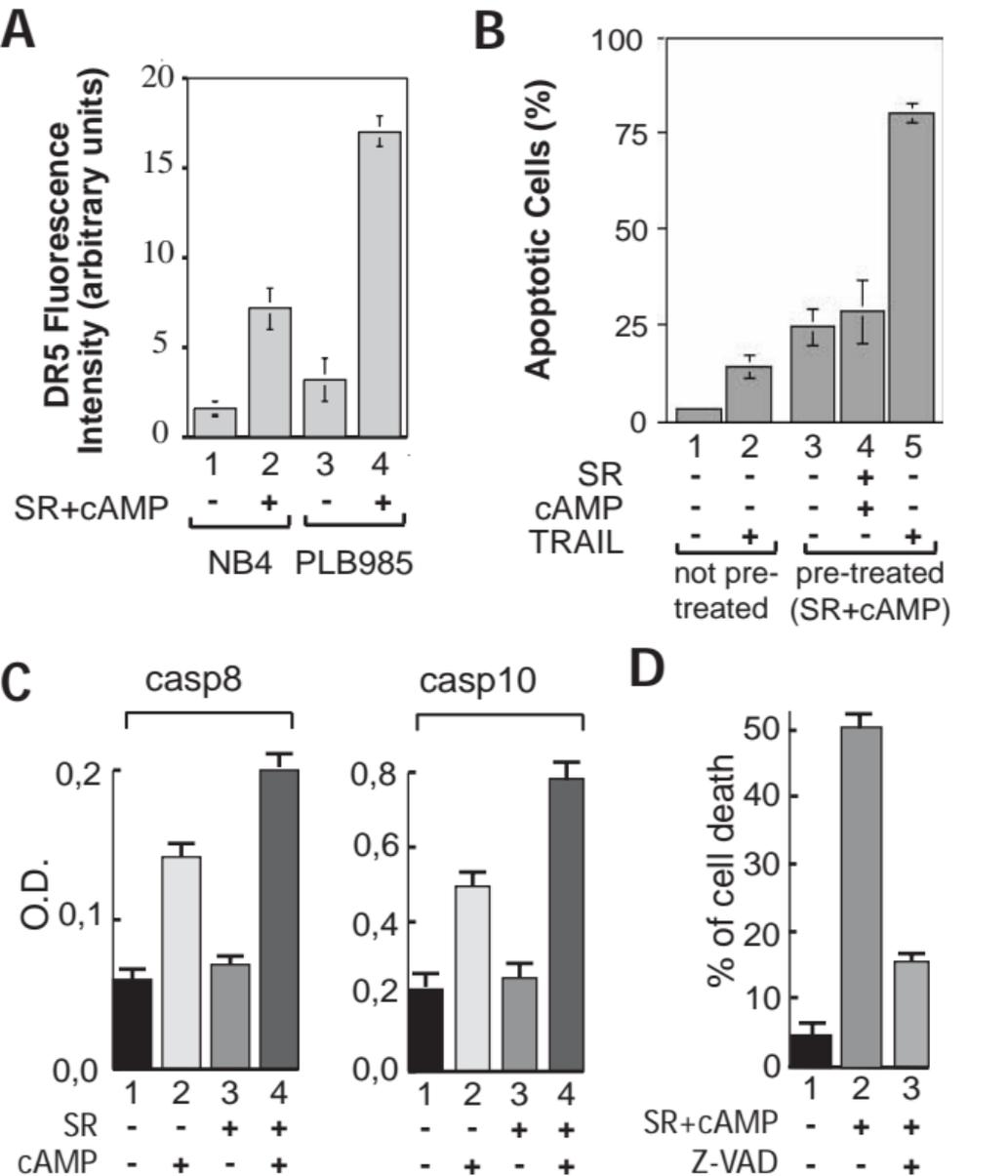


Figure 3
Altucci et al.

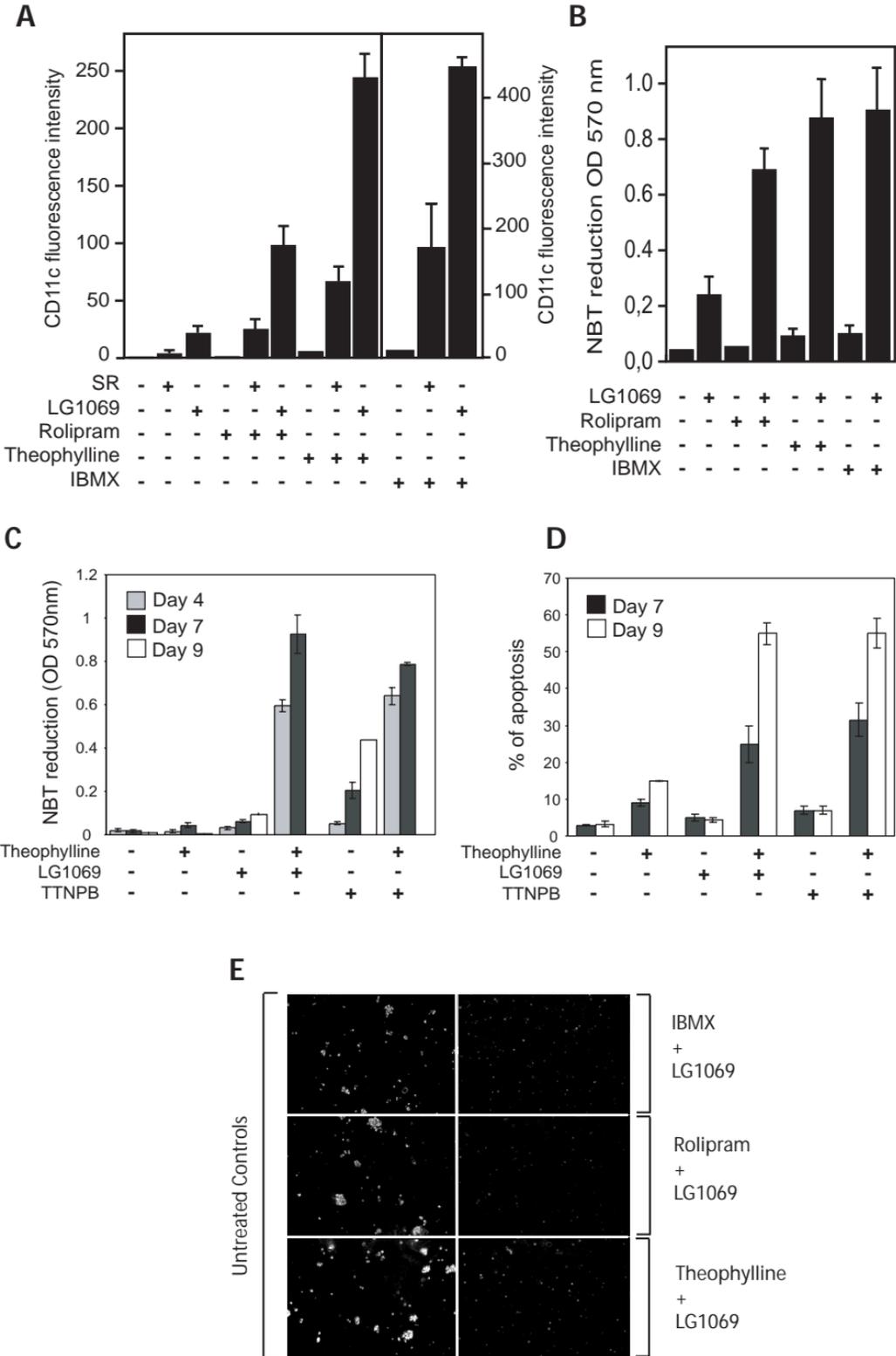


Figure 4
Altucci et al.

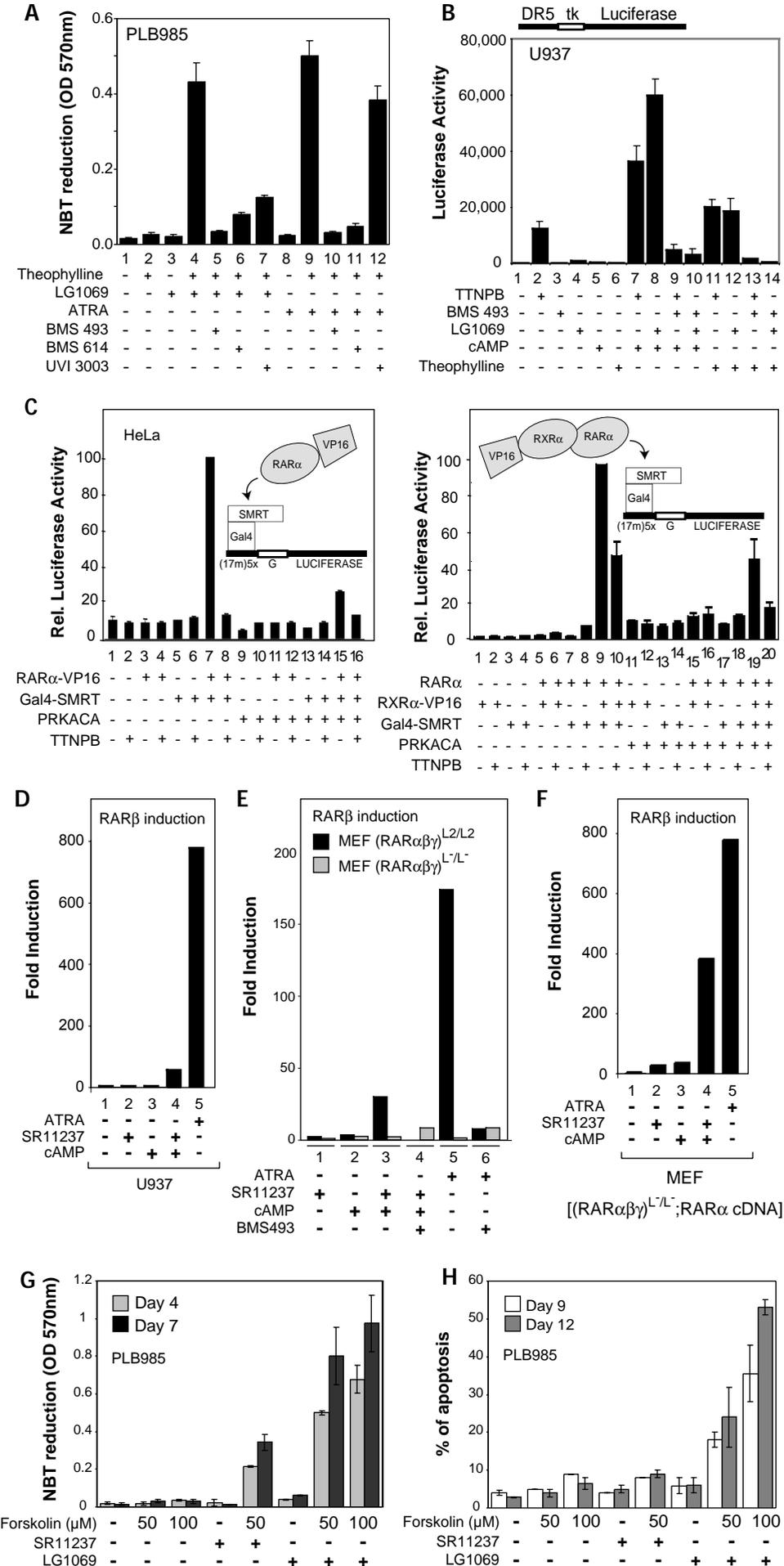
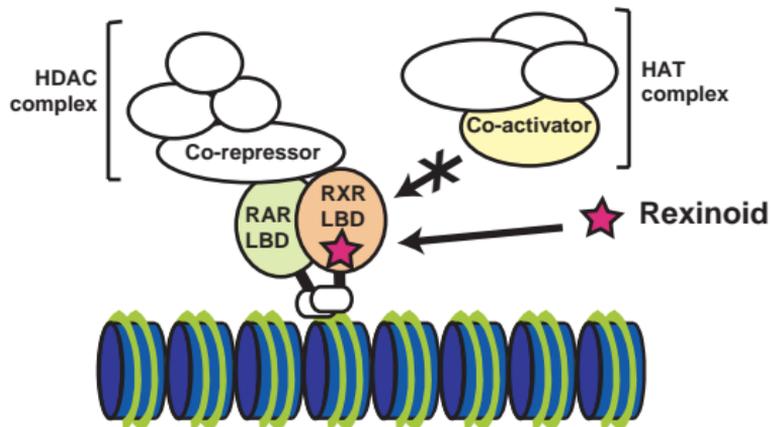


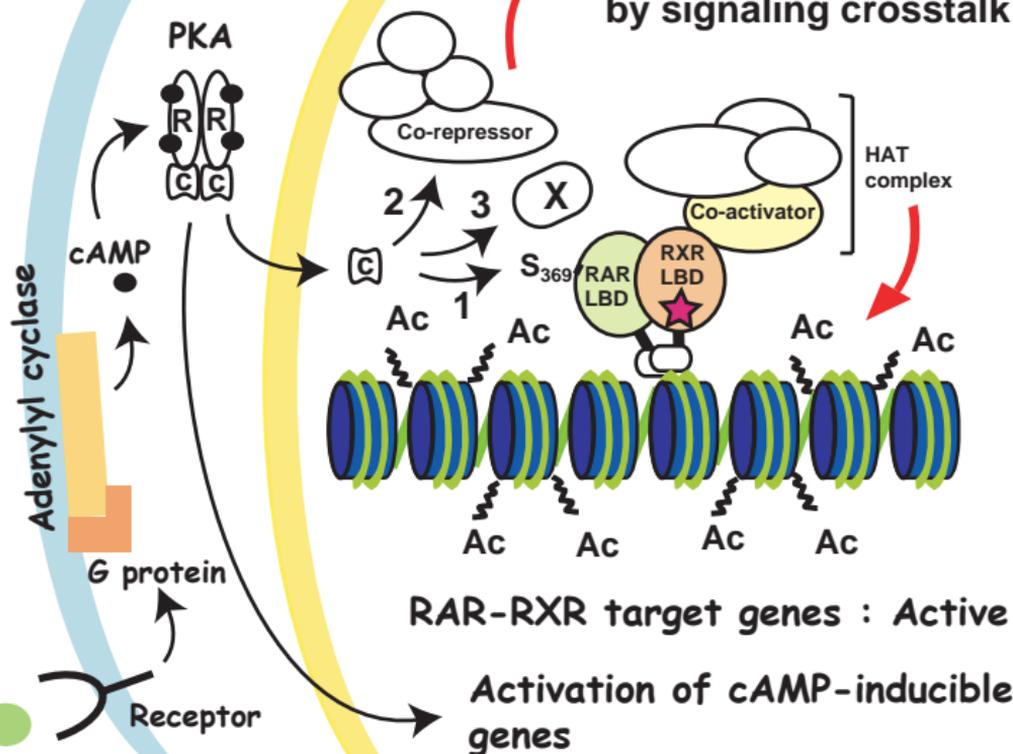
Figure 5
Altucci et al.

RXR subordination



RAR-RXR target genes : Silent

RXR de-subordination by signaling crosstalk



RAR-RXR target genes : Active

Activation of cAMP-inducible genes

Etude de l'apoptose induite par les rexinoïdes dans les cellules AML.

Ce travail a été initié au laboratoire avant mon arrivée et provient également de la collaboration entre notre équipe et celle du professeur Lanotte. L'idée de base du projet a été déduite de l'existence de la signalisation croisée entre RXR et la PKA qui induit la différenciation et apoptose des cellules NB4. En effet, cette observation suggère qu'il pourrait exister une voie autonome induite par RXR et les rexinoïdes et que celle-ci pourrait être régulée de manière positive ou négative par d'autres voies de signalisation. Ainsi, il est possible que l'absence d'effets biologiques induits par les rexinoïdes dans les systèmes cellulaires puisse provenir d'un effet masquant des autres voies de signalisation. Afin de réduire l'impact des voies de signalisation activées par les facteurs présents dans le sérum (que ce soient les facteurs de croissance ou d'autres hormones ou vitamines), les cellules NB4 ont été adaptées en culture avec une concentration réduite en sérum (de 10% en condition normale à 0,5% finale) et en présence d'un substitut synthétique dont la composition est définie. L'adaptation des cellules est effectuée progressivement de manière à conserver le même taux de croissance.

Il a été alors démontré que l'hypothèse de départ était valide : l'addition d'un rexinoïde induit en effet une apoptose massive des cellules NB4 seulement en absence de sérum. Cette apoptose est très rapide et ne nécessite pas de maturation préalable comme c'est le cas lors d'un traitement par les rétinoïdes. La voie d'apoptose induite est totalement indépendante de RAR et est observée également dans les cellules résistantes à l'AR. 3 signaux différents peuvent inhiber cet effet apoptotique des rexinoïdes : premièrement, l'addition de sérum dans le milieu de culture permet de contrecarrer l'apoptose de manière dose-dépendante et restaurer un signal de survie. De plus, l'addition d'agoniste de RAR ou d'agonistes de la PKA vont permettre d'inhiber l'apoptose induite par les rexinoïdes en induisant une voie de différenciation. J'ai rejoint ce projet à ce stade de son élaboration. Ma contribution a d'abord consisté à démontrer que cette voie apoptotique n'était pas restreinte aux cellules APL mais qu'on pouvait également l'observer dans des cellules dépourvues de la protéine de fusion PML-RAR \square telles que les cellules myéloïdes PLB985. L'ensemble de ces résultats ont fait l'objet d'une publication que je mets en annexe de ce manuscrit (Benoit et al., 2001b).

Cette publication et les premiers résultats obtenus sur ce sujet soulèvent de nombreuses questions :

- Quelles sont les voies apoptotiques induites par les rexinoïdes ?
- Quels sont les facteurs présents dans le sérum capables d'inhiber cette apoptose et par quelles voies de signalisation ?
- Quel est le partenaire de RXR ?
- Cette voie induite par les rexinoïdes est-elle restreinte aux cellules myéloïdes ?

La majeure partie de ma thèse a consisté à répondre à ces questions. Les résultats ont été rassemblés dans une publication en cours d'écriture et qui suit ce paragraphe.

PPAR γ /RXR mediates rexinoid apoptosis in Acute Myeloid Leukemia cells by activating the intrinsic death pathway.

Rossin et al

Department of Cell Biology and Signal Transduction, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), BP 10142, 67404 ILLKIRCH CEDEX, C. U. de STRASBOURG, France

Running title: Rexinoid apoptosis

Key words: acute myeloid leukemia / retinoid and rexinoid signaling / apoptosis /

‡ Corresponding author
Hinrich Gronemeyer
IGBMC, B.P. 10142, 67404 Illkirch-Cedex, France
Tel.: +(33) 3 88 65 34 73
Fax: +(33) 3 88 65 34 37
e-mail: hg@igbmc.u-strasbg.fr

ABSTRACT

Retinoid X Receptor (RXR) ligands (rexinoids), even though unable to activate RAR-RXR heterodimers, induce apoptosis of immature acute myeloid leukemia (AML) cells in the absence of growth factor signaling. Here, we show that the permissive RXR-PPAR γ heterodimer mediates rexinoid apoptosis. Accordingly, rexinoids and PPAR γ agonists synergistically induce apoptosis in AML cells in conditions where growth factor-mediated antagonism is abrogated. Mechanistic studies revealed that the production of nitric oxide (NO) is critically required, as pan NO synthase inhibitors decreased rexinoid apoptosis. Rexinoid-induced NO led to the loss of mitochondrial transmembrane potential and release of the proapoptotic proteins cytochrome c and smac/Diablo into the cytoplasm. Activation of the intrinsic death pathway was further boosted by a caspase 3/ caspase 8/ tBid amplification loop and the late overexpression of the death receptor DR5. Growth factor and serum-induced inhibition of rexinoid-apoptosis involves activation of IGF Receptor I and subsequent MAP Kinase signaling. Our results provide the molecular basis of rexinoid apoptosis and suggest the existence of a novel mechanism of cell life and death regulation in which growth factor signalling antagonizes RXR-PPAR γ -mediated default apoptosis to support cell survival.

INTRODUCTION

Due to their ability to control cellular proliferation, differentiation and death, retinoids are used in the prevention and treatment of different types of cancer such as acute promyelocytic leukemia (APL), Kaposi sarcoma, neuroblastoma or leukoplakia (Altucci and Gronemeyer, 2001; Clarke et al., 2004; Sporn et al., 1994; Sun and Lotan, 2002). APL, which accounts for 5 to 10 % of acute myeloid leukemia (AML) cases (Lowenberg et al., 1999), is the prototype of a successful differentiation therapy as the incorporation of all-trans retinoic acid (ATRA) to the chemotherapeutic protocol has led to complete remission in more than 70% of treated patients (Degos and Wang, 2001; Wang et al., 1999). In most cases, APL originates from a t(15;17) chromosomal translocation which leads to the expression of a PML-RAR α fusion protein. Aberrant recruitment of multisubunit complexes that contain histone deacetylase (HDAC) and DNA methyltransferases (Dnmt) by the PML-RAR α protein is responsible for the repression of transcription and for the differentiation block of myeloid precursors at the promyelocytic stage (Di Croce et al., 2002; Grignani et al., 1998; Lin et al., 1998) and for reviews (Minucci et al., 2001; Villa et al., 2004). While physiological ATRA concentration are inefficient, pharmacological doses induce the release of the corepressors, revert silencing and reprogram cells to differentiation (de The and Chelbi-Alix, 2001; Mistry et al., 2003). However, a variety of recent observations indicate that the etiology of APL is more complex. Aspects that have to be further investigated involve (i) the sumoylation of PML-RAR α which is required for the development of APL phenotype, (ii) the alteration of crosstalk to key regulatory factor such as p53 which potentiates cell survival and (iii) the expression of the reciprocal fusion protein whose function is not yet defined (Altucci et al., 2001; Insinga et al., 2004; Mistry et al., 2003; Zhu et al., 2005). With respect to therapy, the

role of TRAIL-mediated tumor-selective death of the APL blasts needs to be considered (Altucci et al., 2001).

Retinoids stimulate transcription through activation of a heterodimer composed of retinoic acid receptors ($RAR\alpha$, β or γ) and retinoid X receptors ($RXR\alpha$, β or γ) (Bastien and Rochette-Egly, 2004). In absence of ligand, the RXR-RAR heterodimer interacts with co-repressor complexes containing HDACs. The binding of a RAR agonist induces the release of co-repressors, the recruitment of co-activator containing complexes and the transcriptional machinery, whereas a RXR agonist is unable to dissociate corepressor and activate transcription (Chen et al., 1996; Germain et al., 2002). This phenomenon is known as RXR subordination. However, a rexinoid can synergize with the retinoid to enhance the RXR-RAR-mediated transcription via the cooperative recruitment of co-activators. In addition to its ability to interact with RAR, RXR can heterodimerize with a variety of other nuclear receptors such as PPARs, VDR, TR or orphan receptors (Laudet and Gronemeyer, 2002). In RXR-VDR or RXR-TR, RXR is also subordinated to its partner but in permissive heterodimers, such as PPAR-RXR, transcription can be activated by both liganded partners and rexinoids operate autonomously (Gronemeyer et al., 2004).

Data from cellular and animal models as well as clinical trials reveals a potent antitumor activity of rexinoids (Gottardis et al., 1996; Sporn and Suh, 2002; Szanto et al., 2004). Indeed, the selective RXR agonist LG1069 (targretin, bexarotene) is currently used as treatment for persistent or refractory cutaneous T-cell lymphoma and is in phase II clinical trials for the treatment of non-small-cell lung cancer (Rigas and Dragnev, 2005; Zhang and Duvic, 2003). Rexinoids exhibit limited toxicity compared with retinoids which could favour their use in the clinic. We have previously demonstrated that in presence of elevated cAMP level, rexinoids induce post-maturation apoptosis of non-APL AML cells and patients blasts which are largely insensitive to retinoids (Benoit et al., 1999). At the molecular level, this

phenomenon involves “desubordination” of RXR in the RXR-RAR heterodimer. In studying whether additional signalling options of RXR may exist, we discovered the existence of a rexinoid-induced cell death in ATRA-resistant APL cells (Benoit et al., 2001). Importantly, rexinoid-induced apoptosis is also operative in non-APL AML cells PLB985 (later described as a sub-clone of HL-60). This apoptotic pathway, which we termed “rexinoid apoptosis” does not require any prior maturation process but is counteracted by growth factor-mediated survival signalling.

In the present work, we demonstrate that rexinoid apoptosis operates mainly but not exclusively through the intrinsic death pathway. This apoptosis is counteracted by IGFI-like activity and involves MAP kinase signalling. Unexpectedly, our results reveal that rexinoid apoptosis is not mediated by RXR-RAR but the permissive RXR-PPAR γ heterodimer.

Results

Rexinoid apoptosis involves primarily activation of intrinsic death pathway.

Although RXR agonists do not affect growth or differentiation of myeloid PLB985 cells in normal culture conditions, cells adapted to growth in low serum undergo rapid and massive apoptosis upon exposure to the rexinoid BMS749 (Benoit et al., 1999) (Fig 1a and (Benoit et al., 2001)). This apoptosis induces the activation of caspases because the pan-caspase inhibitor Z-VAD completely blocks the formation of apoptotic bodies (Fig 1b, lanes 1-3). It is well established that apoptosis can be initiated by at least two mechanistically distinct events: activation of death receptors (extrinsic pathway) and permeabilisation of the mitochondrial membrane (intrinsic pathway) (Debatin, 2004). That rexinoid apoptosis was decreased upon treatment with caspases 8 and 10 selective inhibitors revealed that the death

receptor pathway is involved (fig 1b, lanes 1, 2, 4, 5, 7). Specific cleavage pattern of caspase 8 detected by immunoblot confirmed its rapid activation upon BMS749 exposure (fig 1c). On its own, the caspase 9 inhibitor had no effect on BMS749-induced cell death (Fig 1b lane 5) but in addition to caspase 8 and 10 inhibitors, it further reduced BMS749-mediated apoptosis (fig 1c compare lane 7 and 8). Indeed, activation of caspase 9 has been confirmed by western blot analysis which reveals the active p37/35 fragments (fig 1c). Moreover, some cleavage of the pro-apoptotic bcl-2 family member Bid is observed between 3 and 4 hours of rexinoid treatment (fig 1c) and demonstrates that the two apoptotic pathways are connected. The activation of the executor caspase-3 and the cleavage of its direct substrate PARP were also detected (fig 1c and (Benoit et al., 2001)). Altogether these data account for a contribution of the two apoptotic pathways to rexinoid-induced cell death.

RNAse protection assays did not show any regulation of FasL, TNF α or their cognate receptors by rexinoids (data not shown). While TRAIL expression rather decreased upon rexinoid treatment, its cognate receptor DR5 was strongly overexpressed (fig 2a). However, this up-regulation occurred too late to correspond to the trigger of rexinoid apoptosis. To assess whether DR5 signaling may contribute to rexinoid apoptosis, we generated PLB985 cell lines stably expressing a dominant negative FADD fused to GFP (GFP-FADD-dn) or β -galactosidase using lentivirus transduction. Efficient transgene expression was confirmed by immunoblotting (fig 2b) and FACS analysis of GFP fluorescence, revealing that 98% of the cells were infected (fig 2c). That sensitivity to apoptosis induced by exogenous TRAIL is reduced in GFP-FADDdn expressing cells compared to wild type or LacZ demonstrated that the death receptor pathway is effectively inhibited in these cells (fig 2d). In contrast, staurosporine and CCCP, two drugs which target the mitochondrial death pathway induce apoptosis with the same efficiency in the different cell lines (fig 2d). Interestingly, the

BMS749-induced cell death is 25% lower in the GFP-FADDdn expressing cells than wild type or β -galactosidase expressing cells. This indicates at least a partial involvement of the death receptor signalling in the rexinoid-induced cell death.

Activation of the intrinsic pathway is initiated by permeabilisation of the outer mitochondrial membrane resulting in a loss of transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) (Green and Kroemer, 2004). Indeed, rexinoids induces a loss of $\Delta\Psi_m$ as demonstrated by DioC6 staining (fig 3a) and the release of proapoptotic mitochondrial cytochrome c and Smac/Diablo in the cytoplasm 2 to 3 hours after rexinoid exposure (fig 3b). In order to validate the critical involvement of the intrinsic death pathway in rexinoid-induced apoptosis, we generated cells lines stably expressing Bcl-2 and GFP or only GFP from bicistronic vectors by nucleofection. Immunoblotting (fig 3c) and FACS analysis of GFP fluorescence (fig 3d) confirmed transgene expression. Notably, the sensitivity to rexinoids is dramatically reduced in Bcl-2 overexpressing cells compared to wild type or GFP expressing control cells, demonstrating a major contribution of mitochondrial-dependent apoptosis in rexinoid-induced cell death (fig 3c). That Z-VAD or caspase 8 and 10 inhibitors reduced rexinoid apoptosis (fig 1b) but did not inhibit cytochrome c release (fig 3f), indicated that the permeabilisation of the mitochondrial outer membrane is independent of prior caspase activation. Inhibition of caspase 3 but not caspase 9 resulted in inhibition of caspase 8 cleavage and argued for the presence of a caspase amplification loop. It suggests that activation of caspase 9 is not sufficient to induce rexinoid cell death and that the release of other pro-apoptotic protein such as smac/diablo is also required to activate caspase 3. Altogether, these data provide evidence for initiation of rexinoid apoptosis at the mitochondria and further expansion of apoptosis through amplification loop.

Rexinoid-induced nitric oxide (NO) production is required for apoptosis.

While we did not obtain evidence for an involvement of reactive oxygen species (ROS) or bcl-2 family members in rexinoid apoptosis (supplementary figure 1), we could detect production of NO in BMS749-treated PLB985 cells, which was strongly decreased by the pan NO synthase inhibitor L-NMMA (fig 4a). Interestingly, the kinetics of NO production correlated with that of cytochrome c release (fig 2b). In keeping with the observation that NO production induces the mitochondrial apoptosis pathway (Brune, 2003), L-NMMA decreased rexinoid apoptosis by 60% (fig 4c) and inhibited the cytochrome c release. That antioxidants such as GSH or L-NAC do not affect apoptosis or cytochrome c release (fig 4c, d) excluded the contribution of ROS. Together, these results support that rexinoid-induced NO mediates activation of the intrinsic death pathway.

IGF Receptor I activation antagonizes rexinoid-apoptosis.

That serum concentration progressively inhibited rexinoid apoptosis (figure 5a and (Benoit et al., 2001)) prompted us to investigate the contribution of growth factor signalling in this antagonism. Out a battery of growth factors and cytokines, only IGFI, IGFII or EGF reduced rexinoid apoptosis (fig 5b and data not shown). This antagonism involves the block of cytochrome c release revealing that the growth factors inhibit rexinoid apoptosis at an early stage (fig 5c). The absence of synergy between the 3 growth factors indicated that they act through the same mediator (fig 5b, compare lanes 3-5 and 6). Notably, TRAIL or etoposide-induced apoptosis was not rescued by these factors (fig 5d).

To determine which pathway is activated by the three growth factors, we analysed their signalling cascades in PLB985 cells. MEK1/2 inhibitors U0126 or PD98059 reversed EGF or IGF-mediated survival (fig 6a compare lanes 2-3 to 9 and data not shown) whereas p38 MAP kinase (SB) or PI3 kinase (LY) inhibitors were inefficient (fig 6a lanes 2-7). In

keeping with these results, addition of EGF to the culture medium induced a rapid and sustained phosphorylation of the MEK1/2 substrate p42/44 MAP kinase as shown by western blot analysis (fig 6b). The induction of p42/44 activity by IGFI, EGF but also FCS was confirmed by *in vitro* kinase assay with elk-1 as a substrate (fig 6c). Altogether, these results suggest that the MEK/p42/44 MAPK pathway is mediating the anti-apoptotic action of IGFs and EGF against rexinoid-induced cell death.

Although EGF supports survival and counteracts rexinoid apoptosis, we could not detect EGF receptor expression in PLB985 cells while IGF receptor I (IGF-RI) was rapidly detected (data not shown). Consistent with these results, inhibition of the tyrosine kinase activity of IGF-RI with AG1024 reversed IGFI as well as EGF-induced survival (fig 6d, lanes 1-5 and 8-9) whereas co-treatment with EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 is inefficient (fig 6d lanes 6 and 10). This suggests that IGFI and EGF both antagonized rexinoid-apoptosis through activation of IGFRI.

Most notably, the inhibition of rexinoid-induced cell death by the serum was also reversed specifically by the MEK1/2 inhibitor U0126 (fig 6e lane 1-5) and to a lower extent by the IGF-RI tyrosine kinase inhibitor AG1024 (fig 6e lanes 1-3 10-11) but not by AG1478, SB203580 or LY294002. This decrease of FCS, EGF or IGFI-mediated apoptosis by AG1024 or U0126 correlated with their ability to inhibit p42/44 kinase activation by the growth factors (figure 6f). Altogether, these results demonstrate that growth factors with IGFI-like activity are responsible for serum-induced inhibition of rexinoid apoptosis by activating IGF-RI and MEK1/2/p42/44 MAPK pathway.

Rexinoid-induced apoptosis is mediated by the RXR-PPAR γ heterodimer.

That the RAR α agonist did not induce (BMS753 in fig 1a) but rather inhibited while RAR antagonists increased rexinoid apoptosis (data not shown and Benoit) excluded

involvement of RAR-RXR heterodimer transactivation. In screening a panel of ligands for multiple permissive and non-permissive RXR heterodimer partners, we observed unexpectedly that the PPAR γ agonist troglitazone induced PLB985 cells apoptosis. Most importantly, this apoptosis occurred exactly under conditions where rexinoid induced apoptosis, i.e. when serum concentration is limiting (fig 7a lanes 1, 6, 7 and 11). Note that under identical conditions the cells do not respond to PPAR α (WY) or PPAR β (BMS990) agonists (fig 7a). RT-PCR and western blot analysis confirmed PPAR α , β and γ expression in these cells (data not shown). Most importantly, rexinoids and the PPAR γ agonists troglitazone (fig 7b) or 15d-PGJ2 (fig 7c) strongly synergized for apoptosis induction, supporting a specific involvement of RXR-PPAR γ heterodimers in rexinoid apoptosis.

In agreement with these results, the combination of troglitazone with the rexinoid SR11237 induced a similar profile of caspase activation (fig 7d) and cytochrome c release (fig 7e) as did rexinoids alone, suggesting a common mode of action. Indeed, overexpression of Bcl-2 equally decreased troglitazone/SR11237 and rexinoid-mediated apoptosis (fig 7f) and NO production was detected upon troglitazone/SR11237 exposure (fig 7g). Finally, EGF and IGFI treatment antagonized PPAR γ agonist and PPAR γ agonist/rexinoid mediated apoptosis (fig 7h). Altogether, these results reveal that the PPAR γ agonist/rexinoid combination induces apoptosis by activation of the same signalling pathways as by rexinoids, comforting the hypothesis that RXR-PPAR γ is the functional unit mediating the rexinoid signal.

DISCUSSION

Over the past few years, we have witnessed a rapid accumulation of knowledge on the molecular mechanisms underlying t(15;17) APL, the basis of the therapeutic success of

ATRA combined with chemotherapy and the failure in treating APL variants. While this is a major breakthrough, the large number of non-APL AML patients can not benefit from ATRA therapy. With the aim to uncover novel treatment paradigms, we have tested the potential of alternative rexinoid-based treatments and observed two signalling options which could be effective in AML therapy (Altucci, 2005; Benoit et al., 1999; Benoit et al., 2001). In addition, we and others have explored the use of epigenetic drugs for their antileukemic potential (Ferrara et al., 2001; Insinga et al., 2005; Nebbioso et al., 2005).

Although RXR has been for long considered as a silent partner of non-permissive nuclear receptors (Germain et al., 2002), we have reported that RXR can induce differentiation and/or apoptosis in leukemic cell systems. Rexinoid crosstalk with the PKA pathway can overcome ATRA resistance in APL cells (Benoit et al., 1999) and induces post-maturation apoptosis even in retinoid-insensitive AML cells (Altucci, 2005). The corresponding mechanism has been defined as RXR de-subordination within the RXR-RAR heterodimer which synergizes with additional cAMP-induced signalling (Altucci, 2005; Kamashev et al., 2004). Here we report on the mechanisms of a second entirely distinct signalling pathway of RXR which we termed “rexinoid apoptosis”. Rexinoids which are usually silent have the capacity to induce maturation-independent apoptosis in AML cells when signalling by certain growth factors is interrupted. The two RXR signalling pathways are entirely different because : (i) rexinoid apoptosis is not inhibited but rather increased by RAR antagonists, (ii) rexinoid apoptosis does not involve the RXR-RAR but the RXR-PPAR γ permissive heterodimer, (iii) rexinoid apoptosis does not require prior differentiation and (iv) apoptosis induction involves different apoptotic pathways.

The intrinsic death pathway has a predominant role in rexinoid apoptosis, which is supported by an early release of cytochrome c, a subsequent depolarisation of the mitochondrial membrane potential and the inhibitory role of bcl-2 overexpression in rexinoid-

induced cell death (figure 8). This apoptosis signalling is further enhanced by a caspase 3/ caspase 8/ Bid amplification loop and a late induction of DR5 overexpression. Notably, we have identified NO as an early mediator of rexinoid apoptosis. This is supported by the fact that the selective NO synthase inhibitor L-NMMA is dramatically decreasing rexinoid-induced NO production and apoptosis. NO was described to induce a MAPK-mediated phosphorylation and activation of p53 (Brune, 2003). It is possible that NO-mediated p53 activation is responsible for the observed induction of DR5, a known p53 target (Wu et al., 1997). It remains to be established how rexinoids, in absence of growth factor support, induce NO production and whether the transcriptional induction of iNOS can play a role. A number of mechanisms have been proposed to explain NO-mediated apoptosis through induction of the intrinsic pathway, one of them is based on ROS production as a critical event. We have excluded that ROS production is the cause of rexinoid cell death as antioxidant molecules do not modulate rexinoid apoptosis. It is possible that protein nitrosylation which leads to the opening of the mitochondrial transition pore or inhibition of cytochrome c oxidase play a critical role in NO-mediated apoptosis (Beltran et al., 2000; Halestrap et al., 1997; Moncada and Erusalimsky, 2002).

Growth factor removal is known to induce apoptosis and it has been shown that some receptors called “dependence receptor” transmit directly a signal to the apoptosis machinery (Mehlen and Bredesen, 2004). The IGFRI has not been reported to have the characteristics of a dependence receptor. Our results support an alternative mechanism in which a default apoptosis is triggered by ligands of RXR-PPAR γ heterodimers in absence of growth factor antagonism. Evidence for the existence of endogenous RXR or PPAR γ agonists has been reported (de Urquiza et al., 2000; Forman et al., 1995; Solomin et al., 1998). As classical knock-out are embryonic lethal (Barak et al., 1999; Sucov et al., 1994), future studies with RXR or PPAR γ conditional knock-out mice will be necessary to reveal the possible role of

retinoid apoptosis in developmental events such as control of compartment size or tissue remodelling.

Cell proliferation in body compartments is tightly controlled by hierarchical cell-cell communication involving factor signaling. Uncontrolled growth in the absence of supporting factors progressively leads to cancer. In this respect, retinoid apoptosis may correspond to an innate cancer preventive strategy. A number of observations support this hypothesis: (i) loss of function mutations in PPAR γ have been associated with colon cancer and could argue for a tumor suppressor function of PPAR γ (Sarraf et al., 1999); (ii) the discovery that the PAX8-PPAR γ fusion protein plays a critical role in thyroid follicular oncogenesis through a dominant negative function of PPAR γ has raised the possibility that abrogation of normal PPAR γ function may play a role in the development of cancer (Kroll et al., 2000); (iii) a PPAR γ agonist and a retinoid can synergistically prevent the development of chemically-induced preneoplastic mammary lesions in a mouse model of organ culture (Mehta et al., 2000) and (iv) retinoids and PPAR γ agonists have been reported to induce apoptosis in breast cancer, thyroid carcinoma, or multiple myeloma cells (Crowe and Chandraratna, 2004; Klopper et al., 2004; Ray et al., 2004).

Collectively, our results suggest that retinoids, alone or combined with PPAR γ agonists, may be powerful anti-cancer drugs which can act through several apoptogenic signalling paradigm. It will be interesting to see whether combination therapies with retinoids which have relatively low toxicity compared with retinoids and agents that increases intracellular cAMP (such as phosphodiesterase inhibitors) and/or inhibitors of the IGFRI signalling pathway can lead to improved AML therapy.

MATERIALS AND METHODS

Ligands, chemicals and antibodies. Retinoids, rexinoid and PPARs agonists were provided by Bristol-Myers-Squibb. BMS749 was dissolved in ethanol and used at 1 μ M unless specified. Caspases inhibitors (Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK, Z-AEVD-FMK, and Z-LEHD-FMK) as well as EGF, IGFI, IGFII, insulin, G-CSF, IL3, IL4, IL10, SCF and GM-CSF were purchased from R&D Systems. TRAIL was kindly provided by Immunex. The kinase inhibitors U0126, LY294002 come from Cell Signalling Technology whereas SB203580 and L-NMMA were from Calbiochem, and AG1024 and AG1478 from Alexis biochemicals. Antibodies directed against caspase 3, caspase 8 caspase 9, PARP, Bid, Bcl-2, EGFR, total and phospho IGFR, Akt, p42/44 and p38, were purchased from Cell Signalling technology. Anti-cytochrome c and anti-FADD antibodies were from BD Bioscience, anti-DR5 from Sigma and anti-TRAIL from R&D Systems. The Apo2.7 antibody was purchased from Beckman Coulter and DIOC6 and DAF-FM diacetate from molecular probe.

Cell culture, infection and transfection. PLB985 were adapted to culture conditions with minimal serum addition in the synthetic media. To this purpose, cells were cultured in RPMI, 1% fetal calf serum, complemented with 1% HY (Biosepra), 100 U/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin, 10mM HEPES and 2mM glutamine. Stable PLB985 cell lines were obtained as followed: PLB985 cells were transfected by pIRES GFP and pIRES-Bcl2 GFP via nucleofection using the Amaxa technology and selected for transfection by 0.8 mg/ml G418 on the entire population. The GFP-FADDdn was cloned into the pLenti6/v5 lentiviral vector (Invitrogen) following the manufacturers' instructions. The Virapower lentiviral expression system (Invitrogen) was used to produce lentivirus coding for GFP-FADDdn or β -galactosidase protein following the provided instructions using the pLenti/GFP-FADDdn/v5 and pLenti/LacZ constructs. Once collected, the lentivirus was concentrated by

ultracentrifugation (25,000 rpm, 90 min, 4°C). 3×10^5 PLB985 cells were infected with 2.10^6 IU/ml of virus at an MOI of 20:1 and selected for stable integration with 10mg/ml blasticidin.

Flow cytometry. PLB985 cells apoptosis was quantified by detection of the 7A6 mitochondrial antigen (which is selectively exposed in cells undergoing apoptosis) using the Apo2.7 antibody. 2.10^5 cells were permeabilized for 20 min with 100 ml of cold (4°C) solution of 100µg/ml digitonin(Sigma) in PBS, washed with cold PBS, incubated for 15 min in the dark with 30 ml of a 1/5 dilution of APO2.7 PE conjugated antibody in PBS, and analysed by flow cytometry. An isotypic IgG1-PE antibody was used as non-specific control. For quantification of sub-G1 fraction, the cells were resuspended in 500 µl hypotonic buffer (0.1% Triton X100, 0.1% sodium citrate, 50 µg/ml PI), incubated in dark over night at 4°C and subjected to FACScan analysis. Mitochondrial membrane potential was assayed by incubating 2.5×10^5 cells with 50 nM DiOC6(3) for 30 min in the dark and subsequent examination by flow cytometry. Nitric Oxide production was quantified using the selective DAF-FM diacetate probe. Briefly, 2.5×10^5 cells were incubated for 30 min at 37 °C with 5µM DAF-FM diacetate, washed in PBS and reincubated for 15 min at 37°C prior FACScan analysis with FL2 channel.

RNase Protection Assay. Total RNA was extracted with Trizol (Invitrogen-Gibco BRL, Carlsbad, CA) and RNase protection assays were performed according to the supplier's instructions (Pharmingen, San Diego, CA). Briefly, 4µg total RNA and $6-8 \times 10^5$ cpm of α -[33 P]-uridine triphosphate-labelled template sets were used; after RNase treatment protected probes were resolved on 5% urea-polyacrylamide-bis-acrylamide gels.

Western blot Total cellular protein was prepared using high salt lysis buffer (420 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,3% NP-40, 1 mM DTT, 20 µg/ml

leupeptin, 10 µg/ml pepstatin, 10 µg/ml aproptinin, 1 mM PMSF and 0,25µM okadaic acid). 50µg proteins were separated by SDS acrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and probed by antibodies as indicated. The mitochondrial/cytoplasmic fractionated protein extraction was done as described (Adrain et al., 2001). Briefly, 10⁷ cells were permeabilised in 300µl of 200µg/ml digitonin buffer (250mM sucrose, 70mM KCl, 137 mM NaCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, 100µM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aproptinin) for 5 min at 4°C. Cells were centrifuged at 1000g for 5 min, the supernatant representing the cytosolic fraction. The pellet was solubilized in 300 µl mitochondrial lysis buffer (50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 0.2% triton X-100, 0.3% NP-40, 100µM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aproptinin) for 30min at 4°C and centrifuge at 10000g for 10min. The supernatant is the mitochondrial fraction. 25µl of each extract was used for western blot.

p42/44 MAP Kinase assay. p42/44 activity assay was measured in vitro, using the non-radioactive p42/44 MAP Kinase Assay Kit (Cell Signalling Technology) according to the manufacturer's protocol. Briefly, 200 µg of cell extract were immunoprecipitated with immobilized Phospho-p42/44 antibodies. The resulting immunoprecipitate is incubated with a Elk-1 fusion protein in the presence of ATP. Phosphorylation of Elk-1 is then verified by western blot analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are particularly grateful to Michèle Lieb for excellent technical support. We thank Jean-Marie Garnier for lentiviral vector cloning, Harald Wajant for providing the FADDdn construct, Yvon Cayre for the PLB985 cells and Bristol-Myers Squibb for synthetic retinoids.

AR was supported by a MRT fellowship. This work was supported by funds from the Association for International Cancer Research (AICR 00-108), the Association pour le Recherche sur le Cancer, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Hôpital Universitaire de Strasbourg, and the European Community (HPRN-CT2002-00268, QLG1-CT2000-01935, QLK3-CT2002-02029).

REFERENCES

- Adrain, C., Creagh, E. M., and Martin, S. J. (2001). Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *Embo J* 20, 6627-6636.
- Altucci, L., and Gronemeyer, H. (2001). The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 181-193.
- Altucci, L., Rossin, A., Raffelsberger, W., Reitmair, A., Chomienne, C., and Gronemeyer, H. (2001). Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. *Nat Med* 7, 680-686.
- Altucci, L., Rossin, A., Hirsch, O., Nebbioso, A., Wilhelm, E., Guidez, F., Schiavone, EM., Grimwade, D., Zelent, A., and Gronemeyer, H. (2005). Protein kinase A-mediated de-subordination of RXR in retinoid-insensitive leukemic blasts enables retinoid-induced differentiation and apoptosis by activating tumor-selective death signaling. Submitted.
- Barak, Y., Nelson, M. C., Ong, E. S., Jones, Y. Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K. R., Koder, A., and Evans, R. M. (1999). PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4, 585-595.
- Bastien, J., and Rochette-Egly, C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328, 1-16.
- Beltran, B., Mathur, A., Duchon, M. R., Erusalimsky, J. D., and Moncada, S. (2000). The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14602-14607.
- Benoit, G., Altucci, L., Flexor, M., Ruchaud, S., Lillehaug, J., Raffelsberger, W., Gronemeyer, H., and Lanotte, M. (1999). RAR-independent RXR signaling induces t(15;17) leukemia cell maturation. *Embo J* 18, 7011-7018.
- Benoit, G. R., Flexor, M., Besancon, F., Altucci, L., Rossin, A., Hillion, J., Balajthy, Z., Legres, L., Segal-Bendirdjian, E., Gronemeyer, H., and Lanotte, M. (2001). Autonomous retinoid death signaling is suppressed by converging signaling pathways in immature leukemia cells. *Mol Endocrinol* 15, 1154-1169.

- Brune, B. (2003). Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? *Cell Death Differ* 10, 864-869.
- Chen, J. Y., Clifford, J., Zusi, C., Starrett, J., Tortolani, D., Ostrowski, J., Reczek, P. R., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1996). Two distinct actions of retinoid-receptor ligands. *Nature* 382, 819-822.
- Clarke, N., Germain, P., Altucci, L., and Gronemeyer, H. (2004). Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. *Expert Rev Mol Med* 6, 1-23.
- Crowe, D. L., and Chandraratna, R. A. (2004). A retinoid X receptor (RXR)-selective retinoid reveals that RXR-alpha is potentially a therapeutic target in breast cancer cell lines, and that it potentiates antiproliferative and apoptotic responses to peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Breast Cancer Res* 6, R546-555.
- de The, H., and Chelbi-Alix, M. K. (2001). APL, a model disease for cancer therapies? *Oncogene* 20, 7136-7139.
- de Urquiza, A. M., Liu, S., Sjoberg, M., Zetterstrom, R. H., Griffiths, W., Sjovall, J., and Perlmann, T. (2000). Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290, 2140-2144.
- Debatin, K. M. (2004). Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 53, 153-159.
- Degos, L., and Wang, Z. Y. (2001). All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 20, 7140-7145.
- Di Croce, L., Raker, V. A., Corsaro, M., Fazi, F., Fanelli, M., Faretta, M., Fuks, F., Lo Coco, F., Kouzarides, T., Nervi, C., *et al.* (2002). Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 295, 1079-1082.
- Ferrara, F. F., Fazi, F., Bianchini, A., Padula, F., Gelmetti, V., Minucci, S., Mancini, M., Pelicci, P. G., Lo Coco, F., and Nervi, C. (2001). Histone deacetylase-targeted treatment restores retinoic acid signaling and differentiation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 61, 2-7.
- Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M., and Evans, R. M. (1995). 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83, 803-812.
- Germain, P., Iyer, J., Zechel, C., and Gronemeyer, H. (2002). Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy. *Nature* 415, 187-192.
- Gottardis, M. M., Bischoff, E. D., Shirley, M. A., Wagoner, M. A., Lamph, W. W., and Heyman, R. A. (1996). Chemoprevention of mammary carcinoma by LGD1069 (Targretin): an RXR-selective ligand. *Cancer Res* 56, 5566-5570.
- Green, D. R., and Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629.

- Grignani, F., De Matteis, S., Nervi, C., Tomassoni, L., Gelmetti, V., Cioce, M., Fanelli, M., Ruthardt, M., Ferrara, F. F., Zamir, I., *et al.* (1998). Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* 391, 815-818.
- Gronemeyer, H., Gustafsson, J. A., and Laudet, V. (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3, 950-964.
- Halestrap, A. P., Woodfield, K. Y., and Connern, C. P. (1997). Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem* 272, 3346-3354.
- Insinga, A., Monestiroli, S., Ronzoni, S., Carbone, R., Pearson, M., Prunerì, G., Viale, G., Appella, E., Pelicci, P., and Minucci, S. (2004). Impairment of p53 acetylation, stability and function by an oncogenic transcription factor. *Embo J* 23, 1144-1154.
- Insinga, A., Monestiroli, S., Ronzoni, S., Gelmetti, V., Marchesi, F., Viale, A., Altucci, L., Nervi, C., Minucci, S., and Pelicci, P. G. (2005). Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med* 11, 71-76.
- Kamashev, D., Vitoux, D., and De The, H. (2004). PML-RARA-RXR oligomers mediate retinoid and rexinoid/cAMP cross-talk in acute promyelocytic leukemia cell differentiation. *J Exp Med* 199, 1163-1174.
- Klopper, J. P., Hays, W. R., Sharma, V., Baumbusch, M. A., Hershman, J. M., and Haugen, B. R. (2004). Retinoid X receptor-gamma and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression predicts thyroid carcinoma cell response to retinoid and thiazolidinedione treatment. *Mol Cancer Ther* 3, 1011-1020.
- Kroll, T. G., Sarraf, P., Pecciarini, L., Chen, C. J., Mueller, E., Spiegelman, B. M., and Fletcher, J. A. (2000). PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* 289, 1357-1360.
- Laudet, V., and Gronemeyer, H. (2002). *The Nuclear receptor Facts Book* (San Diego, Academic Press).
- Lin, R. J., Nagy, L., Inoue, S., Shao, W., Miller, W. H., Jr., and Evans, R. M. (1998). Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* 391, 811-814.
- Lowenberg, B., Downing, J. R., and Burnett, A. (1999). Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 341, 1051-1062.
- Mehlen, P., and Bredesen, D. E. (2004). The dependence receptor hypothesis. *Apoptosis* 9, 37-49.
- Mehta, R. G., Williamson, E., Patel, M. K., and Koeffler, H. P. (2000). A ligand of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, retinoids, and prevention of preneoplastic mammary lesions. *J Natl Cancer Inst* 92, 418-423.

- Minucci, S., Nervi, C., Lo Coco, F., and Pelicci, P. G. (2001). Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias? *Oncogene* 20, 3110-3115.
- Mistry, A. R., Pedersen, E. W., Solomon, E., and Grimwade, D. (2003). The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Rev* 17, 71-97.
- Moncada, S., and Erusalimsky, J. D. (2002). Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 214-220.
- Nebbioso, A., Clarke, N., Voltz, E., Germain, E., Ambrosino, C., Bontempo, P., Alvarez, R., Schiavone, E. M., Ferrara, F., Bresciani, F., *et al.* (2005). Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat Med* 11, 77-84.
- Ray, D. M., Bernstein, S. H., and Phipps, R. P. (2004). Human multiple myeloma cells express peroxisome proliferator-activated receptor gamma and undergo apoptosis upon exposure to PPARgamma ligands. *Clin Immunol* 113, 203-213.
- Rigas, J. R., and Dragnev, K. H. (2005). Emerging role of rexinoids in non-small cell lung cancer: focus on bexarotene. *Oncologist* 10, 22-33.
- Sarraf, P., Mueller, E., Smith, W. M., Wright, H. M., Kum, J. B., Aaltonen, L. A., de la Chapelle, A., Spiegelman, B. M., and Eng, C. (1999). Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer. *Mol Cell* 3, 799-804.
- Solomin, L., Johansson, C. B., Zetterstrom, R. H., Bissonnette, R. P., Heyman, R. A., Olson, L., Lendahl, U., Frisen, J., and Perlmann, T. (1998). Retinoid-X receptor signalling in the developing spinal cord. *Nature* 395, 398-402.
- Sporn, M. B., Roberts, A. B., and Goodman, D. S. (1994). *The retinoids: Biology, chemistry and medicine* (New York, Raven Press).
- Sporn, M. B., and Suh, N. (2002). Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 537-543.
- Sucov, H. M., Dyson, E., Gumeringer, C. L., Price, J., Chien, K. R., and Evans, R. M. (1994). RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev* 8, 1007-1018.
- Sun, S. Y., and Lotan, R. (2002). Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol* 41, 41-55.
- Szanto, A., Narkar, V., Shen, Q., Uray, I. P., Davies, P. J., and Nagy, L. (2004). Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ* 11 Suppl 2, S126-143.
- Villa, R., De Santis, F., Gutierrez, A., Minucci, S., Pelicci, P. G., and Di Croce, L. (2004). Epigenetic gene silencing in acute promyelocytic leukemia. *Biochem Pharmacol* 68, 1247-1254.

Wang, Z., Sun, G., Shen, Z., Chen, S., and Chen, Z. (1999). Differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid: 10-year experience of its clinical application. *Chin Med J (Engl)* *112*, 963-967.

Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., Kao, G., Gan, D. D., Zhou, J. Y., Muschel, R., *et al.* (1997). KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet* *17*, 141-143.

Zhang, C., and Duvic, M. (2003). Retinoids: therapeutic applications and mechanisms of action in cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatol Ther* *16*, 322-330.

Zhu, J., Zhou, J., Peres, L., Riaucoux, F., Honore, N., Kogan, S., and de The, H. (2005). A sumoylation site in PML/RARA is essential for leukemic transformation. *Cancer Cell* *7*, 143-153.

FIGURE LEGEND

Figure 1. The rexinoid BMS749 induces PLB985 cells apoptosis via a caspase-dependent process. **a**, BMS749 induces a dose-dependent apoptosis while the RAR α agonist BMS753 has no effect. The cells were treated for 24 hours with the 2 ligands at the indicated concentration and assayed for apoptosis by apo2.7 staining. On the right panel, FACScan analysis of Apo2.7 staining. **b**, Caspase inhibitors reduces BMS749-induced apoptosis. The PLB985 cells were pretreated for 2 hours with 100 μ M Z-VAD-FMK (pan inhibitor), Z-IETD-FMK (caspase 8 inhibitor), Z-AEVD-FMK (caspase 10 inhibitor), Z-LEHD-FMK (caspase 9 inhibitor) or a combination of them prior addition of BMS749. After 48 hours of treatment, the sub-G1 fractions representing apoptotic bodies were analysed by PI staining and FACS analysis. **c**, The rexinoid treatment induces the cleavage of caspase-3, -9, -8, PARP and Bid as revealed by western blot experiments. The PLB985 cells were treated with BMS749 and collected at the indicated time for protein extraction. The full length (FL) or cleaved fragments are indicated.

Figure 2. The death receptor pathway contributes partially to rexinoid-induced apoptosis. **a**, Western blot analysis of TRAIL and DR5 protein expression. The PLB985 cells were treated

for the indicated time with BMS749. The non-specific band (NS) confirms equal loading. **b**, **c**, PLB985 cell lines stably expressing a GFP-tagged dominant negative FADD (GFP-FADDdn) fusion protein or a β -galactosidase protein (LacZ) were generated by lentivirus-mediated infection of the PLB985 wild type (WT) cells. The expression of the fusion protein was verified by western blot in **c** or by GFP fluorescence using FACS analysis in **b**. **d**, PLB985 cells expressing the GFP-FADDdn protein are less sensitive to rexinoid-induced apoptosis. WT, Lac Z or GFP-FADDdn PLB985 cells were treated for 24 hours with BMS749. TRAIL treatment (20ng/ml) was used as positive control for FADD dominant negative effect. Staurosporine (STS, 100nM) and CCCP (2 μ M) are targeting the mitochondrial apoptotic pathway and were used as negative control.

Figure 3. Crucial role of the mitochondrial death pathway in rexinoid-induced PLB985 cells death. **a**, BMS749 induces loss of mitochondrial transmembrane potential. The PLB985 cells were treated for 24 hours with 1 μ M BMS749 or with 20ng/ml of TRAIL as positive control, stained with DiOC6 and analysed by flow cytometry. **b**, Western blot analysis of cytochrome c and Smac/Diablo release from the mitochondria to the cytoplasm. The cells were treated with BMS749 or TRAIL (20ng/ml) as positive control (+) and were collected at the indicated time for mitochondrial and cytoplasmic protein extraction. **c**, **d**, PLB985 cells were stably transfected with pIRES EGFP or pIRES Bcl-2 EGFP vectors by using nucleofection technology. Western blot of bcl-2 (**c**) and GFP detection by FACS analysis (**d**) confirmed the expression of the transgene. **e**, Bcl-2 overexpression decreases rexinoid-induced apoptosis. WT, pIRES or pIRES Bcl-2 GFP expressing cells were exposed to BMS749 at the indicated concentration for 30 hours and assessed for apoptosis by Apo2.7 detection. **f**, Cytochrome c release acts upstream of caspase activation as assessed by western blot analysis of cytochrome

c release and caspase 8 clivage. PLB985 cells were pretreated for 2 hours with 100 μ M of the indicated caspase inhibitors and then exposed for 4 hours to BMS749 prior protein extraction.

Figure 4. Nitric oxide (NO) production is required for rexinoid-induced apoptosis. **a**, FACScan analysis revealing the production of NO. The cells were pre-treated or not with 500 μ M of the pan NO synthase inhibitor L-NMMA, then exposed for 2 hours to BMS749 and prepared for flow cytometry. **b**, Time course of NO production in PLB985 cells treated with BMS749 and detected by FACScan analysis. **c**, The pan NO Synthase inhibitor decreases rexinoid-induced apoptosis. PLB985 cells were pre-treated for 2 hours with L-NMMA (200 and 500 μ M) and 2 antioxidant GSH (reduced glutathione at 1 and 5 mM) and L-NAC (N-Acetyl cysteine at 1 and 5 mM) prior exposition to BMS749 for 24 hours. The apoptosis was assessed by FACScan detection using Apo2.7 antibody labelling. **d**, NO production induces cytochrome c release as demonstrated by this western blot analysis of cytochrome c release. PLB985 cells were pre-treated for 2 hours with L-NMMA (200 and 500 μ M), or with 2mM of GSH or L-NAC. BMS749 was added to the culture for 4 hours before collecting the cells for fractionated protein extraction.

Figure 5. IGF1, IGFII and EGF rescue PLB985 cells from rexinoid-induced apoptosis. **a** Serum factors inhibit rexinoid-induced cell death. The cells were treated for 24 hours with BMS749 and increasing amount of serum and assayed for apoptosis by Apo2.7 detection. **b**, PLB985 cells were co-treated with BMS749 and 1 μ g/ml of several growth factors as indicated. After 48 hours, the cells were submitted to apoptosis detection by FACScan analysis of Apo2.7 labelling. **c**, EGF and IGF1 inhibit apoptosis by blocking cytochrome c release, as revealing by western blot. PLB985 cells were pre-treated for 2 hours with EGF and IGF1 and exposed for 4 hours to BMS749. **d**, PLB985 cells were treated with 20ng/ml TRAIL or 2 μ M

etoposide. Addition of the 3 indicated growth factors does not inhibit apoptosis as assessed by APO2.7 labelling and FACScan detection.

Figure 6. p42/44 MAP Kinase pathway mediates the survival signal counteracting rexinoid apoptosis through IGF-RI activation. **a**, MEK-1/2 inhibition reverses EGF induced survival. PLB985 cells were pre-treated for 2 hours with 10 μ M SB203580 (p38 inhibitor), 10 μ M LY294002 (PI3 Kinase inhibitor) and 5 μ M U0126 (MEK inhibitor). The cells were then exposed or not to a combination of BMS749 and EGF and assessed for apoptosis by Apo2.7 detection after 24 hours of treatment. **b**, Kinetics of p42/44 phosphorylation under EGF exposure as assessed by western blot. **c**, In vitro kinase assay of p42/44 activity performed with PLB985 cell extracts treated or not for 1 hour with IGFI, EGF or 10% FCS. Elk-1 is used as p42/44 target. **d**, PLB985 were pre-treated with 2 tyrosine kinase inhibitors, the tyrphostin AG1024 which inhibits the IGFRI and the tyrphostin AG1048 which inhibits the EGFR. The cells were then exposed to BMS749 in combination or not with EGF or IGFI and submitted to apoptosis detection by Apo2;7 staining. **e**, The FCS-mediated survival is also triggered via IGFRI and p42/44 activation. PLB 985 cells were first pre-treated for 2 hours with 10 μ M U0126, 10 μ M LY294002, 10 μ M SB203580 and 2 μ M of the tyrphostins AG1024 and AG1478. The cells were then exposed for 48 hours to BMS749 combined or not with 10% FCS and apoptosis was detected by FACScan detection of Apo2.7 antibody. **d**, p42/44 kinase activity assay performed on protein extract of PLB985 cells exposed to the indicated treatments. U0126 was used at 5 μ M and AG1024 at 2 μ M.

Figure 7. PPAR γ agonists induce PLB985 cells apoptosis and synergize with rexinoid. **a**, PLB985 cells cultured in 1 or 10% FCS were treated for 24 hours with the indicated concentration of PPAR agonists. WY-14643 is agonist for PPAR α , BMS990 for PPAR β and

troglitazone (TZD) for PPAR γ . Apoptosis was detected by Apo2.7 staining. **b,c**, PLB985 were exposed to 4 different rexinoids : BMS649 (1 μ M), 9-cisRA (1 μ M), LG1069 (1 μ M), and BMS749 (0.5 μ M), in combination with the synthetic PPAR γ agonist troglitazone (b) or the natural PPAR γ agonist 15d prostaglandine J2 (c). Apoptosis assessed by FACScan detection of Apo2.7 staining demonstrates a synergistic action of PPAR γ and RXR agonists. **d**, Western blot analysis of troglitazone (5 μ M) and BMS649 (1 μ M) treated PLB985 cells extracts reveals specific cleavage of caspase 3, 8,9 and PARP, as well as decrease of Bid expression. **e**, Western blot analysis of cytochrome c release using fractionated protein extracts of PLB985 cells treated as in (a). **f**, Bcl-2 overexpression reduces PPAR γ /rexinoid-induced cell death. PLB985 cells stably expressing pIRES or pIRES-Bcl-2 GFP were treated for 24 hours with 5 μ M troglitazone/1 μ M BMS649 and 100nM staurosporine (STS) as positive control. The cells were then submitted to apoptosis detection using A po2.7 staining. **g**, FACS analysis of Nitric Oxide production assessed on PLB985 cells treated for 2 hours with BMS649, troglitazone or both of them. **h**, EGF, IGFI or FCS treatment reduces PPAR γ and PPAR γ /rexinoid-induced cell death. PLB985 were co-treated for 24 hours with the indicated ligands in the presence or not of IGFI, EGF or 10% FCS. Troglitazone was used at 5 μ M, BMS649 at 1 μ M and 15d-PGJ2 at 2 μ M. The cells were then assayed for apoptosis by FACScan detection of Apo2.7 staining.

Figure 8. Schematic representation of RXR-PPAR γ -mediated apoptosis in AML cells. The activation of RXR-PPAR γ heterodimer by RXR or PPAR γ agonists induces NO production which in turn affects mitochondria integrity and triggers cytochrome c release. This step can be inhibited by bcl-2 overexpression. The activation of intrinsic pathway leads to caspase 3 clivage and the initiation of an amplification loop through caspase 8 and bid clivage. A late overexpression of DR5 which could be attributed to a NO/p53 mediated transactivation

increases this caspase 8 activation and can be blocked by a dominant negative form of FADD. IGF-I like growth factors, through their binding to IGFRI activate an antagonizing MEK1/2/p42/44 survival pathway which could inhibit rexinoid apoptosis at several different steps going from initiation of transcription by the heterodimer to activation of intrinsic pathway.

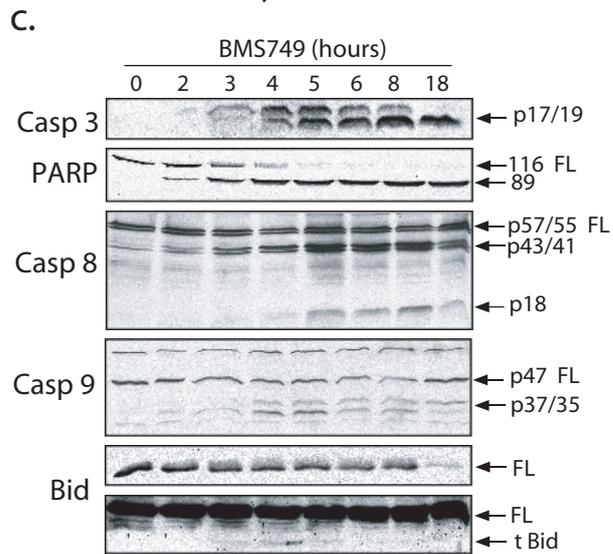
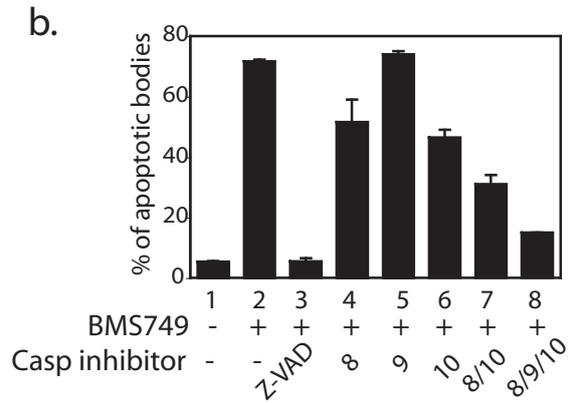
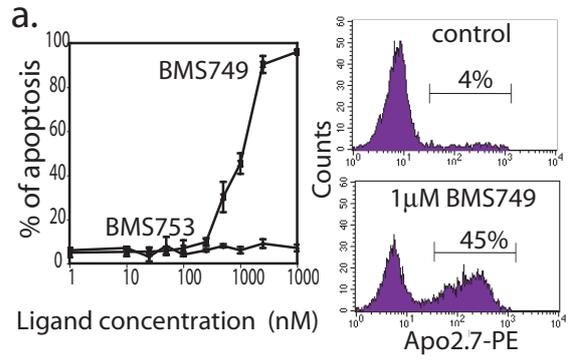


Figure 1

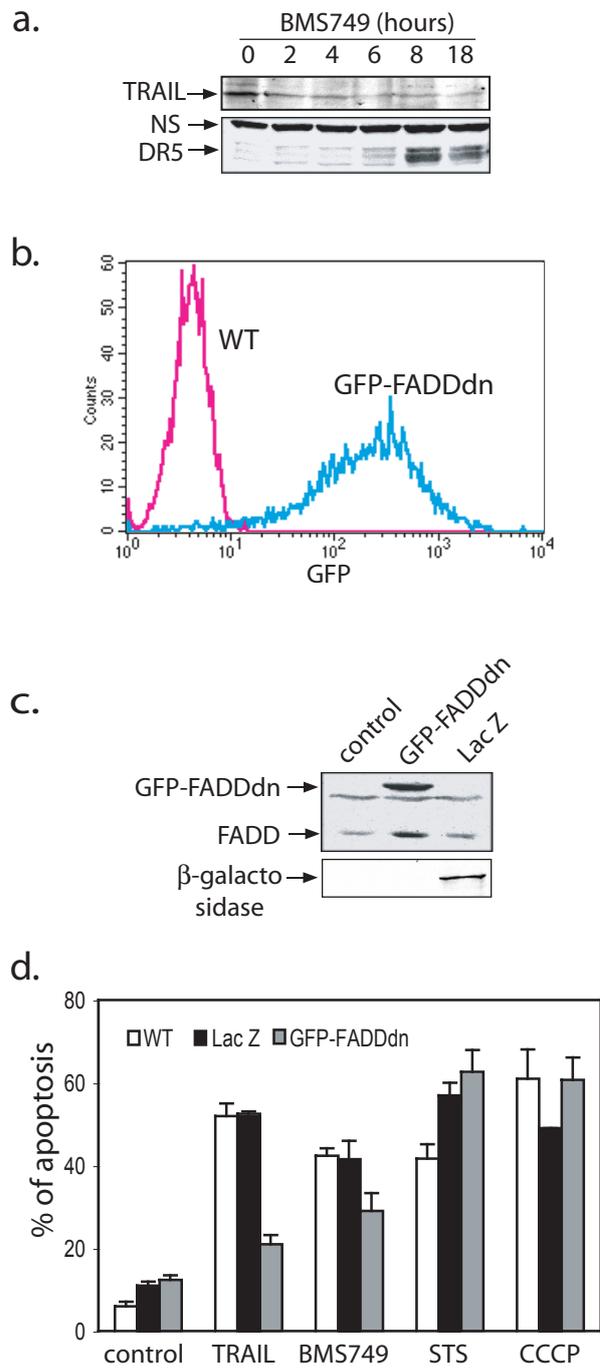


Figure 2

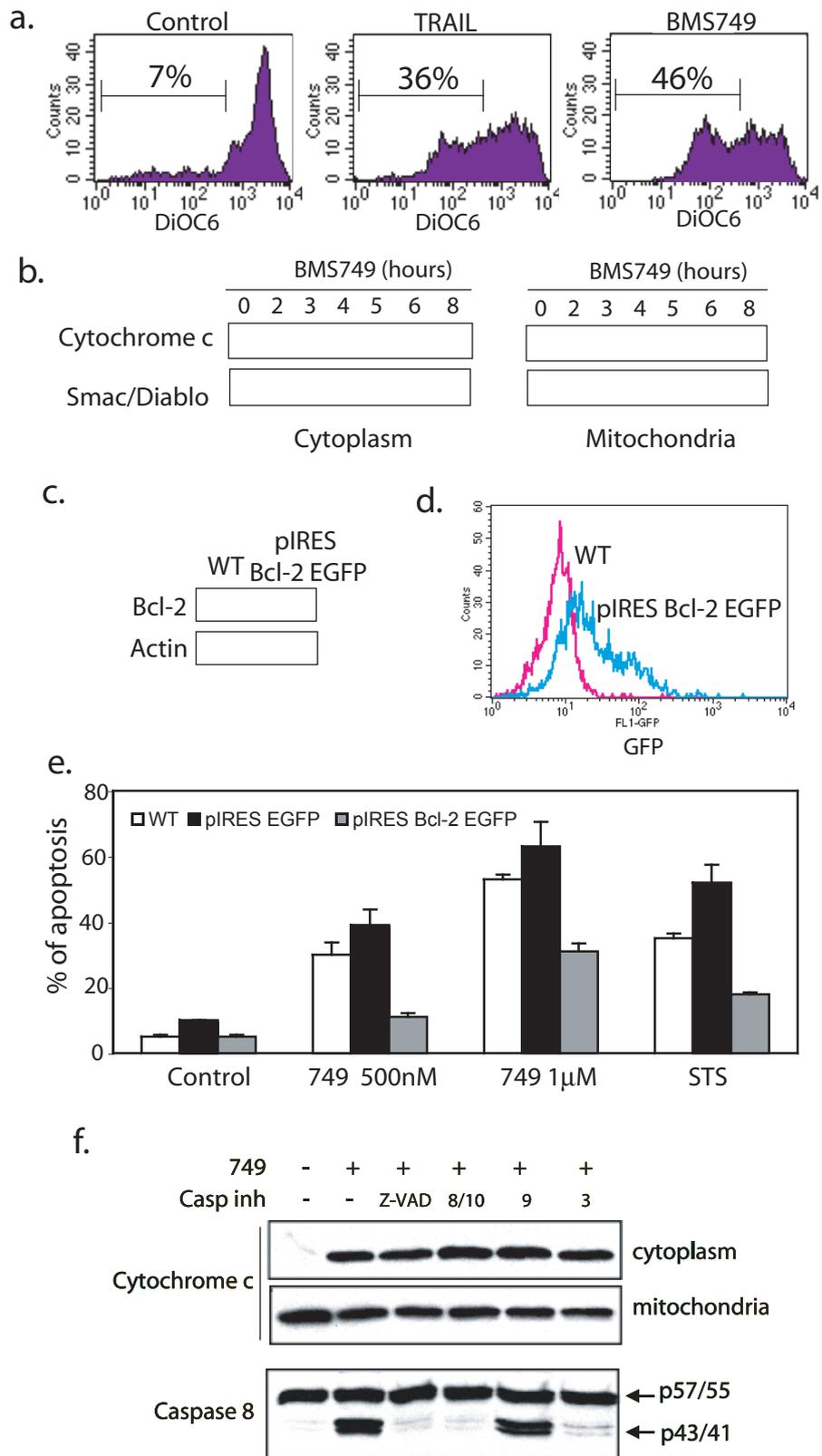


Figure 3

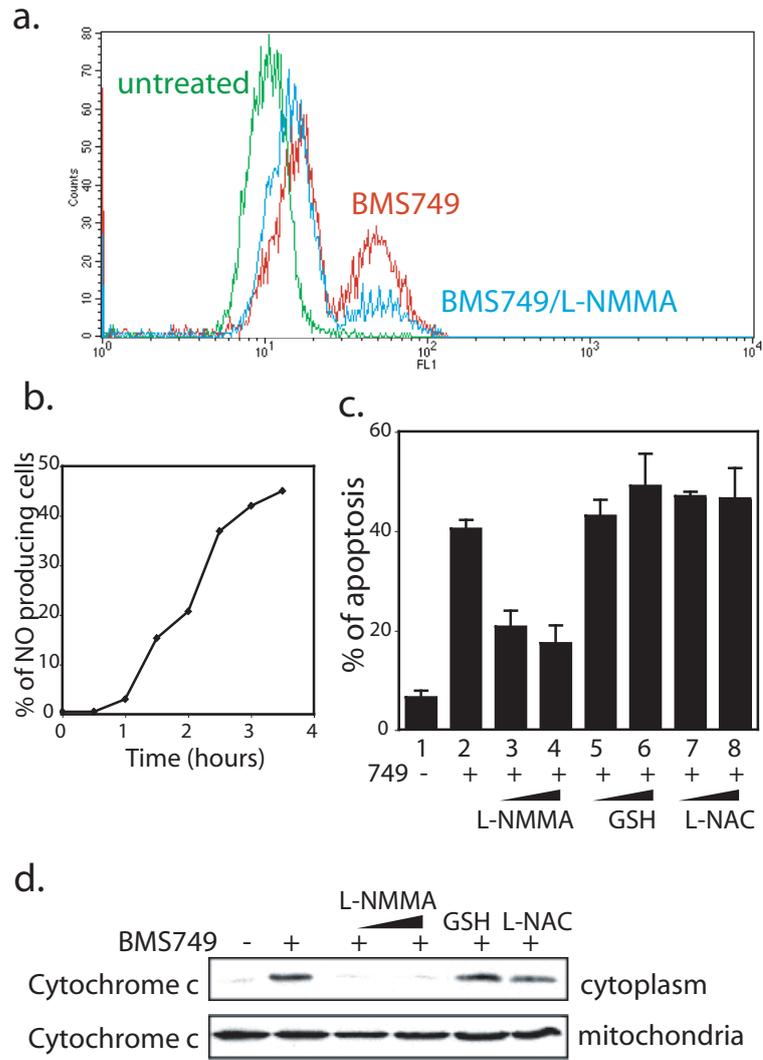


Figure 4

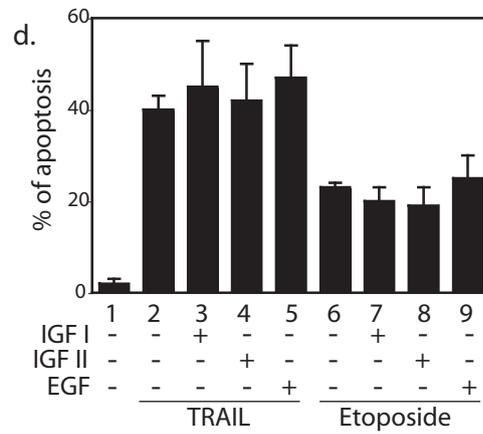
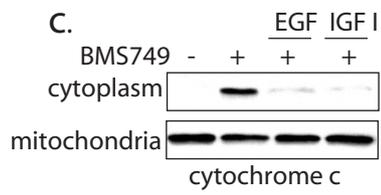
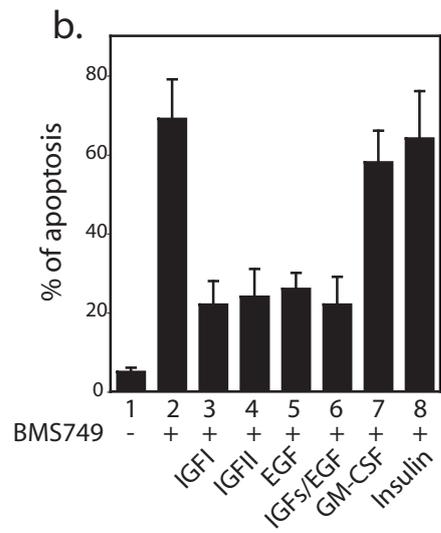
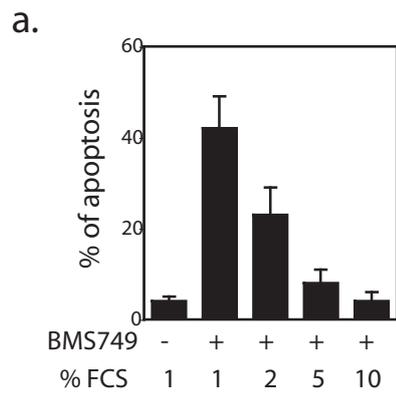


Figure 5

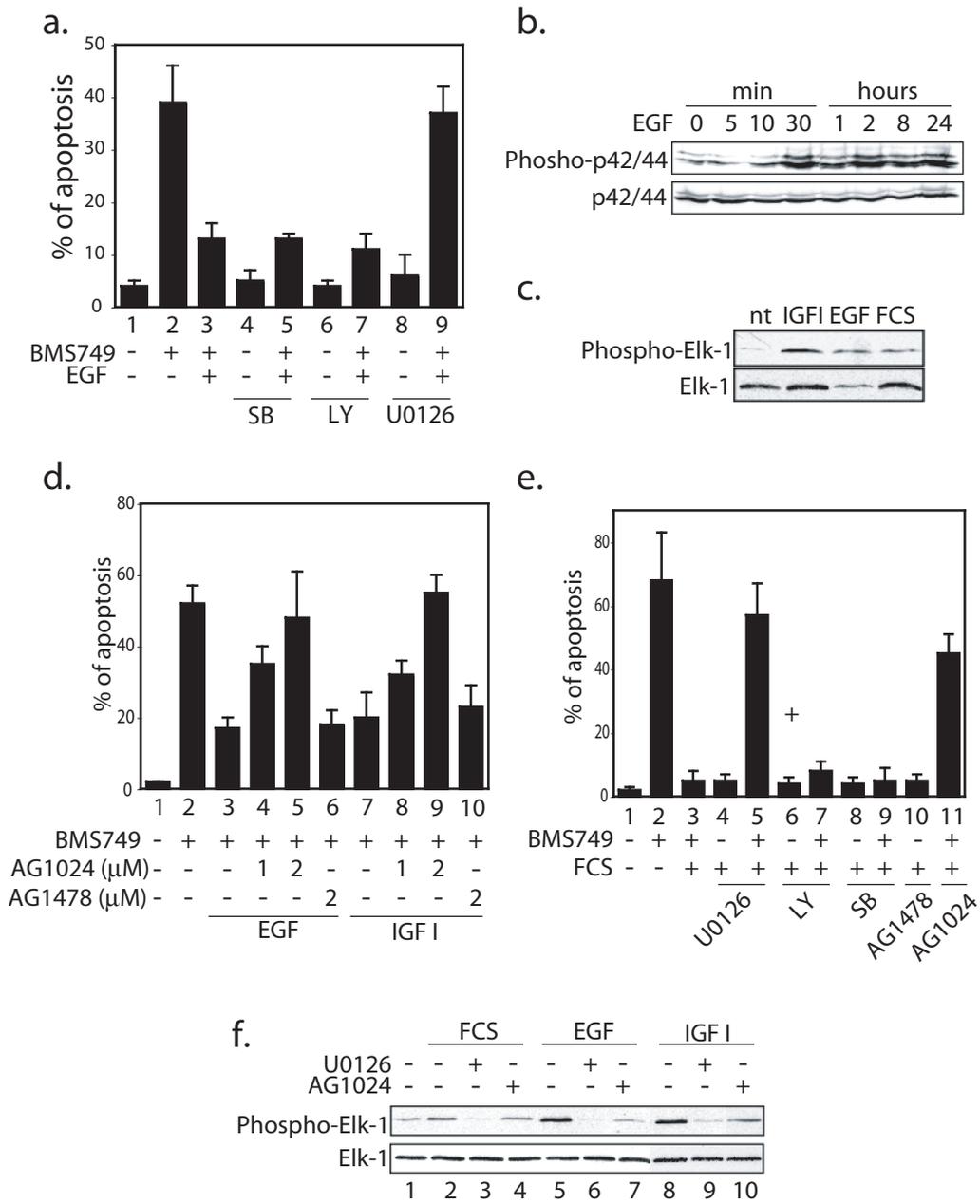


Figure 6

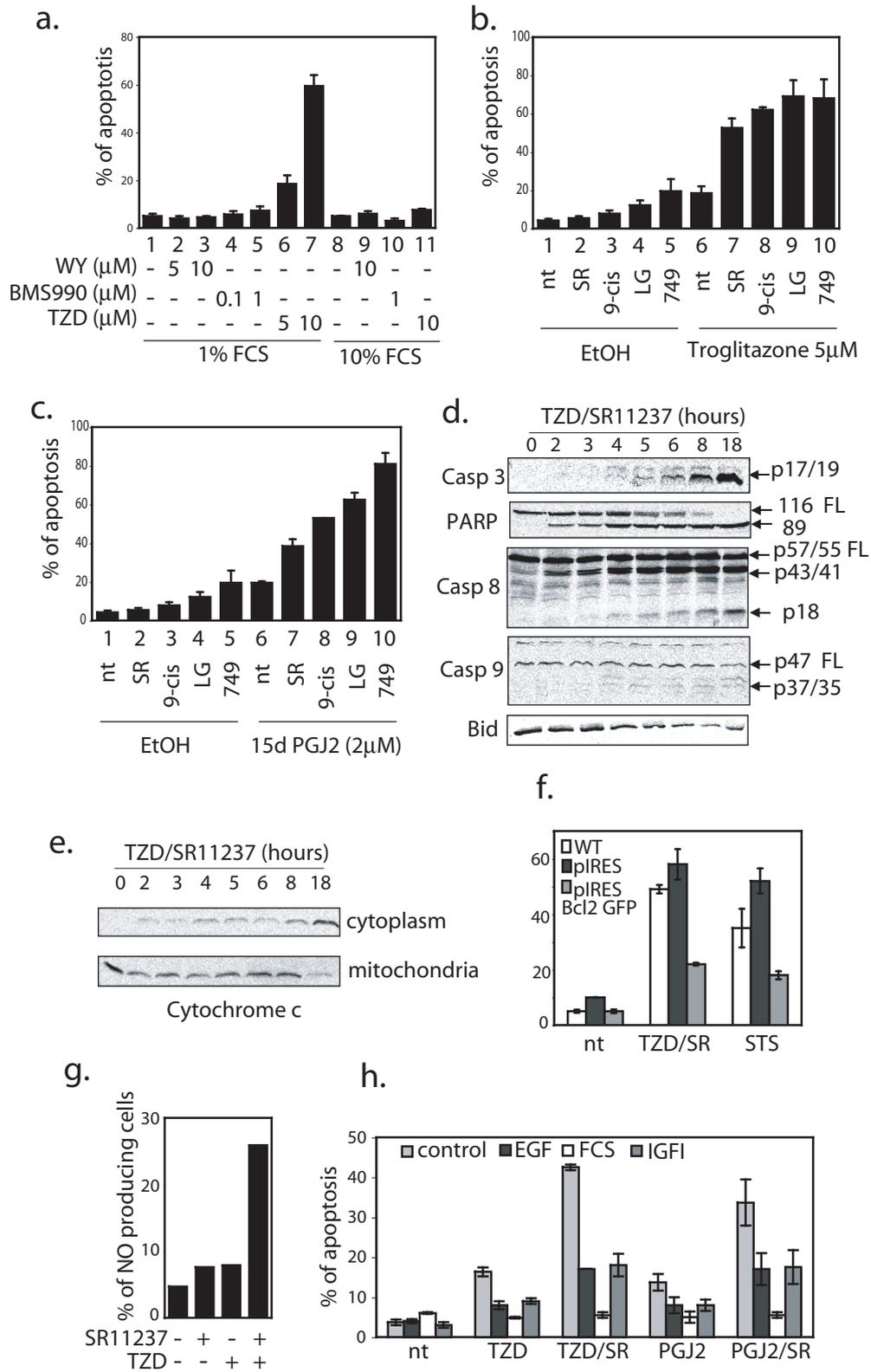


Figure 7

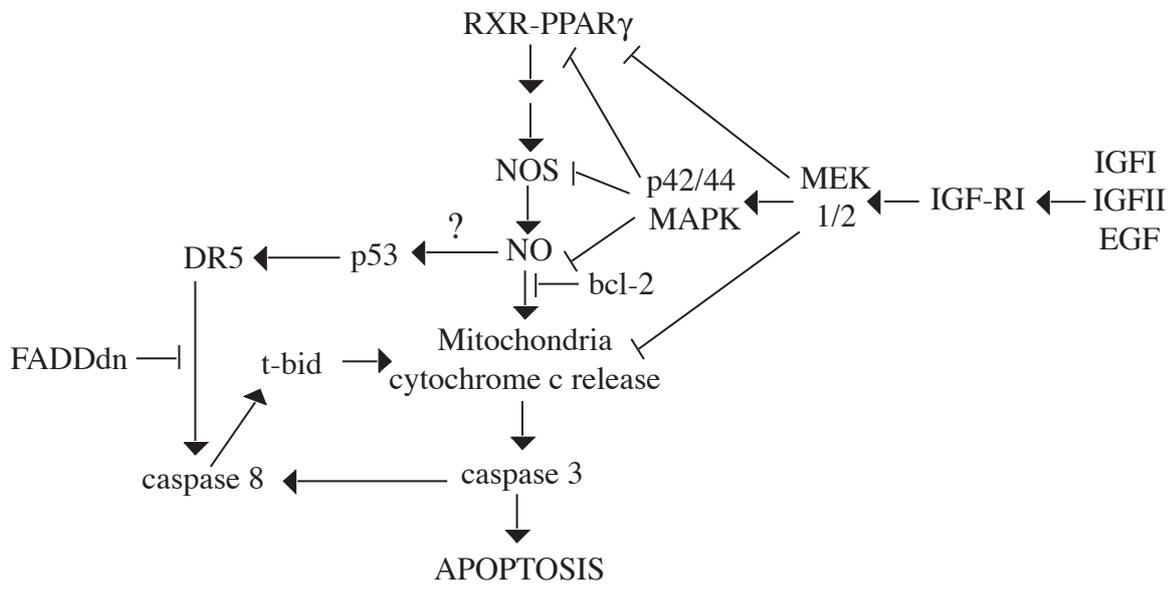
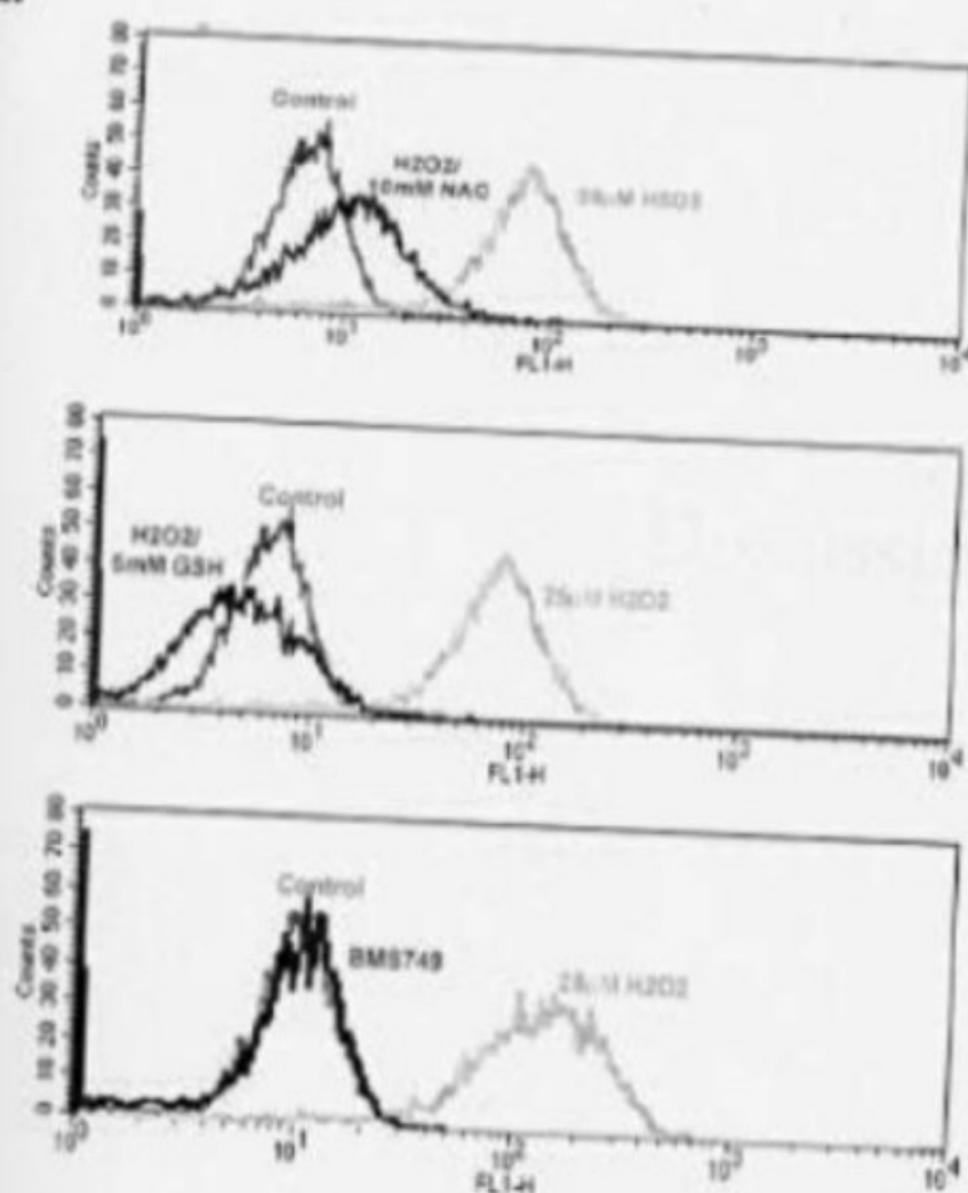
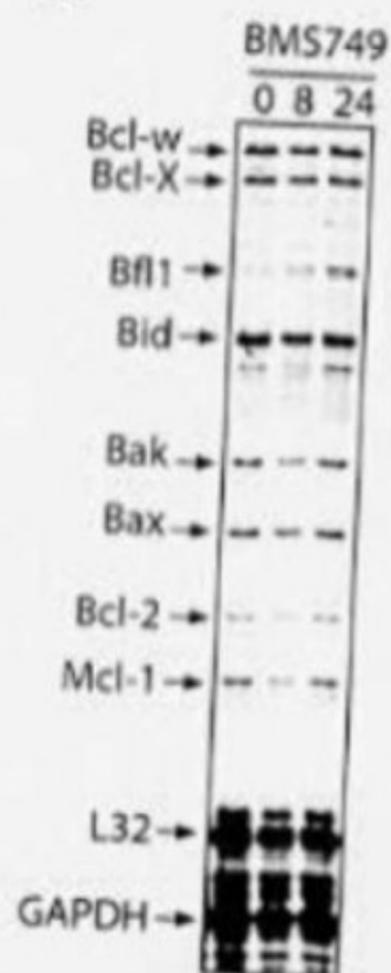


Figure 8

a.



b.



Supplementary figure 1

a. FACS detection of ROS production using the DCFH-DA probe. The cells were pre-treated for 2 hours with the anti oxidant L-NAC or GSH and then exposed to H₂O₂ for 1 hour before ROS detection. On the last panel, the cells were treated for 3 hours with BMS749.

b. RPA analysing the RNA level of Bcl-2 family members after BMS749 exposure.

DISCUSSION

1. Différentes voies d'induction de l'apoptose des cellules APL en ciblant les récepteurs à l'AR.

Il est maintenant clairement établi que les rétinoïdes ont une action préventive ou thérapeutique puissante sur un grand nombre de cancers (Altucci and Gronemeyer, 2001; Sun and Lotan, 2002). Ils peuvent en effet réguler l'expression de gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération, différenciation et apoptose des cellules cancéreuses traitées. Au laboratoire, nous nous sommes focalisés ces dernières années sur l'étude de l'action apoptogénique des rétinoïdes sur les cellules cancéreuses en particulier en utilisant le modèle de la leucémie promyélocytaire aiguë (APL). Les cellules NB4 représentent le seul modèle cellulaire d'APL, expriment la protéine de fusion PML-RAR α et sont bloquées dans leur voie de maturation au stade promyélocytaire (Lanotte et al., 1991). Le traitement des cellules APL (que ce soient les blastes de patients in vivo, cultivés ex vivo ou les cellules NB4) par un agoniste de RAR α tel que ATRA restaure la différenciation de ces cellules dans la voie granulocytaire puis, lorsque le stade de maturation terminal est atteint, induit leur apoptose (Degos and Wang, 2001).

Les travaux réalisés sur les cellules NB4 dans le laboratoire démontrent qu'il existe deux autres voies d'induction de l'apoptose en ciblant l'activation du récepteur RXR. En effet, si un agoniste de RXR seul est inefficace, l'addition simultanée d'un agoniste de la protéine kinase A (PKA) permet également de réengager les cellules dans leur voie de maturation finale suivie de leur mort par apoptose (Benoit et al., 1999). La troisième voie repose sur l'induction directe de l'apoptose des cellules par un rétinoïde et en absence de signaux de survie présents dans le sérum capables de contrecarrer ces effets apoptotiques (Benoit et al., 2001b). Contrairement aux deux autres voies, l'apoptose observée dans ce dernier cas est induite sur les cellules promyélocytaires immatures sans nécessité d'une phase de différenciation préalable en cellules myéloïdes effectrices (**voir tableau 1**).

De manière intéressante, ces deux voies impliquant l'activation de RXR sont également fonctionnelles dans les cellules NB4-R2, un sous-clone des cellules NB4 qui présentent une mutation dans le domaine de liaison du ligand de PML-RAR α et sont par conséquent

	Agoniste de RAR	Agoniste de RXR	Agoniste de RAR/ agoniste de RXR	Agoniste de RXR/ AMPc	Agoniste de RXR Sans sérum
NB4	Différenciation Apoptose	/	Différenciation Apoptose	Différenciation Apoptose	Apoptose
NB4-R2	/	/	/	Différenciation Apoptose	Apoptose
Lignées AML	Différenciation	/	Différenciation Apoptose	Différenciation Apoptose	Apoptose
Blastes AML	/	/	/	Différenciation Apoptose	?

Tableau 1 : Récapitulatif des effets des traitements rétinoïdes et rexinoïdes sur différentes cellules AML testées au laboratoire.

/ signifie qu'il n'y a aucun effet détectable.

résistantes aux rétinoïdes. Or, environ 30% des patients APL traités par ATRA développent une résistance et rechutent. Parmi les différentes causes de cette résistance, on observe l'apparition de ce type de mutations dans la protéine de fusion oncogénique. En plus de l'acquisition de résistance, il existe certains cas d'APL insensibles à ATRA. En effet, dans 95 à 98 % des cas, la protéine de fusion exprimée est PML-RAR α . Cependant, dans certains cas rares la translocation chromosomique génère une fusion entre RAR α et PLZF et le traitement par des doses pharmacologiques d'ATRA est insuffisant pour restaurer la transcription des gènes cibles et la différenciation des cellules. Nous avons eu l'opportunité de tester le co-traitement agoniste de PKA/rexinoïde sur des blastes de patients exprimant la protéine PLZF-RAR α . Alors que les traitements par chaque agoniste séparé n'a induit aucun phénotype de maturation, leur addition simultanée a restauré le processus différenciatif après seulement 3 jours de traitement démontrant qu'il pourrait être effectivement utilisé afin de traiter ces patients APL.

Ces deux traitements basés sur les rexinoïdes pourraient donc enrichir l'arsenal thérapeutique déjà existant pour les thérapies APL et représenter une alternative moins toxique que ATRA pour les patients.

2. Cibler les récepteurs à l'AR dans les cellules AML.

Les résultats obtenus sur les cellules APL résistantes à l'AR ont suggéré que les traitements ciblant RXR pourraient être étendus à d'autres types de leucémie réfractaires au traitement rétinoïde. En effet, même si cette observation semble paradoxale, seules les cellules APL qui présentent une altération dans la fonction de RAR α sont sensibles à ATRA alors que les autres cas de leucémie myéloïde aiguë (AML) qui expriment un récepteur fonctionnel sont majoritairement insensibles à ATRA. C'est d'autant plus surprenant alors qu'il est admis que l'activation de RAR α par son agoniste permet de moduler le processus de différenciation myéloïde (Kastner et al., 2001).

Les lignées cellulaires AML utilisées comme modèle présentent une sensibilité variable au traitement par les rétinoïdes. Les cellules HL-60 sont bloquées au stade myélocytaire et ne présentent pas de translocation chromosomique particulière. L'addition d'un agoniste de RAR α permet d'induire leur différenciation. L'activation concomitante de RXR par son agoniste permet de potentialiser la différenciation des cellules et d'induire ensuite leur

apoptose (Nagy et al., 1995). Les cellules U937 sont quant à elle moins sensibles aux rétinoïdes : le traitement par ATRA induit leur différenciation mais qui n'est pas suivie par l'apoptose (Ho, 1985). Nous avons utilisé une troisième lignée myéloïde : les cellules PLB985 décrites comme étant bloquées à un stade antérieur de différenciation comparé aux lignées précédentes (Tucker et al., 1987). Cependant, des informations récentes laissent à penser que les cellules PLB985 en circulation actuellement seraient un sous-clone particulier des cellules HL-60. J'ai en effet démontré que leur fonctionnement était similaire à celui des cellules HL-60 même si l'on observe une synergie plus marquée entre un agoniste de RAR et un agoniste de RXR au niveau de la différenciation (publication n°2) (**tableau 1**).

Cependant, il existe un décalage entre les lignées myéloïdes utilisées comme modèle en culture et les blastes de patients qui ne présentent pour la plupart aucune sensibilité aux rétinoïdes. De part la très grande hétérogénéité de cette maladie, il n'existe pas de traitement universel capable de traiter tous les patients et excepté pour les cas d'APL. Le taux de survie de ces patients reste très faible et nécessite l'intervention de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous avons donc testé les traitements rétinoides sur ces cellules en commençant par les lignées cellulaires PLB985, HL-60, U937 et NB4-R2. Dans toutes ces lignées, l'addition d'un agoniste de RXR seul n'induit aucun effet biologique décelable. Le traitement par un analogue de l'AMPc (8 CPT-cAMP) induit quant à lui la différenciation des cellules dans la voie granulocytaire. L'addition simultanée d'un agoniste de RXR synergise avec l'agoniste de la PKA pour induire la différenciation terminale des cellules suivi de leur apoptose (publication n°3). Cette étape d'apoptose est également observée dans les cellules U937 qui sont pourtant résistantes à l'action apoptogénique des rétinoïdes. La synergie PKA/RXR est encore plus frappante lorsque l'agoniste de la PKA (qui a de lui-même une forte action différenciative sur les cellules) est remplacé par des molécules permettant d'activer la PKA par l'AMPc intracellulaire. C'est par exemple le cas de la Forskolin qui active l'adényl cyclase et permet la production d'AMPc ou encore les inhibiteurs de phosphodiesterase (théophylline, IBMX, rolipram) qui en inhibant la dégradation de l'AMPc permettent d'augmenter sa concentration intracellulaire. Le traitement des cellules AML par ces molécules seules n'induit qu'une très faible différenciation difficilement détectable puisqu'elles activent la PKA par une dose d'AMPc beaucoup plus physiologique. Cependant, le traitement simultané par un agoniste de RXR induit une forte différenciation suivie de l'apoptose des cellules démontrant une véritable coopération entre la PKA et RXR pour réengager le processus de différenciation. De manière très surprenante, il s'est avéré que ce

co-traitement agoniste de PKA/ rexinoïde était également capable d'affecter la survie des blastes de patients AML cultivés *ex vivo*. Le remplacement de l'agoniste de la PKA par la théophylline ou d'autres inhibiteurs de phosphodiesterase induit également une forte inhibition de la croissance des cellules en milieu semi-solide. Cette activation simultanée de la PKA et de RXR semble pouvoir cibler tous les cas d'AML, sans se limiter aux cellules APL et ceci quelque soient la classification des blastes, leur stade de maturation ou leur immunophénotype. Cependant, cette coopération RXR/PKA semble limitée aux cellules myéloïdes. En effet, la lignée lymphocytaire T jurkat est insensible à ce co-traitement. Il en est de même pour des lignées cellulaires issues de tumeur solides.

Concernant le deuxième traitement ciblant RXR, j'ai adapté différentes lignées leucémiques en condition de culture en milieu synthétique pauvre en sérum (publication n°4). Les cellules PLB985 ont également démontré une forte sensibilité à l'action apoptogénique des rexinoïdes, de même que les cellules HL-60. Les lignées U937, KG1a et jurkat sont également sensibles mais nécessitent une exposition plus longue au ligand (48 heures) afin d'observer les premiers effets. La lignée K562, dans laquelle les cellules sont engagées dans la voie de différenciation érythrocytaire sont réfractaires au traitement. Nous avons récemment établi une collaboration avec l'hôpital de Strasbourg qui nous fourni des blastes de patients leucémiques (myéloïdes et lymphocytaires). Il sera intéressant de tester si ces cellules sont elles aussi sensibles à l'action apoptogénique des rexinoïdes comme les lignées cellulaires.

Il est difficile de statuer sur la sensibilité des lignées issues de tumeurs solides à l'action des rexinoïdes. En effet, l'adaptation de ces cellules, que ce soient des lignées de cancer du sein, de neuroblastomes ou encore des cellules primaires embryonnaires de souris (MEF) en milieu pauvre en sérum a présenté une difficulté majeure. En effet, certains facteurs d'adhésion présents dans le sérum semblent nécessaires pour la croissance de ces cellules. J'essaie actuellement de remédier à ce problème en testant d'autres substituts synthétiques de sérum. Il serait en effet très intéressant de savoir si cette voie est limitée aux cellules leucémiques ou si elle peut être étendue à d'autres tissus. On pourrait effectivement imaginer un rôle physiologique de cette signalisation rexinoïde au cours du développement : elle constituerait une voie de mort par défaut induite dans certaines cellules en présence de ligands engogènes lorsque la signalisation par les facteurs de croissance est interrompue. Elle pourrait ainsi permettre de réguler la taille de certains compartiments cellulaires. Cependant, cette hypothèse est difficilement vérifiable, les souris déficientes en RXR α n'étant pas viables.

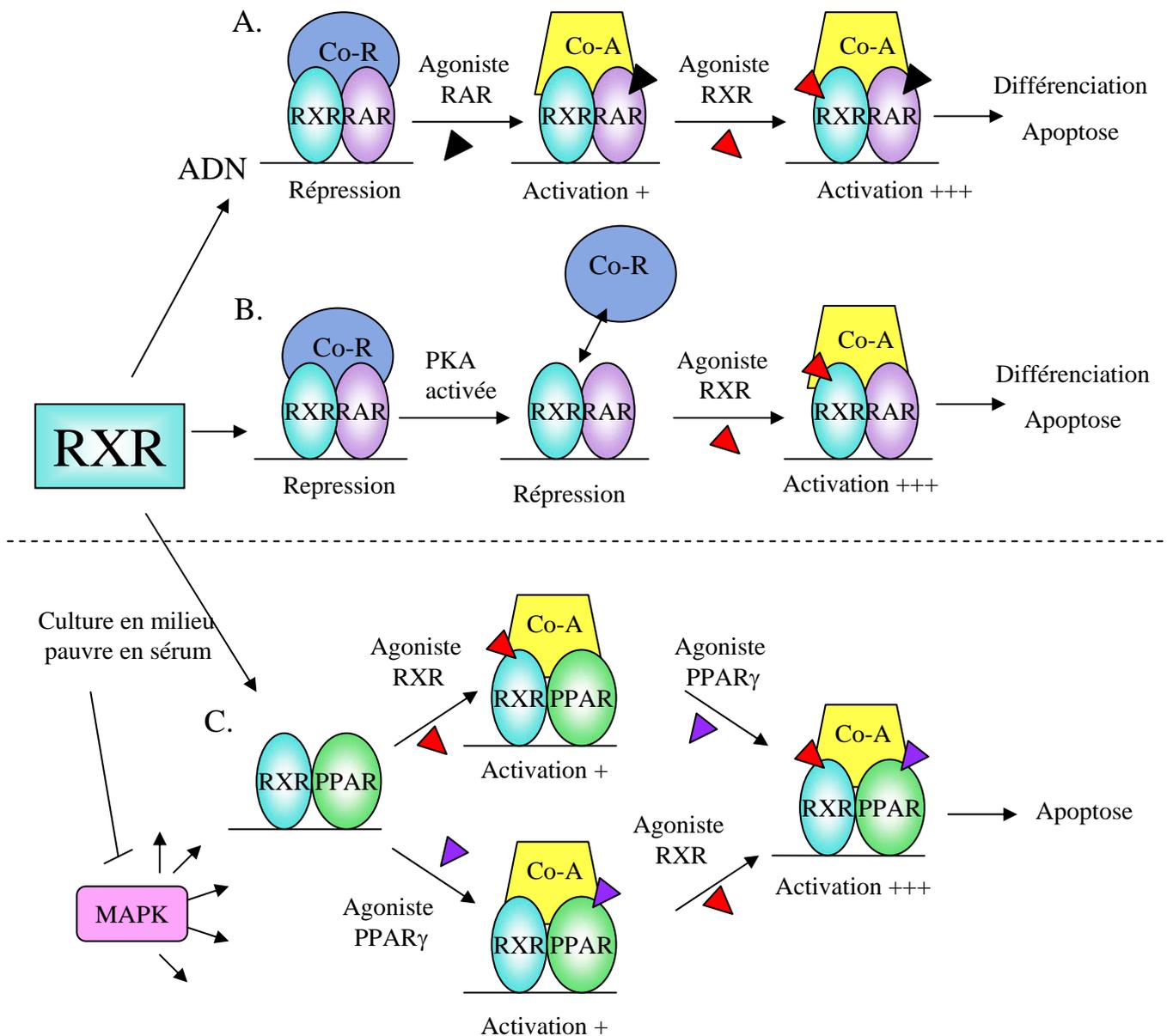


Figure 22 : Les différentes implications de RXR dans la différenciation et/ou l'apoptose induite par les rétinoïdes et les rexinoïdes dans les cellules AML.

- A. Synergie entre RAR et RXR qui conduit à la différenciation et apoptose des cellules AML.
- B. Désubordination de RXR par la PKA qui conduit à la différenciation et apoptose des cellules AML.
- C. Activation de l'hétérodimère permissif RXR-PPAR γ qui induit la transcription de gènes apoptotiques.

En conclusion, nous avons démontré que les voies rétinoides découvertes dans les cellules APL sont également applicables aux cellules AML.

3. Rôle du récepteur RXR dans la différenciation et l'apoptose des cellules AML.

Nos travaux démontrent que l'activation du récepteur RXR par un agoniste sélectif peut induire ou contribuer à la différenciation des cellules myéloïdes cancéreuses puis à leur apoptose ou également induire leur apoptose de manière directe. Ces différents effets biologiques induits par RXR reflètent son implication via différents hétérodimères (**voir figure 22**). Il est pour le moment impossible de discriminer quels isotypes de RXR (α , β ou γ) sont mis en jeu de part l'absence de ligands sélectifs de chacun de ces isotypes. Il semble néanmoins que RXR α soit exprimé majoritairement dans le lignage myéloïde et que RXR β soit également présent. L'isotype RXR γ n'a pas été détecté et son expression dans les différents tissus semble plus localisée que les autres isotypes.

3.1. Potentialisation de l'activation de l'hétérodimère RXR-RAR α .

Nous avons démontré que la différenciation des cellules PLB985 peut être induite par un agoniste de RAR α (publication n°2). Cependant cette maturation est incomplète comme le démontre le taux d'expression faible du marqueur de différenciation CD11c. L'obtention d'un stade de différenciation terminale n'est observée que lorsque RXR est simultanément activé par un agoniste. Ceci illustre au niveau cellulaire l'activation synergique de l'hétérodimère RXR-RAR lorsque les 2 partenaires sont ligandés. Au niveau moléculaire, cette synergie s'explique par la liaison d'une même molécule de coactivateur par chaque partenaire de l'hétérodimère et une potentialisation de l'efficacité de la transcription (Germain et al., 2002). Cet effet synergique de la différenciation a été décrit pour les cellules HL-60 mais également des cellules issues de tumeurs solides telles que les neuroblastomes (Nagy et al., 1995; Rana et al., 2002). (**figure 22 A**)

Des expériences d'inactivation de gènes n'ont pas pu confirmer l'implication de RXR dans la différenciation myéloïde. En effet, Les souris nulles pour RXR α présentent un phénotype embryonnaire létal et les souris nulles pour RXR β sont viables et leur granulopoïèse ne semble pas affectée (pour revue, voir (Kastner et al., 1995)). Cependant,

l'expression ciblée d'un dominant négatif de RXR β dans les cellules myéloïdes de souris induit des perturbations de la différenciation plus ou moins importante selon le niveau d'expression du transgène (Sunaga et al., 1997). Johnson et al ont utilisé un système cellulaire dans lequel des précurseurs myéloïdes exprimant une version mutée de RAR α sont bloquées au stade promyélocytaire (Johnson et al., 1999). L'addition d'un agoniste de RAR α ne permet de réactiver la différenciation qu'à des doses très élevées alors qu'un agoniste de RXR réengage les cellules dans la voie de la maturation avec une efficacité 100 à 1000 fois supérieure. Ceci démontre que RXR a également un rôle dans la différenciation myéloïde par sa contribution à l'hétérodimère RXR-RAR.

Suite à l'induction de la différenciation terminale des cellules PLB985 par les 2 agonistes de RAR et de RXR, les cellules meurent par apoptose alors qu'aucun phénotype apoptotique n'est observé même après plusieurs semaines de traitement par un agoniste de RAR α seul. Deux hypothèses peuvent être invoquées. Il est possible que l'apoptose ne puisse être induite que lorsque les cellules ont dépassé un certain seuil de différenciation qui n'est obtenu que lors d'un traitement par les 2 agonistes et l'activation synergique de la transcription des gènes cibles. Il est également possible d'envisager l'implication d'un autre hétérodimère (permissif) formé avec RXR qui prendrait le relais pour induire la transcription des gènes impliqués dans l'apoptose.

Dans les cellules APL, l'activation de RAR α ou PML-RAR α par son agoniste est suffisante pour induire la maturation terminale puis l'apoptose des cellules suggérant que la protéine de fusion PML-RAR α altère le fonctionnement normal de l'hétérodimère. Une synergie est tout de même obtenue lorsqu'un rétinoloïde est ajouté à l'agoniste de RAR.

La compréhension de ce mécanisme d'induction de la différenciation et de l'apoptose par les récepteurs RARs et RXRs dans les cellules PLB985 et NB4 a permis d'utiliser ces 2 lignées comme un outil très sensible afin de tester les activités et sélectivité de nouveaux agonistes des récepteurs à l'AR. Ces expériences ont permis de déterminer de nouveaux agonistes de RAR et RXR décrits dans les publications situées en annexe (Alvarez et al., 2004; Ivanova et al., 2002; Ivanova et al., 2004).

3.2. Désubordination de RXR par la PKA.

L'activation de RXR par son ligand en présence d'une concentration élevée d'AMPC est capable d'induire la différenciation et l'apoptose des cellules AML insensibles à l'AR (publication n°3). Cependant, RXR est subordonné à RAR dans un hétérodimère RXR-RAR. Ceci permet d'émettre 2 hypothèses : le signal RXR/PKA peut être médié par un hétérodimère permissif où un agoniste de RXR est capable d'activer seul la transcription. On peut également imaginer que c'est effectivement l'hétérodimère RXR-RAR α qui est activé en réponse aux ligands par un mécanisme de désubordination de RXR comme il a été suggéré par Kamashev et al dans le système NB4 (Kamashev et al., 2004). Nous avons validé la deuxième hypothèse par l'utilisation d'antagonistes sélectifs de RAR qui ont la capacité de bloquer la différenciation des cellules PLB985 induite par un agoniste de RXR et un agoniste de la PKA. Nous avons ensuite démontré que l'induction de la différenciation dans ce contexte est médiée par l'activation de la transcription par l'hétérodimère RXR-RAR α . (**figure 22 B**).

Des études réalisées préalablement dans le laboratoire ont démontré que la subordination de RXR provient de l'incapacité d'un agoniste de RXR de dissocier les corépresseurs N-CoR et SMRT (Germain et al., 2002). Nous avons démontré que la PKA activée permet en fait de dissocier SMRT de l'hétérodimère. Le rexinoïde est alors capable d'induire le recrutement des coactivateurs et la transcription des gènes cibles de RXR-RAR α . La dissociation de SMRT en présence d'un analogue d'AMPC a déjà été démontrée avec le récepteur à la progestérone (Wagner et al., 1998). Cependant, aucun mécanisme n'a été mis en évidence pour expliquer cette dissociation au niveau moléculaire.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette action de la PKA. Sachant qu'il existe un site de phosphorylation de la PKA dans le site de liaison du ligand de RAR α , nous avons pensé que la phosphorylation de RAR α en réponse au traitement par l'AMPC pourrait induire un changement conformationnel et permettre de dissocier le corépresseur. Cependant, la mutation de la sérine cible de la PKA en alanine non phosphorylable n'a que très peu modifié ce phénomène de dissociation. On peut également envisager la phosphorylation du corépresseur lui-même ou d'une autre protéine impliquée dans l'interaction SMRT/RAR. Concernant la phosphorylation de SMRT, aucun site consensus de la PKA n'a été rapporté. Cependant, SMRT peut être phosphorylé par d'autres kinases telles que MEKK-1, MEK-1 ou

CK-2 (Hong and Privalsky, 2000; Zhou et al., 2001). Il a été démontré que la phosphorylation de SMRT par les protéines de la voie de MEK-1 en réponse à des facteurs de croissance induit sa dissociation du récepteur TR et son export nucléaire (Hong and Privalsky, 2000). La PKA peut activer la voie de MEK-1 dans les cellules HL-60 (Cho et al., 2003). On peut suggérer que la dissociation de SMRT par la PKA est un événement indirect et passe par l'activation intermédiaire de la voie MEK-1. Il sera possible de vérifier cette hypothèse par l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs de MEK-1 ou la surexpression d'un dominant négatif de cette protéine. Il serait alors intéressant de tester si l'activation de la voie MEK-1 par des facteurs de croissance tels que GM-CSF serait capable d'induire une induction de la différenciation en présence de rexinoïdes. Hong et al ont démontré que l'arsenic, molécule utilisée en thérapie des patients APL résistant à ATRA, est capable via l'activation de la cascade des MAP kinase et la phosphorylation de SMRT, de diminuer l'interaction entre SMRT de PML-RAR α . (Hong et al., 2001). Ainsi, la coopération entre ATRA et l'arsenic dans les cellules APL peut s'expliquer à 2 niveaux : premièrement, par l'induction de la dégradation de PML-RAR α et deuxièmement par une activation plus efficace de PML-RAR α par ATRA de part la dissociation de SMRT. Ainsi, un co-traitement arsenic/rexinoïde pourrait également être testé dans les cellules AML.

Ces résultats illustrent parfaitement le fait que l'activation des récepteurs nucléaires par leur ligand n'est pas le seul moyen d'activer la transcription. En effet, l'intégration de signaux médiés par de nombreuses voies de signalisation module de manière très efficace leur activité, que ce soit de manière directe en ciblant la phosphorylation du récepteur ou de manière plus indirecte en ciblant d'autres protéines impliquées dans l'activation de la transcription.

3.3. Activation d'un hétérodimère permissif.

L'activation de RXR par un rexinoïde peut également induire une apoptose directe des cellules AML traitées sans nécessité d'une phase de maturation préalable (publication n°4). Les 2 mêmes hypothèses que précédemment peuvent être proposées pour expliquer la réponse au rexinoïde: l'activation d'un hétérodimère permissif ou une désubordination de RXR dans un hétérodimère RXR-RAR α . Cependant, un antagoniste de RAR ne diminue pas l'apoptose induite par le rexinoïde mais au contraire provoque son augmentation, ce qui invalide la dernière hypothèse. Il est possible d'expliquer cette augmentation : en présence de

l'antagoniste de RAR BMS493, l'interaction récepteur/co-répresseur est renforcée. Ainsi, une séquestration des co-répresseurs sur l'hétérodimère RXR-RAR α par l'antagoniste permettrait de libérer les autres hétérodimères de l'action répressive des corépresseurs et augmenter leur capacité transactivatrice.

Parmi les différents partenaires de RXR dans des hétérodimères permissifs, les récepteurs PPAR représentaient des candidats potentiels. De plus, il est à présent démontré que l'hétérodimère RXR-PPAR γ joue un rôle important dans la différenciation des macrophages *in vivo* dans le contexte des lésions athérosclérotiques (Nagy et al., 1998; Tontonoz et al., 1998). Or, nous avons démontré que le traitement des cellules AML par des agonistes de PPAR γ permet également d'induire l'apoptose des cellules et seulement en condition de culture faible en sérum. De plus, on observe une activation synergique de l'apoptose en combinant différents agonistes de PPAR γ (synthétiques ou naturels) avec différents rexinoïdes. Les voies apoptotiques alors activées sont exactement les mêmes que dans le cas de l'apoptose induite par les rexinoïdes seuls. Toutes ces données suggèrent fortement l'implication de l'hétérodimère RXR-PPAR γ dans l'apoptose induite par les rexinoïdes (**figure 22 C**). L'extinction de l'expression de PPAR γ par l'utilisation de shRNA dirigés contre ce récepteur nous permettront de tester cette hypothèse. On ne peut en effet pas exclure totalement l'implication d'autres hétérodimères permissifs tels que RXR-TR3 et une action non génomique de RXR. Récemment Konopleva et al ont démontré que l'activation de l'hétérodimère PPAR γ /RXR par leurs agonistes respectifs permet d'induire la différenciation de différentes lignées myéloïdes en condition de culture normale (Konopleva et al., 2004). J'ai testé ces combinaisons agonistes de PPAR γ /rexinoïde en condition de culture normale en sérum dans les lignées cellulaires U937, HL60 et PLB985. Je n'ai cependant observé ni phénomène de différenciation ni apoptose des cellules même après 10 jours de traitement. Il faut cependant préciser que les concentrations de ligands utilisés dans notre étude étaient beaucoup plus faibles que celles utilisées dans cette publication. Cependant, cette modulation de la prolifération, différenciation et apoptose des cellules a été rapportée dans de nombreux cas de cellules cancéreuses traitées par les agonistes de RXR et de PPAR γ (voir introduction). Ainsi, si l'action de l'hétérodimère RXR-PPAR γ a été très étudiée dans le contrôle de l'homéostasie du glucose, de la sensibilité à l'insuline ou encore dans l'adipogenèse, il jouerait également un rôle important dans la carcinogenèse (pour revue, voir (Fajas et al., 2001)).

4. Cibler les cellules AML par la différenciation ou l'apoptose.

Les cellules AML sont bloquées dans leur maturation à des stades différents qui définissent les différentes catégories de leucémie. Ce blocage des cellules incombe à une mutation ou une altération de la fonction de différents facteurs de transcription qui vont empêcher l'induction de programmes génétiques nécessaires à la progression dans la voie de maturation. Il existe 2 stratégies différentes afin d'affecter la survie des cellules AML.

La première stratégie consiste à réengager les blastes immatures dans le processus de différenciation. Ce type de thérapie différenciative a été décrit en premier lieu dans le cas du traitement des cellules APL par ATRA (Degos and Wang, 2001). En effet, l'addition d'ATRA permet de réverser le processus de répression de la transcription exercé par la protéine de fusion PML-RAR α . Dans les autres cas d'AML non APL, ni l'expression ni les fonctions des récepteurs à l'AR ne sont altérées et des mutations dans d'autres facteurs de transcription sont responsables de l'arrêt dans le processus de différenciation (pour revue, voir (Tenen, 2003). Cependant, on peut constater que l'activation de l'hétérodimère RXR-RAR α par l'addition d'AR 9-cis réinduit le processus de différenciation dans les cellules PLB985 ou HL-60. Le rôle de RAR α dans la différenciation myéloïde normale a été démontré et l'activation de RAR α par un agoniste accélère le processus de maturation (Kastner et al., 2001). On peut donc penser que l'activation de l'hétérodimère RXR-RAR dans les lignées myéloïdes va permettre de réactiver l'expression de gènes cibles nécessaires pour l'induction de la différenciation (par exemple les facteurs de transcription de la famille de C/EBP) et dépasser le stade de maturation dans lequel la cellule est bloquée, et ceci même si l'origine du blocage de la différenciation est différent.

Cette situation n'est pourtant pas transposable aux blastes de patients AML qui sont de manière générale insensibles à l'action différenciative de l'AR. Cependant différents travaux ont démontré que la combinaison d'ATRA avec d'autres agents différenciatifs tels que les inhibiteurs de HDAC ou les facteurs de croissance GM-CSF et G-CSF permettent d'outrepasser le blocage de la différenciation (Ferrara et al., 2001; Notario et al., 1996; Oka and Takeda, 1997). Glasow et al suggèrent que ces 2 facteurs de croissance activent la voie des MAP kinases et potentialisent ainsi les capacités transcriptionnelles de RAR α activé par

son ligand (Glasow et al., 2005). La combinaison G-CSF/AR est actuellement en phase III d'essais clinique pour les patients AML. Un recrutement aberrant des HDAC par des facteurs de transcription est responsable de la répression de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la prolifération, différenciation ou apoptose. Traiter les cellules AML par des inhibiteurs de HDAC est donc un moyen de restaurer l'expression de ces gènes et induire la différenciation des cellules (Nebbio et al., 2005). La combinaison des inhibiteurs de HDAC avec des inhibiteurs de DNA méthyltransférase a également démontré son efficacité (Weisberg et al., 2004). Différentes classes d'inhibiteurs de HDAC existent et certains d'entre eux sont actuellement en phase d'essai clinique pour traiter les leucémies AML.

Nous avons mis en évidence un autre traitement composé d'un rétinol et d'un agoniste de la PKA qui permet également un réengagement des cellules dans le processus de différenciation des cellules AML (APL compris). Nous avons démontré que la PKA induit la désubordination de RXR via la dissociation du co-répresseur SMRT. Ainsi, le rétinol est capable d'activer l'hétérodimère RXR-RAR et d'induire la transcription des gènes cibles de l'AR. Cependant ; si l'activation des gènes cibles de RXR-RAR par le rétinol est impliqué dans ce réengagement dans le processus de différenciation, cet événement n'est pas suffisant. En effet dans la plupart des blastes AML testés, le traitement par ATRA ne permet pas d'induire la maturation alors que le co-traitement agoniste de la PKA/rétinol le peut. Ceci suggère que ce co-traitement est capable d'induire l'expression d'autres gènes cibles supplémentaires par un mécanisme n'impliquant pas l'hétérodimère RXR-RAR. Il est donc possible que le rétinol puisse également induire l'activation d'autres hétérodimères (permissifs) et plus probablement que la voie PKA/CREB induise la transcription de gènes cibles spécifiques qui pourraient avoir un rôle dans la différenciation. D'ailleurs, l'induction de différenciation des lignées myéloïdes HL-60 ou U937 en présence d'analogues d'AMPc suggère que la PKA peut effectivement induire un programme de gènes impliqués dans la différenciation.

Toutes ces données démontrent que l'alternative de la thérapie différenciative peut être très efficace dans le traitement des leucémies AML et de gros efforts sont menés actuellement dans cette voie. Et dans tous ces cas décrits les cellules meurent ensuite par apoptose lorsqu'elles ont atteint le stade de maturation terminal.

Une autre stratégie permettant d'affecter la survie des cellules AML consiste à directement induire leur apoptose. Par exemple, dans le traitement des cellules APL par l'arsenic, l'induction d'apoptose sans différenciation préalable a été décrite. D'autres équipes émettent un jugement plus nuancé et concluent à 2 types de réponse à l'arsenic: l'une induisant l'apoptose et l'autre la différenciation des blastes (pour revue, voir (Zhu et al., 2001)). Nous avons démontré de notre côté que le traitement des lignées myéloïdes par un rétinoloïde peut induire une apoptose massive et directe en absence de signaux de survie contrecarrant cet effet. L'apoptose observée ne requiert pas de différenciation préalable et au contraire, est inhibée en présence de signaux différenciatifs.

Une seconde classe de mutation affectant les voies de transduction de signal prolifératifs sont associées avec le phénotype AML. D'ailleurs le théorème des « 2 événements » suggère qu'une mutation dans un facteur de transcription est nécessaire pour induire le blocage de la différenciation, mais qu'une deuxième mutation dans une voie de survie est nécessaire pour le développement de la leucémie en conférant aux cellules un avantage prolifératif. Ainsi, les agents ciblant ces voies de survie, tels que les inhibiteurs de la voie Ras (inhibiteurs de farnésyl transférase) ou du récepteur à activité tyrosine kinase FLT3 permettent de bloquer la prolifération des cellules AML et induire leur apoptose (pour revue, voir (John et al., 2004)). Certaines de ces molécules sont également en phase d'essai cliniques. Un double traitement ciblant respectivement les 2 types de mutation est envisagé pour les patients AML.

5. Rétinoïdes et différenciation : induction de programmes de survie

L'un des buts de nos travaux effectués au laboratoire consiste à comprendre quels sont les programmes de gènes induits par les traitements rétinoloïde ou rétinoloïde et responsables des phases de différenciation puis d'apoptose.

5.1. Induction de programmes de survie.

Nous avons utilisé la technique de RPA qui permet d'évaluer la modulation de l'expression de nombreux ARNm au cours d'une seule expérience en nous focalisant sur les gènes connus pour moduler la balance survie/apoptose.

De manière très surprenante, les premiers signaux observés en réponse au traitement par l'AR dans les cellules NB4 ou les cellules PLB985 sont des signaux de survie (publications n°1 et n°2). Ces gènes anti-apoptotiques sont également induits dans les cellules AML par un traitement rexinoïde/PKA.

Après seulement quelques heures de traitement, une forte induction de la protéine anti-apoptotique A1(Bfl1) est détectée. A1 est un membre anti-apoptotique appartenant à la famille de bcl-2 et son induction a été répertoriée dans de nombreuses études au cours de la différenciation neutrophile : il peut être induit par de nombreux traitements différenciatifs tels que GM-CSF, LPS ou l'AR pour prolonger la survie des neutrophiles (Chuang et al., 1998; Lin et al., 1996; Moreb and Schweder, 1997). L'apoptose spontanée des neutrophiles de souris A1^{-/-} démontre un rôle essentiel de cette protéine dans la survie des cellules myéloïdes (Hamasaki et al., 1998). Au niveau mécanistique A1 est capable de séquestrer la version tronquée de bid et d'inhiber sa collaboration avec les protéines pro-apoptotiques bak et bax. Il est ainsi capable d'inhiber l'apoptose induite par TRAIL ou fas L (Werner et al., 2002). Il est donc intéressant de constater que l'AR induit 2 programmes antagonistes : dans un premier temps A1 dont l'expression permet de contrecarrer l'effet apoptogénique de TRAIL induit de manière plus tardive et ceci afin de permettre aux cellules d'atteindre la phase de maturation terminale (Yin et al., 2005).

Une seconde vague de gènes anti-apoptotique parmi lesquels les protéines de la famille des IAPs est induite de manière plus tardive. Elles peuvent inhiber l'apoptose à 2 niveaux : dans un premier temps, elles inhibent l'activation des caspases 3, 7 et 9 (voir introduction). De plus, l'expression simultanée de cIAP1, cIAP2, TRAF1 et TRAF2 contribue à la transduction d'un signal anti-apoptotique par le récepteur TNF-R1 et conduit à l'activation de NF-KB dans les cellules NB4 mais également PLB985. NF-kB est un facteur de transcription qui permet d'activer l'expression de nombreux gènes anti-apoptotiques dont les IAPs les TRAFs et également bcl2A1 (voir introduction) . On observe donc une boucle d'amplification de l'activation des voies anti-apoptotiques durant la phase de différenciation induite par l'AR. Dans ce contexte une synergie entre ATRA et le TNF α dans l'induction de la différenciation

a été observée dans les cellules NB4 et résulte de l'activation coopérative de NF- κ B (Witcher et al., 2004).

Il semble donc que les agents différenciatifs induisent les mêmes voies anti-apoptotiques dans un premier temps, afin de permettre aux cellules d'atteindre leur phase de maturation terminale avant l'induction de l'apoptose.

5.2. RAM : modulateur du signal rétinoïde.

La technique de mutagenèse par insertion rétrovirale nous a permis d'identifier un nouveau gène régulé par l'AR et que nous avons nommé RAM pour Retinoic Acid Modulator. L'intégration du virus dans le premier intron de ce gène induit un phénotype de résistance à l'AR dans les cellules PLB985. Dans ces cellules mutantes (WY-1), la phase de différenciation ainsi que la phase d'apoptose induites par l'AR sont altérées. L'analyse comparative de l'expression de ce gène entre les cellules sauvages et mutante a démontré que l'insertion virale a induit une surexpression de RAM certainement via un effet stimulateur du promoteur du virus. Ainsi RAM aurait plutôt une fonction antiapoptotique puisque sa surexpression est corrélée avec une sensibilité réduite à l'action des rétinoïdes. D'ailleurs, l'expression de l'ARNm de RAM diminue au cours du traitement par l'AR jusqu'à sa disparition qui coïncide avec l'induction de l'apoptose. Cette diminution d'expression est également observée à moindre mesure dans les cellules mutantes mais un certain niveau basal est conservé même après 14 jours de traitement. L'expression de l'ARNm de RAM a été détectée dans d'autres lignées myéloïdes mais semble restreinte à ce tissu. RAM pourrait donc jouer un rôle dans le processus de différenciation neutrophile.

Toutes ces données convergent vers une contribution de RAM dans la modulation du signal rétinoïde. Cependant, la surexpression de RAM dans les cellules PLB985 par infection rétrovirale n'a pas conduit à l'acquisition de résistance au traitement par l'AR. On peut imaginer que l'expression d'un tag à l'extrémité de la protéine puisse modifier sa structure ou sa fonction. Nous envisageons donc d'utiliser une version non taggée de la protéine. L'ARNm de RAM est extrêmement long comparé à la séquence codante putative de la protéine. Il est possible d'imaginer un rôle fonctionnel de cette ARNm et non de la protéine dans l'effet anti-apoptotique observé. De nombreuses expériences peuvent être envisagées afin de mieux caractériser ce gène et définir son action. Dans un premier temps, nous étudions la possibilité

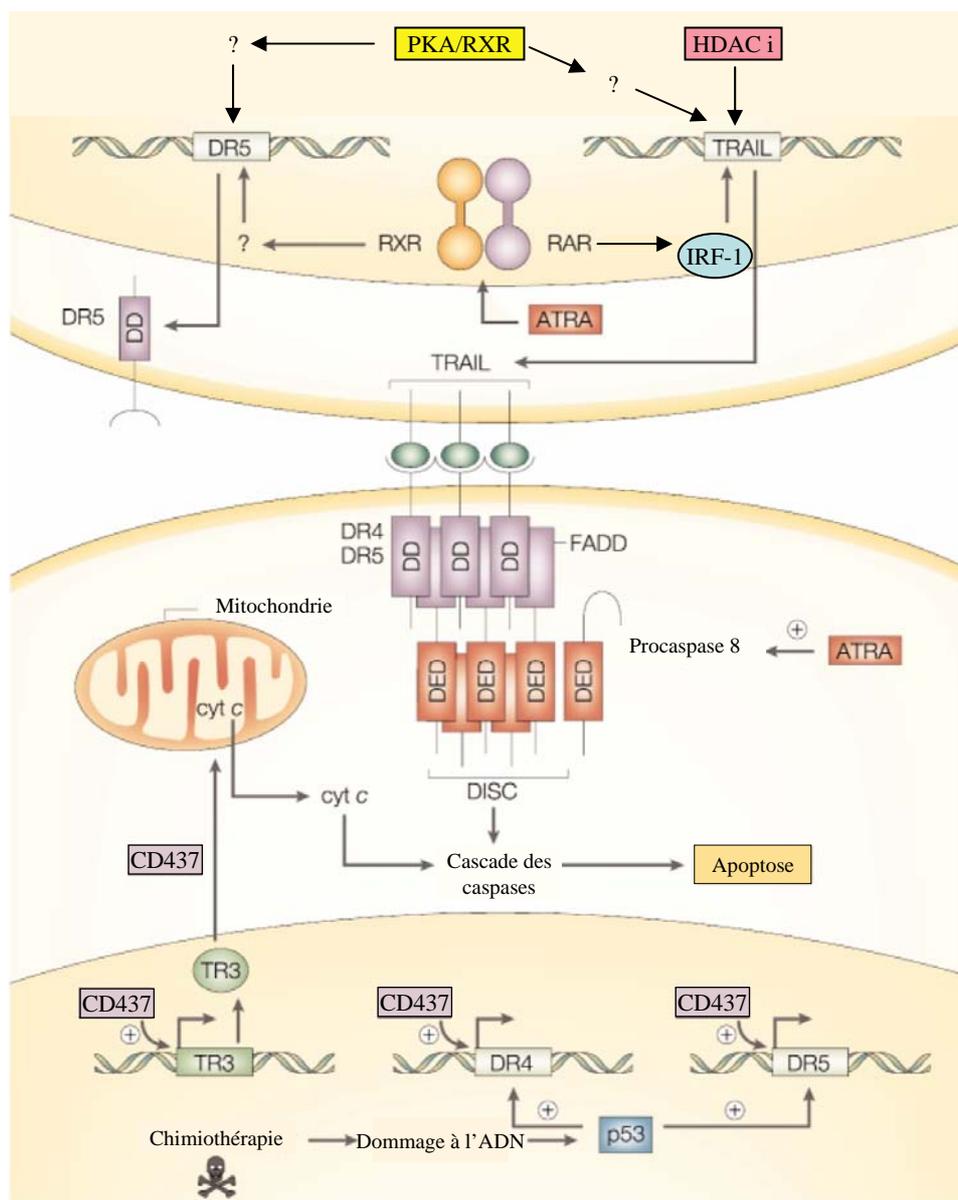


Figure 23 : Les rétinoïdes et la voie de TRAIL.

Dans les cellules APL et AML non-APL, les rétinoïdes ou la combinaison rétinoloïde/agoniste de la PKA induisent l'expression de TRAIL et de son récepteur DR5. Les cellules voisines (homo ou hétérologues) qui expriment les récepteurs de TRAIL DR4 ou DR5 vont entrer en apoptose suite à la liaison de TRAIL à ses récepteurs et l'activation de la cascade apoptotique. Dans certaines cellules, le rétinoïde atypique ou CD437 induit l'expression des récepteurs DR4 et DR5 et ainsi sensibilise les cellules à l'action de TRAIL. Il peut aussi induire la translocation du récepteur orphelin TR3 à la mitochondrie et induire le relargage du cytochrome c. Enfin, les agents chimiothérapeutiques peuvent également sensibiliser les cellules à l'action apoptotique de TRAIL en activant l'expression des récepteurs DR4 et DR5.

D'après Altucci *et al* 2001.

d'une structure tertiaire particulière du transcrit de RAM qui révélerait une production potentielle de microRNA qui pourrait médier l'extinction de gènes impliqués directement dans la signalisation par l'AR. Ceci pourrait ainsi expliquer l'absence d'activité de la protéine. Nous envisageons également d'utiliser un siRNA dirigé contre le transcrit de RAM afin de vérifier si l'extinction de son expression peut influencer la survie des cellules comme il serait attendu. Il serait également intéressant d'étudier sa contribution éventuelle dans d'autres voies de signalisation régulant la survie cellulaire. D'ailleurs, nous avons démontré une altération de la signalisation de la voie NB-kB dans les cellules mutantes mais des études supplémentaires sont nécessaires afin d'en déterminer les raisons. Enfin, nous envisageons de cloner le promoteur de RAM afin d'étudier l'effet inhibiteur du traitement par l'AR sur l'expression de RAM.

6. Les rétinoïdes et l'apoptose.

6.1. la connexion TRAIL-Rétinoïdes.

- Induction de TRAIL par les rétinoïdes

Suite à l'activation de programmes anti-apoptotiques, ATRA induit l'expression du ligand de mort TRAIL dans les cellules NB4 et les blastes de patients APL et nous avons démontré que TRAIL est effectivement responsable de l'effet apoptogénique de ATRA (publication n°1). En effet, la neutralisation de TRAIL inhibe l'apoptose induite par ATRA. L'induction de TRAIL n'est pas restreinte aux cellules APL et nous avons également pu l'observer dans les cellules PLB985 (publication n°2). Dans ces cellules, l'extinction de l'expression de TRAIL par un siRNA diminue l'apoptose induite par l'AR 9-cis. De plus, les cellules mutantes WY-1 résistantes à l'AR présentent également une sensibilité réduite à TRAIL confirmant l'existence d'un lien entre les rétinoïdes et TRAIL. Par la suite, l'induction de TRAIL par l'AR a également été confirmée dans des cellules de cancer du sein MCF-7 ou SK-BR3 (Clarke et al., 2004b) démontrant que la connexion entre TRAIL et l'AR n'est pas restreinte au système leucémique (pour revue, voir(Altucci and Gronemeyer, 2004)) (**Figure 23**).

Le cotraitement des cellules AML (lignées cellulaire et blastes de patients) par un rétinoïde et un agoniste de la PKA induit également l'expression de TRAIL mais aussi et surtout de son récepteur DR5. Un marquage des cellules par des anticorps sélectifs de TRAIL

ou de DR5 a démontré que seules les cellules présentant un phénotype différencié expriment les 2 protéines à leur surface. Ceci suggère qu'une phase de maturation préalable est nécessaire à l'expression de TRAIL et DR5 et à l'induction de l'apoptose.

En parallèle, Sun et al ont démontré que le traitement des cellules du cancer de la prostate et du poumon par le rétinoïde atypique CD437 induit l'expression des récepteurs de mort Fas, DR4 et DR5. Ainsi ils rapportent une induction synergique de l'apoptose par un co-traitement par le CD437 et TRAIL (Sun et al., 2000a; Sun et al., 2000b; Sun et al., 2000c).

Ainsi toutes les données convergent vers un lien entre les rétinoïdes (au sens large du terme) et le système TRAIL/DR4/DR5. Il est donc probable que l'activité anti-tumorale des rétinoïdes soit liée à leur capacité à induire l'expression de TRAIL et ceci dans différents systèmes cellulaires.

- Convergence des voies de l'AR et de l'interféron sur le promoteur de TRAIL

L'induction tardive de TRAIL par l'AR dans les différents systèmes étudiés implique une induction transcriptionnelle indirecte. Une étude réalisée dans le laboratoire a permis d'identifier IRF-1, une protéine impliquée dans la voie de l'interféron comme le facteur clé responsable de l'induction de TRAIL par l'AR (Clarke et al., 2004b). En effet, l'expression de IRF-1 est induite très rapidement suite au traitement par l'AR. Il est ensuite recruté sur le promoteur de TRAIL au niveau de 2 séquences consensus ISRE et IRF-E. Par conséquent, le traitement des cellules par les 2 agents anti-tumoraux AR et interféron gamma (IFN γ) induit la liaison coopérative de IRF-1 sur le promoteur de TRAIL, permettant son induction de manière synergique. Ainsi, ce cotraitement peut induire la mort par apoptose de cellules cancéreuses hétérologues d'une manière paracrine.

De manière intéressante, IRF-1 est décrit comme un suppresseur de tumeur et sa capacité à induire l'expression de TRAIL est certainement liée à sa capacité d'inhiber la croissance des tumeurs ou de différentes cellules cancéreuses. Une étude est en cours au laboratoire afin de déterminer les mécanismes d'induction de IRF-1 par l'AR. L'induction rapide de IRF-1 par l'AR suggère en effet une régulation directe. De plus, des éléments de réponse à l'AR ont été identifiés sur le promoteur de IRF-1. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine vont nous permettre de déterminer si les récepteurs à l'AR sont recrutés au niveau de ce promoteur, si ce recrutement se fait en réponse à l'AR et lequel des isotypes de RAR est mis en jeu. En effet, RAR α est exprimé dans ces cellules de

manière constitutive mais RAR β , considéré également comme un suppresseur de tumeur est induit suite au traitement par ATRA. Il serait donc intéressant de déterminer si un lien RAR β /IRF-1/TRAIL peut être établi.

- Potentiel anti-tumoral de TRAIL.

L'intérêt porté à TRAIL suite à son clonage a été renforcé par la découverte de son apparente sélectivité tumorale. De nombreuses études réalisées *in vitro* et dans des modèles animaux ont démontré que TRAIL serait capable d'induire l'apoptose des cellules tumorales sans affecter les cellules normales, ceci en faisant le candidat idéal en thérapie des cancers. Les bases moléculaires de cette sélectivité tumorale n'ont toujours pas été élucidées. Certaines hypothèses telles qu'une expression différentielle des différents types de récepteurs ou l'expression de protéines inhibitrices telles que FLIP ont été évoquées mais ne permettent pas de répondre à la question de manière globale. Nesterov et al ont démontré que le processus de transformation de cellules normales par l'activation de Ras sensibilise les cellules à l'action de TRAIL en augmentant le recrutement de la caspase 8 au niveau du DISC (Nesterov et al., 2004). Ce phénomène dépendrait de l'activation de la voie des MAP kinases mais le lien entre les 2 évènements n'est pas clairement établi. Des études menées au laboratoire tentent d'élucider cette sensibilisation des cellules à TRAIL au cours du processus de transformation.

Le rôle physiologique de TRAIL est également lié au cancer et serait majoritairement un rôle de surveillance des tumeurs. En effet, Les souris TRAIL $^{-/-}$ n'ont pas de phénotype particulier mais présentent une plus grande susceptibilité à développer des tumeurs (Cretney et al., 2002; Sedger et al., 2002). TRAIL est exprimé sur de nombreuses cellules impliquées dans le système immunitaire telles que les cellules dendritiques, les monocytes ou les cellules NK (natural killer). De nombreux travaux menés dans le groupe de Okumura ont démontré que l'induction de TRAIL par l'IFN γ sur les cellules NK était nécessaire pour leur activité d'immunosurveillance des cancers, dans le contexte de l'inhibition du processus d'initiation tumorale ou dans leur fonctions anti-métastatiques (pour revue, voir (Yagita et al., 2004)). Dans un contexte un peu différent, il a été démontré que des cellules NK activées *ex vivo* provenant de patient AML-M4 peuvent induire l'apoptose des cellules AML via l'induction de TRAIL lorsque celles-ci sont cultivées *ex vivo* mais également *in vivo* dans un modèle murin (Nieda et al., 2001). Ceci démontre que l'induction de TRAIL sur les cellules NK

activées pourrait être utilisée en thérapie immunitaire adaptative des patients AML et peut-être dans d'autres cancers.

Des expériences réalisées dans des modèles murins ont démontré que le traitement des souris par TRAIL exogène permet la régression de tumeurs et ne présente pas de toxicité comparé à TNF α ou FasL (pour revue, voir (Yagita et al., 2004)). Des essais cliniques ont été récemment initiés afin de valider l'utilisation de TRAIL en thérapie des cancers. Des anticorps anti-DR5 capables d'activer la voie apoptotique extrinsèque sont également en cours de développement. Il est donc très intéressant de constater que l'induction de TRAIL peut être médiée par différents agents anti-tumoraux tels que l'AR ou l'INF γ . Plus récemment l'induction de TRAIL par les inhibiteurs de HDAC a été démontrée dans des modèles cellulaires et murins d'AML. Cette induction de TRAIL est responsable de l'effet apoptotique des inhibiteurs de HDAC et pourrait expliquer la sélectivité tumorale décrite pour certaines de ces molécules (Insinga et al., 2005; Nebbioso et al., 2005). Induire l'expression de TRAIL dans les cellules tumorales par l'utilisation de molécules anti-cancéreuses semble être une stratégie prometteuse pour lutter contre le développement des tumeurs. Enfin, de nombreuses études ont démontré que la combinaison de TRAIL avec certains agents chimiothérapeutiques peut être très efficace dans le traitement de cellules cancéreuses. En effet, ces agents chimiothérapeutiques, de même que l'irradiation des cellules par les UV activent le suppresseur de tumeur p53 qui est lui-même capable d'activer la transcription des récepteurs DR4 et DR5. Ainsi, l'induction de l'expression de ces récepteurs permet de sensibiliser les cellules à l'apoptose induite par TRAIL.

En conclusion, l'activité anti-tumorale intrinsèque de TRAIL, son action synergique avec certains agents chimiothérapeutiques et son induction par d'autres agents anti-tumoraux tels que l'AR font de TRAIL un candidat idéal dans la thérapie de nombreux types de cancer.

6.2. L'apoptose induite par les rexinoïdes

- Voies apoptotiques impliquées.

L'apoptose induite par les rexinoïdes en condition pauvre en sérum implique un mécanisme très différent de celui des rétinoïdes et ne repose pas sur l'induction de TRAIL. Le traitement par un rexinoïde induit une dépolarisation de la membrane mitochondriale et un

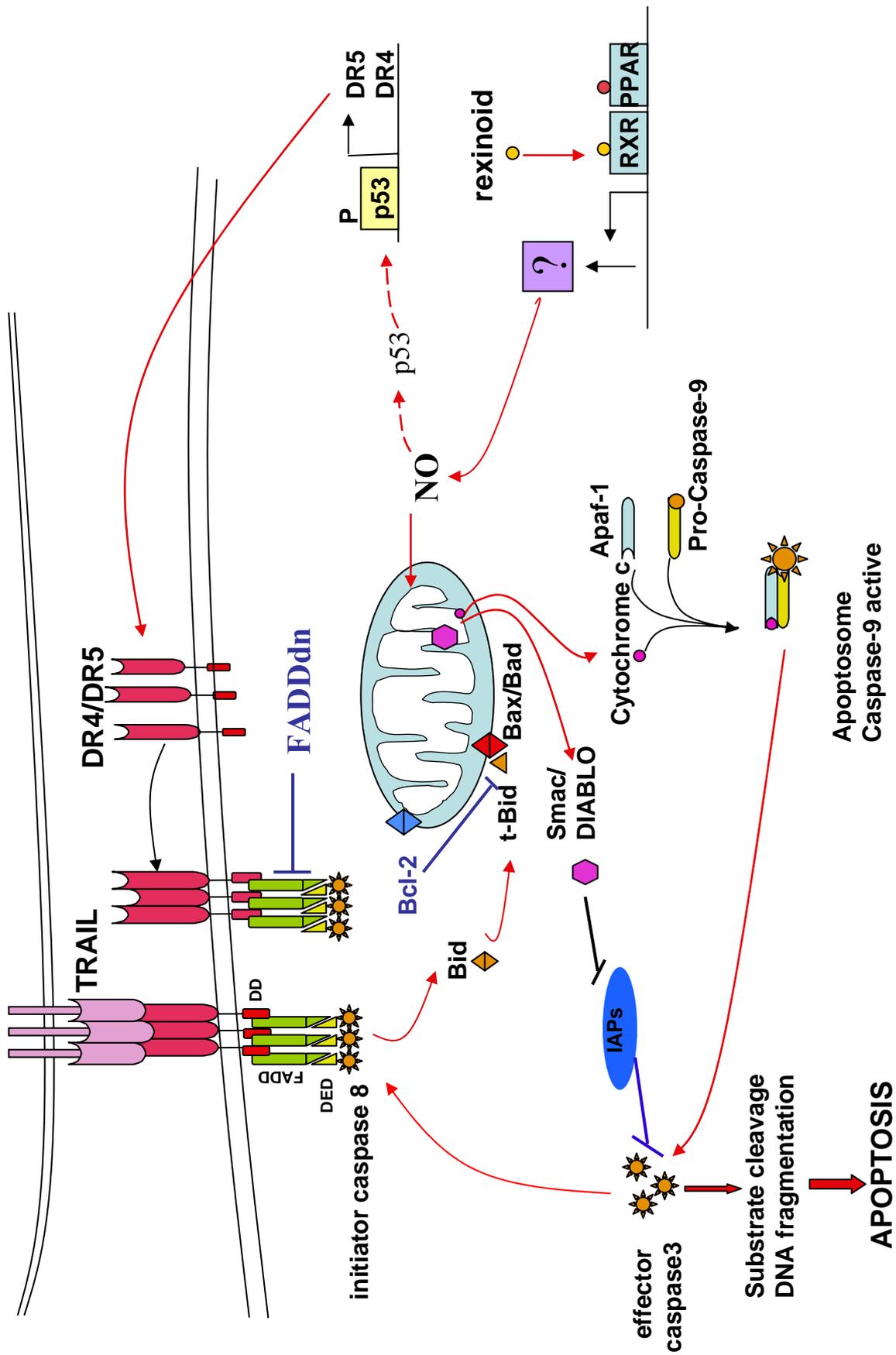


Figure 24 : Apoptose induite par les rexinoïdes : schéma global.

relargage du cytochrome c de manière très rapide. De plus, la surexpression de bcl-2 diminue de manière drastique l'apoptose induite par les rexinoïdes, démontrant une contribution majeure de la voie apoptotique intrinsèque. Ces dernières années, l'activation de la caspase 2 en aval de la mitochondrie a été suggérée comme mécanisme d'activation de la voie apoptotique intrinsèque (voir introduction). Cependant, l'absence d'inhibition du relargage du cytochrome c par l'inhibiteur général de caspase Z-VAD démontre qu'aucune activation de caspase ne précède cette étape et exclu donc une implication de la caspase 2.

Nous avons également démontré la présence d'une boucle d'amplification du signal apoptotique : lorsque la caspase 3 est clivée suite à l'activation de la voie mitochondriale, elle induit le clivage de la caspase 8 qui propage à son tour le signal apoptotique. La contribution de la caspase 9 n'est pas très claire dans ce système. En effet, l'addition d'un inhibiteur de la caspase 9 ne diminue pas l'apoptose induite par les rexinoïdes lorsqu'il est utilisé seul mais seulement lorsqu'il est combiné aux inhibiteurs de caspase 8 et 10. De plus, alors qu'une inhibition de la caspase 3 bloque l'activation de la caspase 8, l'inhibition de la caspase 9 n'induit pas ce même effet. Ceci démontre que le clivage de la caspase 9 n'est pas suffisant pour activer la caspase 3 et suggère un rôle fondamental de Smac/diablo dans ce processus. Un mécanisme similaire a déjà été décrit dans le cadre de l'apoptose induite par TRAIL (Deng et al., 2002). De plus, l'apoptose induite par différents stimuli n'est pas modifiée dans des cellules caspase 9^{-/-}, démontrant que son activation n'est pas toujours nécessaire à la transduction du signal apoptotique (Marsden et al., 2002). Afin de clarifier le rôle de cette caspase dans l'apoptose induite par les rexinoïdes, nous allons exprimer un dominant négatif de la caspase 9 dans les cellules PLB985.

Une seconde boucle d'amplification a été mise en évidence et implique l'induction tardive de DR5 et l'activation de la voie extrinsèque. Ceci explique la diminution partielle de l'apoptose induite par les rexinoïdes en présence d'un dominant négatif de FADD.

En conclusion, les rexinoïdes induisent l'apoptose des cellules PLB985 via l'activation principale de la voie mitochondriale et l'activation secondaire de la voie extrinsèque (**figure 24**)

- Rexinoïde et NO

Nous avons ensuite démontré que cette atteinte à l'intégrité de la mitochondrie est dépendante de la production d'oxide nitrique (NO). Le lien entre les rexinoïdes et la

production de NO n'est pas encore élucidé. Il existe 3 enzymes capables de produire le NO : les NO synthases endothéliales (eNOS), neuronales (nNOS) ou inducibles (iNOS). Le NO est un régulateur important de l'apoptose capable selon les circonstances d'induire ou de prévenir la mort cellulaire. Il apparaît de manière générale qu'une production basale de NO par la eNOS protège les cellules de l'apoptose alors qu'une production élevée de NO par la iNOS induit l'apoptose des cellules (pour revue, voir (Brune and Schneiderhan, 2003; Razavi et al., 2005)). Il semble plus probable que le NO produit suite au traitement rexinoïde provienne de l'expression de la iNOS. Il est donc nécessaire de vérifier si cette protéine est effectivement induite suite au traitement rexinoïde.

Au niveau moléculaire, les voies d'activation de la transcription de iNOS semble varier selon les types cellulaires et les stimuli reçus (pour revue, voir (Kleinert et al., 2003)). Entre autres, NF-kB est une cible essentielle des activateurs ou inhibiteurs de l'expression de iNOS et différents éléments de réponse ont été identifiés. Certains travaux rapportent une activation de NF-kB par des agonistes de PPAR γ (Schlezinger et al., 2002). Il serait donc possible d'imaginer que l'activation de l'hétérodimère RXR-PPAR γ par un rexinoïde puisse activer la voie NF-kB qui activerait l'expression de iNOS. Cependant, les nombreux éléments de réponse présents au niveau du promoteur de iNOS permettent également d'envisager d'autres scénarios et peut-être l'induction directe de iNOS par l'hétérodimère RXR-PPAR γ .

Une fois produit, le NO peut moduler l'apoptose selon différents mécanismes. La mitochondrie est l'une des cibles du NO et de nombreuses évidences démontrent que l'inhibition de la chaîne respiratoire via sa liaison et inhibition de la cytochrome c oxydase est un facteur clé dans l'apoptose induite par le NO (pour revue, voir (Brune, 2003; Moncada and Erusalimsky, 2002)) Suite à l'inhibition de la cytochrome c oxydase, une production de ROS ou peroxy-nitrite est induite et peut affecter l'intégrité de la mitochondrie. Il semble cependant que dans notre cas, la production de ROS ne joue aucun rôle dans l'apoptose puisque l'addition de molécules anti-oxidantes ne diminue pas l'apoptose induite par les rexinoïdes. Une inhibition prolongée de la cytochrome c oxydase conduit à la diminution du potentiel mitochondrial, l'ouverture du pore de transition et le relargage du cytochrome c (Beltran et al., 2000). Ce scénario semble correspondre à ce que nous observons. En effet, la production de NO entre 2 et 3 heures de traitement par un rexinoïde précède le relargage du cytochrome c qui apparaît maximum entre 3 et 4 heures de traitement. De plus, l'addition d'un inhibiteur de NOS inhibe cette étape de relargage du cytochrome c. Enfin, le NO peut

également activer l'apoptose via la voie de p53 : NO active les MAP Kinases p38 et JNK qui conduisent à la phosphorylation de p53 à la sérine 15. En conséquence, p53 est stabilisée, transloquée dans le noyau où elle active la transcription de gènes cibles impliqués dans l'apoptose (Li et al., 2004; Schneiderhan et al., 2003). DR5 est une cible directe de p53 (Wu et al., 1997). Il est donc possible que l'induction de DR5 observée suite au traitement par les rexinoïdes provienne d'une activation de p53 par le NO. Nous allons vérifier l'hypothèse de l'activation de p53 par l'utilisation d'anticorps sélectifs dirigés contre les formes phosphorylées de p53.

Ainsi, la production de NO par les rexinoïdes pourrait affecter l'apoptose à 2 niveaux : l'altération de la mitochondrie et l'induction plus tardive de DR5 via p53.

- Inhibition de l'apoptose par la voie des MAP kinases.

L'apoptose induite par les rexinoïdes peut être contrecarrée par l'addition de sérum de manière dose-dépendante. Nous avons démontré que EGF, IGF1 et IGF2 ont la capacité d'inhiber l'apoptose induite par les rexinoïdes en activant la voie des MAP kinases p42/44. L'inhibition de la voie p42/44 en présence de sérum permet d'ailleurs d'induire l'apoptose des cellules PLB985 traitées par les rexinoïdes. Nous n'avons pas encore élucidé le mécanisme par lequel p42/44 inhibe la signalisation induite par les rexinoïdes. Il existe en effet une multitude de cibles phosphorylables par p42/44 dont les protéines impliquées dans la transcription ou l'apoptose. Il paraît plus vraisemblable d'imaginer un rôle global de p42/44 et la phosphorylation de différentes cibles plutôt que la fonction primordiale d'une seule protéine. Cependant, nous pouvons émettre certaines hypothèses. Alors qu'aucun site de phosphorylation de p42/44 n'a été décrit pour RXR, PPAR γ peut être phosphorylé par p42/44 dans sa région A/B (Camp and Tafuri, 1997) et cette étape de phosphorylation réduit l'activité transcriptionnelle du récepteur. Il est donc possible qu'en présence de sérum et donc d'activation de la voie p42/44, on observe une phosphorylation de PPAR γ et une inhibition de l'hétérodimère PPAR γ -RXR. Lorsque cette voie est inhibée (en situation de concentration faible en sérum ou en présence d'un inhibiteur de la voie), PPAR γ n'est plus phosphorylé et un rexinoïde ou un agoniste de PPAR γ peut activer la transcription des gènes cibles et induire l'apoptose. De plus p42/44 comprends de nombreux facteurs impliqués dans l'apoptose parmi ses cibles. Par exemple, il a été démontré que la phosphorylation de bcl-2 par p42/44 renforce

ses capacités anti-apoptotiques. L'activation de la voie p42/44 par le sérum pourrait ainsi cibler bcl-2 et contrecarrer des potentiels effets apoptotiques des rétinoides.

D'autres études ont démontré un rôle pro-apoptotique des rétinoides et de RXR mais aucun mécanisme n'a été mis en évidence (voir introduction). Il serait donc intéressant d'étendre nos observations à d'autres modèles afin de vérifier si l'axe RXR-PPAR γ /NO est valide dans d'autres systèmes.

7. Implications thérapeutiques.

Les avancées réalisées ces dernières années vont permettre d'envisager certaines applications thérapeutiques. Tout d'abord, nous avons démontré que TRAIL était impliqué dans l'apoptose induite par les rétinoides dans les lignées APL. Or les traitements des patients par ATRA sont très toxiques et induisent de nombreux effets secondaires lourds. De plus, les traitements prolongés induisent très souvent l'acquisition de résistance. Il serait donc envisageable de diminuer les doses de rétinoides et compenser par l'addition de TRAIL. Le traitement par TRAIL avec des agents chimiothérapeutiques qui induisent l'expression de DR5 (par exemple rétinoides atypiques) pourrait être également envisagé. Les résultats des essais cliniques réalisés actuellement avec différentes formes de TRAIL recombinant seront donc très attendus.

Nous avons également démontré qu'un rétinol en présence d'une concentration élevée d'AMPC peut induire la différenciation des blastes de patients AML et pourrait représenter une alternative thérapeutique intéressante pour les patients. Cependant, l'utilisation d'analogues de l'AMPC ou de la forskolin qui active la production d'AMPC sont limités par leur toxicité élevée. Nous avons démontré qu'un inhibiteur de phosphodiésterase peut remplacer fonctionnellement un analogue de l'AMPC en augmentant la concentration intracellulaire d'AMPC et activant ainsi la PKA. Or, certains de ces inhibiteurs comme la théophylline sont approuvés pour un usage clinique. La théophylline est actuellement utilisée dans le traitement de l'asthme. De plus, certaines études ont démontré que la théophylline, utilisée seule ou en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques peut induire l'apoptose de différentes cellules cancéreuses. Des essais cliniques sont actuellement en cours dans le cadre du traitement de patients atteints de cancer du poumon (Hirsh et al., 2004). Un

cas de rémission d'un patient APL résistants aux traitements par l'AR et l'arsenic a été rapporté lorsque la théophylline a été ajoutée aux 2 traitements (Guillemin et al., 2002). Concernant les rexinoïdes ; le LG1069 (ou bexarotène ou targretin) est utilisé actuellement en clinique dans le traitement des formes cutanées des lymphomes T. Comparé aux rétinoïdes, les rexinoïdes ont l'avantage d'une toxicité très réduite. La combinaison du bexarotène et de la théophylline pourrait donc être utilisée pour traiter les patients AML réfractaires à d'autres traitements. Nous envisageons le début des premiers essais prochainement en collaboration avec l'hôpital de Naples.

Enfin, il a été démontré que l'inhibition de la voie ras/MEK/ERK pourrait être une stratégie intéressante pour traiter certains cancers. Ainsi de nombreux inhibiteurs de chacune des protéines impliquées dans la voie de signalisation ont été générés et certains sont actuellement en phase d'essai clinique (par exemple l'inhibiteur de MEK PD184352) (pour revue, voir (Lee and McCubrey, 2002)). L'induction de l'apoptose par certains de ces inhibiteurs dans les cellules AML a d'ailleurs été rapportée (Milella et al., 2002; Milella et al., 2001). Nous allons donc tester la combinaison rexinoïde/inhibiteur de MEK en commençant sur des blastes de patients AML *ex vivo* pour vérifier son efficacité. A plus long terme, cette combinaison pourrait être envisagée pour traiter les patients AML.

Conclusions et perspectives

Au cours de cette thèse, nous avons démontré que TRAIL est responsable de l'apoptose induite par les rétinoïdes dans différentes lignées myéloïdes. D'autres études réalisées au laboratoire dans la même période ont étendu cette observation aux lignées de cancer du sein, démontrant l'existence d'un véritable lien entre TRAIL et les rétinoïdes. De même, la connexion entre les inhibiteurs de HDAC et TRAIL a également été démontrée. Suite à ces différents travaux, une partie du laboratoire s'est focalisé sur l'étude de TRAIL selon 2 thématiques principales. La première s'intéresse à la régulation transcriptionnelle de l'expression de TRAIL par l'étude de son promoteur. Il serait effectivement intéressant de connaître avec précision les différents facteurs impliqués dans sa régulation et leur contribution respective afin de comprendre son mécanisme d'induction. La deuxième thématique est orientée sur la compréhension de la sélectivité tumorale de TRAIL, plus précisément de l'acquisition de sensibilité à TRAIL au cours du processus d'oncogenèse.

Au cours de la deuxième partie de ma thèse, nous avons démontré que l'activation de la voie de signalisation croisée entre RXR et la PKA induit la différenciation et l'apoptose des cellules AML résistantes aux rétinoïdes. Nous avons élucidé en partie le mécanisme moléculaire sous-jacent. Il est à présent nécessaire de déterminer quels sont les cibles de la PKA responsable de la dissociation de SMRT de l'hétérodimère RXR-RAR afin de déterminer précisément le mécanisme de la désubordination de RXR. Nous allons également initier des essais cliniques combinant les inhibiteurs de phosphodiésterase et les réxinoïdes en collaboration avec le centre d'hématologie de Naples.

Enfin, nous avons mis en évidence l'existence d'une voie de signalisation dépendante des réxinoïdes en absence de signalisation par les facteurs de croissance. Il reste encore certains points clés à étudier. Dans un premier temps, il serait nécessaire de clarifier l'étape de production du NO, de déterminer l'enzyme responsable et le mécanisme de son activation. La contribution de l'hétérodimère RXR-PPAR γ doit également être confirmée. Pour ceci, nous avons construits des vecteurs exprimant des shRNA dirigés contre RXR et surtout PPAR γ . Il serait également intéressant de déterminer si cette apoptose induite par les réxinoïdes est limitée aux cellules myéloïdes et également si elle est efficace in vivo. Nous envisageons en effet de tester une combinaison réxinoïde/inhibiteur de MAP kinase dans un modèle murin de cancer.

Références bibliographiques

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., and Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9, 423-432.
- Adam-Stitah, S., Penna, L., Chambon, P., and Rochette-Egly, C. (1999). Hyperphosphorylation of the retinoid X receptor alpha by activated c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem* 274, 18932-18941.
- Agarwal, V. R., Bischoff, E. D., Hermann, T., and Lamph, W. W. (2000). Induction of adipocyte-specific gene expression is correlated with mammary tumor regression by the retinoid X receptor-ligand LGD1069 (targretin). *Cancer Res* 60, 6033-6038.
- Altucci, L., and Gronemeyer, H. (2001). The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 181-193.
- Altucci, L., and Gronemeyer, H. (2004). Retinoids and TRAIL: two cooperating actors to fight against cancer. *Vitam Horm* 67, 319-345.
- Alvarez, R., Vega, M. J., Kammerer, S., Rossin, A., Germain, P., Gronemeyer, H., and de Lera, A. R. (2004). 9-cis-retinoic acid analogues with bulky hydrophobic rings: new RXR-selective agonists. *Bioorg Med Chem Lett* 14, 6117-6122.
- Aranda, A., and Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81, 1269-1304.
- Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2, 420-430.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11, 255-260.
- Ashkenazi, A., Pai, R. C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D. A., Marsters, S. A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A. E., Hebert, A., *et al.* (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 104, 155-162.
- Barnea, E., and Bergman, Y. (2000). Synergy of SF1 and RAR in activation of Oct-3/4 promoter. *J Biol Chem* 275, 6608-6619.
- Bartsch, D., Boye, B., Baust, C., zur Hausen, H., and Schwarz, E. (1992). Retinoic acid-mediated repression of human papillomavirus 18 transcription and different ligand regulation of the retinoic acid receptor beta gene in non-tumorigenic and tumorigenic HeLa hybrid cells. *Embo J* 11, 2283-2291.
- Bastien, J., Adam-Stitah, S., Plassat, J. L., Chambon, P., and Rochette-Egly, C. (2002). The phosphorylation site located in the A region of retinoic X receptor alpha is required for the antiproliferative effect of retinoic acid (RA) and the activation of RA target genes in F9 cells. *J Biol Chem* 277, 28683-28689.

- Bastien, J., Adam-Stitah, S., Riedl, T., Egly, J. M., Chambon, P., and Rochette-Egly, C. (2000). TFIIH interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7. *J Biol Chem* 275, 21896-21904.
- Bastien, J., and Rochette-Egly, C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328, 1-16.
- Beltran, B., Mathur, A., Duchen, M. R., Erusalimsky, J. D., and Moncada, S. (2000). The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14602-14607.
- Benoit, G., Altucci, L., Flexor, M., Ruchaud, S., Lillehaug, J., Raffelsberger, W., Gronemeyer, H., and Lanotte, M. (1999). RAR-independent RXR signaling induces t(15;17) leukemia cell maturation. *Embo J* 18, 7011-7018.
- Benoit, G., Roussel, M., Pendino, F., Segal-Bendirdjian, E., and Lanotte, M. (2001a). Orchestration of multiple arrays of signal cross-talk and combinatorial interactions for maturation and cell death: another vision of t(15;17) preleukemic blast and APL-cell maturation. *Oncogene* 20, 7161-7177.
- Benoit, G. R., Flexor, M., Besancon, F., Altucci, L., Rossin, A., Hillion, J., Balajthy, Z., Legres, L., Segal-Bendirdjian, E., Gronemeyer, H., and Lanotte, M. (2001b). Autonomous retinoid death signaling is suppressed by converging signaling pathways in immature leukemia cells. *Mol Endocrinol* 15, 1154-1169.
- Berard, J., Laboune, F., Mukuna, M., Masse, S., Kothary, R., and Bradley, W. E. (1996). Lung tumors in mice expressing an antisense RARbeta2 transgene. *Faseb J* 10, 1091-1097.
- Bernard, J., Weil, M., Boiron, M., Jacquillat, C., Flandrin, G., and Gemon, M. F. (1973). Acute promyelocytic leukemia: results of treatment by daunorubicin. *Blood* 41, 489-496.
- Bischof, O., Kirsh, O., Pearson, M., Itahana, K., Pelicci, P. G., and Dejean, A. (2002). Deconstructing PML-induced premature senescence. *Embo J* 21, 3358-3369.
- Bischoff, E. D., Gottardis, M. M., Moon, T. E., Heyman, R. A., and Lamph, W. W. (1998). Beyond tamoxifen: the retinoid X receptor-selective ligand LGD1069 (TARGRETIN) causes complete regression of mammary carcinoma. *Cancer Res* 58, 479-484.
- Blanc, E., Roux, G. L., Benard, J., and Raguenez, G. (2005). Low expression of Wnt-5a gene is associated with high-risk neuroblastoma. *Oncogene* 24, 1277-1283.
- Bode, A. M., and Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 4, 793-805.
- Bodmer, J. L., Holler, N., Reynard, S., Vinciguerra, P., Schneider, P., Juo, P., Blenis, J., and Tschopp, J. (2000a). TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol* 2, 241-243.
- Bodmer, J. L., Meier, P., Tschopp, J., and Schneider, P. (2000b). Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 275, 20632-20637.

- Bollag, W. (1972). Prophylaxis of chemically induced benign and malignant epithelial tumors by vitamin A acid (retinoic acid). *Eur J Cancer* 8, 689-693.
- Borriello, A., Pietra, V. D., Criscuolo, M., Oliva, A., Tonini, G. P., Iolascon, A., Zappia, V., and Ragione, F. D. (2000). p27Kip1 accumulation is associated with retinoic-induced neuroblastoma differentiation: evidence of a decreased proteasome-dependent degradation. *Oncogene* 19, 51-60.
- Bour, G., Plassat, J. L., Bauer, A., Lalevee, S., and Rochette-Egly, C. (2005). Vinexin {beta} Interacts with the Non-phosphorylated AF-1 Domain of Retinoid Receptor {gamma} (RAR{gamma}) and Represses RAR{gamma}-mediated Transcription. *J Biol Chem* 280, 17027-17037.
- Bourguet, W., Germain, P., and Gronemeyer, H. (2000). Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol Sci* 21, 381-388.
- Boya, P., Morales, M. C., Gonzalez-Polo, R. A., Andraeu, K., Gourdiere, I., Perfettini, J. L., Larochette, N., Deniaud, A., Baran-Marszak, F., Fagard, R., *et al.* (2003). The chemopreventive agent N-(4-hydroxyphenyl)retinamide induces apoptosis through a mitochondrial pathway regulated by proteins from the Bcl-2 family. *Oncogene* 22, 6220-6230.
- Breitman, T. R., Selonick, S. E., and Collins, S. J. (1980). Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 2936-2940.
- Brown, D., Kogan, S., Lagasse, E., Weissman, I., Alcalay, M., Pelicci, P. G., Atwater, S., and Bishop, J. M. (1997a). A PMLRARalpha transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2551-2556.
- Brown, T. R., Stonehouse, T. J., Branch, J. S., Brickell, P. M., and Katz, D. R. (1997b). Stable transfection of U937 cells with sense or antisense RXR-alpha cDNA suggests a role for RXR-alpha in the control of monoblastic differentiation induced by retinoic acid and vitamin D. *Exp Cell Res* 236, 94-102.
- Bruel, A., Benoit, G., De Nay, D., Brown, S., and Lanotte, M. (1995). Distinct apoptotic responses in maturation sensitive and resistant t(15;17) acute promyelocytic leukemia NB4 cells. 9-cis retinoic acid induces apoptosis independent of maturation and Bcl-2 expression. *Leukemia* 9, 1173-1184.
- Brune, B. (2003). Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? *Cell Death Differ* 10, 864-869.
- Brune, B., and Schneiderhan, N. (2003). Nitric oxide evoked p53-accumulation and apoptosis. *Toxicol Lett* 139, 119-123.
- Bush, T. S., St Coeur, M., Resendes, K. K., and Rosmarin, A. G. (2003). GA-binding protein (GABP) and Sp1 are required, along with retinoid receptors, to mediate retinoic acid responsiveness of CD18 (beta 2 leukocyte integrin): a novel mechanism of transcriptional regulation in myeloid cells. *Blood* 101, 311-317.

- Camp, H. S., and Tafuri, S. R. (1997). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272, 10811-10816.
- Campbell, R. A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N. M., Constantinidou, D., Ali, S., and Nakshatri, H. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 276, 9817-9824.
- Cao, X., Liu, W., Lin, F., Li, H., Kolluri, S. K., Lin, B., Han, Y. H., Dawson, M. I., and Zhang, X. K. (2004). Retinoid X receptor regulates Nur77/TR3-dependent apoptosis [corrected] by modulating its nuclear export and mitochondrial targeting. *Mol Cell Biol* 24, 9705-9725.
- Casini, T., and Pelicci, P. G. (1999). A function of p21 during promyelocytic leukemia cell differentiation independent of CDK inhibition and cell cycle arrest. *Oncogene* 18, 3235-3243.
- Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* 10, 940-954.
- Chan, S. L., and Yu, V. C. (2004). Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31, 119-128.
- Chaudhary, P. M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J., and Hood, L. (1997). Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 7, 821-830.
- Chen, J. D., and Evans, R. M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454-457.
- Chen, J. Y., Clifford, J., Zusi, C., Starrett, J., Tortolani, D., Ostrowski, J., Reczek, P. R., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1996). Two distinct actions of retinoid-receptor ligands. *Nature* 382, 819-822.
- Chen, J. Y., Penco, S., Ostrowski, J., Balaguer, P., Pons, M., Starrett, J. E., Reczek, P., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1995). RAR-specific agonist/antagonists which dissociate transactivation and AP1 transrepression inhibit anchorage-independent cell proliferation. *Embo J* 14, 1187-1197.
- Chen, Z. P., Iyer, J., Bourguet, W., Held, P., Mioskowski, C., Lebeau, L., Noy, N., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1998). Ligand- and DNA-induced dissociation of RXR tetramers. *J Mol Biol* 275, 55-65.
- Cheng, E. H., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T., and Korsmeyer, S. J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8, 705-711.
- Cho, Y. J., Kim, J. Y., Jeong, S. W., Lee, S. B., and Kim, O. N. (2003). Cyclic AMP induces activation of extracellular signal-regulated kinases in HL-60 cells: role in cAMP-induced differentiation. *Leuk Res* 27, 51-56.
- Chomienne, C., Balitrand, N., Cost, H., Degos, L., and Abita, J. P. (1986). Structure-activity relationships of aromatic retinoids on the differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937. *Leuk Res* 10, 1301-1305.

- Christine Pratt, M. A., Niu, M., and White, D. (2003). Differential regulation of protein expression, growth and apoptosis by natural and synthetic retinoids. *J Cell Biochem* 90, 692-708.
- Chuang, P. I., Yee, E., Karsan, A., Winn, R. K., and Harlan, J. M. (1998). A1 is a constitutive and inducible Bcl-2 homologue in mature human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 361-365.
- Clarke, N., Germain, P., Altucci, L., and Gronemeyer, H. (2004a). Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. *Expert Rev Mol Med* 6, 1-23.
- Clarke, N., Jimenez-Lara, A. M., Voltz, E., and Gronemeyer, H. (2004b). Tumor suppressor IRF-1 mediates retinoid and interferon anticancer signaling to death ligand TRAIL. *Embo J* 23, 3051-3060.
- Claudiel, T., Leibowitz, M. D., Fievet, C., Tailleux, A., Wagner, B., Repa, J. J., Torpier, G., Lobaccaro, J. M., Paterniti, J. R., Mangelsdorf, D. J., *et al.* (2001). Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2610-2615.
- Clifford, J., Chiba, H., Sobieszczuk, D., Metzger, D., and Chambon, P. (1996). RXRalpha-null F9 embryonal carcinoma cells are resistant to the differentiation, anti-proliferative and apoptotic effects of retinoids. *Embo J* 15, 4142-4155.
- Cosma, M. P. (2002). Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation. *Mol Cell* 10, 227-236.
- Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J. J., and Smyth, M. J. (2002). Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol* 168, 1356-1361.
- Croce, L. D. (2005). Chromatin modifying activity of leukaemia associated fusion proteins. *Hum Mol Genet* 14 *Spec No 1*, R77-84.
- Crowe, D. L., and Chandraratna, R. A. (2004). A retinoid X receptor (RXR)-selective retinoid reveals that RXR-alpha is potentially a therapeutic target in breast cancer cell lines, and that it potentiates antiproliferative and apoptotic responses to peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Breast Cancer Res* 6, R546-555.
- Dahl, A. R., Grossi, I. M., Houchens, D. P., Scovell, L. J., Placke, M. E., Imondi, A. R., Stoner, G. D., De Luca, L. M., Wang, D., and Mulshine, J. L. (2000). Inhaled isotretinoin (13-cis retinoic acid) is an effective lung cancer chemopreventive agent in A/J mice at low doses: a pilot study. *Clin Cancer Res* 6, 3015-3024.
- Dawson, M. I. (2004). Synthetic retinoids and their nuclear receptors. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 4, 199-230.
- Dawson, M. I., Hobbs, P. D., Peterson, V. J., Leid, M., Lange, C. W., Feng, K. C., Chen, G., Gu, J., Li, H., Kolluri, S. K., *et al.* (2001). Apoptosis induction in cancer cells by a novel analogue of 6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphthalenecarboxylic acid lacking retinoid receptor transcriptional activation activity. *Cancer Res* 61, 4723-4730.

- de Graaf, A. O., de Witte, T., and Jansen, J. H. (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: new therapeutic targets in hematological cancer? *Leukemia* 18, 1751-1759.
- de The, H., Lavau, C., Marchio, A., Chomienne, C., Degos, L., and Dejean, A. (1991). The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66, 675-684.
- de Urquiza, A. M., Liu, S., Sjoberg, M., Zetterstrom, R. H., Griffiths, W., Sjovall, J., and Perlmann, T. (2000). Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290, 2140-2144.
- de Vos, S., Dawson, M. I., Holden, S., Le, T., Wang, A., Cho, S. K., Chen, D. L., and Koeffler, H. P. (1997). Effects of retinoid X receptor-selective ligands on proliferation of prostate cancer cells. *Prostate* 32, 115-121.
- Defacque, H., Sevilla, C., Piquemal, D., Rochette-Egly, C., Marti, J., and Commes, T. (1997). Potentiation of VD-induced monocytic leukemia cell differentiation by retinoids involves both RAR and RXR signaling pathways. *Leukemia* 11, 221-227.
- Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. A., and Goodwin, R. G. (1997a). The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7, 813-820.
- Degli-Esposti, M. A., Smolak, P. J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C. P., DuBose, R. F., Goodwin, R. G., and Smith, C. A. (1997b). Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 186, 1165-1170.
- Degos, L., and Wang, Z. Y. (2001). All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 20, 7140-7145.
- del Rincon, S. V., Rousseau, C., Samanta, R., and Miller, W. H., Jr. (2003). Retinoic acid-induced growth arrest of MCF-7 cells involves the selective regulation of the IRS-1/PI 3-kinase/AKT pathway. *Oncogene* 22, 3353-3360.
- Deng, Y., Lin, Y., and Wu, X. (2002). TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev* 16, 33-45.
- Desagher, S., and Martinou, J. C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10, 369-377.
- Deveraux, Q. L., and Reed, J. C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13, 239-252.
- Di Croce, L., Raker, V. A., Corsaro, M., Fazi, F., Fanelli, M., Faretta, M., Fuks, F., Lo Coco, F., Kouzarides, T., Nervi, C., *et al.* (2002). Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 295, 1079-1082.
- Dilworth, F. J., and Chambon, P. (2001). Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene* 20, 3047-3054.

- Dimberg, A., Karlberg, I., Nilsson, K., and Oberg, F. (2003). Ser727/Tyr701-phosphorylated Stat1 is required for the regulation of c-Myc, cyclins, and p27Kip1 associated with ATRA-induced G0/G1 arrest of U-937 cells. *Blood* 102, 254-261.
- Dong, S., Stenoien, D. L., Qiu, J., Mancini, M. A., and Tweardy, D. J. (2004). Reduced intranuclear mobility of APL fusion proteins accompanies their mislocalization and results in sequestration and decreased mobility of retinoid X receptor alpha. *Mol Cell Biol* 24, 4465-4475.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
- Du, C., Redner, R. L., Cooke, M. P., and Lavau, C. (1999). Overexpression of wild-type retinoic acid receptor alpha (RARalpha) recapitulates retinoic acid-sensitive transformation of primary myeloid progenitors by acute promyelocytic leukemia RARalpha-fusion genes. *Blood* 94, 793-802.
- Duprez, E., Lillehaug, J. R., Naoe, T., and Lanotte, M. (1996). cAMP signalling is decisive for recovery of nuclear bodies (PODs) during maturation of RA-resistant t(15;17) promyelocytic leukemia NB4 cells expressing PML-RAR alpha. *Oncogene* 12, 2451-2459.
- Duprez, E., Wagner, K., Koch, H., and Tenen, D. G. (2003). C/EBPbeta: a major PML-RARA-responsive gene in retinoic acid-induced differentiation of APL cells. *Embo J* 22, 5806-5816.
- Easwaran, V., Pishvaian, M., Salimuddin, and Byers, S. (1999). Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Curr Biol* 9, 1415-1418.
- Egyed, M., Kollar, B., Rumi, G., Keller, E., Vass, J., and Fekete, S. (2003). Effect of retinoic acid treatment on cytogenetic remission of chronic myeloid leukaemia. *Acta Haematol* 109, 84-89.
- Ehrhardt, H., Fulda, S., Schmid, I., Hiscott, J., Debatin, K. M., and Jeremias, I. (2003). TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB. *Oncogene* 22, 3842-3852.
- Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E. R., Eichman, C., DiPrinzio, R., *et al.* (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 273, 14363-14367.
- Enoksson, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Bu, P., Kropotov, A., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2004). Caspase-2 permeabilizes the outer mitochondrial membrane and disrupts the binding of cytochrome c to anionic phospholipids. *J Biol Chem* 279, 49575-49578.
- Fajas, L., Debril, M. B., and Auwerx, J. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: from adipogenesis to carcinogenesis. *J Mol Endocrinol* 27, 1-9.
- Fanjul, A., Dawson, M. I., Hobbs, P. D., Jong, L., Cameron, J. F., Harlev, E., Graupner, G., Lu, X. P., and Pfahl, M. (1994). A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. *Nature* 372, 107-111.

- Farboud, B., Hauksdottir, H., Wu, Y., and Privalsky, M. L. (2003). Isotype-restricted corepressor recruitment: a constitutively closed helix 12 conformation in retinoic acid receptors beta and gamma interferes with corepressor recruitment and prevents transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 23, 2844-2858.
- Fazi, F., Travaglini, L., Carotti, D., Palitti, F., Diverio, D., Alcalay, M., McNamara, S., Miller, W. H., Coco, F. L., Pelicci, P. G., and Nervi, C. (2005). Retinoic acid targets DNA-methyltransferases and histone deacetylases during APL blast differentiation in vitro and in vivo. *Oncogene*.
- Ferrara, F. (2004). Unanswered questions in acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* 5, 443-450.
- Ferrara, F. F., Fazi, F., Bianchini, A., Padula, F., Gelmetti, V., Minucci, S., Mancini, M., Pelicci, P. G., Lo Coco, F., and Nervi, C. (2001). Histone deacetylase-targeted treatment restores retinoic acid signaling and differentiation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 61, 2-7.
- Fimia, G. M., and Sassone-Corsi, P. (2001). Cyclic AMP signalling. *J Cell Sci* 114, 1971-1972.
- Fleury, C., Mignotte, B., and Vayssiere, J. L. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 84, 131-141.
- Fraker, L. D., Halter, S. A., and Forbes, J. T. (1984). Growth inhibition by retinol of a human breast carcinoma cell line in vitro and in athymic mice. *Cancer Res* 44, 5757-5763.
- Freemantle, S. J., Spinella, M. J., and Dmitrovsky, E. (2003). Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene* 22, 7305-7315.
- Fry, C. J., and Peterson, C. L. (2001). Chromatin remodeling enzymes: who's on first? *Curr Biol* 11, R185-197.
- Fu, M., Wang, C., Zhang, X., and Pestell, R. G. (2004). Acetylation of nuclear receptors in cellular growth and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 68, 1199-1208.
- Germain, P., Iyer, J., Zechel, C., and Gronemeyer, H. (2002). Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy. *Nature* 415, 187-192.
- Germain, P., Kammerer, S., Perez, E., Peluso-Iltis, C., Tortolani, D., Zusi, F. C., Starrett, J., Lapointe, P., Daris, J. P., Marinier, A., *et al.* (2004). Rational design of RAR-selective ligands revealed by RARbeta crystal structure. *EMBO Rep* 5, 877-882.
- Gery, S., Park, D. J., Vuong, P. T., Chih, D. Y., Lemp, N., and Koeffler, H. P. (2004). Retinoic acid regulates C/EBP homologous protein expression (CHOP), which negatively regulates myeloid target genes. *Blood* 104, 3911-3917.
- Gianni, M., Bauer, A., Garattini, E., Chambon, P., and Rochette-Egly, C. (2002a). Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA- induced RARgamma degradation and transactivation. *Embo J* 21, 3760-3769.

- Gianni, M., Kopf, E., Bastien, J., Oulad-Abdelghani, M., Garattini, E., Chambon, P., and Rochette-Egly, C. (2002b). Down-regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is involved in retinoic acid-induced phosphorylation, degradation, and transcriptional activity of retinoic acid receptor gamma 2. *J Biol Chem* 277, 24859-24862.
- Gianni, M., Ponzanelli, I., Mologni, L., Reichert, U., Rambaldi, A., Terao, M., and Garattini, E. (2000). Retinoid-dependent growth inhibition, differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. Expression and activation of caspases. *Cell Death Differ* 7, 447-460.
- Gianni, M., Tarrade, A., Nigro, E. A., Garattini, E., and Rochette-Egly, C. (2003). The AF-1 and AF-2 domains of RAR gamma 2 and RXR alpha cooperate for triggering the transactivation and the degradation of RAR gamma 2/RXR alpha heterodimers. *J Biol Chem* 278, 34458-34466.
- Giannini, G., Dawson, M. I., Zhang, X., and Thiele, C. J. (1997). Activation of three distinct RXR/RAR heterodimers induces growth arrest and differentiation of neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 272, 26693-26701.
- Giguere, V., Ong, E. S., Segui, P., and Evans, R. M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330, 624-629.
- Gilliland, D. G. (2004). Targeted therapies in myeloid leukemias. *Ann Hematol* 83 Suppl 1, S75-76.
- Glasow, A., Prodromou, N., Xu, K., von Lindern, M., and Zelent, A. (2005). Retinoids and myelomonocytic growth factors cooperatively activate RARA and induce human myeloid leukemia cell differentiation via MAP kinase pathways. *Blood* 105, 341-349.
- Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 14, 121-141.
- Goto, H., Takahashi, H., Fujii, H., Ikuta, K., and Yokota, S. (2003). N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR) induces leukemia cell death via generation of reactive oxygen species. *Int J Hematol* 78, 219-225.
- Gottardis, M. M., Bischoff, E. D., Shirley, M. A., Wagoner, M. A., Lamph, W. W., and Heyman, R. A. (1996). Chemoprevention of mammary carcinoma by LGD1069 (Targretin): an RXR-selective ligand. *Cancer Res* 56, 5566-5570.
- Griffiths, G. J., Dubrez, L., Morgan, C. P., Jones, N. A., Whitehouse, J., Corfe, B. M., Dive, C., and Hickman, J. A. (1999). Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 144, 903-914.
- Grignani, F., De Matteis, S., Nervi, C., Tomassoni, L., Gelmetti, V., Cioce, M., Fanelli, M., Ruthardt, M., Ferrara, F. F., Zamir, I., *et al.* (1998). Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* 391, 815-818.
- Grignani, F., Fagioli, M., Ferrucci, P. F., Alcalay, M., and Pelicci, P. G. (1993). The molecular genetics of acute promyelocytic leukemia. *Blood Rev* 7, 87-93.

- Grignani, F., Valtieri, M., Gabbianelli, M., Gelmetti, V., Botta, R., Luchetti, L., Masella, B., Morsilli, O., Pelosi, E., Samoggia, P., *et al.* (2000). PML/RAR alpha fusion protein expression in normal human hematopoietic progenitors dictates myeloid commitment and the promyelocytic phenotype. *Blood* 96, 1531-1537.
- Grisolano, J. L., Wesselschmidt, R. L., Pelicci, P. G., and Ley, T. J. (1997). Altered myeloid development and acute leukemia in transgenic mice expressing PML-RAR alpha under control of cathepsin G regulatory sequences. *Blood* 89, 376-387.
- Gronemeyer, H., Gustafsson, J. A., and Laudet, V. (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3, 950-964.
- Guidez, F., Ivins, S., Zhu, J., Soderstrom, M., Waxman, S., and Zelent, A. (1998). Reduced retinoic acid-sensitivities of nuclear receptor corepressor binding to PML- and PLZF-RARalpha underlie molecular pathogenesis and treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 91, 2634-2642.
- Guillemin, M. C., Raffoux, E., Vitoux, D., Kogan, S., Soilhi, H., Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., Janin, A., Daniel, M. T., Gourmel, B., *et al.* (2002). In vivo activation of cAMP signaling induces growth arrest and differentiation in acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med* 196, 1373-1380.
- Guo, Y., Srinivasula, S. M., Druilhe, A., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (2002). Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem* 277, 13430-13437.
- Hafezi-Moghadam, A., Simoncini, T., Yang, E., Limbourg, F. P., Plumier, J. C., Rebsamen, M. C., Hsieh, C. M., Chui, D. S., Thomas, K. L., Prorock, A. J., *et al.* (2002). Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 8, 473-479.
- Hager, G. L., Nagaich, A. K., Johnson, T. A., Walker, D. A., and John, S. (2004). Dynamics of nuclear receptor movement and transcription. *Biochim Biophys Acta* 1677, 46-51.
- Halestrap, A. P., Woodfield, K. Y., and Connern, C. P. (1997). Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem* 272, 3346-3354.
- Hamada, K., Gleason, S. L., Levi, B. Z., Hirschfeld, S., Appella, E., and Ozato, K. (1989). H-2RIIBP, a member of the nuclear hormone receptor superfamily that binds to both the regulatory element of major histocompatibility class I genes and the estrogen response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 8289-8293.
- Hamasaki, A., Sendo, F., Nakayama, K., Ishida, N., Negishi, I., and Hatakeyama, S. (1998). Accelerated neutrophil apoptosis in mice lacking A1-a, a subtype of the bcl-2-related A1 gene. *J Exp Med* 188, 1985-1992.
- Han, J., Hajjar, D. P., Tauras, J. M., Feng, J., Gotto, A. M., Jr., and Nicholson, A. C. (2000). Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta2 decrease expression of CD36, the type B scavenger receptor, through mitogen-activated protein kinase phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Biol Chem* 275, 1241-1246.

- Harisiadis, L., Miller, R. C., Hall, E. J., and Borek, C. (1978). A vitamin A analogue inhibits radiation-induced oncogenic transformation. *Nature* 274, 486-487.
- Hauksdottir, H., Farboud, B., and Privalsky, M. L. (2003). Retinoic acid receptors beta and gamma do not repress, but instead activate target gene transcription in both the absence and presence of hormone ligand. *Mol Endocrinol* 17, 373-385.
- He, L. Z., Guidez, F., Tribioli, C., Peruzzi, D., Ruthardt, M., Zelent, A., and Pandolfi, P. P. (1998). Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL. *Nat Genet* 18, 126-135.
- He, L. Z., Tribioli, C., Rivi, R., Peruzzi, D., Pelicci, P. G., Soares, V., Cattoretti, G., and Pandolfi, P. P. (1997). Acute leukemia with promyelocytic features in PML/RARalpha transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5302-5307.
- Hirsh, L., Dantes, A., Suh, B. S., Yoshida, Y., Hosokawa, K., Tajima, K., Kotsuji, F., Merimsky, O., and Amsterdam, A. (2004). Phosphodiesterase inhibitors as anti-cancer drugs. *Biochem Pharmacol* 68, 981-988.
- Ho, C. K. (1985). Synergistic anticellular effect of a combination of beta-interferon and retinoic acid against U937 cells. *Cancer Res* 45, 5348-5351.
- Hoffmann, B., Lehmann, J. M., Zhang, X. K., Hermann, T., Husmann, M., Graupner, G., and Pfahl, M. (1990). A retinoic acid receptor-specific element controls the retinoic acid receptor-beta promoter. *Mol Endocrinol* 4, 1727-1736.
- Holmes, W. F., Soprano, D. R., and Soprano, K. J. (2003a). Comparison of the mechanism of induction of apoptosis in ovarian carcinoma cells by the conformationally restricted synthetic retinoids CD437 and 4-HPR. *J Cell Biochem* 89, 262-278.
- Holmes, W. F., Soprano, D. R., and Soprano, K. J. (2003b). Early events in the induction of apoptosis in ovarian carcinoma cells by CD437: activation of the p38 MAP kinase signal pathway. *Oncogene* 22, 6377-6386.
- Holmes, W. F., Soprano, D. R., and Soprano, K. J. (2004). Synthetic retinoids as inducers of apoptosis in ovarian carcinoma cell lines. *J Cell Physiol* 199, 317-329.
- Hong, S. H., and Privalsky, M. L. (2000). The SMRT corepressor is regulated by a MEK-1 kinase pathway: inhibition of corepressor function is associated with SMRT phosphorylation and nuclear export. *Mol Cell Biol* 20, 6612-6625.
- Hong, S. H., Yang, Z., and Privalsky, M. L. (2001). Arsenic trioxide is a potent inhibitor of the interaction of SMRT corepressor with its transcription factor partners, including the PML-retinoic acid receptor alpha oncoprotein found in human acute promyelocytic leukemia. *Mol Cell Biol* 21, 7172-7182.
- Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K., and et al. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.

- Houle, B., Rochette-Egly, C., and Bradley, W. E. (1993). Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor beta in human epidermoid lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 985-989.
- Hsu, S. L., Hsu, J. W., Liu, M. C., Chen, L. Y., and Chang, C. D. (2000). Retinoic acid-mediated G1 arrest is associated with induction of p27(Kip1) and inhibition of cyclin-dependent kinase 3 in human lung squamous carcinoma CH27 cells. *Exp Cell Res* *258*, 322-331.
- Hu, L., Crowe, D. L., Rheinwald, J. G., Chambon, P., and Gudas, L. J. (1991). Abnormal expression of retinoic acid receptors and keratin 19 by human oral and epidermal squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res* *51*, 3972-3981.
- Hu, X., and Lazar, M. A. (2000). Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* *11*, 6-10.
- Huang, C., Ma, W. Y., Dawson, M. I., Rincon, M., Flavell, R. A., and Dong, Z. (1997). Blocking activator protein-1 activity, but not activating retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 5826-5830.
- Huang, M. E., Ye, Y. C., Chen, S. R., Chai, J. R., Lu, J. X., Zhao, L., Gu, L. J., and Wang, Z. Y. (1988). Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* *72*, 567-572.
- Huggenvik, J. I., Collard, M. W., Kim, Y. W., and Sharma, R. P. (1993). Modification of the retinoic acid signaling pathway by the catalytic subunit of protein kinase-A. *Mol Endocrinol* *7*, 543-550.
- Hymowitz, S. G., Christinger, H. W., Fuh, G., Ultsch, M., O'Connell, M., Kelley, R. F., Ashkenazi, A., and de Vos, A. M. (1999). Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol Cell* *4*, 563-571.
- Hymowitz, S. G., O'Connell, M. P., Ultsch, M. H., Hurst, A., Totpal, K., Ashkenazi, A., de Vos, A. M., and Kelley, R. F. (2000). A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry* *39*, 633-640.
- Ijpenberg, A., Tan, N.S., Gelman, L., Seydoux, J., Xu, J., Metzger, D., Canaple, L., Chambon, P., Wahli, W., and Devergne, B. (2004). In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *EMBO J* *23*, 2083-2091.
- Insinga, A., Monestiroli, S., Ronzoni, S., Carbone, R., Pearson, M., Pruneri, G., Viale, G., Appella, E., Pelicci, P., and Minucci, S. (2004). Impairment of p53 acetylation, stability and function by an oncogenic transcription factor. *Embo J* *23*, 1144-1154.
- Insinga, A., Monestiroli, S., Ronzoni, S., Gelmetti, V., Marchesi, F., Viale, A., Altucci, L., Nervi, C., Minucci, S., and Pelicci, P. G. (2005). Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med* *11*, 71-76.

- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* *388*, 190-195.
- Ishida, A., Sasaguri, T., Miwa, Y., Kosaka, C., Taba, Y., and Abumiya, T. (1999). Tumor suppressor p53 but not cGMP mediates NO-induced expression of p21(Waf1/Cip1/Sdi1) in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* *56*, 938-946.
- Ivanova, D., Gaudon, C., Rossin, A., Bourguet, W., and Gronemeyer, H. (2002). RAR-RXR selectivity and biological activity of new retinoic acid analogues with heterocyclic or polycyclic aromatic systems. *Bioorg Med Chem* *10*, 2099-2102.
- Ivanova, D., Rossin, A., Gronemeyer, H., Valla, A., Cartier, D., Le Guillou, R., and Labia, R. (2004). Structure-activity relationships of methylene or terminal side chain modified retinoids on the differentiation and cell death signaling in NB4 promyelocytic leukemia cells. *Bioorg Med Chem Lett* *14*, 4257-4261.
- Jensen, K., Shiels, C., and Freemont, P. S. (2001). PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* *20*, 7223-7233.
- Jeong, J. H., Park, J. S., Moon, B., Kim, M. C., Kim, J. K., Lee, S., Suh, H., Kim, N. D., Kim, J. M., Park, Y. C., and Yoo, Y. H. (2003). Orphan nuclear receptor Nur77 translocates to mitochondria in the early phase of apoptosis induced by synthetic chenodeoxycholic acid derivatives in human stomach cancer cell line SNU-1. *Ann N Y Acad Sci* *1010*, 171-177.
- John, A. M., Thomas, N. S., Mufti, G. J., and Padua, R. A. (2004). Targeted therapies in myeloid leukemia. *Semin Cancer Biol* *14*, 41-62.
- Johnson, B. S., Chandraratna, R. A., Heyman, R. A., Allegretto, E. A., Mueller, L., and Collins, S. J. (1999). Retinoid X receptor (RXR) agonist-induced activation of dominant-negative RXR-retinoic acid receptor alpha403 heterodimers is developmentally regulated during myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* *19*, 3372-3382.
- Kamashev, D., Vitoux, D., and De The, H. (2004). PML-RARA-RXR oligomers mediate retinoid and rexinoid/cAMP cross-talk in acute promyelocytic leukemia cell differentiation. *J Exp Med* *199*, 1163-1174.
- Kastner, P., and Chan, S. (2001). Function of RARalpha during the maturation of neutrophils. *Oncogene* *20*, 7178-7185.
- Kastner, P., Lawrence, H. J., Waltzinger, C., Ghyselinck, N. B., Chambon, P., and Chan, S. (2001). Positive and negative regulation of granulopoiesis by endogenous RARalpha. *Blood* *97*, 1314-1320.
- Kastner, P., Mark, M., and Chambon, P. (1995). Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* *83*, 859-869.
- Kastner, P., Mark, M., Leid, M., Gansmuller, A., Chin, W., Grondona, J. M., Decimo, D., Krezel, W., Dierich, A., and Chambon, P. (1996). Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. *Genes Dev* *10*, 80-92.

- Katagiri, Y., Takeda, K., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Ozato, K., and Guroff, G. (2000). Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B. *Nat Cell Biol* 2, 435-440.
- Kelly, L. M., Kutok, J. L., Williams, I. R., Boulton, C. L., Amaral, S. M., Curley, D. P., Ley, T. J., and Gilliland, D. G. (2002). PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8283-8288.
- Keriel, A., Stary, A., Sarasin, A., Rochette-Egly, C., and Egly, J. M. (2002). XPD mutations prevent TFIIH-dependent transactivation by nuclear receptors and phosphorylation of RARalpha. *Cell* 109, 125-135.
- Kim, J. S., Lee, H., Kim, H., Shim, Y. M., Han, J., Park, J., and Kim, D. H. (2004). Promoter methylation of retinoic acid receptor beta 2 and the development of second primary lung cancers in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 22, 3443-3450.
- Kinjo, K., Kizaki, M., Muto, A., Fukuchi, Y., Umezawa, A., Yamato, K., Nishihara, T., Hata, J., Ito, M., Ueyama, Y., and Ikeda, Y. (2000). Arsenic trioxide (As₂O₃)-induced apoptosis and differentiation in retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia model in hGM-CSF-producing transgenic SCID mice. *Leukemia* 14, 431-438.
- Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J., and Ashkenazi, A. (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 12, 611-620.
- Kiyoi, H., Naoe, T., Yokota, S., Nakao, M., Minami, S., Kuriyama, K., Takeshita, A., Saito, K., Hasegawa, S., Shimodaira, S., *et al.* (1997). Internal tandem duplication of FLT3 associated with leukocytosis in acute promyelocytic leukemia. Leukemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare (Kohseisho). *Leukemia* 11, 1447-1452.
- Kleinert, H., Schwarz, P. M., and Forstermann, U. (2003). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol Chem* 384, 1343-1364.
- Kliwer, S. A., Umesono, K., Noonan, D. J., Heyman, R. A., and Evans, R. M. (1992). Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 358, 771-774.
- Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136.
- Koken, M. H., Puvion-Dutilleul, F., Guillemain, M. C., Viron, A., Linares-Cruz, G., Stuurman, N., de Jong, L., Szosteki, C., Calvo, F., Chomienne, C., and *et al.* (1994). The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. *Embo J* 13, 1073-1083.
- Kolluri, S. K., Corr, M., James, S. Y., Bernasconi, M., Lu, D., Liu, W., Cottam, H. B., Leoni, L. M., Carson, D. A., and Zhang, X. K. (2005). The R-enantiomer of the nonsteroidal antiinflammatory drug etodolac binds retinoid X receptor and induces tumor-selective apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2525-2530.

- Konopleva, M., Elstner, E., McQueen, T. J., Tsao, T., Sudarikov, A., Hu, W., Schober, W. D., Wang, R. Y., Chism, D., Kornblau, S. M., *et al.* (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor ligands are potent inducers of differentiation and apoptosis in leukemias. *Mol Cancer Ther* 3, 1249-1262.
- Kopf, E., Plassat, J. L., Vivat, V., de The, H., Chambon, P., and Rochette-Egly, C. (2000). Dimerization with retinoid X receptors and phosphorylation modulate the retinoic acid-induced degradation of retinoic acid receptors alpha and gamma through the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 275, 33280-33288.
- Korsmeyer, S. J., Wei, M. C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K. J., and Schlesinger, P. H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7, 1166-1173.
- Kottaridis, P. D., Gale, R. E., Frew, M. E., Harrison, G., Langabeer, S. E., Belton, A. A., Walker, H., Wheatley, K., Bowen, D. T., Burnett, A. K., *et al.* (2001). The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* 98, 1752-1759.
- Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneiter, R., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (2002). Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111, 331-342.
- Lallemand-Breitenbach, V., Guillemin, M. C., Janin, A., Daniel, M. T., Degos, L., Kogan, S. C., Bishop, J. M., and de The, H. (1999). Retinoic acid and arsenic synergize to eradicate leukemic cells in a mouse model of acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med* 189, 1043-1052.
- Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., Puvion, F., Koken, M., Honore, N., Doubeikovsky, A., Duprez, E., Pandolfi, P. P., Puvion, E., Freemont, P., and de The, H. (2001). Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As₂O₃-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J Exp Med* 193, 1361-1371.
- Lanotte, M., Martin-Thouvenin, V., Najman, S., Balerini, P., Valensi, F., and Berger, R. (1991). NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood* 77, 1080-1086.
- Lasnitzki, I. (1955). The influence of A hypervitaminosis on the effect of 20-methylcholanthrene on mouse prostate glands grown in vitro. *Br J Cancer* 9, 434-441.
- Lassus, P., Opitz-Araya, X., and Lazebnik, Y. (2002). Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 297, 1352-1354.
- Laudet, V., and Gronemeyer, H. (2002). *The Nuclear receptor Facts Book* (San Diego, Academic Press).
- Le Beau, M. M., Bitts, S., Davis, E. M., and Kogan, S. C. (2002). Recurring chromosomal abnormalities in leukemia in PML-RARA transgenic mice parallel human acute promyelocytic leukemia. *Blood* 99, 2985-2991.

- Lee, H. Y., Suh, Y. A., Robinson, M. J., Clifford, J. L., Hong, W. K., Woodgett, J. R., Cobb, M. H., Mangelsdorf, D. J., and Kurie, J. M. (2000). Stress pathway activation induces phosphorylation of retinoid X receptor. *J Biol Chem* 275, 32193-32199.
- Lee, J. T., Jr., and McCubrey, J. A. (2002). The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia* 16, 486-507.
- Lee, K. H., Chang, M. Y., Ahn, J. I., Yu, D. H., Jung, S. S., Choi, J. H., Noh, Y. H., Lee, Y. S., and Ahn, M. J. (2002). Differential gene expression in retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells, NB4 and HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 1125-1133.
- Leid, M., Kastner, P., Lyons, R., Nakshatri, H., Saunders, M., Zacharewski, T., Chen, J. Y., Staub, A., Garnier, J. M., Mader, S., and et al. (1992). Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 68, 377-395.
- Lemotte, P. K., Keidel, S., and Apfel, C. M. (1996). Phytanic acid is a retinoid X receptor ligand. *Eur J Biochem* 236, 328-333.
- Lenhard, J. M., Lancaster, M. E., Paulik, M. A., Weiel, J. E., Binz, J. G., Sundseth, S. S., Gaskill, B. A., Lightfoot, R. M., and Brown, H. R. (1999). The RXR agonist LG100268 causes hepatomegaly, improves glycaemic control and decreases cardiovascular risk and cachexia in diabetic mice suffering from pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetologia* 42, 545-554.
- Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., and Korsmeyer, S. J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2, 183-192.
- Li, C. Q., Robles, A. I., Hanigan, C. L., Hofseth, L. J., Trudel, L. J., Harris, C. C., and Wogan, G. N. (2004). Apoptotic signaling pathways induced by nitric oxide in human lymphoblastoid cells expressing wild-type or mutant p53. *Cancer Res* 64, 3022-3029.
- Li, H., Kolluri, S. K., Gu, J., Dawson, M. I., Cao, X., Hobbs, P. D., Lin, B., Chen, G., Lu, J., Lin, F., *et al.* (2000). Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science* 289, 1159-1164.
- Lin, B., Kolluri, S. K., Lin, F., Liu, W., Han, Y. H., Cao, X., Dawson, M. I., Reed, J. C., and Zhang, X. K. (2004a). Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3. *Cell* 116, 527-540.
- Lin, E. Y., Orlofsky, A., Wang, H. G., Reed, J. C., and Prystowsky, M. B. (1996). A1, a Bcl-2 family member, prolongs cell survival and permits myeloid differentiation. *Blood* 87, 983-992.
- Lin, F., Xiao, D., Kolluri, S. K., and Zhang, X. (2000a). Unique anti-activator protein-1 activity of retinoic acid receptor beta. *Cancer Res* 60, 3271-3280.
- Lin, R. J., and Evans, R. M. (2000). Acquisition of oncogenic potential by RAR chimeras in acute promyelocytic leukemia through formation of homodimers. *Mol Cell* 5, 821-830.

- Lin, R. J., Nagy, L., Inoue, S., Shao, W., Miller, W. H., Jr., and Evans, R. M. (1998). Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* *391*, 811-814.
- Lin, X. F., Zhao, B. X., Chen, H. Z., Ye, X. F., Yang, C. Y., Zhou, H. Y., Zhang, M. Q., Lin, S. C., and Wu, Q. (2004b). RXRalpha acts as a carrier for TR3 nuclear export in a 9-cis retinoic acid-dependent manner in gastric cancer cells. *J Cell Sci* *117*, 5609-5621.
- Lin, Y., Ma, W., and Benchimol, S. (2000b). Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nat Genet* *26*, 122-127.
- Lindner, D. J., Borden, E. C., and Kalvakolanu, D. V. (1997). Synergistic antitumor effects of a combination of interferons and retinoic acid on human tumor cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* *3*, 931-937.
- Liu, B., Lee, H. Y., Weinzimer, S. A., Powell, D. R., Clifford, J. L., Kurie, J. M., and Cohen, P. (2000). Direct functional interactions between insulin-like growth factor-binding protein-3 and retinoid X receptor-alpha regulate transcriptional signaling and apoptosis. *J Biol Chem* *275*, 33607-33613.
- Liu, H., Shaw, C. K., Reineke, E. L., Liu, Y., and Kao, H. Y. (2004). Retinoid X receptor alpha (RXRalpha) helix 12 plays an inhibitory role in the recruitment of the p160 co-activators by unliganded RXRalpha/retinoic acid receptor alpha heterodimers. *J Biol Chem* *279*, 45208-45218.
- Liu, M., Iavarone, A., and Freedman, L. P. (1996a). Transcriptional activation of the human p21(WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation. *J Biol Chem* *271*, 31723-31728.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996b). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* *86*, 147-157.
- Liu, Y., Lee, M. O., Wang, H. G., Li, Y., Hashimoto, Y., Klaus, M., Reed, J. C., and Zhang, X. (1996c). Retinoic acid receptor beta mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. *Mol Cell Biol* *16*, 1138-1149.
- Llambi, F., Laurencio, F. C., Gozuacik, D., Guix, C., Pays, L., Del Rio, G., Kimchi, A., and Mehlen, P. (2005). The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. *Embo J*.
- Lohnes, D., Mark, M., Mendelsohn, C., Dolle, P., Dierich, A., Gorry, P., Gansmuller, A., and Chambon, P. (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants. *Development* *120*, 2723-2748.
- Lopez-Carballo, G., Moreno, L., Masia, S., Perez, P., and Baretino, D. (2002). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* *277*, 25297-25304.
- Lotan, R., and Lotan, Y. (2004). Retinoic acid receptor beta2 hypermethylation: implications for prostate cancer detection, prevention, and therapy. *Clin Cancer Res* *10*, 3935-3936.

- Lotan, R., Neumann, G., and Lotan, D. (1980). Relationships among retinoid structure, inhibition of growth, and cellular retinoic acid-binding protein in cultured S91 melanoma cells. *Cancer Res* 40, 1097-1102.
- Lovat, P. E., Corazzari, M., Goranov, B., Piacentini, M., and Redfern, C. P. (2004a). Molecular mechanisms of fenretinide-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *Ann N Y Acad Sci* 1028, 81-89.
- Lovat, P. E., Di Sano, F., Corazzari, M., Fazi, B., Donnorso, R. P., Pearson, A. D., Hall, A. G., Redfern, C. P., and Piacentini, M. (2004b). Gangliosides link the acidic sphingomyelinase-mediated induction of ceramide to 12-lipoxygenase-dependent apoptosis of neuroblastoma in response to fenretinide. *J Natl Cancer Inst* 96, 1288-1299.
- Lovat, P. E., Oliverio, S., Corazzari, M., Ranalli, M., Pearson, A. D., Melino, G., Piacentini, M., and Redfern, C. P. (2003). Induction of GADD153 and Bak: novel molecular targets of fenretinide-induced apoptosis of neuroblastoma. *Cancer Lett* 197, 157-163.
- Ludwig, K. W., Lowey, B., and Niles, R. M. (1980). Retinoic acid increases cyclic AMP-dependent protein kinase activity in murine melanoma cells. *J Biol Chem* 255, 5999-6002.
- Lundberg, A. S., and Weinberg, R. A. (1999). Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 35, 1886-1894.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.
- Luria, A., and Furlow, J. D. (2004). Spatiotemporal retinoid-X receptor activation detected in live vertebrate embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8987-8992.
- MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G. M., and Alnemri, E. S. (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 272, 25417-25420.
- Mader, S., Leroy, P., Chen, J. Y., and Chambon, P. (1993). Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements. Selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptors. *J Biol Chem* 268, 591-600.
- Malik, S., and Roeder, R. G. (2000). Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem Sci* 25, 277-283.
- Mangelsdorf, D. J., Borgmeyer, U., Heyman, R. A., Zhou, J. Y., Ong, E. S., Oro, A. E., Kakizuka, A., and Evans, R. M. (1992). Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* 6, 329-344.
- Mangelsdorf, D. J., and Evans, R. M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.
- Mangelsdorf, D. J., Ong, E. S., Dyck, J. A., and Evans, R. M. (1990). Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345, 224-229.

- Marsden, V. S., O'Connor, L., O'Reilly, L. A., Silke, J., Metcalf, D., Ekert, P. G., Huang, D. C., Cecconi, F., Kuida, K., Tomaselli, K. J., *et al.* (2002). Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* *419*, 634-637.
- Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A. D., Godowski, P., and Ashkenazi, A. (1997). A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* *7*, 1003-1006.
- Maruvada, P., Baumann, C. T., Hager, G. L., and Yen, P. M. (2003). Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors. *J Biol Chem* *278*, 12425-12432.
- Mascrez, B., Mark, M., Dierich, A., Ghyselinck, N. B., Kastner, P., and Chambon, P. (1998). The RXRalpha ligand-dependent activation function 2 (AF-2) is important for mouse development. *Development* *125*, 4691-4707.
- Matsuo, T., Seth, P., and Thiele, C. J. (2001). Increased expression of p27Kip1 arrests neuroblastoma cell growth. *Med Pediatr Oncol* *36*, 97-99.
- Matsushima-Nishiwaki, R., Okuno, M., Adachi, S., Sano, T., Akita, K., Moriwaki, H., Friedman, S. L., and Kojima, S. (2001). Phosphorylation of retinoid X receptor alpha at serine 260 impairs its metabolism and function in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* *61*, 7675-7682.
- Mattson, M. P., and Kroemer, G. (2003). Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med* *9*, 196-205.
- Mazelin, L., Bernet, A., Bonod-Bidaud, C., Pays, L., Arnaud, S., Gespach, C., Bredesen, D. E., Scoazec, J. Y., and Mehlen, P. (2004). Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature* *431*, 80-84.
- McKenna, N. J., and O'Malley, B. W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* *108*, 465-474.
- Meani, N., Minardi, S., Licciulli, S., Gelmetti, V., Coco, F. L., Nervi, C., Pelicci, P. G., Muller, H., and Alcalay, M. (2005). Molecular signature of retinoic acid treatment in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*.
- Mehlen, P., and Bredesen, D. E. (2004). The dependence receptor hypothesis. *Apoptosis* *9*, 37-49.
- Melino, G., Thiele, C. J., Knight, R. A., and Piantini, M. (1997). Retinoids and the control of growth/death decisions in human neuroblastoma cell lines. *J Neurooncol* *31*, 65-83.
- Melnick, A., and Licht, J. D. (1999). Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* *93*, 3167-3215.
- Mendelsohn, C., Lohnes, D., Decimo, D., Lufkin, T., LeMeur, M., Chambon, P., and Mark, M. (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* *120*, 2749-2771.

- Metivier, R., Penot, G., Hubner, M. R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., and Gannon, F. (2003). Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* *115*, 751-763.
- Milella, M., Estrov, Z., Kornblau, S. M., Carter, B. Z., Konopleva, M., Tari, A., Schober, W. D., Harris, D., Leysath, C. E., Lopez-Berestein, G., *et al.* (2002). Synergistic induction of apoptosis by simultaneous disruption of the Bcl-2 and MEK/MAPK pathways in acute myelogenous leukemia. *Blood* *99*, 3461-3464.
- Milella, M., Kornblau, S. M., Estrov, Z., Carter, B. Z., Lapillonne, H., Harris, D., Konopleva, M., Zhao, S., Estey, E., and Andreeff, M. (2001). Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest* *108*, 851-859.
- Minucci, S., Maccarana, M., Cioce, M., De Luca, P., Gelmetti, V., Segalla, S., Di Croce, L., Giavara, S., Matteucci, C., Gobbi, A., *et al.* (2000). Oligomerization of RAR and AML1 transcription factors as a novel mechanism of oncogenic activation. *Mol Cell* *5*, 811-820.
- Minucci, S., Monestiroli, S., Giavara, S., Ronzoni, S., Marchesi, F., Insinga, A., Diverio, D., Gasparini, P., Capillo, M., Colombo, E., *et al.* (2002). PML-RAR induces promyelocytic leukemias with high efficiency following retroviral gene transfer into purified murine hematopoietic progenitors. *Blood* *100*, 2989-2995.
- Mistry, A. R., Pedersen, E. W., Solomon, E., and Grimwade, D. (2003). The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Rev* *17*, 71-97.
- Moncada, S., and Erusalimsky, J. D. (2002). Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 214-220.
- Moreb, J. S., and Schweder, M. (1997). Human A1, a Bcl-2-related gene, is induced in leukemic cells by cytokines as well as differentiating factors. *Leukemia* *11*, 998-1004.
- Mukherjee, R., Davies, P. J., Crombie, D. L., Bischoff, E. D., Cesario, R. M., Jow, L., Hamann, L. G., Boehm, M. F., Mondon, C. E., Nadzan, A. M., *et al.* (1997). Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature* *386*, 407-410.
- Muto, Y., Moriwaki, H., Ninomiya, M., Adachi, S., Saito, A., Takasaki, K. T., Tanaka, T., Tsurumi, K., Okuno, M., Tomita, E., *et al.* (1996). Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatoma Prevention Study Group. *N Engl J Med* *334*, 1561-1567.
- Muzio, M. (1998). Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis. *Int J Clin Lab Res* *28*, 141-147.
- Nagaich, A. K., Walker, D. A., Wolford, R., and Hager, G. L. (2004). Rapid periodic binding and displacement of the glucocorticoid receptor during chromatin remodeling. *Mol Cell* *14*, 163-174.
- Nagy, L., Thomazy, V. A., Chandraratna, R. A., Heyman, R. A., and Davies, P. J. (1996). Retinoid-regulated expression of BCL-2 and tissue transglutaminase during the differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia (HL-60) cells. *Leuk Res* *20*, 499-505.

- Nagy, L., Thomazy, V. A., Shipley, G. L., Fesus, L., Lamph, W., Heyman, R. A., Chandraratna, R. A., and Davies, P. J. (1995). Activation of retinoid X receptors induces apoptosis in HL-60 cell lines. *Mol Cell Biol* *15*, 3540-3551.
- Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J. G., Chen, H., and Evans, R. M. (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* *93*, 229-240.
- Nakagawa, S., Fujii, T., Yokoyama, G., Kazanietz, M. G., Yamana, H., and Shirouzu, K. (2003). Cell growth inhibition by all-trans retinoic acid in SKBR-3 breast cancer cells: involvement of protein kinase Calpha and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase. *Mol Carcinog* *38*, 106-116.
- Naumovski, L., and Cleary, M. L. (1994). Bcl2 inhibits apoptosis associated with terminal differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells. *Blood* *83*, 2261-2267.
- Nebbio, A., Clarke, N., Voltz, E., Germain, E., Ambrosino, C., Bontempo, P., Alvarez, R., Schiavone, E. M., Ferrara, F., Bresciani, F., *et al.* (2005). Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat Med* *11*, 77-84.
- Nervi, C., Ferrara, F. F., Fanelli, M., Rippo, M. R., Tomassini, B., Ferrucci, P. F., Ruthardt, M., Gelmetti, V., Gambacorti-Passerini, C., Diverio, D., *et al.* (1998). Caspases mediate retinoic acid-induced degradation of the acute promyelocytic leukemia PML/RARalpha fusion protein. *Blood* *92*, 2244-2251.
- Nesterov, A., Nikrad, M., Johnson, T., and Kraft, A. S. (2004). Oncogenic Ras sensitizes normal human cells to tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res* *64*, 3922-3927.
- Nguyen, T., Hocker, J. E., Thomas, W., Smith, S. A., Norris, M. D., Haber, M., Cheung, B., and Marshall, G. M. (2003). Combined RAR alpha- and RXR-specific ligands overcome N-myc-associated retinoid resistance in neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* *302*, 462-468.
- Nieda, M., Nicol, A., Koezuka, Y., Kikuchi, A., Lapteva, N., Tanaka, Y., Tokunaga, K., Suzuki, K., Kayagaki, N., Yagita, H., *et al.* (2001). TRAIL expression by activated human CD4(+)V alpha 24NKT cells induces in vitro and in vivo apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Blood* *97*, 2067-2074.
- Niederreither, K., Subbarayan, V., Dolle, P., and Chambon, P. (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* *21*, 444-448.
- Niles, R. M. (2004). Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. *Mutat Res* *555*, 81-96.
- Njar, V. C. (2002). Cytochrome p450 retinoic acid 4-hydroxylase inhibitors: potential agents for cancer therapy. *Mini Rev Med Chem* *2*, 261-269.
- Notario, A., Rolandi, M. L., and Mazzucchelli, I. (1996). Peripheral blood and bone marrow changes after treatment with ATRA and G-CSF in AML, APL and blast crisis following Vaquez's disease. *Haematologica* *81*, 261-264.

- Oka, Y., and Takeda, K. (1997). Retinoic acid combined with GM-CSF induces morphological changes with segmented nuclei in human myeloblastic leukemia ML-1 cells. *Anticancer Res* *17*, 1951-1955.
- Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* *74*, 609-619.
- Onodera, M., Kunisada, T., Nishikawa, S., Sakiyama, Y., and Matsumoto, S. (1995). Overexpression of retinoic acid receptor alpha suppresses myeloid cell differentiation at the promyelocyte stage. *Oncogene* *11*, 1291-1298.
- Ortiz, M. A., Bayon, Y., Lopez-Hernandez, F. J., and Piedrafita, F. J. (2002). Retinoids in combination therapies for the treatment of cancer: mechanisms and perspectives. *Drug Resist Updat* *5*, 162-175.
- Osburn, D. L., Shao, G., Seidel, H. M., and Schulman, I. G. (2001). Ligand-dependent degradation of retinoid X receptors does not require transcriptional activity or coactivator interactions. *Mol Cell Biol* *21*, 4909-4918.
- Osone, S., Hosoi, H., Kuwahara, Y., Matsumoto, Y., Iehara, T., and Sugimoto, T. (2004). Fenretinide induces sustained-activation of JNK/p38 MAPK and apoptosis in a reactive oxygen species-dependent manner in neuroblastoma cells. *Int J Cancer* *112*, 219-224.
- Otake, Y., Sengupta, T. K., Bandyopadhyay, S., Spicer, E. K., and Fernandes, D. J. (2005). Retinoid-induced apoptosis in HL-60 cells is associated with nucleolin down-regulation and destabilization of Bcl-2 mRNA. *Mol Pharmacol* *67*, 319-326.
- Pagnan, G., Montaldo, P. G., Pastorino, F., Raffaghello, L., Kirchmeier, M., Allen, T. M., and Ponzoni, M. (1999). GD2-mediated melanoma cell targeting and cytotoxicity of liposome-entrapped fenretinide. *Int J Cancer* *81*, 268-274.
- Pan, G., Ni, J., Wei, Y. F., Yu, G., Gentz, R., and Dixit, V. M. (1997a). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* *277*, 815-818.
- Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., and Dixit, V. M. (1997b). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* *276*, 111-113.
- Park, D. J., Chumakov, A. M., Vuong, P. T., Chih, D. Y., Gombart, A. F., Miller, W. H., Jr., and Koeffler, H. P. (1999). CCAAT/enhancer binding protein epsilon is a potential retinoid target gene in acute promyelocytic leukemia treatment. *J Clin Invest* *103*, 1399-1408.
- Park, J. R., Robertson, K., Hickstein, D. D., Tsai, S., Hockenbery, D. M., and Collins, S. J. (1994). Dysregulated bcl-2 expression inhibits apoptosis but not differentiation of retinoic acid-induced HL-60 granulocytes. *Blood* *84*, 440-445.
- Patel, J. B., Huynh, C. K., Handratta, V. D., Gediya, L. K., Brodie, A. M., Goloubeva, O. G., Clement, O. O., Nanne, I. P., Soprano, D. R., and Njar, V. C. (2004). Novel retinoic acid metabolism blocking agents endowed with multiple biological activities are efficient growth inhibitors of human breast and prostate cancer cells in vitro and a human breast tumor xenograft in nude mice. *J Med Chem* *47*, 6716-6729.

- Paul, C. C., Mahrer, S., Tolbert, M., Elbert, B. L., Wong, I., Ackerman, S. J., and Baumann, M. A. (1995). Changing the differentiation program of hematopoietic cells: retinoic acid-induced shift of eosinophil-committed cells to neutrophils. *Blood* 86, 3737-3744.
- Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P. P., and Pelicci, P. G. (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* 406, 207-210.
- Pendaries, V., Verrecchia, F., Michel, S., and Mauviel, A. (2003). Retinoic acid receptors interfere with the TGF-beta/Smad signaling pathway in a ligand-specific manner. *Oncogene* 22, 8212-8220.
- Perez, A., Kastner, P., Sethi, S., Lutz, Y., Reibel, C., and Chambon, P. (1993). PMLRAR homodimers: distinct DNA binding properties and heteromeric interactions with RXR. *Embo J* 12, 3171-3182.
- Perlmann, T., and Jansson, L. (1995). A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev* 9, 769-782.
- Peterson, C. L., and Laniel, M. A. (2004). Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14, R546-551.
- Petkovich, M., Brand, N. J., Krust, A., and Chambon, P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330, 444-450.
- Pettersson, F., Dalgleish, A. G., Bissonnette, R. P., and Colston, K. W. (2002). Retinoids cause apoptosis in pancreatic cancer cells via activation of RAR-gamma and altered expression of Bcl-2/Bax. *Br J Cancer* 87, 555-561.
- Pietras, R. J., and Szego, C. M. (1977). Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265, 69-72.
- Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A., and Ashkenazi, A. (1996). Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 271, 12687-12690.
- Pollock, J. L., Westervelt, P., Kurichety, A. K., Pelicci, P. G., Grisolano, J. L., and Ley, T. J. (1999). A bcr-3 isoform of RARalpha-PML potentiates the development of PML-RARalpha-driven acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15103-15108.
- Prufer, K., and Barsony, J. (2002). Retinoid X receptor dominates the nuclear import and export of the unliganded vitamin D receptor. *Mol Endocrinol* 16, 1738-1751.
- Quenech'Du, N., Ruchaud, S., Khelef, N., Guiso, N., and Lanotte, M. (1998). A sustained increase in the endogenous level of cAMP reduces the retinoid concentration required for APL cell maturation to near physiological levels. *Leukemia* 12, 1829-1833.
- Rana, B., Veal, G. J., Pearson, A. D., and Redfern, C. P. (2002). Retinoid X receptors and retinoid response in neuroblastoma cells. *J Cell Biochem* 86, 67-78.

- Ray, D. M., Bernstein, S. H., and Phipps, R. P. (2004). Human multiple myeloma cells express peroxisome proliferator-activated receptor gamma and undergo apoptosis upon exposure to PPARgamma ligands. *Clin Immunol* 113, 203-213.
- Razavi, H. M., Hamilton, J. A., and Feng, Q. (2005). Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure. *Pharmacol Ther* 106, 147-162.
- Redner, R. L., Chen, J. D., Rush, E. A., Li, H., and Pollock, S. L. (2000). The t(5;17) acute promyelocytic leukemia fusion protein NPM-RAR interacts with co-repressor and co-activator proteins and exhibits both positive and negative transcriptional properties. *Blood* 95, 2683-2690.
- Reid, G., Hubner, M. R., Metivier, R., Brand, H., Denger, S., Manu, D., Beaudouin, J., Ellenberg, J., and Gannon, F. (2003). Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell* 11, 695-707.
- Reynolds, C. P., Matthay, K. K., Villablanca, J. G., and Maurer, B. J. (2003). Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Lett* 197, 185-192.
- Riedl, S. J., and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 897-907.
- Rigas, J. R., and Dragnev, K. H. (2005). Emerging role of rexinoids in non-small cell lung cancer: focus on bexarotene. *Oncologist* 10, 22-33.
- Robertson, J. D., Gogvadze, V., Kropotov, A., Vakifahmetoglu, H., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2004). Processed caspase-2 can induce mitochondria-mediated apoptosis independently of its enzymatic activity. *EMBO Rep* 5, 643-648.
- Rochette-Egly, C. (2003). Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal* 15, 355-366.
- Rochette-Egly, C., Adam, S., Rossignol, M., Egly, J. M., and Chambon, P. (1997). Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* 90, 97-107.
- Rochette-Egly, C., Oulad-Abdelghani, M., Staub, A., Pfister, V., Scheuer, I., Chambon, P., and Gaub, M. P. (1995). Phosphorylation of the retinoic acid receptor-alpha by protein kinase A. *Mol Endocrinol* 9, 860-871.
- Romert, A., Tuvendal, P., Simon, A., Dencker, L., and Eriksson, U. (1998). The identification of a 9-cis retinol dehydrogenase in the mouse embryo reveals a pathway for synthesis of 9-cis retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4404-4409.
- Roth, W., and Reed, J. C. (2004). FLIP protein and TRAIL-induced apoptosis. *Vitam Horm* 67, 189-206.
- Roy, B., Taneja, R., and Chambon, P. (1995). Synergistic activation of retinoic acid (RA)-responsive genes and induction of embryonal carcinoma cell differentiation by an RA receptor alpha (RAR alpha)-, RAR beta-, or RAR gamma-selective ligand in combination with a retinoid X receptor-specific ligand. *Mol Cell Biol* 15, 6481-6487.

- Ruchaud, S., Duprez, E., Gendron, M. C., Houge, G., Genieser, H. G., Jastorff, B., Doskeland, S. O., and Lanotte, M. (1994). Two distinctly regulated events, priming and triggering, during retinoid-induced maturation and resistance of NB4 promyelocytic leukemia cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 8428-8432.
- Saffiotti, U., Montesano, R., Sellakumar, A. R., and Borg, S. A. (1967). Experimental cancer of the lung. Inhibition by vitamin A of the induction of tracheobronchial squamous metaplasia and squamous cell tumors. *Cancer* *20*, 857-864.
- Salomoni, P., and Pandolfi, P. P. (2002). The role of PML in tumor suppression. *Cell* *108*, 165-170.
- Scaffidi, C., Medema, J. P., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1997). FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J Biol Chem* *272*, 26953-26958.
- Schlezing, J. J., Jensen, B. A., Mann, K. K., Ryu, H. Y., and Sherr, D. H. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated NF-kappa B activation and apoptosis in pre-B cells. *J Immunol* *169*, 6831-6841.
- Schneiderhan, N., Budde, A., Zhang, Y., and Brune, B. (2003). Nitric oxide induces phosphorylation of p53 and impairs nuclear export. *Oncogene* *22*, 2857-2868.
- Schule, R., Rangarajan, P., Yang, N., Kliwer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Verma, I. M., and Evans, R. M. (1991). Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 6092-6096.
- Scorrano, L., and Korsmeyer, S. J. (2003). Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* *304*, 437-444.
- Sedger, L. M., Glaccum, M. B., Schuh, J. C., Kanaly, S. T., Williamson, E., Kayagaki, N., Yun, T., Smolak, P., Le, T., Goodwin, R., and Gliniak, B. (2002). Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. *Eur J Immunol* *32*, 2246-2254.
- Sedlak, T. W., Oltvai, Z. N., Yang, E., Wang, K., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (1995). Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 7834-7838.
- Segalla, S., Rinaldi, L., Kilstrup-Nielsen, C., Badaracco, G., Minucci, S., Pelicci, P. G., and Landsberger, N. (2003). Retinoic acid receptor alpha fusion to PML affects its transcriptional and chromatin-remodeling properties. *Mol Cell Biol* *23*, 8795-8808.
- Shah, S., Hecht, A., Pestell, R., and Byers, S. W. (2003). Trans-repression of beta-catenin activity by nuclear receptors. *J Biol Chem* *278*, 48137-48145.
- Shao, W., Fanelli, M., Ferrara, F. F., Riccioni, R., Rosenauer, A., Davison, K., Lamph, W. W., Waxman, S., Pelicci, P. G., Lo Coco, F., *et al.* (1998). Arsenic trioxide as an inducer of apoptosis and loss of PML/RAR alpha protein in acute promyelocytic leukemia cells. *J Natl Cancer Inst* *90*, 124-133.

- Shao, W., Rosenauer, A., Mann, K., Chang, C. P., Rachez, C., Freedman, L. P., and Miller, W. H., Jr. (2000). Ligand-inducible interaction of the DRIP/TRAP coactivator complex with retinoid receptors in retinoic acid-sensitive and -resistant acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 96, 2233-2239.
- Shemshedini, L., Knauthe, R., Sassone-Corsi, P., Pornon, A., and Gronemeyer, H. (1991). Cell-specific inhibitory and stimulatory effects of Fos and Jun on transcription activation by nuclear receptors. *EMBO J* 10, 3839-3849.
- Sheridan, J. P., Marsters, S. A., Pitti, R. M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C. L., Baker, K., Wood, W. I., *et al.* (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277, 818-821.
- Shin, D. M., Glisson, B. S., Khuri, F. R., Clifford, J. L., Clayman, G., Benner, S. E., Forastiere, A. A., Ginsberg, L., Liu, D., Lee, J. J., *et al.* (2002). Phase II and biologic study of interferon alfa, retinoic acid, and cisplatin in advanced squamous skin cancer. *J Clin Oncol* 20, 364-370.
- Shinohara, Y., Almofti, M. R., Yamamoto, T., Ishida, T., Kita, F., Kanzaki, H., Ohnishi, M., Yamashita, K., Shimizu, S., and Terada, H. (2002). Permeability transition-independent release of mitochondrial cytochrome c induced by valinomycin. *Eur J Biochem* 269, 5224-5230.
- Shiohara, M., Dawson, M. I., Hobbs, P. D., Sawai, N., Higuchi, T., Koike, K., Komiyama, A., and Koeffler, H. P. (1999). Effects of novel RAR- and RXR-selective retinoids on myeloid leukemic proliferation and differentiation in vitro. *Blood* 93, 2057-2066.
- Shishodia, S., and Aggarwal, B. B. (2004). Nuclear factor-kappaB: a friend or a foe in cancer? *Biochem Pharmacol* 68, 1071-1080.
- Sidell, N. (1982). Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* 68, 589-596.
- Simeone, A. M., Ekmekcioglu, S., Broemeling, L. D., Grimm, E. A., and Tari, A. M. (2002). A novel mechanism by which N-(4-hydroxyphenyl)retinamide inhibits breast cancer cell growth: the production of nitric oxide. *Mol Cancer Ther* 1, 1009-1017.
- Simeone, A. M., and Tari, A. M. (2004). How retinoids regulate breast cancer cell proliferation and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 61, 1475-1484.
- Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D. P., Ley, K., Chin, W. W., and Liao, J. K. (2000). Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 407, 538-541.
- Simoncini, T., Rabkin, E., and Liao, J. K. (2003). Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 198-203.
- Singh, U. S., Pan, J., Kao, Y. L., Joshi, S., Young, K. L., and Baker, K. M. (2003). Tissue transglutaminase mediates activation of RhoA and MAP kinase pathways during retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells. *J Biol Chem* 278, 391-399.

- Sirchia, S. M., Ren, M., Pili, R., Sironi, E., Somenzi, G., Ghidoni, R., Toma, S., Nicolo, G., and Sacchi, N. (2002). Endogenous reactivation of the RARbeta2 tumor suppressor gene epigenetically silenced in breast cancer. *Cancer Res* 62, 2455-2461.
- Slee, E. A., O'Connor, D. J., and Lu, X. (2004). To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* 23, 2809-2818.
- Sohal, J., Phan, V. T., Chan, P. V., Davis, E. M., Patel, B., Kelly, L. M., Abrams, T. J., O'Farrell, A. M., Gilliland, D. G., Le Beau, M. M., and Kogan, S. C. (2003). A model of APL with FLT3 mutation is responsive to retinoic acid and a receptor tyrosine kinase inhibitor, SU11657. *Blood* 101, 3188-3197.
- Solomin, L., Johansson, C. B., Zetterstrom, R. H., Bissonnette, R. P., Heyman, R. A., Olson, L., Lendahl, U., Frisen, J., and Perlmann, T. (1998). Retinoid-X receptor signalling in the developing spinal cord. *Nature* 395, 398-402.
- Spanjaard, R. A., Ikeda, M., Lee, P. J., Charpentier, B., Chin, W. W., and Eberlein, T. J. (1997). Specific activation of retinoic acid receptors (RARs) and retinoid X receptors reveals a unique role for RARGamma in induction of differentiation and apoptosis of S91 melanoma cells. *J Biol Chem* 272, 18990-18999.
- Sporn, M. B., Roberts, A. B., and Goodman, D. S. (1994). *The retinoids: Biology, chemistry and medicine* (New York, Raven Press).
- Sprick, M. R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M. A., and Walczak, H. (2002). Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *Embo J* 21, 4520-4530.
- Sprick, M. R., Weigand, M. A., Rieser, E., Rauch, C. T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P. H., and Walczak, H. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 12, 599-609.
- Srinivas, H., Juroske, D. M., Kalyankrishna, S., Cody, D. D., Price, R. E., Xu, X. C., Narayanan, R., Weigel, N. L., and Kurie, J. M. (2005). c-Jun N-terminal kinase contributes to aberrant retinoid signaling in lung cancer cells by phosphorylating and inducing proteasomal degradation of retinoic acid receptor alpha. *Mol Cell Biol* 25, 1054-1069.
- Steinmetz, A. C., Renaud, J. P., and Moras, D. (2001). Binding of ligands and activation of transcription by nuclear receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30, 329-359.
- Suh, Y. A., Lee, H. Y., Virmani, A., Wong, J., Mann, K. K., Miller, W. H., Jr., Gazdar, A., and Kurie, J. M. (2002). Loss of retinoic acid receptor beta gene expression is linked to aberrant histone H3 acetylation in lung cancer cell lines. *Cancer Res* 62, 3945-3949.
- Sun, S. Y., Kurie, J. M., Yue, P., Dawson, M. I., Shroot, B., Chandraratna, R. A., Hong, W. K., and Lotan, R. (1999). Differential responses of normal, premalignant, and malignant human bronchial epithelial cells to receptor-selective retinoids. *Clin Cancer Res* 5, 431-437.
- Sun, S. Y., and Lotan, R. (2002). Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol* 41, 41-55.

- Sun, S. Y., Yue, P., Chen, X., Hong, W. K., and Lotan, R. (2002). The synthetic retinoid CD437 selectively induces apoptosis in human lung cancer cells while sparing normal human lung epithelial cells. *Cancer Res* *62*, 2430-2436.
- Sun, S. Y., Yue, P., Hong, W. K., and Lotan, R. (2000a). Augmentation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by the synthetic retinoid 6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid (CD437) through up-regulation of TRAIL receptors in human lung cancer cells. *Cancer Res* *60*, 7149-7155.
- Sun, S. Y., Yue, P., Hong, W. K., and Lotan, R. (2000b). Induction of Fas expression and augmentation of Fas/Fas ligand-mediated apoptosis by the synthetic retinoid CD437 in human lung cancer cells. *Cancer Res* *60*, 6537-6543.
- Sun, S. Y., Yue, P., and Lotan, R. (2000c). Implication of multiple mechanisms in apoptosis induced by the synthetic retinoid CD437 in human prostate carcinoma cells. *Oncogene* *19*, 4513-4522.
- Sunaga, S., Maki, K., Lagasse, E., Blanco, J. C., Ozato, K., Miyazaki, J., and Ikuta, K. (1997). Myeloid differentiation is impaired in transgenic mice with targeted expression of a dominant negative form of retinoid X receptor beta. *Br J Haematol* *96*, 19-30.
- Suzuki, M., Youle, R. J., and Tjandra, N. (2000). Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* *103*, 645-654.
- Szanto, A., Narkar, V., Shen, Q., Uray, I. P., Davies, P. J., and Nagy, L. (2004). Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ* *11 Suppl 2*, S126-143.
- Takahashi, Y., Lallemand-Breitenbach, V., Zhu, J., and de The, H. (2004). PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene* *23*, 2819-2824.
- Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M. J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., and Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med* *7*, 94-100.
- Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2002). Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* *195*, 161-169.
- Tarrade, A., Bastien, J., Bruck, N., Bauer, A., Gianni, M., and Rochette-Egly, C. (2005). Retinoic acid and arsenic trioxide cooperate for apoptosis through phosphorylated RXR alpha. *Oncogene* *24*, 2277-2288.
- Tenen, D. G. (2003). Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* *3*, 89-101.
- Tinel, A., and Tschopp, J. (2004). The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* *304*, 843-846.
- Tocci, A., Parolini, I., Gabbianelli, M., Testa, U., Luchetti, L., Samoggia, P., Masella, B., Russo, G., Valtieri, M., and Peschle, C. (1996). Dual action of retinoic acid on human

embryonic/fetal hematopoiesis: blockade of primitive progenitor proliferation and shift from multipotent/erythroid/monocytic to granulocytic differentiation program. *Blood* 88, 2878-2888.

Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G., Thomazy, V. A., and Evans, R. M. (1998). PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93, 241-252.

Truneh, A., Sharma, S., Silverman, C., Khandekar, S., Reddy, M. P., Deen, K. C., McLaughlin, M. M., Srinivasula, S. M., Livi, G. P., Marshall, L. A., *et al.* (2000). Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. *J Biol Chem* 275, 23319-23325.

Truong, B. T., Lee, Y. J., Lodie, T. A., Park, D. J., Perrotti, D., Watanabe, N., Koeffler, H. P., Nakajima, H., Tenen, D. G., and Kogan, S. C. (2003). CCAAT/Enhancer binding proteins repress the leukemic phenotype of acute myeloid leukemia. *Blood* 101, 1141-1148.

Tsai, S., and Collins, S. J. (1993). A dominant negative retinoic acid receptor blocks neutrophil differentiation at the promyelocyte stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7153-7157.

Tsao, A. S., Kim, E. S., and Hong, W. K. (2004). Chemoprevention of cancer. *CA Cancer J Clin* 54, 150-180.

Tsimberidou, A. M., Giles, F., Romaguera, J., Duvic, M., and Kurzrock, R. (2004). Activity of interferon-alpha and isotretinoin in patients with advanced, refractory lymphoid malignancies. *Cancer* 100, 574-580.

Tsujie, M., Nakamori, S., Okami, J., Hayashi, N., Hiraoka, N., Nagano, H., Dono, K., Umeshita, K., Sakon, M., and Monden, M. (2003). Thiazolidinediones inhibit growth of gastrointestinal, biliary, and pancreatic adenocarcinoma cells through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha pathway. *Exp Cell Res* 289, 143-151.

Tsuzuki, S., Kitajima, K., Nakano, T., Glasow, A., Zelent, A., and Enver, T. (2004). Cross talk between retinoic acid signaling and transcription factor GATA-2. *Mol Cell Biol* 24, 6824-6836.

Tucker, K. A., Lilly, M. B., Heck, L., Jr., and Rado, T. A. (1987). Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood* 70, 372-378.

Umesono, K., Murakami, K. K., Thompson, C. C., and Evans, R. M. (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65, 1255-1266.

van Gorp, M., Festjens, N., van Loo, G., Saelens, X., and Vandenabeele, P. (2003). Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 487-497.

- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.
- Veronesi, U., De Palo, G., Marubini, E., Costa, A., Formelli, F., Mariani, L., Decensi, A., Camerini, T., Del Turco, M. R., Di Mauro, M. G., *et al.* (1999). Randomized trial of fenretinide to prevent second breast malignancy in women with early breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 91, 1847-1856.
- Villa, R., De Santis, F., Gutierrez, A., Minucci, S., Pelicci, P. G., and Di Croce, L. (2004). Epigenetic gene silencing in acute promyelocytic leukemia. *Biochem Pharmacol* 68, 1247-1254.
- Villunger, A., Michalak, E. M., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, M. J., Adams, J. M., and Strasser, A. (2003). p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 302, 1036-1038.
- Visnjic, D., Crljen, V., Curic, J., Batinic, D., Volinia, S., and Banfic, H. (2002). The activation of nuclear phosphoinositide 3-kinase C2beta in all-trans-retinoic acid-differentiated HL-60 cells. *FEBS Lett* 529, 268-274.
- Vivat-Hannah, V., You, D., Rizzo, C., Daris, J. P., Lapointe, P., Zusi, F. C., Marinier, A., Lorenzi, M. V., and Gottardis, M. M. (2001). Synergistic cytotoxicity exhibited by combination treatment of selective retinoid ligands with taxol (Paclitaxel). *Cancer Res* 61, 8703-8711.
- Wagner, B. L., Norris, J. D., Knotts, T. A., Weigel, N. L., and McDonnell, D. P. (1998). The nuclear corepressors NCoR and SMRT are key regulators of both ligand- and 8-bromo-cyclic AMP-dependent transcriptional activity of the human progesterone receptor. *Mol Cell Biol* 18, 1369-1378.
- Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., Timour, M. S., Gerhart, M. J., Schooley, K. A., Smith, C. A., *et al.* (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 16, 5386-5397.
- Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., *et al.* (1999). Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* 5, 157-163.
- Wan, H., Dawson, M. I., Hong, W. K., and Lotan, R. (1998). Overexpressed activated retinoid X receptors can mediate growth inhibitory effects of retinoids in human carcinoma cells. *J Biol Chem* 273, 26915-26922.
- Wan, H., Oridate, N., Lotan, D., Hong, W. K., and Lotan, R. (1999). Overexpression of retinoic acid receptor beta in head and neck squamous cell carcinoma cells increases their sensitivity to retinoid-induced suppression of squamous differentiation by retinoids. *Cancer Res* 59, 3518-3526.
- Wang, Z., Benoit, G., Liu, J., Prasad, S., Aarnisalo, P., Liu, X., Xu, H., Walker, N. P., and Perlmann, T. (2003). Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 423, 555-560.

- Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 14, 2060-2071.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-730.
- Weis, K., Rambaud, S., Lavau, C., Jansen, J., Carvalho, T., Carmo-Fonseca, M., Lamond, A., and Dejean, A. (1994). Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell* 76, 345-356.
- Weisberg, E., Catley, L., Kujawa, J., Atadja, P., Remiszewski, S., Fuerst, P., Cavazza, C., Anderson, K., and Griffin, J. D. (2004). Histone deacetylase inhibitor NVP-LAQ824 has significant activity against myeloid leukemia cells in vitro and in vivo. *Leukemia* 18, 1951-1963.
- Wen, Y., Hu, M. C., Makino, K., Spohn, B., Bartholomeusz, G., Yan, D. H., and Hung, M. C. (2000). HER-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the Akt pathway. *Cancer Res* 60, 6841-6845.
- Werner, A. B., de Vries, E., Tait, S. W., Bontjer, I., and Borst, J. (2002). Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax. *J Biol Chem* 277, 22781-22788.
- Westervelt, P., Lane, A. A., Pollock, J. L., Oldfather, K., Holt, M. S., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., DiPersio, J. F., and Ley, T. J. (2003). High-penetrance mouse model of acute promyelocytic leukemia with very low levels of PML-RARalpha expression. *Blood* 102, 1857-1865.
- Widschwendter, M., Berger, J., Daxenbichler, G., Muller-Holzner, E., Widschwendter, A., Mayr, A., Marth, C., and Zeimet, A. G. (1997). Loss of retinoic acid receptor beta expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer. *Cancer Res* 57, 4158-4161.
- Widschwendter, M., Berger, J., Muller, H. M., Zeimet, A. G., and Marth, C. (2001). Epigenetic downregulation of the retinoic acid receptor-beta2 gene in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6, 193-201.
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A., and et al. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-682.
- Willy, P. J., Umesono, K., Ong, E. S., Evans, R. M., Heyman, R. A., and Mangelsdorf, D. J. (1995). LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 9, 1033-1045.
- Wilson, A. J., Arango, D., Mariadason, J. M., Heerdt, B. G., and Augenlicht, L. H. (2003). TR3/Nur77 in colon cancer cell apoptosis. *Cancer Res* 63, 5401-5407.

- Witcher, M., Shiu, H. Y., Guo, Q., and Miller, W. H., Jr. (2004). Combination of retinoic acid and tumor necrosis factor overcomes the maturation block in a variety of retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* *104*, 3335-3342.
- Wolter, K. G., Hsu, Y. T., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X. G., and Youle, R. J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* *139*, 1281-1292.
- Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., Kao, G., Gan, D. D., Zhou, J. Y., Muschel, R., *et al.* (1997). KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet* *17*, 141-143.
- Wu, J. M., DiPietrantonio, A. M., and Hsieh, T. C. (2001). Mechanism of fenretinide (4-HPR)-induced cell death. *Apoptosis* *6*, 377-388.
- Wu, K., Zhang, Y., Xu, X. C., Hill, J., Celestino, J., Kim, H. T., Mohsin, S. K., Hilsenbeck, S. G., Lamph, W. W., Bissonette, R., and Brown, P. H. (2002). The retinoid X receptor-selective retinoid, LGD1069, prevents the development of estrogen receptor-negative mammary tumors in transgenic mice. *Cancer Res* *62*, 6376-6380.
- Xiao, C., Yang, B. F., Asadi, N., Beguinot, F., and Hao, C. (2002). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced death-inducing signaling complex and its modulation by c-FLIP and PED/PEA-15 in glioma cells. *J Biol Chem* *277*, 25020-25025.
- Xiao, J. H., Ghosn, C., Hinchman, C., Forbes, C., Wang, J., Snider, N., Cordrey, A., Zhao, Y., and Chandraratna, R. A. (2003). Adenomatous polyposis coli (APC)-independent regulation of beta-catenin degradation via a retinoid X receptor-mediated pathway. *J Biol Chem* *278*, 29954-29962.
- Xu, X. C., Liu, X., Tahara, E., Lippman, S. M., and Lotan, R. (1999). Expression and up-regulation of retinoic acid receptor-beta is associated with retinoid sensitivity and colony formation in esophageal cancer cell lines. *Cancer Res* *59*, 2477-2483.
- Xu, X. C., Sneige, N., Liu, X., Nandagiri, R., Lee, J. J., Lukmanji, F., Hortobagyi, G., Lippman, S. M., Dhingra, K., and Lotan, R. (1997a). Progressive decrease in nuclear retinoic acid receptor beta messenger RNA level during breast carcinogenesis. *Cancer Res* *57*, 4992-4996.
- Xu, X. C., Sozzi, G., Lee, J. S., Lee, J. J., Pastorino, U., Pilotti, S., Kurie, J. M., Hong, W. K., and Lotan, R. (1997b). Suppression of retinoic acid receptor beta in non-small-cell lung cancer in vivo: implications for lung cancer development. *J Natl Cancer Inst* *89*, 624-629.
- Yagita, H., Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M. J., and Okumura, K. (2004). TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy. *Cancer Sci* *95*, 777-783.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., and Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* *275*, 1129-1132.
- Yang, Q., Shan, L., Yoshimura, G., Nakamura, M., Nakamura, Y., Suzuma, T., Umemura, T., Mori, I., Sakurai, T., and Kakudo, K. (2002). 5-aza-2'-deoxycytidine induces retinoic acid

- receptor beta 2 demethylation, cell cycle arrest and growth inhibition in breast carcinoma cells. *Anticancer Res* 22, 2753-2756.
- Yang-Yen, H. F., Zhang, X. K., Graupner, G., Tzukerman, M., Sakamoto, B., Karin, M., and Pfahl, M. (1991). Antagonism between retinoic acid receptors and AP-1: implications for tumor promotion and inflammation. *New Biol* 3, 1206-1219.
- Yen, A., Roberson, M. S., Varvayanis, S., and Lee, A. T. (1998). Retinoic acid induced mitogen-activated protein (MAP)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase-dependent MAP kinase activation needed to elicit HL-60 cell differentiation and growth arrest. *Cancer Res* 58, 3163-3172.
- Yin, W., Raffelsberger, W., and Gronemeyer, H. (2005). Retinoic acid determines life span of leukemic cells by inducing antagonistic apoptosis-regulatory programs. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1696-1708.
- Yin, X. M., Oltvai, Z. N., and Korsmeyer, S. J. (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369, 321-323.
- Youssef, E. M., Lotan, D., Issa, J. P., Wakasa, K., Fan, Y. H., Mao, L., Hassan, K., Feng, L., Lee, J. J., Lippman, S. M., *et al.* (2004). Hypermethylation of the retinoic acid receptor-beta(2) gene in head and neck carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 10, 1733-1742.
- Zelent, A., Guidez, F., Melnick, A., Waxman, S., and Licht, J. D. (2001). Translocations of the RARalpha gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 20, 7186-7203.
- Zhang, C., and Duvic, M. (2003). Retinoids: therapeutic applications and mechanisms of action in cutaneous T-cell lymphoma. *Dermatol Ther* 16, 322-330.
- Zhang, H., and Rosdahl, I. (2004). Expression profiles of p53, p21, bax and bcl-2 proteins in all-trans-retinoic acid treated primary and metastatic melanoma cells. *Int J Oncol* 25, 303-308.
- Zhao, Y., Qin, S., Atangan, L. I., Molina, Y., Okawa, Y., Arpawong, H. T., Ghosn, C., Xiao, J. H., Vuligonda, V., Brown, G., and Chandraratna, R. A. (2004). Casein kinase 1alpha interacts with retinoid X receptor and interferes with agonist-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279, 30844-30849.
- Zhou, Y., Gross, W., Hong, S. H., and Privalsky, M. L. (2001). The SMRT corepressor is a target of phosphorylation by protein kinase CK2 (casein kinase II). *Mol Cell Biochem* 220, 1-13.
- Zhu, J., Chen, Z., Lallemand-Breitenbach, V., and de The, H. (2002a). How acute promyelocytic leukaemia revived arsenic. *Nat Rev Cancer* 2, 705-713.
- Zhu, J., Gianni, M., Kopf, E., Honore, N., Chelbi-Alix, M., Koken, M., Quignon, F., Rochette-Egly, C., and de The, H. (1999). Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and oncogenic RARalpha fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14807-14812.
- Zhu, J., Lallemand-Breitenbach, V., and de The, H. (2001). Pathways of retinoic acid- or arsenic trioxide-induced PML/RARalpha catabolism, role of oncogene degradation in disease remission. *Oncogene* 20, 7257-7265.

Zhu, J., Zhou, J., Peres, L., Riaucoux, F., Honore, N., Kogan, S., and de The, H. (2005). A sumoylation site in PML/RARA is essential for leukemic transformation. *Cancer Cell* 7, 143-153.

Zhu, Q., Zhang, J. W., Zhu, H. Q., Shen, Y. L., Flexor, M., Jia, P. M., Yu, Y., Cai, X., Waxman, S., Lanotte, M., *et al.* (2002b). Synergic effects of arsenic trioxide and cAMP during acute promyelocytic leukemia cell maturation subtends a novel signaling cross-talk. *Blood* 99, 1014-1022.

Annexe 1

Ligand	Sélectivité	Activité
ATRA AR 9cis	RAR α, β, γ RAR α, β, γ et RXR α, β, γ	Agoniste Agoniste
BMS753 TTNPB BMS493 BMS614	RAR α RAR α, β, γ RAR α, β, γ RAR α	Agoniste Agoniste Agoniste inverse Antagoniste
LG1069=Targretin=Bexarotene BMS649 = SR11237	RXR α, β, γ RXR α, β, γ	Agoniste Agoniste
BMS749	RXR α, β, γ	Agoniste
UVI3003	RXR α, β, γ	Antagoniste

Tableau récapitulatif des activités et sélectivités des différents agonistes des RAR et RXR utilisés au cours des études présentées.

Annexe 2

Autres travaux auxquels j'ai collaboré au cours de ma thèse et qui ont donné lieu à des publications. Les publications correspondantes sont à la suite.

Autonomous rexinoid death signaling is suppressed by converging signaling pathways in immature leukemia cells. -Gr. Benoit, M.Flexor, F.Besancon, L.Altucci, A.Rossin, J.Hillion, Z.Balajthy, L.Legres, E.Segal-Bendirdjian, H.Gronemeyer, M.Lanotte. - *Molecular Endocrinology*. 2001 Jul;15(7):1154-69

Les 3 publications suivantes correspondent à la caractérisation de nouveaux ligands. J'ai contribué au travail en les testant sur les lignées NB4 et PLB985.

RAR-RXR selectivity and biological activity of new retinoic acid analogues with heterocyclic or polycyclic aromatic systems – D. Ivanova, C.Gaudon, A.Rossin, W. Bourguet, H.Gronemeyer - *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2002 Jul;10(7):2099-102.

Structure-activity relationships of methylene or terminal side chain modified retinoids on the differentiation and cell death signaling in NB4 promyelocytic leukemia cells. - D.Ivanova, A.Rossin, H.Gronemeyer, A.Valla, D.Cartier, R.Le Guillou, R.Labia - *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2004 Aug 16;14(16):4257-61.

9-cis Retinoic Acid analogues with bulky hydrophobic rings : new RXR-selective agonists – R.Alvarez, MJ.Vega, S.Kammerer, A.Rossin, P.Germain, H.Gronemeyer, A.De Lera - *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2004 Dec 20;14(24):6117-6122

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Autonomous Reginoid Death Signaling Is Suppressed by Converging Signaling Pathways in Immature Leukemia Cells

G. R. Benoit, M. Flexor, F. Besançon, L. Altucci, **A. Rossin**, J. Hillion, Z. Balajthy, L. Legres, E. Ségal-Bendirdjian, H. Gronemeyer et M. Lanotte

Molecular Endocrinology, 2001, Vol. 15, Pages 1154-1169

Pages 1154 à 1169 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://mend.endojournals.org/cgi/content/full/15/7/1154>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

RAR–RXR Selectivity and Biological Activity of New Retinoic Acid Analogues with Heterocyclic or Polycyclic Aromatic Systems

D. Ivanova, C. Gaudon, **A. Rossin**, W. Bourguet and H. Gronemeyer

Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, Vol. 10, Pages 2099-2102

Pages 2099 à 2102

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
[http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0896\(02\)00083-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0896(02)00083-4)

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Structure–activity relationships of methylene or terminal side chain modified retinoids on the differentiation and cell death signaling in NB4 promyelocytic leukemia cells

Diana Ivanova, **Aurélie Rossin**, Hinrich Gronemeyer, Alain Valla, Dominique Cartier, Régis Le Guillou et Roger Labia

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2004, Vol. 14, Pages 4257-4261

Pages 4257 à 4261 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.06.002>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

9-*cis*-Retinoic acid analogues with bulky hydrophobic rings: new RXR-selective agonists

Rosana Alvarez, M. Jesús Vega, Sabrina Kammerer, **Aurélié Rossin**, Pierre Germain, Hinrich Gronemeyer et Angel R. de Lera

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2004, Vol. 14, Pages 6117-6122

Pages 6117 à 6122 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.08.072>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr