



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Thèse présentée par  
**Sébastien LALEVEE**

Pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Strasbourg**  
Sciences du Vivant-Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**Les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque :**  
**Phosphorylation et contrôle dynamique de**  
**l'association/dissociation de complexes protéiques**

*Soutenue publiquement le 9 octobre 2009 devant le jury composé de :*

Rapporteur externe	:	<b>Dr William BOURGUET (CBS, Montpellier)</b>
Rapporteur externe	:	<b>Dr Laurent SCHAEFFER (ENS Lyon)</b>
Rapporteur interne	:	<b>Dr Ali HAMICHE (IGBMC, Illkirch)</b>
Examineur	:	<b>Dr Pierre JALINOT (ENS Lyon)</b>
Examineur	:	<b>Pr. Claude KEDINGER (ESBS, Illkirch)</b>
Membre invité	:	<b>Pr Bruno KIEFFER (ESBS, Illkirch)</b>
Directeur de Thèse	:	<b>Dr Cécile ROCHETTE-EGLY (IGBMC, Illkirch)</b>

## Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury, tout particulièrement Monsieur le Docteur William Bourguet et Monsieur Le Docteur Laurent Schaeffer en tant que Rapporteurs Externes, ainsi que Monsieur le Docteur Ali Hamiche en tant que Rapporteur Interne et Monsieur le Professeur Claude Kedinger, Monsieur le Docteur Pierre Jalinot en tant qu'Examineurs, d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Je remercie également Monsieur le Professeur Bruno Kieffer d'avoir accepté de prendre part à ce jury de thèse en tant qu'Examineur Invité.

Je tiens à présenter toute ma gratitude envers « mon directeur » de thèse, Dr. Cécile Rochette-Egly, qui m'a supporté (dans le bon sens du terme, j'espère) dans l'ensemble des travaux entrepris durant mon premier stage de laboratoire, mon « Master » ainsi que ma thèse. Merci à ses encouragements perpétuels, à la confiance qu'elle m'a accordé, à son soutien durant toute cette période. Merci d'avoir laissé libre cours à toutes mes hypothèses de travail (et il y en a eu beaucoup, je pense) et de m'avoir également recadré dans le « droit » chemin quand cela était nécessaire. Merci pour ces longues discussions animées, pour cette émulation, pour cette ferveur dans l'attente d'un nouveau résultat (quoi de plus stimulant !!!). C'était un réel plaisir de travailler dans ce cadre (petite équipe mais dynamique).

Une équipe se construit également avec ses différents membres. Evidemment, je vais commencer par remercier les personnes qui ont le plus souffert durant ces dernières semaines, les petites « fourmis » qui ont décortiqué les moindre fautes dans tout les recoins de ce manuscrit, mais également et surtout, les deux « cigales » qui ont essayé de faire vivre ce manuscrit en compensant mes talents bien cachés (ou encore insoupçonnés) de dessinateur et de « mise en pageur »

Une équipe se construit autour d'une atmosphère de travail ; l'atmosphère a bien évolué au cours de ces différentes années mais avec toujours le même leitmotiv : le travail et la cohésion. Evidemment, il est difficile de faire cohabiter autant d'accents méridionaux, metzois( ???), centriste ( ???), nordiste. Mais cette diversité (enfin française en majorité) a conduit à une belle alchimie, une équipe soudée, ouverte vers l'extérieur (hum) et alliant travail et plaisir.

Bien que je ne sois pas très ordonné, je vais commencer par remercier « mon mantor » qui m'a appris tant de choses du point de vue expérimental mais également d'un point de vue professionnel en général. Merci à toi Gaétan pour ta patience, pour m'avoir laissé prolonger ton sujet malgré tous les enjeux et pour toutes ces discussions passées, présentes et certainement futures. Merci également à Christine, on ne refait pas une équipe qui gagne. A deux, on a réussi à allier patience et dynamisme, réflexion et action, rires et désillusions mais au bout du compte, on est toujours aux avant-postes. Je regretterais ce travail « solidaire » (oui, c'est un mot tendance), cette complémentarité à toute épreuve, cette oreille attentive (oui bon la mienne est parfois réticente), ces moments de panique dans le calme... bref, ce punch et toutes ces autres qualités qui t'animent. On se retrouvera bien dans un coin des UK.

Merci aux « girls » du groupe, pour toutes les informations que j'ai pu glaner, les chats, les points (bonus ??), les cierges, les expressions du Sud, le franc parler, les oreilles attentives... qui ne rêverait pas d'une équipe comme celle-ci.

Merci à tous les autres membres passés, présents et futurs ; je vais forcément en oublier mais je tente une liste exhaustive : Régis, Aleksander, Eric, Annie, Jean-Luc, Julie (les deux), Emilie, Hussein, Perrine, Anne

Les remerciements passent également par toutes les personnes qui gravitent autour de cette bande. En premier lieu, les fidèles amis avec qui j'ai partagé tant de si bons repas : Emilie (et Marc), le moral à toute épreuve, du « pep's » à revendre (je n'ai toujours pas trouvé d'où ça vient), bref un plaisir quotidien et une amitié qui j'espère perdurera. Les 50 autres personnes qui ont rythmées les repas, particulièrement le Shankar « national », toujours dans les bons plans, toujours au courant de tout et toujours en train de parler (STOP !!!), mais aussi Sarah, Jérôme, Giovanni, Christina, Sandra, Cathrin, Jelena...

Je ne pourrais pas citer toutes les autres personnes, mais je remercierais également quelques personnes clés avec qui j'ai pu passé de longs moments : Pascal, le FRETilleur hors pair, toujours disponible, mais toujours dans le noir ; Marc (finalement les deux Marc), les RMNistes avec qui j'ai pu passer de bons moments, de bons petits repas, en toute quiétude ; Yannick-Noël pour sa disponibilité, ses pauses café et son franc-parler ; Michèle Claudine, et Cathie, les « inséparables » voisines, qui m'ont lâchement abandonné depuis peu, avec qui j'ai partagé de très bons moments (sans tabou !!!) ; Jean-Marie et Pascal, les « inséparables » voisins ( !!!) qui ont tant contribué par leur bonne humeur et leurs conseils avisés à la réussite de mes expériences. Ainsi que toutes les personnes qui gravitent autour, de l'accueil aux voisins de box, du sourire aux conseils expérimentaux...

Merci à mes amis proches (Anne Laure, Sébastien, Cécé...) et lointains (les Lyonnais exilés Ludo et Soso, les Lyonnais résidents Tristan Greg...)

Enfin, cette thèse se termine en beauté, au milieu de cerveaux en ébullition, dans une bibliothèque en surchauffe, dans un climat studieux enfin jusqu'au vendredi 16h, donc merci à tous les colocataires du loft.

Pour compléter ce tableau, je remercierais personnellement tous les membres de ma famille qui m'ont permis d'arriver au bout de cette entreprise (ouf... enfin la délivrance, je sais !!! mais ce n'est pas terminé ...). Merci particulièrement à ma mère, ma sœur, ma cousine et ma tante, les personnes toujours présentes dans les moments de bonheur (comme de tristesse), toujours à cœur ouvert et à porte ouverte. Mes Grand-Mères pour leur gentillesse et leur soutien. Merci à tous les autres membres de ma famille. Je sais que ces pages seront les seules que vous aurez plaisir à lire, mais je vous promets que la science n'est pas si « barbare » qu'elle en a l'air.

Enfin, merci à Catherine et à sa mère, pour les futurs plats concoctés maison que de nombreuses personnes ne se priveront pas de picorer sans modération. Merci à Toi, pour ta patience, tes dernières « nuits courtes » partagées avec moi, pour ce soutien quotidien durant tant d'années, pour m'avoir permis d'arriver au bout de ce marathon d'écriture et pour tout ce qui nous attend...

Pour terminer, je tiens à dédier ce manuscrit à mes deux Grand-Pères, avec toute mon affection.

## Liste des publications

**Lalevee, S.**, Bour, G., Vitorino, M., Kessler, P., Raad, H., Vonesch, J.L., Kieffer, B. and Rochette-Egly, C. Phosphorylation controls the interaction of the N-terminal domain of the Retinoic Acid Receptor gamma (RAR $\gamma$ ) with Vinexin  $\beta$ . Manuscript in preparation

**Lalevee, S.\***, Ferry, C.\* & Rochette-Egly, C. (2009, Review, In press). Phosphorylation control of nuclear receptors. **Methods in Molecular Biology** : Transcription Factors: Methods and Protocols, Editor P. Higgins Humana Press, a part of Springer Science+ Business media.

Ferry, C., Gianni, M., **Lalevee, S.**, Bruck, N., Plassat, J. L., Raska, I., Jr., Garattini, E., and Rochette-Egly, C. (2009). SUG-1 plays proteolytic and non-proteolytic roles in the control of retinoic acid target genes *via* its interaction with SRC-3. **J Biol Chem** 284, 8127-8135.

Bour, G., **Lalevee, S.**, and Rochette-Egly, C. (2007). Protein kinases and the proteasome join in the combinatorial control of transcription by nuclear retinoic acid receptors. **Trends Cell Biol** 17, 302-309.

Gaillard, E., Bruck, N., Brelivet, Y., Bour, G., **Lalevee, S.**, Bauer, A., Poch, O., Moras, D., and Rochette-Egly, C. (2006). Phosphorylation by PKA potentiates retinoic acid receptor alpha activity by means of increasing interaction with and phosphorylation by cyclin H/cdk7. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103, 9548-9553.

Bour, G., Gaillard, E., Bruck, N., **Lalevee, S.**, Plassat, J. L., Busso, D., Samama, J. P., and Rochette-Egly, C. (2005). Cyclin H binding to the RARalpha activation function (AF)-2 domain directs phosphorylation of the AF-1 domain by cyclin-dependent kinase 7. **Proc Natl Acad Sci U S A** 102, 16608-16613.

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 (RARgamma) and represses RARgamma-mediated transcription. **J Biol Chem** 280, 17027-17037.

\* Equal first authors

## Liste des figures

FIGURE 1 : ORGANISATION MODULAIRE DES RAR.....	- 15 -
FIGURE 2 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU DBD .....	- 18 -
FIGURE 3 : LES DIFFERENTS TYPES DE RARE .....	- 19 -
FIGURE 4 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU LBD.....	- 20 -
FIGURE 5 : CHANGEMENTS CONFORMATIONNELS DU NTD.....	- 24 -
FIGURE 6 : COREPRESSEURS ET COMPLEXES ASSOCIES .....	- 26 -
FIGURE 7 : COACTIVATEURS ET PROTEINES ASSOCIEES.....	- 29 -
FIGURE 8 : CHANGEMENTS CONFORMATIONNELS DU LBD ET INTERACTION AVEC DES COREGULATEURS.....	- 31 -
FIGURE 9 : MODELE CLASSIQUE D'ACTIVATION DES GENES CIBLES DE L'AR.....	- 32 -
FIGURE 10 : SEQUENCE DU NLS DE RAR $\gamma$ .....	- 37 -
FIGURE 11 : VOIES DE SIGNALISATION ET PHOSPHORYLATION DE CIBLES .....	- 40 -
FIGURE 12 : SITES DE PHOSPHORYLATION CONSTITUTIFS OU DEPENDANTS DE L'AR DES RAR ET RXR .....	- 43 -
FIGURE 13 : ENSEMBLE DES SITES DE PHOSPHORYLATION CONNUS DE RAR ET RXR .....	- 49 -
FIGURE 14 : MODE D'ACTION DE SRA/PUS1P SUR LA TRANSACTIVATION DES GENES CIBLES DE L'AR.....	- 52 -
FIGURE 15 : ACTINE ET ABP : REGULATION DE L'ARN POLYMERASE II ET DES RECEPTEURS NUCLEAIRES .....	- 54 -
FIGURE 16 : STRUCTURE DE TFIIF ET CASCADE DE PHOSPHORYLATION DE RAR $\alpha$ .....	- 62 -
FIGURE 17 : PONTS SALINS ET PHOSPHORYLATION DU LBD DE RAR $\alpha$ .....	- 64 -
FIGURE 18 : PROTEINES DE LA FAMILLE DES VINEXINES ET ORGANISATION MODULAIRE .....	- 66 -
FIGURE 19 : DOMAINE SH3 ET LIAISON A UN MRP .....	- 68 -
FIGURE 20 : RECHERCHE DE DR5 PROCHES D'UN GENE ET PHYLOGENETIQUEMENT CONSERVES.....	- 76 -
FIGURE 21: ANALYSE « GENOME WIDE » DES MOTIFS DR5 RGK TSA .....	- 78 -
FIGURE 22 : ANALYSE COMPARATIVE DES GENES ASSOCIES AUX DR5 SELECTIONNES HUMAINS ET MURINS.....	- 82 -
FIGURE 23: ANALYSE DES RARE POTENTIELS SELECTIONNES.....	- 84 -
FIGURE 24 : STRUCTURE ET FONCTION PROTEOLYTIQUE DU PROTEASOME .....	- 88 -

FIGURE 25 : FLEXIBILITE CONFORMATIONNELLE DU NTD .....	- 92 -
FIGURE 26 : EFFETS ALLOSTERIQUES A L'EHELLE DU RAR.....	- 95 -
TABLEAU 1 : 47 RARE DR5 SELECTIONNES CHEZ L'HOMME.....	- 80 -
TABLEAU 2: 44 RARE DR5 SELECTIONNES CHEZ LA SOURIS.....	- 80 -

## Liste des abréviations

**ABP:** Actin Binding Protein

**AC :** Adénylate Cyclase

**Acinus:** Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus

**ACO2:** ACOitase 2

**AD:** Activation Domain ou domaine d'activation

**ADN** ou **DNA:** Acide DésoxyriboNucléique ou DesoxyriboNucleic Acid

**AF:** Activation Function

**Akt:** protéine kinase B

**AMP:** Adénosine MonoPhosphate

**AndR:** Androgen Receptor

**ANT1:** Androgen receptor N-terminal domain Transactivating protein-1

**AP1:** Activator Protein 1

**AR:** Retinoic Acid ou Acide Rétinoïque

**ArgBP2:** c-Arg Binding Protein 2

**ARN** ou **RNA:** Acide RiboNucléique ou RiboNucleic Acid

**ARNm:** Acide RiboNucléique messenger

**ASAP:** Apoptosis Splicing Associated Protein

**ATP:** Adénosine Tri Phosphate

**ATRA:** All Trans Retinoic Acid ou Acide Rétinoïque tout trans

**BHLHE40** ou **Stra13:** Stimulated by retinoic acid 13

**bHLH-PAS:** basic Helix Loop Helix-PerArnt/AhRSim

**CAK:** Cdk Activating Complex

**CAMK II $\gamma$ :** Ca<sup>2+</sup> CalModuline Kinase II gamma

**CAP/Ponsin:** c-Abl Associated Protein/Ponsin

**CAR:** Constitutive Androstane Receptor

**CARM1:** Coactivator associated Arginine Methyltransferase 1

**CBP:** CREB Binding Protein

**Cdk:** Cyclin dependant kinase ou kinase dépendante de cycline

**ChIP:** Chromatin ImmunoPrecipitation

**ChIP-ChIP:** Chromatin ImmunoPrecipitation on *ChIP*

**CoR-NR box:** CoRepressor-Nuclear Receptor box

**CRABP2:** Cytoplasmic Retinoic Acid Binding Protein 2

**CRAPB:** Cytoplasmic Retinoic Acid Binding Protein

**CRBP1:** Cellular Retinol Binding Protein 1

**CRBP2:** Cellular Retinol Binding Protein 2

**CREB:** Cyclic AMP Response Element Binding

**CTD:** C-Terminal Domain ou Domaine C Terminal

**CTE:** COOH-Terminal Extension

**CYP26A1:** CYtochrome Protein 26A1

**Dab2:** Disabled homolog 2

**DBD:** DNA Binding Domain ou Domaine de Liaison à l'ADN

**DR:** Direct Repeat ou répétition directe

**DRIP205/TRAP220 :** Vitamin D Receptor Interacting Protein 205

**dTSS:** distance au TSS

**EGF:** Epidermal Growth Factor

**EJC:** Complexe de Jonction Exon/exon

**ER:** Estrogen Receptor ou récepteur aux œstrogènes

**ERAP 140:** Estrogen Receptor Associated Protein 140 kDa

**Erk:** Extracellular signal regulated kinase

**ES:** Embryonic Stem cell

**Ets1:** v-ets Erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1

**Fli1:** Flightless 1

**FoxA1:** Forkhead box A1

**FRAP:** Fluorescence Recovery after Photobleaching

**FRET:** Fluorescence Resonance Energy Transfer

**FSH:** Follicle Stimulating Hormone ou Hormone Folliculo-Stimulante

**FXR:** Farnesoid X Receptor

**Gata2 ou 3:** GATA binding protein 2 ou 3

**GFP:** Green Fluorescent Protein

**GlutR:** Glutamate Receptor

**GPS:** Gene context database Positioning System

**GPS2:** G Protein Pathway Suppressor 2

**GR:** Glucocorticoid Receptor

**GRE:** Glucocorticoid Response Element

**GST-pulldown:** Glutathione S-Transferase – pulldown

**GTF:** Facteurs Généraux de Transcription

**HAT:** Histone Acetyl Transferase

**HDAC:** Histone DesAcetylase

**HIC1:** Hypermethylated In Cancer 1

**HMT:** Histone Methyl Transferase

**HNF:** Hepatocyte Nuclear Factor

**HOX:** Homeobox

**IKK:** I-kappa-B kinase

**IL:** InterLeukine

**IR-10:** coronin, actin binding protein, 2A

**IUD:** Intrinsically Unstructured Domain ou structure naturellement désordonnée

**IUPAC:** International Union of Pure and Applied Chemistry

**JNK:** c-Jun N-terminal Kinase

**LBD:** Ligand Binding Domain ou Domaine de liaison du ligand

**LBP:** Ligand Binding Pocket ou Poche de Liaison du Ligand

**MAPK:** Mitogen Activated Protein Kinase

**MAT1:** Ménage à trois 1

**MEF:** Mouse Embryonic Fibroblast ou Fibroblaste Embryonnaire de Souris

**Meis2:** Myeloid ecotropic viral integration site 2

**miRNA:** micro RNA

**MKK4/SEK1:** Mitogen activated protein kinase kinase 4/ SAPK/Erk Kinase 1

**MPT:** Modifications Post Traductionnelles

**MR:** Mineralocorticoid Receptor

**MRP:** Motif Riche en Proline

**MSK1:** Mitogen and Stress activated protein Kinase 1

**MSL1:** Male-Specific Lethal 1

**NCOA:** Nuclear receptor COActivator

**NCoR:** Nuclear receptor CoRepressor

**NER:** Nucleotide Excision Repair

**NES:** Nuclear Export Signal ou Signaux d'Export Nucléaire

**NGFIB:** Nerve Growth Factor induced protein I-B

**NIX1:** Neuronal Interacting factor X 1

**NLS:** Nuclear Localization Signal ou signal de localisation nucléaire

**NPDC1:** Neural Proliferation, Differentiation and Control 1

**NR:** Nuclear Receptor ou Récepteur Nucléaire

**NR-box :** Nuclear Receptor-box

**NRID ou NID:** Nuclear Receptor Interacting Domain ou domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires

**NTD:** N-Terminal Domain ou domaine N-Terminal

**NURR1:** NUclear Receptor Related 1



**Oct4:** Octamer 4

**P/CAF:** P300/CBP Associated Factor

**PAK:** p21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase

**pb:** paire de base

**PCBP4:** Poly(rC) Binding Protein 4

**PGC1:** Peroxisome proliferator activated receptor gamma Coactivator 1

**PI3K:** Phosphatidylinositol 3 Kinase

**PIC:** PreInitiation complex ou Complexe de Préinitiation de la transcription

**Pin1:** Proline cis/trans isomérase 1

**PIX:** PAK Interacting eXchange factor

**PKC:** Protéine Kinase C

**PLZF:** Promyelocytic Leukemia Zinc Finger

**PML:** ProMyelocytic Leukemia protein

**PPAR:** Peroxisome Proliferator Activated Receptor

**PPII :** PolyProline de type II

**PR:** Progesterone Receptor

**PRAME:** PReferentially expressed Antigen in MElanoma

**PRMT1:** Protein arginine MethylTransferase 1

**PSF:** Polypyrimidine tract binding protein associated Splicing Factor

**Pur $\alpha$ :** Purine-rich element binding protein alpha

**Pusp1p:** Pseudo uridyl synthase protein 1p

**PXR:** Pregnane X Receptor

**RARE:** Retinoic Acid Response Element

**RAR $\alpha,\beta,\gamma$ :** Retinoic Acid Receptor  $\alpha, \beta, \gamma$  ou Récepteur à l'Acide Rétinoïque  $\alpha, \beta, \gamma$

**RD:** Repression Domain

**RE:** Réticulum endoplasmique

**RIF1:** RAP1 Interacting Factor homolog

**RIP140 :** Receptor Interacting Protein 140

**RMN:** Résonance Magnétique Nucléaire

**RNP:** RiboNucleoProtein

**RTK :** Récepteur Tyrosine Kinase

**RXR:** Rexinoid Receptor

**SAFB1/2:** Scaffold Attachment Factor B1/2

**SAGA:** Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase

**SANT:** Swi3/Ada2/N-CoR/TFIID

**SAPK:** Stress Activated Protein Kinase

**SF3a120:** Splicing Factor 3a 120 kDa

**SH3:** Src Homology 3

**SILAC:** Stable isotope labelling with amino acids in cell culture

**Sin3A:** SIN3 homolog A

**SLIRP:** SRA stem-LOOP-Interacting RNA binding Protein

**SMRT:** Silencing Mediator of Retinoic and Thyroid receptors

**snRNP:** small nuclear RiboNucleoProtein

**SoHo:** Sorbin Homology

**SOS-1:** Son Of Sevenless-1

**SPBP:** Stromelysin-1 Platelet-derived growth factor-responsive element Binding Protein

**SRA:** Steroid receptor RNA Activator

**Src:** v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog

**SRC-1, 2 ou 3:** Steroid Receptor Activator 1, 2 ou 3

**Stra13 ou BHLHE40:** Stimulated by Retinoic Acid 13

**SUG-1:** 26S-ATPase Subunit 5

**SUSP1:** SUmo Specific Protease 1

**SUZ12:** SUppressor of Zeste 12 homolog

**SWI/SNF:** Switching deficient/Sucrose Non Fermenting

**TBL1:** Transducin Beta-Like protein 1

**TBLR1:** TBL1 Related protein

**TBP:** TATA Binding Protein

**TCF:** T-cell-specific transcription factor

**TFIIH:** Transcription Factor II H

**TIF1 $\alpha$ :** Transcription Intermediary Factor 1 $\alpha$

**TNF $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor alpha ou Facteur de Nécrose Tumorale alpha

**TR:** Thyroid hormone Receptor

**TR2:** Testis Receptor 2

**TSG101:** Tumor Susceptibility Gene 101

**TSS:** Transcription Start Site

**UCSC:** University of California, Santa Cruz

**UNRRREAL:** Universal Nuclear Receptor Response Element Analytic Localizer

**UTR:** UnTranslated Region ou région non traduite

**UV:** UltraViolet

**VDR:** Vitamin D Receptor

**WASP:** Wiskott-Aldrich Syndrome Protein

**WAVE:** WASP family VErpilin-homologous protein

**Wnt:** Wingless-type MMTV integration site family

**WT1:** Wilms Tumor 1

**WW:** tryptophane/tryptophane

**XPD:** Xeroderma Pigmentosum D

**ZAC1:** pleiomorphic adenoma gene-like 1

**Znf423:** Zinc Finger Protein 423

**Znf503:** Zinc Finger Protein 503

# Sommaire

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>- 2 -</b>
<b>LISTE DES PUBLICATIONS .....</b>	<b>- 4 -</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>- 5 -</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>- 7 -</b>
<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>- 11 -</b>
<b>AVANT PROPOS.....</b>	<b>- 14 -</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>- 17 -</b>
<b>I. STRUCTURE DES RAR ET MODELE CLASSIQUE DE L'ACTIVATION DES GENES CIBLES DE L'AR .....</b>	<b>- 17 -</b>
<b>A. Structure modulaire des RAR.....</b>	<b>- 17 -</b>
1. Le domaine de liaison à l'ADN : DBD .....	- 17 -
a) Structure tridimensionnelle.....	- 17 -
b) Eléments de réponse (RARE) et gènes cibles de l'AR .....	- 19 -
2. Le domaine de liaison du ligand : LBD .....	- 20 -
a) Interface de dimérisation .....	- 21 -
b) Poche de liaison du ligand : LBP .....	- 21 -
c) L'hélice H12 COOH-terminale .....	- 22 -
3. Le domaine NH2-Terminal : NTD .....	- 23 -
a) Fonction et conservation.....	- 23 -
b) Structure du NTD.....	- 23 -
4. La région D : région charnière DBD/LBD.....	- 24 -
5. La région F COOH-terminale .....	- 25 -
<b>B. Modèle classique de l'activation des gènes cibles de l'AR.....</b>	<b>- 25 -</b>
1. Corépresseurs et coactivateurs conventionnels du LBD des RAR.....	- 25 -
a) Corépresseurs et complexes associés.....	- 25 -
b) Coactivateurs et complexes associés aux RAR .....	- 28 -
2. Modèle séquentiel d'activation des gènes cibles de l'AR .....	- 30 -
a) Hélice H12 : pierre angulaire du LBD .....	- 30 -
b) De la répression à l'activation : le modèle séquentiel.....	- 32 -
3. Les corégulateurs non conventionnels du LBD.....	- 34 -
a) Corépresseurs à motif LxxLL .....	- 34 -
b) Autres corégulateurs .....	- 34 -

II.	NOUVEAUX CONCEPTS POUR LES RAR.....	- 36 -
A.	<i>Effets non génomiques des RAR</i> .....	- 36 -
1.	Dynamique de la localisation intracellulaire des RAR.....	- 36 -
a)	RAR : localisation extranucléaire rare ?.....	- 36 -
b)	Dynamique de l'import/export nucléaire des RAR.....	- 37 -
2.	Localisation cytoplasmique des RAR et régulation de la traduction.....	- 38 -
3.	Localisation extranucléaire des RAR et activation rapide de voies kinasiques .....	- 39 -
a)	Activation rapide de voies kinasiques par l'AR .....	- 39 -
b)	Deux modèles d'activation des voies kinasiques par l'AR : .....	- 41 -
	PKC- et/ou RAR-dépendant .....	- 41 -
c)	Les cibles potentielles des voies kinasiques.....	- 42 -
B.	<i>Modifications post-traductionnelles des RAR et conséquences transcriptionnelles</i> .....	- 42 -
1.	Phosphorylation en réponse à l'AR et initiation de la transcription .....	- 43 -
a)	Phosphorylation des RAR par cdk7/TFIIH .....	- 43 -
b)	Phosphorylation des partenaires : RXR et corégulateurs .....	- 45 -
2.	Autres modifications post-traductionnelles : interférence avec la phosphorylation. ....	- 46 -
a)	Ubiquitination et dégradation des RAR par le protéasome.....	- 46 -
b)	Autres MPT et leurs conséquences sur l'activité transcriptionnelle des RAR. ....	- 47 -
3.	Phosphorylation indépendante de l'AR : répression de la transcription .....	- 48 -
a)	RAR, RXR et JNK : « Junk RAR ».....	- 48 -
b)	Autres voies kinasiques et répression des RAR .....	- 50 -
C.	<i>Nouveaux partenaires des RAR et interférence avec d'autres voies de signalisation</i> .....	- 50 -
1.	Phosphorylation et nouveaux partenaires du NTD des RAR.....	- 50 -
2.	RAR et complexes ribonucléoprotéiques.....	- 51 -
3.	RAR et actine/matrice nucléaire.....	- 53 -
4.	Interférence des RAR avec d'autres voies de signalisation.....	- 55 -
a)	RAR et développement embryonnaire .....	- 56 -
b)	RAR et mise en place/maintenance du système nerveux. ....	- 57 -
c)	Transrépression d'autres gènes.....	- 57 -
	<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>- 59 -</b>
	<b>RESULTATS</b> .....	<b>- 61 -</b>
I.	PHOSPHORYLATION DU LBD ET INTERACTION DYNAMIQUE DE CDK7/TFIIH (PUBLICATIONS 1 ET 2 ET REVUE 1) .....	- 61 -
A.	<i>Recrutement de cdk7/TFIIH par RAR : synergie LBD/NTD</i> .....	- 61 -
B.	<i>Phosphorylation et dynamique conformationnelle du LBD</i> .....	- 63 -
II.	PHOSPHORYLATION DU NTD ET INTERACTION DYNAMIQUE AVEC LA VINEXINE $\beta$ (PUBLICATIONS 3 ET 4 ET REVUE 1) -	66 -
A.	<i>Vinexine : découverte, isoformes et structure</i> .....	- 66 -
B.	<i>Domaine SH3 de la Vinexine <math>\beta</math> et motif riche en prolines (MRP) de RAR<math>\gamma</math></i> .....	- 68 -
C.	<i>Effet de la phosphorylation de RAR<math>\gamma</math> sur l'interaction avec la Vinexine <math>\beta</math></i> .....	- 69 -
D.	<i>In vivo, phosphorylation de RAR<math>\gamma</math> et dissociation de la Vinexine <math>\beta</math> en réponse à l'AR</i> .....	- 70 -

III. DYNAMIQUE DE RECRUTEMENT DE RAR $\gamma$ AU PROMOTEUR : PHOSPHORYLE ET SANS VINEXINE $\beta$ (PUBLICATIONS 3 ET 4).....	- 71 -
A. <i>Recrutement de RAR<math>\gamma</math> et importance de la phosphorylation</i> .....	- 72 -
B. <i>RAR<math>\gamma</math> et Vinexine <math>\beta</math>, une interaction rare au promoteur ?</i> .....	- 73 -
IV. RECHERCHE DE NOUVEAUX RARE (RESULTATS NON PUBLIES).....	- 74 -
A. <i>Prologue</i> .....	- 74 -
B. <i>Choix de la stratégie : bioinformatique, phylogénétique, DR5, RGK TSA</i> .....	- 75 -
C. <i>Analyse « genome wide » des motifs DR5 RGK TSA chez l'homme et la souris : localisation et conservation</i> .....	- 77 -
1. Programmes utilisés et données disponibles.....	- 77 -
2. Recherche et analyse « genome wide » des motifs DR5 RGK TSA.....	- 79 -
D. <i>Analyse de RARE conservés et proches du TSS : comparaison homme/souris</i> .....	- 81 -
1. Critères de sélection des sites conservés et proches du TSS.....	- 81 -
2. Analyse comparative des RARE humains et murins.....	- 81 -
E. <i>Analyse des RARE potentiels sélectionnés : conservation de distance, d'orientation et ontologie des gènes associés</i> .....	- 85 -
1. Conservation de distance et d'orientation.....	- 85 -
2. Ontologie des gènes associés.....	- 85 -
V. REGULATION DU SIGNAL AR ET RECRUTEMENT DU PROTEASOME (PUBLICATION 5 ET REVUE 1).....	- 87 -
A. <i>Protéasome : structure et fonctions</i> .....	- 87 -
B. <i>RAR<math>\alpha</math>, SUG-1 et SRC-3 : à la vie à la mort</i> .....	- 89 -
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>- 90 -</b>
I. LE MRP DU NTD, UN MOTIF REELLEMENT PROMETTEUR (NOUVEAUX PARTENAIRES, PHOSPHORYLATIONS)...	- 90 -
A. <i>MRP et une nouvelle famille de partenaires</i> .....	- 90 -
B. <i>MRP et changements conformationnels</i> .....	- 91 -
C. <i>MRP et dynamique d'association/dissociation de partenaires : rôle de la phosphorylation</i> .....	- 93 -
II. DBD, AU CENTRE DU DEBAT.....	- 94 -
A. <i>DBD, intégrateur de changements allostériques</i> .....	- 95 -
1. Phosphorylation, effets allostériques et impact sur le DBD.....	- 95 -
2. DBD et son ligand « ADN ».....	- 96 -
B. <i>Quand le DBD met le RARE sous contrainte</i> .....	- 97 -
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	<b>- 99 -</b>

**AVANT PROPOS**

## Avant propos

Le génome humain, composé de quelques 3 milliards de paires de base, comprend l'ensemble des informations nécessaires à la formation d'un individu dès le stade de l'œuf. Au sein de l'embryon, puis de l'individu, aucun tissu n'est identique, tant au niveau de l'ultrastructure que de la fonction. Ainsi, deux cellules filles peuvent avoir des devenir différents alors que leur contenu génétique est le même. Pourquoi au niveau de l'individu, les cellules lymphocytaires sont-elles différentes des cellules de la peau alors que leur matériel génétique est identique ? Les principes généraux permettant de répondre à cette question ont été élucidés durant la dernière décennie. Ainsi la transcription, et notamment l'expression régulée des gènes par l'ARN polymérase II, permet l'expression d'un ensemble de gènes restreint mais spécifique d'un type cellulaire donné, et cela parmi les quelques 30 000 gènes prédits du génome humain. De plus, à côté des gènes constitutivement exprimés, se trouvent des gènes dont l'expression va dépendre de stimuli externes (hormone, stress, ...).

La transcription des gènes est un mécanisme complexe faisant intervenir un grand nombre de protéines et de complexes protéiques parmi lesquels on distingue l'ARN polymérase II, le médiateur, les facteurs généraux de la transcription avec leurs protéines associées ainsi que les activateurs de la transcription. Ce sont ces derniers, dont l'expression et la présence au niveau des promoteurs des gènes cibles peuvent être modulées, qui nous intéressent plus particulièrement. Ils sont caractérisés, en règle générale, par la présence d'un domaine de fixation à l'ADN (DBD) et d'un ou plusieurs domaine(s) activateur(s) de la transcription (AF). Les récepteurs nucléaires (NR) correspondent à de tels activateurs de la transcription. Chez les Métazoaires, ces récepteurs appartiennent à une superfamille qui englobe les récepteurs nucléaires des hormones stéroïdiennes tels que les récepteurs des œstrogènes (ER), de la progestérone (PR), des glucocorticoïdes (GR), des minéralocorticoïdes (MR) et des androgènes (AndR). Elle englobe aussi la famille des récepteurs nucléaires d'hormones non stéroïdiennes, comprenant notamment les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR), d'acide gras (PPAR), de la vitamine D (VDR) et des acides rétinoïques (RAR, RXR).

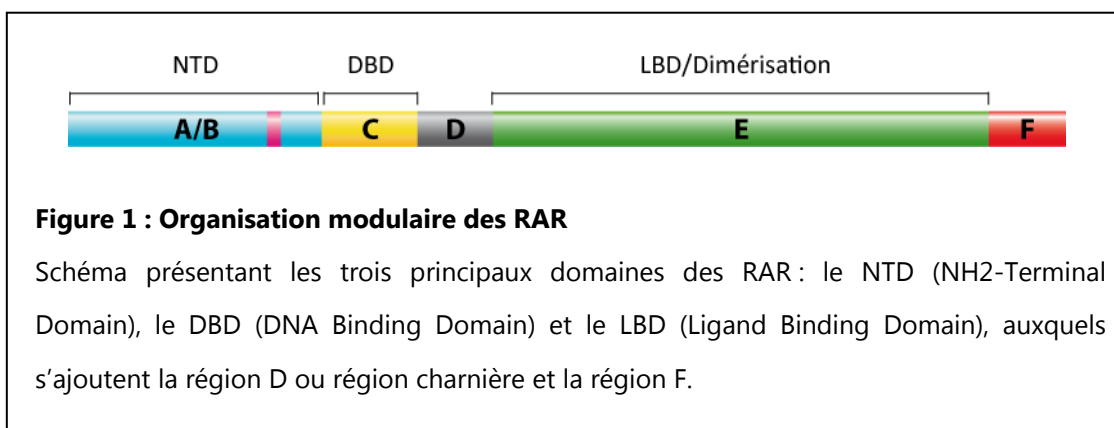
Historiquement, en plus de ces récepteurs dont le ligand est connu, des récepteurs nucléaires dits « orphelins », dont le ligand n'a pas encore été identifié, ont été aussi découverts. Ces récepteurs ont été isolés sur la base de leur homologie avec les récepteurs non orphelins. La découverte récente, pour certains d'entre eux, d'un ligand leur a fait perdre ce caractère « orphelin ».

Dans ce manuscrit, nous allons plus particulièrement nous intéresser aux récepteurs de l'acide rétinoïque.

Il existe deux familles de récepteurs de l'acide rétinoïque (AR), les RAR (Retinoic Acid Receptor) qui peuvent lier l'acide rétinoïque tout-trans et son isomère 9-cis, et les RXR (Retinoid X Receptor) qui ne lient que l'acide rétinoïque 9-cis. Au sein de ces deux familles, il existe trois sous-types, RAR :  $\alpha$  (NR1B1),  $\beta$  (NR1B2) et  $\gamma$  (NR1B3) et RXR :  $\alpha$  (NR2B1),  $\beta$  (NR2B2) et  $\gamma$  (NR2B3) codés par des gènes distincts (Germain et al., 2006c). Pour chaque sous-type, on distingue plusieurs isoformes qui résultent de l'utilisation de promoteurs différents et/ou d'un épissage alternatif (Germain et al., 2006a; Germain et al., 2006b; Laudet and Gronemeyer, 2002).

L'expression des RAR et RXR est régulée de façon spatio-temporelle dans l'organisme au cours du développement (Dolle, 2009). Selon l'étape du développement et selon le tissu cellulaire considéré, c'est un hétérodimère RAR/RXR spécifique qui va être principalement actif et responsable de l'expression d'un ensemble de gènes. Alors que les RAR n'ont que les RXR pour partenaire d'hétérodimérisation, les RXR peuvent soit s'homodimériser, soit s'hétérodimériser avec de nombreux autres récepteurs nucléaires tels que VDR, TR, PPAR, LXR, FXR, CAR, PXR, NGFIB et NURR1 (Germain et al., 2006b).

Les RAR présentent une structure et des domaines bien définis comprenant un domaine NH2-terminal (NTD) non structuré ainsi qu'un domaine de liaison à l'ADN (DBD) relié à un domaine COOH-terminal comprenant le site de liaison du ligand (LBD) (Germain et al., 2006c) (Figure 1). Les effets des RAR sur la transcription passent d'une part, par leur liaison à l'ADN, au niveau de séquences spécifiques nommées RARE (Retinoic Acid Response Element) localisées au sein des promoteurs de gènes cibles et, d'autre part, par des changements conformationnels du LBD induits par le ligand permettant l'association/dissociation de corégulateurs, nécessaires aux modifications de la chromatine, au niveau des gènes cibles.





En plus d'induire des changements conformationnels au niveau des RAR, l'AR peut aussi activer plusieurs voies de signalisation impliquant des kinases. En outre, les récepteurs de l'AR sont eux-mêmes des cibles pour de telles kinases et comme nous le verrons, les phosphorylations apportent un niveau de régulation supplémentaire vis-à-vis de l'activité transcriptionnelle des RAR et RXR. L'ensemble des effets de l'AR sur la transcription des gènes cibles a fait l'objet d'une revue récente dans NURSA (Rochette-Egly and Germain, 2009).

Lors de mon travail de thèse, je me suis particulièrement intéressé à étudier les dynamiques d'association/dissociation des RAR ( $\alpha$  et  $\gamma$ ) avec différents partenaires protéiques en corrélation avec leur état de phosphorylation, leur intégration à l'échelle structurale et leurs conséquences sur la transcription des gènes cibles de l'AR.

Avant de présenter cette étude dynamique des RAR, je présenterai dans un premier temps la structure globale des RAR ainsi que le modèle d'activation des RAR établi en se basant sur la dynamique du LBD. Dans un second temps, je présenterai de nouveaux concepts établis autour des RAR, notamment les effets non-génomiques, les modifications post-traductionnelles et les nouveaux partenaires pouvant moduler la fonctionnalité des RAR. Enfin, je présenterai et discuterai mes résultats en mettant en avant le rôle clé de deux domaines, le NTD « non structuré » et le DBD « structuré », dans l'intégration du signal AR.

# INTRODUCTION

## Introduction

### I. Structure des RAR et modèle classique de l'activation des gènes cibles de l'AR

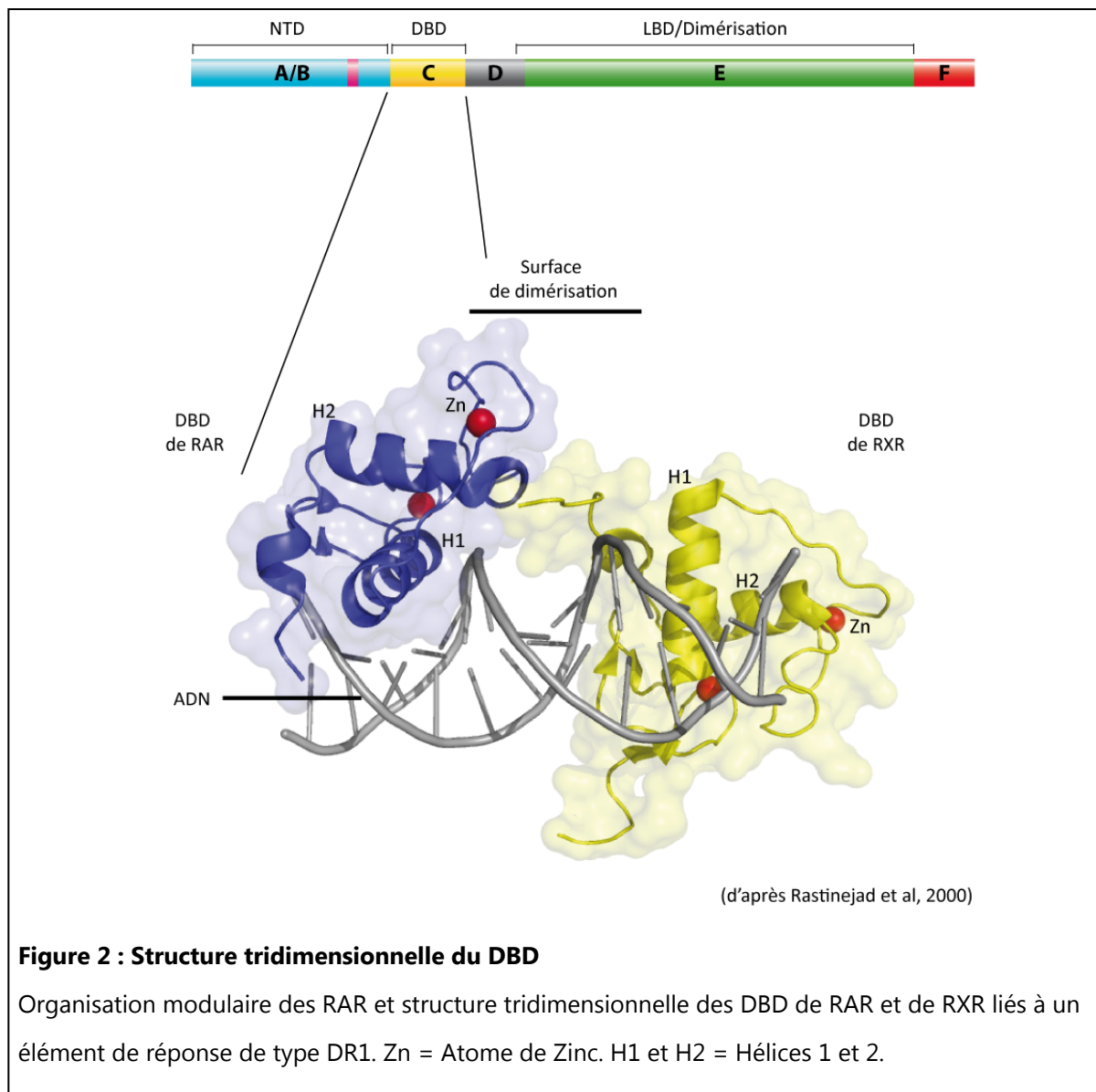
#### A. Structure modulaire des RAR

##### 1. Le domaine de liaison à l'ADN : DBD

###### a) *Structure tridimensionnelle*

La région centrale (notée C) des récepteurs nucléaires est la plus conservée parmi les sous-types de RAR mais aussi parmi l'ensemble des récepteurs nucléaires et elle correspond au domaine de liaison à l'ADN ou DBD (DNA Binding Domain) (Chambon, 1996; Laudet and Gronemeyer, 2002). Les RAR agissent comme des facteurs de transcription inductibles par leur ligand en se liant, *via* leur DBD, au niveau de courtes séquences d'ADN nommées RARE (Retinoic Acid Response Element) localisées dans les promoteurs des gènes cibles de l'AR. La reconnaissance des RARE nécessite la formation d'un hétérodimère RAR/RXR (Kliwer et al., 1992). Chaque partenaire établit des contacts avec un des deux hémisites composant le RARE. De nombreuses études structurales par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) et par cristallographie ont été réalisées avec les DBD de RAR et RXR isolés ou en association avec l'ADN (Holmbeck et al., 1998a; Holmbeck et al., 1998b; Knegtel et al., 1993; Lee et al., 1993; Rastinejad et al., 2000). Ces travaux ont permis d'obtenir une structure type du DBD et de déterminer ses contacts avec l'ADN (Figure 2).

Le DBD des RAR est un domaine globulaire composé de deux motifs en doigt de zinc reliés par une boucle, chaque atome de zinc étant coordonné par quatre cystéines ( $C_4$ ), et suivi d'une extension COOH-terminale (Zechel et al., 1994a; Zechel et al., 1994b). Ces motifs forment deux hélices alpha perpendiculaires. L'hélice 1 NH<sub>2</sub>-terminale s'insère dans le sillon majeur de l'ADN, en établissant des contacts non-spécifiques avec le squelette de l'ADN (phosphate et ribose) et des contacts spécifiques avec les bases azotées (Figure 2). Trois résidus seulement de l'hélice 1 déterminent la spécificité de liaison du récepteur à son élément de réponse et forment une région nommée boîte P. Cette hélice 1 est recouverte de façon perpendiculaire par l'hélice 2 qui contribue essentiellement à la stabilisation du domaine (Lee et al., 1993) (Figure 2).



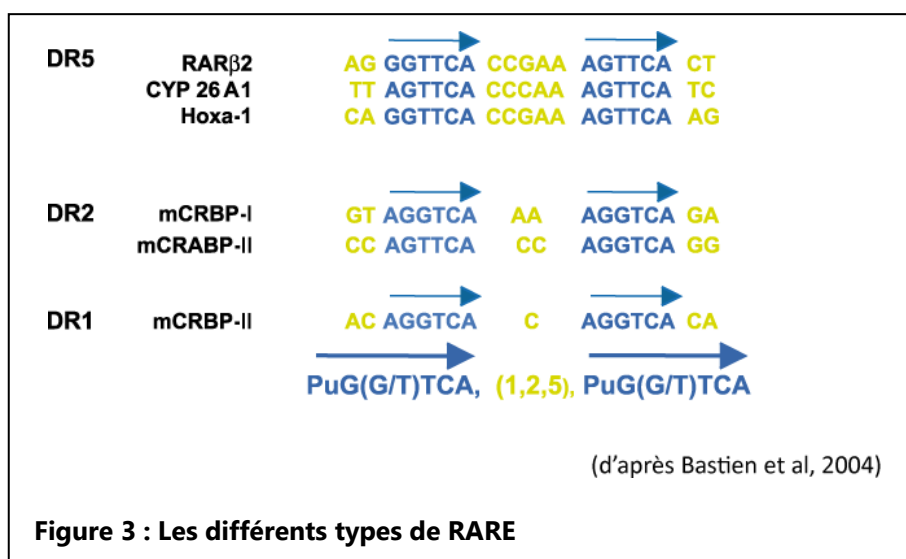
Lors de l'hétérodimérisation d'un RAR avec un RXR au niveau d'un RARE canonique de type DR5 (Direct Repeat 5 : répétition directe du même hémisite séparé par 5 nucléotides), des résidus du premier doigt de zinc du partenaire RAR créent avec des résidus du début du second doigt de zinc (boîte D) de RXR, une surface de dimérisation permettant l'interaction entre les DBD de chaque partenaire (Zechel et al., 1994a). Selon l'espacement entre les deux hémisites, la surface d'interaction peut varier (Perlmann et al., 1993) (Figure 2). Cette surface joue un rôle clé dans la reconnaissance de l'espace entre les deux hémisites, à l'origine de la règle « de l'espacement » (Mangelsdorf and Evans, 1995; Umesono et al., 1991).

De plus en plus de données soulignent l'importance de l'extension COOH-terminale du DBD dans la reconnaissance à l'ADN et/ou la dimérisation, *via* notamment des changements conformationnels (Hsu et al., 1998; Khorasanizadeh and Rastinejad, 2001). La formation d'une hélice

alpha dans RXR $\alpha$  peut contribuer à l'établissement de contacts supplémentaires avec l'ADN *via* un sillon mineur de l'ADN et à une stabilisation de l'interface de dimérisation (Holmbeck et al., 1998a; Rastinejad, 2001; Wright and Dyson, 1999). A noter, le DBD est également susceptible de subir de nombreux changements conformationnels subtils en fonction de son association avec les autres domaines NTD ou LBD mais aussi en fonction de la séquence d'ADN reconnue (cf. Discussion). Ce domaine est également le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles pouvant moduler son interaction avec l'ADN (cf. II.B).

### b) *Eléments de réponse (RARE) et gènes cibles de l'AR*

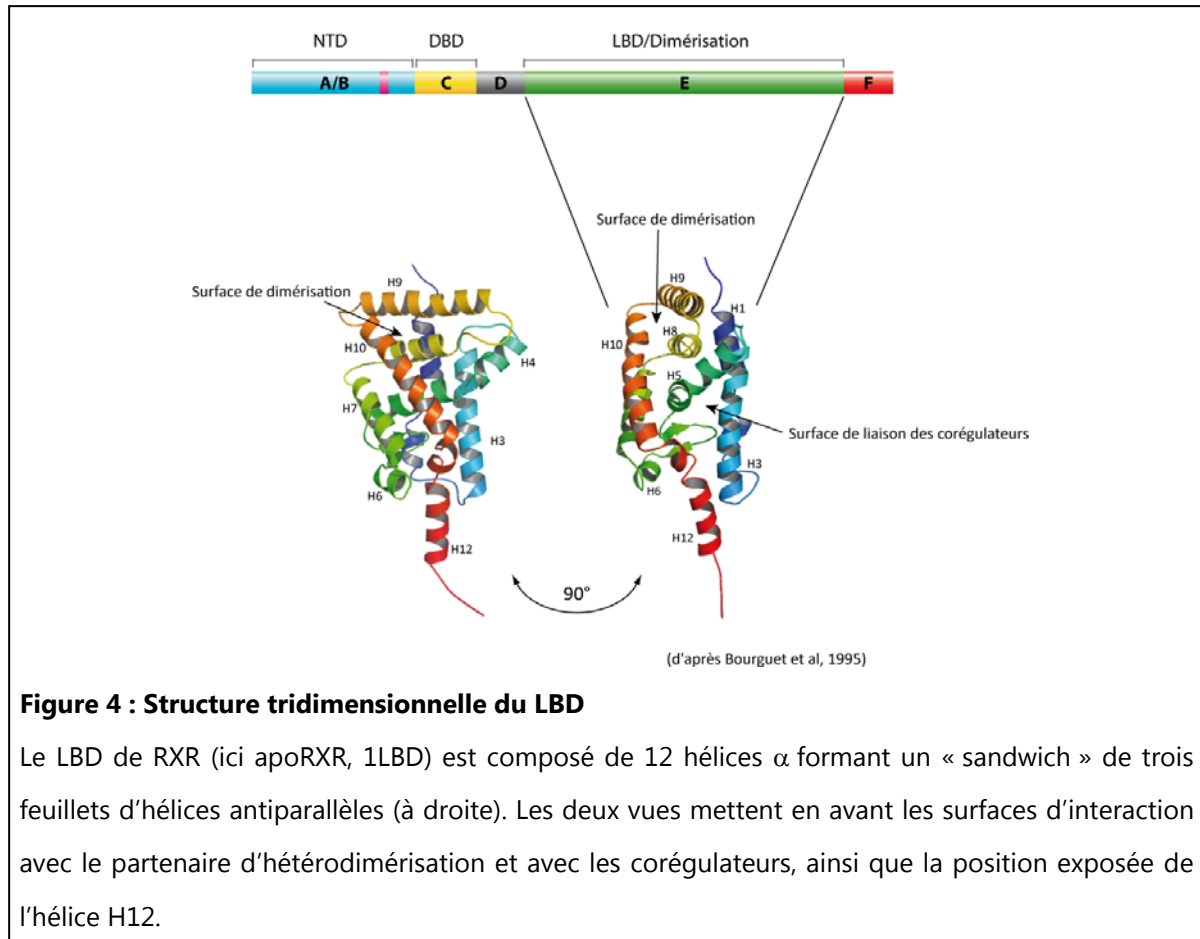
Historiquement, des études biochimiques réalisées *in vitro* ont permis de démontrer que les hétérodimères RAR/RXR peuvent se lier au niveau de deux séquences hexamériques séparées par 1 à 5 nucléotides, organisées en palindrome, en répétition directe ou en répétition inversée (Mader et al., 1993a; Mader et al., 1993b). La découverte et l'analyse des promoteurs de quelques gènes cibles de l'AR, associées à des études de mutagenèse dirigée, ont permis d'affiner ces motifs (Figure 3). RAR et RXR se lient avec la plus grande affinité au niveau de RARE composés de deux répétitions directes (DR) d'un motif consensus 5'-(A/G)G(G/T)TCA-3' séparés par 5 nucléotides (DR5) (Leid et al., 1992; Umesono et al., 1991) (Figure 3). Ils peuvent également se lier au niveau de DR séparés par 2 nucléotides (DR2) ou 1 nucléotide (DR1) avec une affinité décroissante (Figure 3). Des homodimères RXR/RXR peuvent également se lier au niveau de DR1. Les hétérodimères se lient avec une certaine polarité au niveau des DR : sur les éléments DR2 et DR5, RXR occupe le motif hexamérique en 5', alors que RAR occupe le motif en 3' (Zechel et al., 1994b). Au contraire, la polarité RAR/RXR est inversée dans le cas d'un DR1 (Zechel et al., 1994b).



Actuellement, le RARE canonique semble être le DR5 (Figure 3). Des DR5 ont été identifiés dans les promoteurs de nombreux gènes cibles de l'AR, notamment des gènes impliqués dans la signalisation de l'AR (*RARβ2*, *CYP26A1*) (de The et al., 1990; Loudig et al., 2000) et dans le développement (*Hox*, *HNF*) (Dupe et al., 1997; Qian et al., 2000). Des DR2 ont été trouvés dans les promoteurs de quelques gènes (*CRABP2* et *CRBP1*) (Durand et al., 1992; Smith et al., 1991). Quant au DR1, il a été référencé uniquement dans le promoteur de *CRBP2* chez le rat (Mangelsdorf et al., 1991). Des études *in silico* et d'autres basées sur la littérature ont permis de déterminer un panel de gènes potentiellement régulés par l'AR (Balmer and Blomhoff, 2002).

## 2. Le domaine de liaison du ligand : LBD

Le LBD (Ligand Binding Domain), en position COOH-terminale par rapport au DBD, présente également une bonne conservation parmi les sous-types des RAR et joue un rôle central dans la reconnaissance du ligand, d'où son nom de domaine de liaison du ligand. Il est fonctionnellement complexe de part le fait qu'il englobe i) la poche de liaison spécifique du ligand ou LBP (Ligand Binding Pocket), ii) une surface de dimérisation avec le LBD du partenaire, iii) une surface de liaison pour des corégulateurs et iv) une hélice H12 qui renferme la fonction de transactivation dépendante du ligand appelée AF-2 (Figure 4).



De nombreuses structures à haute résolution ont été obtenues pour le LBD des RAR et RXR, isolés avec/sans ligand et avec/sans corégulateur (Bourguet et al., 2000a; Bourguet et al., 1995; Moras and Gronemeyer, 1998; Renaud and Moras, 2000; Renaud et al., 1995; Wurtz et al., 1996). Toutes ces études ont révélé une structure canonique, constituée typiquement de 12 hélices alpha [notées de H1 à H12] (sauf dans le cas de RAR $\gamma$ , où l'hélice H2 n'est pas observable) et d'un feuillet beta court à deux brins béta, le tout formant un domaine globulaire (Figure 4). Du point de vue de la structure tertiaire, l'ensemble de ces hélices forme un « sandwich » composé de trois feuillets d'hélices antiparallèles (Figure 4).

#### *a) Interface de dimérisation*

En plus des contacts qui peuvent s'établir entre les deux partenaires RAR/RXR au niveau du DBD, la surface majeure d'hétérodimérisation se situe au niveau du LBD (Bourguet et al., 2000b).

Initialement disséquée par des études biochimiques, cette surface a été identifiée suite à l'obtention de la structure tridimensionnelle du dimère de LBD RAR/RXR (Bourguet et al., 2000a; Rachez et al., 1996). Plus précisément, les résidus hydrophobes des hélices H9 et H10 contribuent à la majorité de la surface (plus de 75%), auxquels viennent s'ajouter quelques résidus des hélices H7 et H11 et des boucles 8-9 et 9-10 (Figure 4). La récente découverte de ponts salins établis au sein même du LBD entre des résidus conservés parmi les récepteurs nucléaires tend à apporter une nouvelle dimension au LBD (Brelivet et al., 2004). Ces ponts salins pourraient « transmettre » des changements allostériques subtils suite à la fixation du ligand, affectant la stabilité de l'hétérodimère (Brelivet et al., 2004). Ceci laisse présager un lien « énergétique » entre la poche de liaison du ligand et la surface de dimérisation dans le cas des RAR, mais aussi entre la surface de dimérisation et la surface d'interaction avec les corégulateurs dans le cas des RXR (Brelivet et al., 2004; Pogenberg et al., 2005).

#### *b) Poche de liaison du ligand : LBP*

Les RAR et RXR sont capables de lier chacun l'acide rétinoïque (isomères AR tout-trans et AR 9-cis pour RAR, et AR 9-cis seulement pour RXR).

La structure du LBD de RAR $\gamma$  « ligandé » à l'AR tout-trans (ATRA) a permis de localiser la poche de liaison du ligand ou LBP à l'intérieur de la structure du LBD (Bourguet et al., 2000a; Li et al., 2003; Renaud et al., 1995). La LBP est enserrée d'une part par les hélices H3 et H5 et le feuillet beta, et d'autre part par les hélices H11 et H12. La spécificité et l'affinité du ligand pour le récepteur sont essentiellement liées à trois paramètres : i) la taille et la forme de la poche de liaison, ii) la présence de résidus polaires au fond de la poche assurant l'ancrage et la sélectivité du ligand et

iii) l'établissement de nombreuses liaisons hydrogènes ligand/récepteur (Gehin et al., 1999; Klaholz et al., 2000). Parmi les résidus de la LBP des RAR impliqués dans la liaison de l'ATRA, seuls trois résidus polaires diffèrent entre les sous-types de RAR (Klaholz et al., 2000). Ceci est à l'origine du développement de ligands spécifiques, notamment pour RAR $\alpha$  et RAR $\gamma$  (Chen et al., 1995; de Lera et al., 2007; Germain et al., 2004).

### c) *L'hélice H12 COOH-terminale*

L'hélice H12 est un composant crucial du LBD puisqu'elle contrôle l'activité transcriptionnelle ligand-dépendante des RAR *via* la dynamique de recrutement de complexes corégulateurs. Cette propriété avait été déterminée bien avant la résolution de la structure tridimensionnelle du LBD par des expériences de mutagenèse démontrant sa conservation parmi les récepteurs nucléaires et son rôle fonctionnel (Chambon, 1996). La résolution des structures cristallographiques de RXR $\alpha$  « non ligandé » (Bourguet et al., 1995) et de RAR $\gamma$  « ligandé » à l'ATRA (Renaud et al., 1995) a permis d'étayer cette hypothèse et d'établir un mécanisme de l'activation transcriptionnelle dépendante du ligand en lien avec la flexibilité conformationnelle de l'hélice H12 (Egea et al., 2001; Moras and Gronemeyer, 1998; Steinmetz et al., 2001) (Figure 4 et Figures 8A et 8B).

En absence de ligand, l'hélice H12 du LBD est exposée au solvant, en position étendue vers le « bas » du LBD (Figure 4). Après liaison du ligand, une série d'interactions intramoléculaires entraînent le repositionnement de l'hélice H11 en continuité de l'hélice H10 ainsi que le balancement de l'hélice H12, refermant la cavité du LBP à la manière d'un piège à souris (Moras and Gronemeyer, 1998) (Figure 8B). Une fois l'hélice H12 positionnée, des changements structuraux au niveau des hélices H3 et H4 et de la boucle H3-H4 induisent la création d'une nouvelle surface d'interaction pour le recrutement de coactivateurs transcriptionnels. L'importance de l'hélice H12 dans la régulation de l'interaction avec les corépresseurs et coactivateurs sera détaillée dans le paragraphe I.B.2.

Ce modèle a été validé avec l'analyse de la structure tridimensionnelle du sous-type RAR $\alpha$  et d'autres récepteurs nucléaires (Egea et al., 2001). Cependant, des expériences récentes réalisées avec différents sous-types des RAR semblent démontrer des spécificités du point de vue du positionnement de l'hélice H12 en absence de ligand (Farboud et al., 2003; Farboud and Privalsky, 2004; Hauksdottir et al., 2003). En lien avec la faible capacité de répression des gènes de RAR $\beta$  et RAR $\gamma$  en absence de ligand, l'hélice H12 de ces deux sous-types pourrait interagir avec l'hélice H3 et adopter une conformation proche de celle de RAR $\alpha$  « ligandé » (Farboud et al., 2003).



### 3. Le domaine NH2-Terminal : NTD

#### a) *Fonction et conservation*

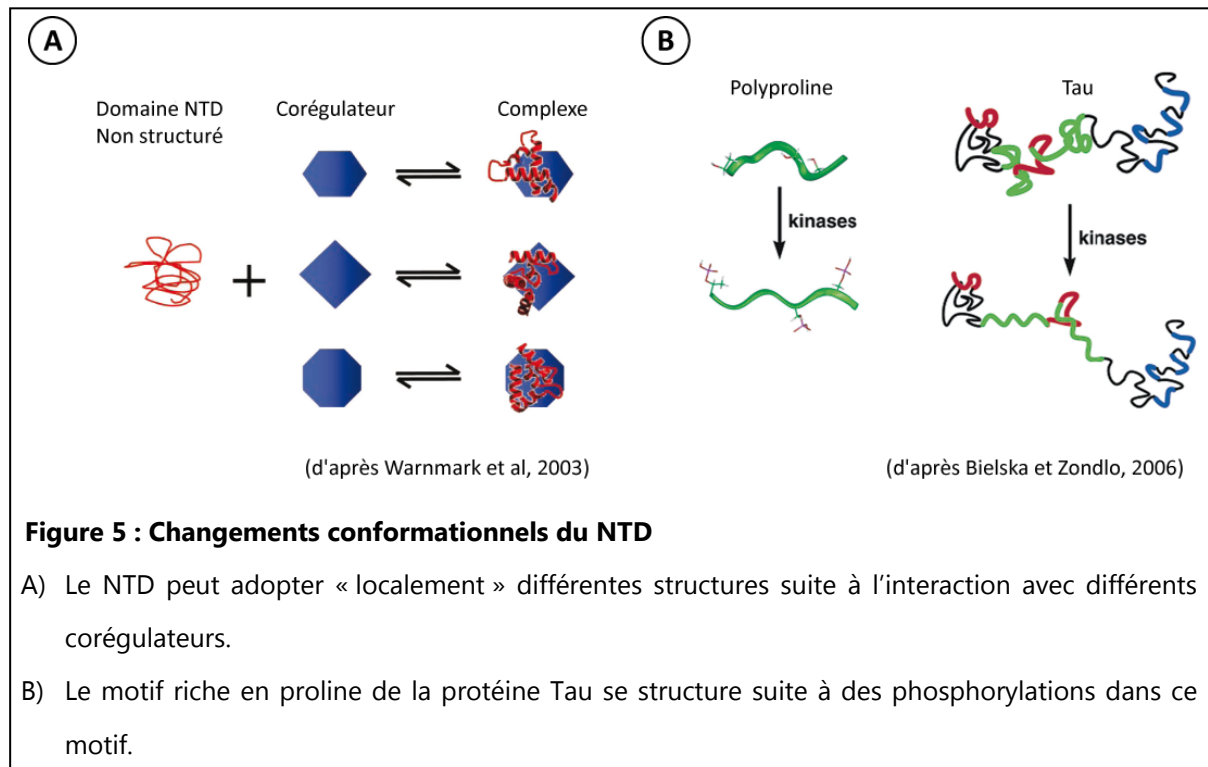
Le NTD renferme les deux régions A et B et inclue une fonction de transactivation indépendante du ligand appelée AF-1 (Nagpal et al., 1993; Nagpal et al., 1992). Le NTD est capable à lui-seul d'activer la transactivation de gènes cibles même en absence du ligand. Cette fonction reste cependant minoritaire comparée à la celle du LBD et devient dépendante du ligand dans le cadre du récepteur entier. Ainsi, il existe une forte synergie entre le NTD et le LBD des RAR mais le mécanisme moléculaire qui la sous-tend n'a pas encore été élucidé (Nagpal et al., 1993; Taneja et al., 1997). La fonction de transactivation de RAR $\beta$ 2 a été localisée au niveau des acides aminés 1 à 32 (région A), et aussi des 15 derniers aminoacides du NTD (extrémité COOH-terminale de la région B) (Folkers et al., 1993).

Le NTD entier présente une conservation très faible au sein des récepteurs nucléaires, et également entre les différents sous-types des RAR eux mêmes. En effet, la région A, issue de l'utilisation d'un promoteur alternatif du premier exon, diffère entre chaque isoforme des RAR (Chambon, 1996; Mangelsdorf et al., 1995). Au contraire, la région B bien que peu conservée au regard des autres récepteurs nucléaires, est fortement conservée entre les différents sous-types des RAR.

#### b) *Structure du NTD*

Il n'existe pas de données structurales permettant d'obtenir une structure tridimensionnelle du NTD des RAR. Cependant, cette région est très sensible à la protéolyse (Reddy et al., 1992; Rochette-Egly et al., 1991) et, en accord avec le NTD des autres récepteurs nucléaires, elle renferme une grande proportion d'acides aminés acides et hydrophobes (Folkers et al., 1993; McEwan et al., 2007). Ces données associées aux nombreuses études biochimiques et structurales réalisées avec les autres récepteurs nucléaires ont permis de définir le NTD comme une structure naturellement désordonnée ou IUD (Intrinsically Unstructured Domain) (Lavery and McEwan, 2005; McEwan et al., 2007). De telles régions non-structurées peuvent adopter différents états conformationnels plus ou moins structurés localement ou globalement en fonction d'interactions avec d'autres protéines ou en fonction d'effets allostériques liés à la liaison à l'ADN ou à la proximité du DBD (Dyson and Wright, 2005; Lavery and McEwan, 2005; Warnmark et al., 2003; Wright and Dyson, 2009) (Figure 5A). De plus, ces régions structurellement « flexibles » sont susceptibles d'être le siège de modifications post-traductionnelles telles que phosphorylation, ubiquitination. Ces modifications peuvent en retour engendrer des changements structuraux subtils sur le(s) domaine(s) adjacent(s) ou servir de point

d'ancrage pour le recrutement d'autres complexes moléculaires (Bielska and Zondlo, 2006) (Figure 5B).



A noter, le NTD des RAR présente un motif riche en proline qui a la potentialité de former une hélice polyproline et est susceptible d'interagir avec des protéines à domaine(s) SH3 ou à domaine(s) WW (cf. II.C.). Des motifs Proline/Sérine sont également le siège de phosphorylations *in vivo* (cf. II.B.).

#### 4. La région D : région charnière DBD/LBD

Bien que la région D soit peu conservée en séquence et en longueur entre les différents récepteurs nucléaires, elle présente une bonne conservation entre les différents sous-types des RAR à son extrémité NH<sub>2</sub>-terminale (proche du DBD) et une forte variabilité à son extrémité COOH-terminale (proche du LBD). En position NH<sub>2</sub>-terminale, la séquence est riche en résidus basiques (arginine et lysine) et forme un motif servant de signal de localisation nucléaire ou NLS (Nuclear Localisation Signal) (Hamy et al., 1991). En outre, en réponse au ligand, cette région peut subir des changements conformationnels importants, qui en lien avec sa flexibilité permettraient d'accommoder le bon positionnement du LBD et/ou DBD l'un par rapport à l'autre sans créer de problèmes d'encombrement stérique (Chandra et al., 2008; Driscoll et al., 1996). Cette région est aussi le siège d'interactions avec des partenaires protéiques et de modifications post-traductionnelles (cf. II.B. et II.C.).

## 5. La région F COOH-terminale.

Cette région, qui n'est pas du tout conservée entre les différents sous-types des RAR, voire absente dans les RXR, présente une grande variabilité en séquence et en longueur. Cette région est en continuité directe de l'hélice H12 du LBD et sa conformation peut jouer un rôle déterminant dans la fonctionnalité du récepteur et ses interactions avec les corégulateurs (Skafar and Zhao, 2008; Tate et al., 1996). Etant donné le nombre important de glycines et de prolines qu'elle contient, la région F de RAR $\alpha$  pourrait adopter une conformation ouverte et ainsi altérer la position ou la conformation de l'hélice H12 adjacente (Farboud and Privalsky, 2004). Cette région peu structurée est également le siège de nombreuses phosphorylations, qui peuvent modifier la structure et la fonction des RAR (cf. II.B.). Enfin, cette région pourrait servir d'ancrage pour des ARN, tel que les ARNm codant pour des récepteurs au glutamate (cf. II.A.2.).

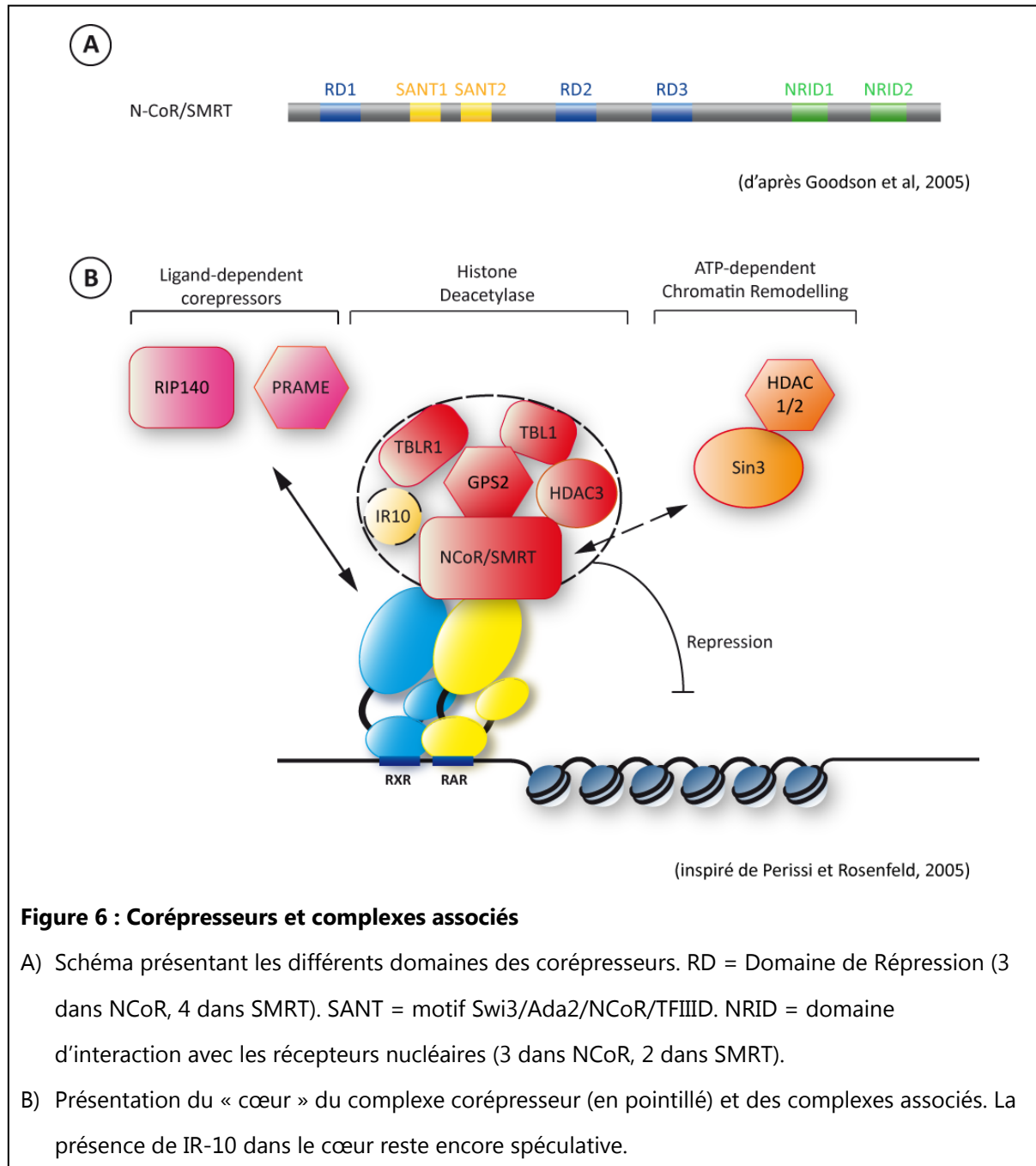
## B. Modèle classique de l'activation des gènes cibles de l'AR

L'organisation structurale du LBD et la dynamique conformationnelle de l'hélice H12 contribuent au rôle clé joué par le LBD dans l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de l'AR, *via* le recrutement dynamique et séquentiel de complexes protéiques, nommés corépresseurs et coactivateurs.

### 1. Corépresseurs et coactivateurs conventionnels du LBD des RAR

#### a) Corépresseurs et complexes associés

Les premiers corépresseurs des récepteurs nucléaires ont été identifiés avec des cribles double-hybride réalisés dans la levure en utilisant le LBD de RAR $\alpha$  ou RXR $\alpha$  comme appât. Deux équipes ont simultanément identifiés NCoR (Nuclear receptor CoRepressor) (Horlein et al., 1995) et SMRT (Silencing Mediator of Retinoic and Thyroid receptors) (Chen and Evans, 1995), deux protéines de haut poids moléculaire présentant une forte homologie de séquence (plus de 45% d'identité de séquence) (Privalsky, 2004). Ces deux protéines présentent des fonctions similaires de répression de l'expression des gènes cibles, mais aussi des spécificités fonctionnelles. L'analyse de souris « knock-out » pour chacune de ces protéines démontre que l'inactivation de SMRT induit une létalité embryonnaire au stade E16.5 due essentiellement à une défaillance cardiaque, alors que l'inactivation de NCoR induit une létalité au stade E15.5 due essentiellement à une anémie et à une réduction de la taille des souris (Jepsen et al., 2008; Jepsen et al., 2000).



NCoR et SMRT présentent par ailleurs une organisation modulaire similaire (Figure 6A). En effet, deux régions présentent une forte conservation de séquence : la région COOH-terminale impliquée dans l'interaction avec les récepteurs nucléaires *via* des domaines nommés NRID (Nuclear Receptor Interaction Domain) et la région NH2-terminale qui confère les propriétés répressives *via* des domaines d'interaction protéine-protéine nommés RD (Repression Domain) et SANT (Swi3/Ada2/NCoR/TFIIID) (Lazar, 2003; Stanya and Kao, 2009) (Figure 6A).

Les NRID de NCoR et SMRT sont composés d'un ou plusieurs motifs importants pour l'interaction avec les récepteurs nucléaires (Chen and Evans, 1995; Horlein et al., 1995; Nagy et al.,

1997). Il s'agit du motif nommé « CoR-NR box » dont la séquence consensus est : LxxI/HIxxxI/L (Hu and Lazar, 1999; Nagy et al., 1999; Perissi et al., 1999). Ce motif adopte une conformation en hélices alpha de trois tours, qui peut se lier au niveau d'un sillon hydrophobe composé des hélices H3, H4 et H5 du LBD des RAR (Perissi et al., 1999). SMRT contient deux boîtes CoR-NR alors que NCoR en contient trois. Ces motifs ont des affinités différentes pour les récepteurs, qui découlent notamment des acides aminés flanquant la boîte CoR-NR. Les RAR se lient préférentiellement à SMRT et ont une faible affinité pour NCoR, alors que RXR se lie aux deux protéines sans préférence. En outre, les différents sous types de RAR ont des affinités très différentes pour SMRT, RAR $\alpha$  présentant la meilleure affinité et RAR $\beta$  la plus faible. Cette faible affinité de RAR $\beta$  pour SMRT serait liée à des différences structurales du LBD et au positionnement de l'hélice H12 à proximité de l'hélice H3 (cf. I.B.2.a.).

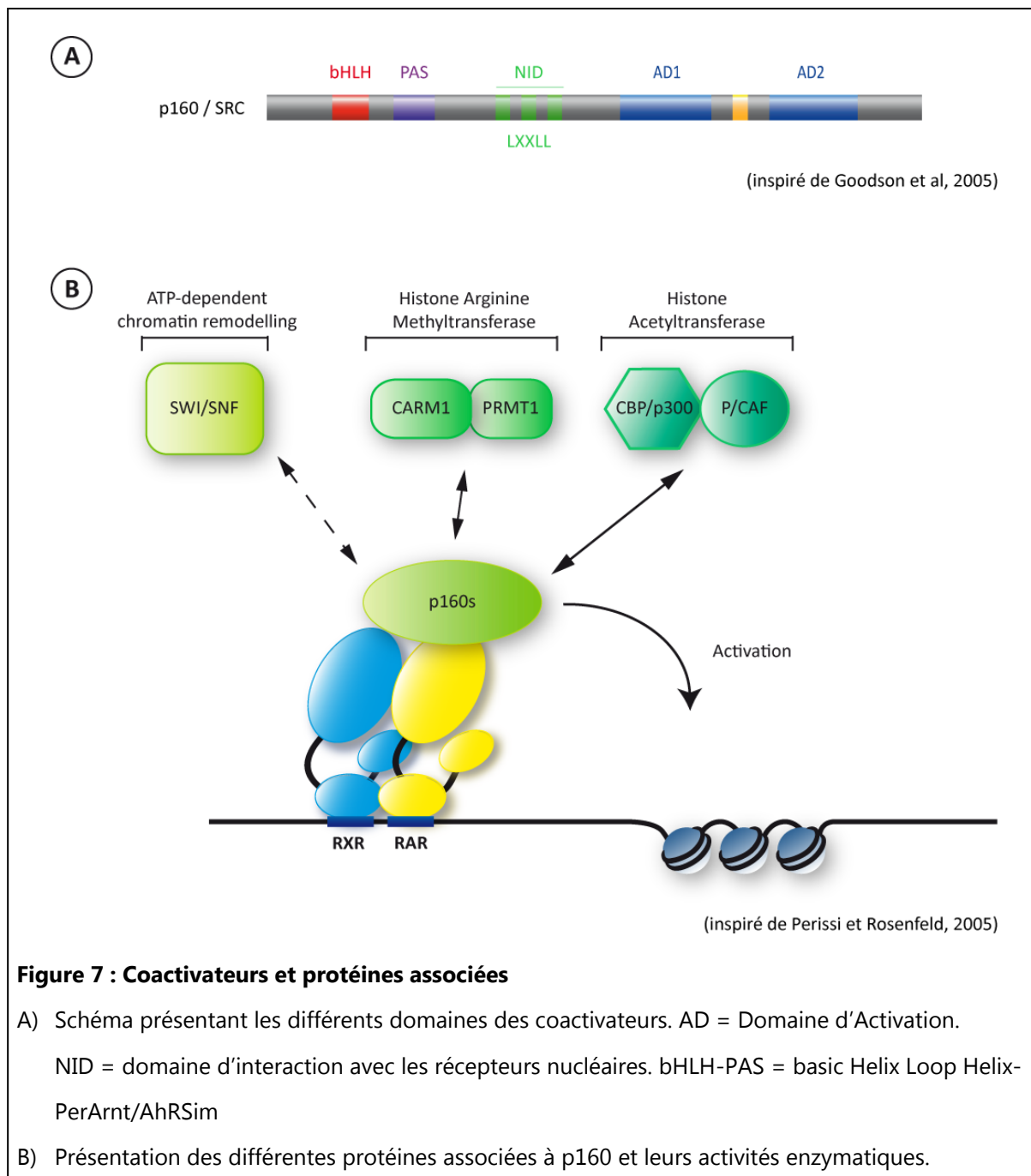
De manière intéressante, SMRT et NCoR ne recèlent pas de domaine(s) à activité enzymatique pouvant expliquer leur propriété répressive sur l'expression des gènes cibles de l'AR. En fait, leur activité répressive dépend des motifs RD et SANT qui servent de plateforme pour le recrutement de larges complexes macromoléculaires (de 1,5 à 2 MDa) possédant des activités enzymatiques. Initialement, des partenaires (Sin3A et HDAC1) avaient été obtenus et identifiés par des méthodes de GST-pulldown et de crible double hybride (Alland et al., 1997; Heinzel et al., 1997; Nagy et al., 1997) (Figure 6B). Cependant, des purifications biochimiques ultérieures des complexes associés à NCoR et SMRT n'ont pas permis de les retrouver. Toutefois, le « cœur » du complexe a été identifié et est composé d'au moins 4 autres protéines : HDAC3 (Histone DeAcetylase 3), GPS2, TBL1 et TBLR1 (Guenther et al., 2000; Li et al., 2000; Yoon et al., 2003; Zhang et al., 2002) (Figure 6B). Ces protéines ont été trouvées associées aussi bien à NCoR qu'à SMRT. D'autres protéines associées en quantités sub-stœchiométriques pourraient être spécifiques d'un des complexes ; ainsi la protéine IR-10, une protéine de liaison à l'actine, a été identifiée uniquement dans le complexe SMRT et non dans celui de NCoR (Yoon et al., 2003).

L'activation de la fonction de répression du complexe nécessite une coopération entre différents partenaires protéiques : le complexe corépresseur, recruté par les récepteurs nucléaires, reconnaît initialement les queues des histones acétylées (Yu et al., 2003). Cette interaction activerait la fonction enzymatique de la protéine HDAC3 (Histone DeAcetylase), qui en retour désacétylerait la queue des histones (Guenther et al., 2001). Ainsi, en absence d'AR, le complexe maintiendrait la chromatine sous forme compactée et réprimerait l'expression des gènes cibles de l'AR (Hartman et al., 2005; Vermeulen et al., 2004).

De plus, SMRT, NCoR et leurs protéines associées sont toutes susceptibles d'être modifiées post-traductionnellement (phosphorylation, sumoylation, ubiquitination) et /ou dégradées en réponse à différents stimuli, servant ainsi de détecteurs (nommés « sensors ») et régulant la dynamique d'association/dissociation de ces complexes (Perissi et al., 2004; Perissi and Rosenfeld, 2005; Perissi et al., 2008; Stanya et al., 2008; Tiefenbach et al., 2006) (cf. II.B.). Des études récentes mettent également en lumière l'importance de la synthèse de différents ARNm issus d'épissages alternatifs de SMRT et de NCoR dans la régulation de la répression, *via* la disparition de certains motifs de liaisons aux récepteurs ou de certains motifs de répression (Faist et al., 2009; Goodson et al., 2005a; Goodson et al., 2005b; Jonas et al., 2007).

### *b) Coactivateurs et complexes associés aux RAR*

L'existence de protéines impliquées dans la fonction de transactivation des RAR a depuis longtemps été suggérée par des expériences démontrant la répression de la transcription des gènes cibles d'un récepteur suite à la surexpression du domaine LBD d'un autre récepteur. Ce phénomène appelé « squelching » laisse supposer qu'il existe des protéines ou complexes présents en quantité limitante dans la cellule, nécessaires pour l'activation des gènes cibles de l'AR et capables d'interagir avec le LBD. Parmi ces protéines ont été découverts trois membres de la famille p160, nommés NCOA1 (SRC-1), NCOA2 (TIF-2, GRIP-1, SRC-2) et NCOA3 (SRC-3, pCIP, ACTR, AIB-1, TRAM-1, RAC-3) (Hong et al., 1997; Torchia et al., 1997; Voegel et al., 1996; Yao et al., 1996) (Figure 7A). Ces protéines nucléaires possèdent toutes un domaine NH2-terminal très conservé nommé bHLH-PAS (basic Helix Loop Helix-PerArnt/AhRSim) et deux domaines en position COOH-terminale nommés domaines d'activation (AD1 et AD2), qui établissent notamment des interactions avec d'autres coactivateurs (Glass and Rosenfeld, 2000; Heery et al., 1997; Lefebvre et al., 2005; Perissi and Rosenfeld, 2005; Voegel et al., 1998) (Figure 7A). La liaison avec les récepteurs nucléaires se fait *via* un domaine central nommé NID. Ce domaine est composé, pour chaque membre de la famille p160, de trois motifs LxxLL qui peuvent s'insérer sous forme d'hélice alpha à deux tours au niveau du même sillon hydrophobe du LBD que les corépresseurs (Figure 7A).



Les coactivateurs de la famille p160 possèdent intrinsèquement un domaine à activité Histone Acetyl Transferase (HAT) (Chen et al., 1997; Spencer et al., 1997). Comme les corépresseurs, ils servent également de plateforme d'interaction entre les récepteurs nucléaires et d'autres coactivateurs à activité enzymatique. Parmi les nombreux partenaires identifiés, on note des protéines à activité Histone Acetyl Transferase telles que CBP/p300 et P/CAF, des protéines à activité Histone Methyl Transferase (HMT) telles que CARM1 et PRMT1, mais aussi des protéines à activité kinasique, ubiquitine-ligase ou ATPasique (SWI/SNF) (Perissi and Rosenfeld, 2005; Rosenfeld et al., 2006; Yao et al., 1996) (Figure 7B). L'ensemble de ces protéines à activité enzymatique va modifier

les queues des histones, décompacter la chromatine, déplacer les nucléosomes et rendre ainsi la chromatine accessible pour le recrutement du complexe de préinitiation de la transcription (PIC) et de l'ARN polymérase II, conduisant ainsi à la transcription des gènes cibles de l'AR (Perissi and Rosenfeld, 2005; Rosenfeld et al., 2006).

Notons que contrairement aux corépresseurs, il n'a pas été mis en évidence de spécificité d'interaction entre les différents membres de la famille p160 et les sous-types des RAR. Par ailleurs, les coactivateurs sont aussi les cibles de kinases et d'ubiquitine-ligases (Han et al., 2009a). Les modifications post-traductionnelles qui en résultent jouent un rôle important dans la régulation de la réponse à l'AR, notamment *via* la dégradation des coactivateurs en réponse au signal AR (cf. II.B.).

## 2. Modèle séquentiel d'activation des gènes cibles de l'AR

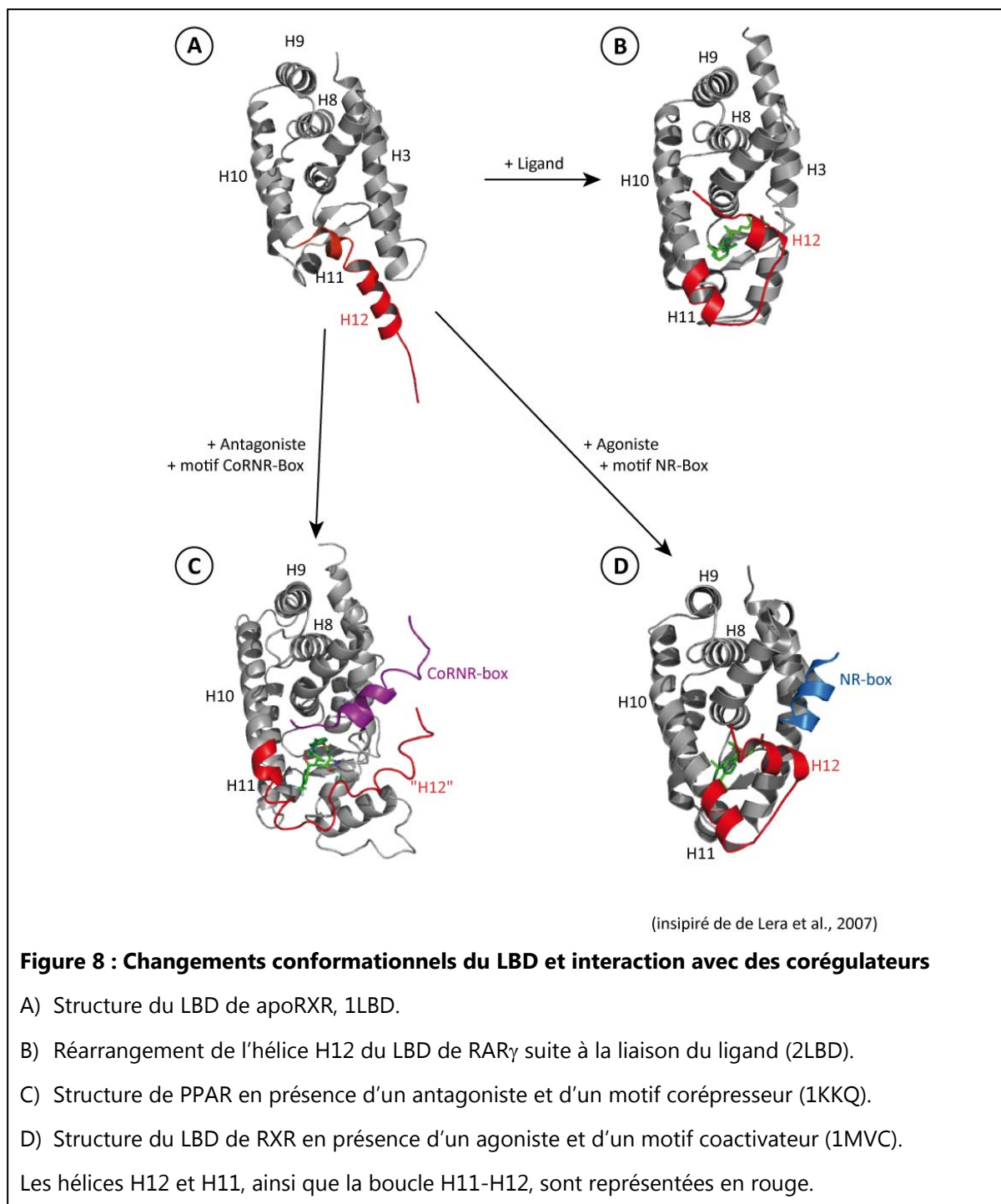
Ce modèle a été proposé sur la base d'expériences biochimiques, structurales et moléculaires. Il présente de façon séquentielle les étapes permettant de passer d'un état de répression des gènes cibles de l'AR à leur activation sur le principe de changements structuraux, liés à la position de l'hélice H12, l'apparition/disparition de surfaces d'interaction et le recrutement dynamique de complexes multiprotéiques par le LBD de RAR (Dilworth and Chambon, 2001; Perissi and Rosenfeld, 2005; Rosenfeld et al., 2006).

### a) Hélice H12 : pierre angulaire du LBD

Le mécanisme d'activation de RAR $\alpha$  a été établi grâce à l'apport de nombreuses structures cristallographiques du LBD (Bourguet et al., 2000a). L'étude comparative de la structure tridimensionnelle du LBD en absence et en présence d'un ligand met en évidence l'importance du changement conformationnel de l'hélice H12 induit par le ligand (Bourguet et al., 2000a; de Lera et al., 2007) (Figures 8A et 8B).

Le motif d'interaction des coactivateurs avec le LBD a été identifié comme étant le motif LxxLL ou « NR-box » (Heery et al., 1997). Il interagit spécifiquement au niveau d'un sillon hydrophobe du LBD de RAR, composé de résidus des hélices H3, H4, H5 et H12 (Feng et al., 1998) (Figure 8D). Deux résidus chargés, un glutamate dans l'hélice H12 et une lysine présente dans le sillon hydrophobe, jouent le rôle d'une « pince » chargée, qui stabilise l'interaction entre le LBD et le coactivateur et qui n'est pas compatible avec le recrutement des corépresseurs (Feng et al., 1998). Ces données, obtenues par mutagenèse, ont été renforcées par l'obtention d'une structure cristallographique du LBD associé à un peptide renfermant le motif LxxLL d'un coactivateur (Darimont et al., 1998; Nolte et al., 1998; Shiao et al., 1998) (Figure 8D).





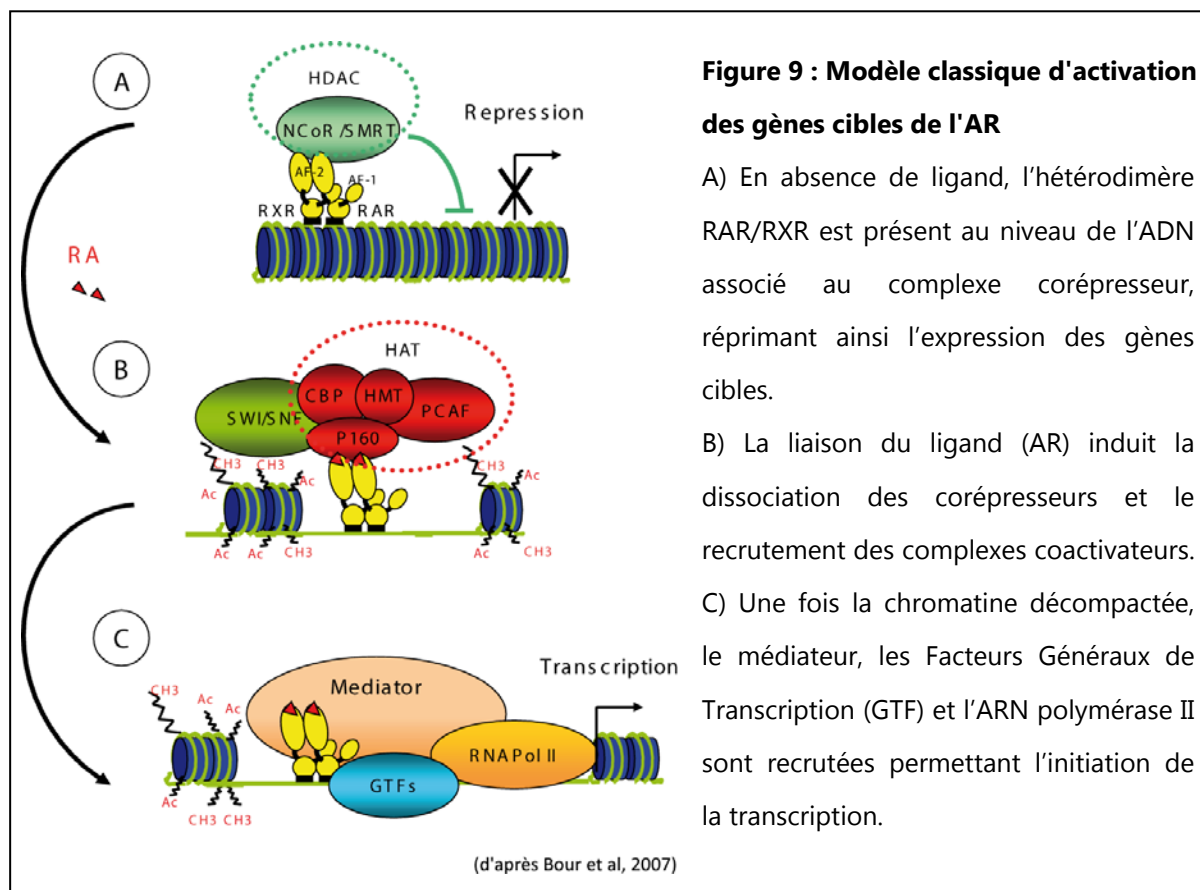
Il est intéressant de noter que le motif consensus LxxI/HlxxxI/L des corépresseurs présente une grande ressemblance avec le motif LxxLL des coactivateurs (Hu and Lazar, 1999; Perissi et al., 1999). De plus, en absence de ligand, ce motif corépresseur se lie au LBD des RAR au niveau d'une surface composée des hélices H3, H4 et H5. Cette surface est semblable à la surface d'interaction des coactivateurs, mais ne comprend pas l'hélice H12 (Nagy et al., 1999) (Figure 8C). Cependant, le motif LxxI/HlxxxI/L forme du côté NH<sub>2</sub>-terminal une hélice plus grande que celle du motif des coactivateurs (Figure 8C). Cette différence de longueur, qui masque l'interface d'interaction de H12, expliquerait le

fait que la fixation des coactivateurs et corépresseurs est mutuellement exclusive et a permis de proposer un modèle pour l'échange entre corépresseurs et coactivateurs (Nagy et al., 1999). L'obtention d'une structure cristallographique de PPAR $\gamma$  associé à un motif corépresseur et à un antagoniste, qui maintient l'hélice H12 dans une conformation ouverte différente de celle obtenue avec un agoniste, a confirmé ce modèle (Xu et al., 2002) (Figure 8C).

Des expériences réalisées sur les différents sous-types de RAR ont permis de démontrer que contrairement à RAR $\alpha$ , les autres sous-types RAR $\beta$  et RAR $\gamma$  interagissent très faiblement avec les corépresseurs (Farboud et al., 2003). Il a été émis l'hypothèse qu'en absence de ligand, l'hélice H12 de RAR $\beta$  et RAR $\gamma$  se lierait par des interactions hydrophobes avec des résidus de l'hélice H3 (Farboud et al., 2003). Ainsi, le positionnement de l'hélice H12 dans une conformation fermée empêcherait la fixation des corépresseurs et également celle des coactivateurs.

### *b) De la répression à l'activation : le modèle séquentiel.*

L'ensemble de ces données peuvent être intégrées dans un modèle séquentiel d'activation des gènes cibles de l'AR gouverné essentiellement par le LBD (Dilworth and Chambon, 2001). Ce modèle a été proposé dans le cas de RAR $\alpha$  (Figure 9).



En absence de ligand, RAR $\alpha$  est présent au niveau de l'ADN sous forme d'hétérodimère (Figure 9A). Ce sous-type est un répresseur fort, notamment *via* son interaction avec des corépresseurs tel que SMRT. Ces protéines, sans propriété enzymatique intrinsèque, servent de plateforme pour le recrutement de protéines de haut poids moléculaire formant ainsi un complexe à activité histone désacétylase. Cette activité HDAC maintient ainsi la chromatine à proximité des promoteurs sous forme compactée et réprime l'expression des gènes cibles.

En réponse à l'AR, l'hélice H12 et une partie du LBD subissent des changements conformationnels induisant ainsi le départ des corépresseurs et la création d'une nouvelle surface d'interaction pour les coactivateurs (Bourguet et al., 2000a). Cet échange corépresseur/coactivateur peut également être régulé par des modifications post-traductionnelles et/ou par la dégradation de certaines protéines accessoires présentes dans les complexes corépresseurs telles que les protéines TBL1 et TBLR1 (Perissi et al., 2004; Perissi and Rosenfeld, 2005; Perissi et al., 2008). La fixation des coactivateurs, tels que les protéines de la famille p160, permet à son tour le recrutement de complexes protéiques à activité HAT, HMT, d'ubiquitine-ligases et de complexes de remodelage de nucléosomes (Figure 9B). Toutes ces protéines associées vont être recrutées séquentiellement et modifier les queues des histones afin de permettre la décompaction de la chromatine au niveau du promoteur du gène. Finalement, RAR $\alpha$  activé va pouvoir recruter des facteurs généraux de la transcription, des protéines du médiateur *via* une interaction directe avec une sous unité du médiateur DRIP205/TRAP220 ainsi que l'ARN Polymérase II (Bastien and Rochette-Egly, 2004; Lefebvre et al., 2005; Rochette-Egly, 2005) (Figure 9C).

A ce modèle peuvent s'associer des variantes liées notamment au contexte chromatinien du promoteur des gènes. En effet, RAR $\alpha$ , le médiateur et l'ARN polymérase II peuvent déjà occuper le promoteur de certains gènes cibles si celui-ci est accessible (Flajollet et al., 2006; Pavri et al., 2005). Dans ce cas, l'initiation de la transcription est liée à la dissociation d'une sous-unité du médiateur, cdk8, qui joue normalement un rôle inhibiteur (Andrau et al., 2006; Elmlund et al., 2006). Au contraire, d'autres promoteurs ne sont occupés ni par RAR $\alpha$  ni par l'ARN polymérase II en absence d'AR et une cascade d'activation permettant le recrutement du récepteur et de la machinerie transcriptionnelle est nécessaire (Bruck et al., 2009). Enfin, il existe de nombreux RARE très éloignés par rapport au promoteur pour lesquels la mise en place de la transcription nécessiterait la création de boucles au niveau de l'ADN, permettant ainsi le rapprochement des différents acteurs intervenant dans la régulation de l'expression des gènes cibles de l'AR (Bruck et al., 2009).

### 3. Les corégulateurs non conventionnels du LBD

En raison de son importance fonctionnelle, le LBD des RAR a fait l'objet d'études approfondies pour la recherche de nouveaux partenaires. Ainsi, une pléthore de protéines a été identifiée par des cribles double-hybrides (Lefebvre et al., 2005). Nous nous focaliserons principalement sur deux familles de protéines dont l'interaction physique et le rôle fonctionnel ont été confirmés : les corépresseurs à motif LxxLL d'une part, et les protéines jouant un rôle dans le transport de l'AR et la modulation de l'activité des RAR, d'autre part.

#### *a) Corépresseurs à motif LxxLL*

Parmi les protéines isolées, certaines présentent une grande similitude avec les coactivateurs de la famille p160. Elles sont recrutées en présence de ligand et présentent plusieurs motifs de type LxxLL dans leur séquence (Gurevich et al., 2007; White et al., 2004). Cependant, une analyse fonctionnelle de ces protéines démontre qu'elles jouent un rôle de corépresseur en présence de ligand (Gurevich et al., 2007; White et al., 2004).

Au sein de ces protéines, on trouve notamment la protéine RIP140, initialement découverte comme corégulateur du récepteur des estrogènes (ER $\alpha$ ) (Cavaillès et al., 1995). Dans le cas des RAR, cette protéine est capable d'entrer en compétition avec les coactivateurs de la famille p160 et ainsi de réprimer la transcription des gènes cibles de l'AR en présence de ligand *via* un domaine d'activité inhibitrice (Lee and Wei, 1999). Cette protéine possède notamment 9 domaines LxxLL capables d'interagir préférentiellement avec RAR ou RXR (Farooqui et al., 2003; Heery et al., 1997). Deux autres protéines ont été identifiées sur les mêmes critères : la protéine TIF1 $\alpha$ , qui possède un seul motif LxxLL (Le Douarin et al., 1995) et la protéine PRAME qui possède 7 motifs LxxLL (Epping et al., 2005). Le mécanisme de répression des gènes cibles de l'AR par TIF1 $\alpha$  n'a pas été encore déterminé. La protéine PRAME, quant à elle, pourrait recruter des protéines du groupe Polycomb (PcG) qui induiraient une répression des gènes cibles de l'AR au cours du développement (Epping et al., 2005). Ces protéines pourraient alors jouer un rôle à la fin du signal de l'AR (Gurevich et al., 2007; White et al., 2004).

#### *b) Autres corégulateurs*

Parmi l'ensemble des autres partenaires potentiels associés au LBD, de nombreuses protéines ont été isolées mais leur mécanisme d'action n'a pas été réellement approfondi. On pourra tout de même citer quelques acteurs qui ont fait l'objet d'une plus grande attention : SUG-1, cycline H et CRABP2.

CRABP2 (Cytoplasmic Retinoic Acid Binding Protein), initialement mise en évidence dans le cytoplasme, est une protéine impliquée dans le transport de l'AR et joue un rôle de navette entre le cytoplasme et le noyau (Budhu et al., 2001; Budhu and Noy, 2002). Elle interagit avec RAR $\alpha$  dans le noyau (Bastie et al., 2001; Delva et al., 1999) et cette interaction nécessite une protéine intermédiaire qui a été identifiée comme étant la cycline D3 (Despouy et al., 2003).

La cycline H interagit au niveau d'une surface du LBD différente de la surface d'interaction avec des coactivateurs, il s'agit de la boucle L8-L9 et du début de l'hélice H9 (Publication 1). Cette interaction qui ne dépend pas de la fixation du ligand, joue un rôle d'ancrage permettant le bon positionnement de la kinase associée cdk7 et ainsi la phosphorylation du NTD de RAR $\alpha$  (cf. Résultats).

SUG-1 (26S-ATPase Subunit 5), identifiée initialement comme interagissant avec le récepteur des hormones thyroïdiennes (TR), est une sous unité du protéasome 26S et possède une activité ATPasique (vom Baur et al., 1996). Dans le cas de RAR $\gamma$ , SUG-1 serait impliqué dans la dégradation du récepteur par le protéasome (Gianni et al., 2002a). Il a également été démontré dans notre équipe que SUG-1 aurait un effet sur la régulation de la transcription des gènes cibles de l'AR indépendamment de son activité protéolytique (cf. Résultats).

## II. Nouveaux concepts pour les RAR

### A. Effets non génomiques des RAR

#### 1. Dynamique de la localisation intracellulaire des RAR

##### a) *RAR : localisation extranucléaire rare ?*

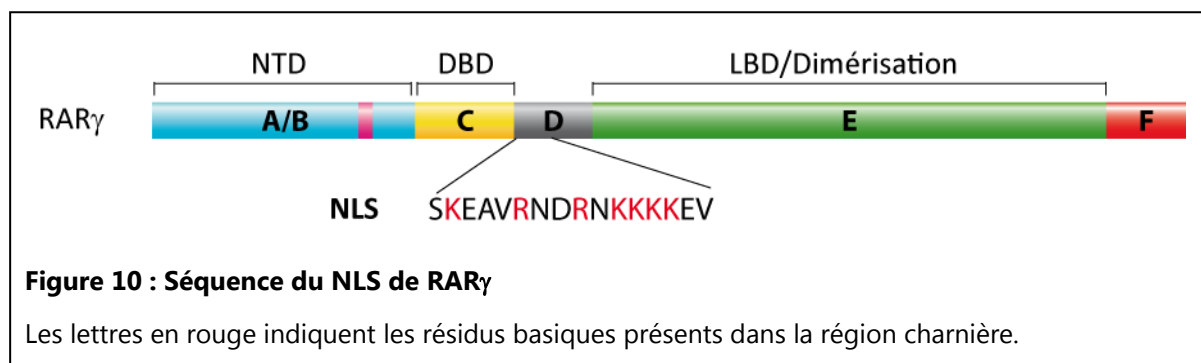
Initialement, les RAR ont été découverts sur la base de leur similarité de séquence avec les membres de la superfamille des récepteurs stéroïdiens / « nucléaires » (Brand et al., 1988; Krust et al., 1989; Petkovich et al., 1987). En réponse au ligand, ces récepteurs agissent comme des facteurs de transcription *via* leur présence dans le compartiment nucléaire et *via* leur liaison à l'ADN. Cependant, la localisation subcellulaire de ces récepteurs « nucléaires » sans ligand a fait l'objet de nombreuses controverses.

Les premières études réalisées par des méthodes de fractionnement cellulaire et d'immunohistochimie sur des cellules fixées ou des tissus ont confirmé la localisation nucléaire des RAR (Kastner et al., 1992; Mackem et al., 2001; Nervi et al., 1989; Reichrath et al., 1997). Cependant, l'avènement des techniques de microscopie, l'utilisation de protéines-rapporteurs fluorescentes et le perfectionnement des techniques précédemment citées a permis d'arriver à un consensus : le terme de superfamille des récepteurs « nucléaires » est un terme mal approprié. En effet, la plupart des récepteurs, y compris les RAR, auraient des localisations subcellulaires différentes en fonction du sous-type considéré, du type cellulaire, de leur activité transcriptionnelle, des stimuli environnementaux.

Bien que les RAR soient majoritairement présents dans le noyau des lignées cellulaires, des tissus et des organes étudiés, quelques études réalisées dans les années 2000 ont élargi la présence des RAR au compartiment cytoplasmique. De manière intéressante, la proportion de RAR présent dans le cytoplasme diffère d'un sous-type à l'autre. Une telle localisation extranucléaire a été initialement observée dans les cellules de Sertoli et les cellules germinales des testicules ainsi que dans les cellules de l'endomètre utérin (Dufour and Kim, 1999; Fukunaka et al., 2001). Ces données ont été corroborées lors de l'analyse de cellules transfectées avec des vecteurs codant pour des protéines de fusion GFP-RAR (Braun et al., 2000) et élargies à d'autres types cellulaires telles que les neurones dopaminergiques, les motoneurones, les cellules de Schwann ainsi que les cellules de la microglie (Jokic et al., 2007; Katsuki et al., 2009; Zhelyaznik and Mey, 2006).

### b) Dynamique de l'import/export nucléaire des RAR

Ces « patterns » de localisation des RAR sont très dynamiques. En effet, des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) et de microscopie en temps réel ont montré qu'il existe un équilibre entre les localisations nucléaire et cytoplasmique des RAR, comme de leur partenaire d'hétérodimérisation RXR (Dong et al., 2004; Kumar et al., 2006; Maruvada et al., 2003). Etant donné leur taille et leur masse moléculaire, cette dynamique ne peut pas s'expliquer par un simple passage passif à travers les ports nucléaires. Un motif riche en acides aminés basiques (lysines et arginines) est présent dans la région charnière (Figure 10). Ce motif, nommé NLS (Nuclear Localisation Signal), est reconnu par des protéines type Importines  $\alpha/\beta$  et permet un transport facilité du RAR dans le noyau (Hamy et al., 1991; Mezaki et al., 2009). Quant à l'export nucléaire, il serait lié à la présence d'un ou plusieurs motifs riche en leucine, nommés NES (Nuclear Export Signal), présents dans le DBD et/ou le LBD des RAR, mais il reste encore à confirmer leur(s) fonctionnalité(s) (Black et al., 2001; Poon and Chen, 2008).



Parmi les nombreux facteurs pouvant influencer la localisation des RAR, on peut noter l'importance des facteurs solubles. Certains facteurs comme TNF $\alpha$ , IL-6, EGF peuvent induire la translocation dans le noyau des RAR (Han et al., 2009b; Mey et al., 2007). Par contre, d'autres facteurs comme l'hormone FSH, et l'AMP cyclique vont favoriser leur export (Braun et al., 2000). Il y aurait également des variations de la localisation cellulaire en fonction du cycle menstruel utérin (Fukunaka et al., 2001), du stade de développement (hippocampe) (Huang et al., 2008) et du grade tumoral (mélanomes, cancers de la thyroïde et de la prostate) (Chakravarti et al., 2007; Hoftijzer et al., 2009; Richter et al., 2002). Les mécanismes sous-jacents de ces dynamiques de localisation sont encore mal compris.

Le ligand et les partenaires d'interaction jouent également un rôle clé dans l'import nucléaire des RAR. En réponse au ligand, les RAR présents initialement dans le cytoplasme se relocalisent dans le noyau des cellules (Akmal et al., 1998; Braun et al., 2000; Tahayato et al., 1993; Weis et al., 1994). Le partenaire d'hétérodimérisation RXR jouerait un rôle prépondérant dans cet import nucléaire

(Han et al., 2009b; Maruvada et al., 2003; Prufer and Barsony, 2002). Il en serait de même des modifications post-traductionnelles des RAR (Braun et al., 2002; Han et al., 2009b; Sun et al., 2007; Tahayato et al., 1993). Ainsi, la phosphorylation des RAR par la kinase PKC (Protéine Kinase C) et les MAPK favoriserait leur export et leur import respectivement (cf. II.B.).

En conclusion, la dynamique de la localisation subcellulaire des RAR représenterait un des moyens de réguler leur activité transcriptionnelle.

## 2. Localisation cytoplasmique des RAR et régulation de la traduction

Afin de déterminer la fonctionnalité des RAR dans le cytoplasme des cellules, quelques équipes se sont focalisées sur l'étude de leur présence au sein d'ultrastructures cellulaires.

Une étude par microscopie confocale a mis en évidence une localisation cytoplasmique des RAR dans l'endomètre (Fukunaka et al., 2001). Cette localisation extranucléaire est spécifique du sous-type RAR $\gamma$  et a lieu uniquement lors de la phase sécrétoire de l'endomètre. Des expériences d'immuno-microscopie électronique ont révélé la présence du récepteur sous forme de granules autour du Réticulum Endoplasmique (RE) (Fukunaka et al., 2001). Cette localisation suggère que les protéines RAR $\gamma$  néo-synthétisées durant la période sécrétoire s'accumuleraient autour du RE avant leur import nucléaire durant la phase proliférative de l'endomètre.

Récemment, deux équipes ont simultanément mis en évidence un rôle nouveau de RAR $\alpha$  dans les dendrites de neurones (Chen et al., 2008; Maghsoodi et al., 2008). Dans ces cellules, l'AR augmente rapidement la fréquence des potentiels d'action et ainsi la libération de neurotransmetteurs au niveau des synapses (Aoto et al., 2008; Liao et al., 2004; Liou et al., 2005). Cette activité synaptique a été corrélée avec une traduction rapide de récepteurs au glutamate ainsi que leur export au niveau de la membrane plasmique en réponse à l'AR (Aoto et al., 2008; Chen and Napoli, 2008). Ces effets sont très rapides (de l'ordre de 5 à 10 minutes) et dépendants de RAR $\alpha$  (Chen and Napoli, 2008; Liao et al., 2004), d'où l'hypothèse que RAR $\alpha$  jouerait un rôle indépendamment de son activité transcriptionnelle, notamment *via* sa présence dans le cytoplasme (Aoto et al., 2008). En effet, dans ces cellules neuronales, RAR $\alpha$  est présent non seulement dans le noyau mais aussi au niveau des dendrites (Chen et al., 2008; Maghsoodi et al., 2008; Poon and Chen, 2008). Plus précisément, il est localisé dans des particules ribonucléoprotéiques (RNP) neuronales (Maghsoodi et al., 2008) et associé à des protéines de liaison aux ARN, tel que Pur $\alpha$  (Chen et al., 2008). RAR $\alpha$  peut également s'associer directement à des ARN : le récepteur se lie, *via* son domaine F et/ou l'hélice H12, à une extrémité UTR de certains ARNm tels que les ARN codant pour les récepteurs au glutamate (GlutR1 et GlutR2) (Chen et al., 2008; Poon and Chen, 2008). Le mécanisme



d'action de RAR $\alpha$  au sein des particules ribonucléoprotéiques a été décortiqué. En s'associant à certains ARNm, RAR $\alpha$  va réprimer leur traduction en absence de ligand (Chen et al., 2008; Poon and Chen, 2008). Cette inhibition serait levée en réponse au ligand *via* les changements conformationnels du LBD permettant ainsi la traduction et l'export rapide des récepteurs au glutamate au niveau des synapses (Poon and Chen, 2008).

De telles études démontrent le rôle clé de RAR $\alpha$  dans la plasticité synaptique *via* la régulation de la traduction d'ARN messager dans les dendrites neuronales (Aoto et al., 2008).

### **3. Localisation extranucléaire des RAR et activation rapide de voies kinasiques**

#### ***a) Activation rapide de voies kinasiques par l'AR***

L'AR, *via* les RAR, est connu pour sa capacité à inhiber la prolifération des cellules, à induire leur différenciation et/ou leur mort par apoptose. Les cascades de kinases jouent également un rôle important dans la régulation de ces processus cellulaires. Aussi, l'effet de l'AR sur la régulation des voies kinasiques a fait l'objet d'une attention toute particulière.

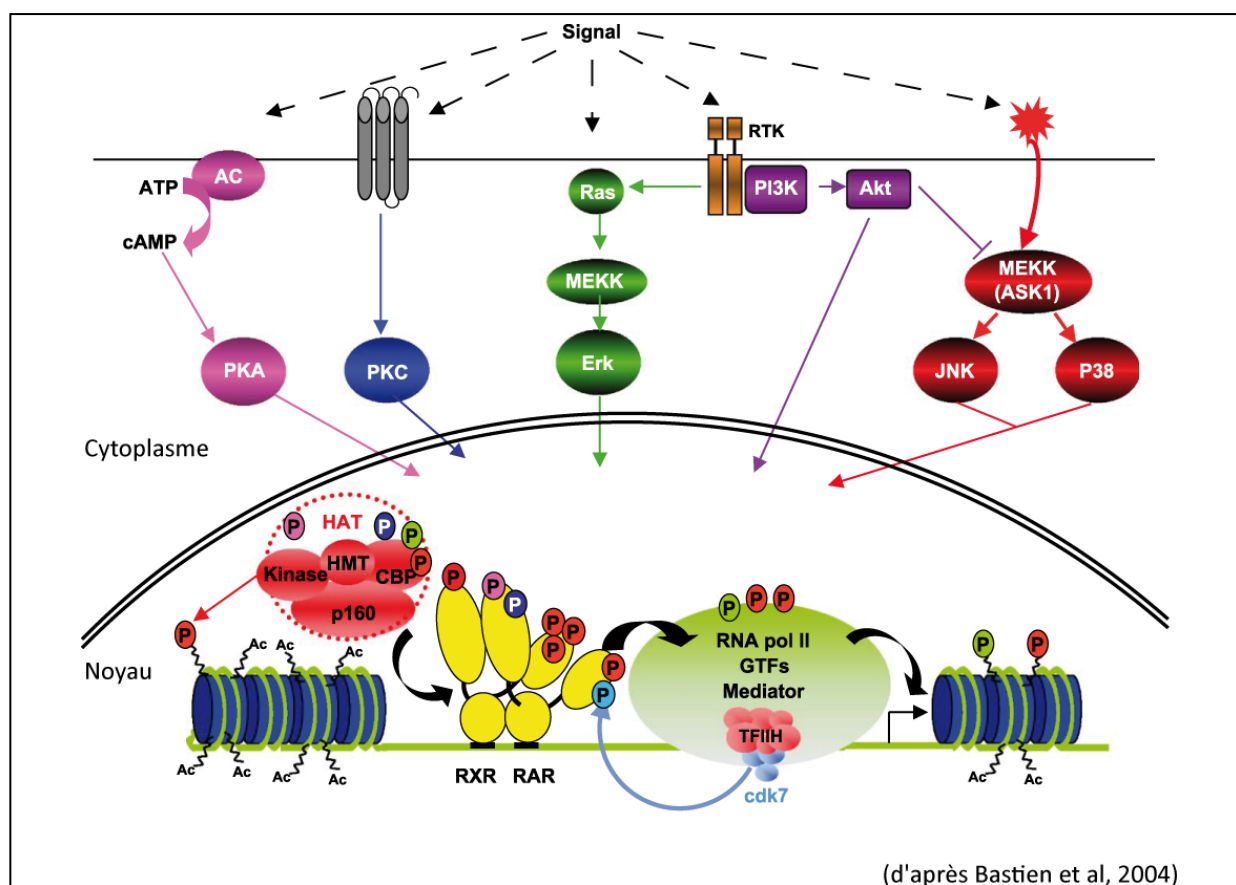
Initialement, l'étude des kinases activées et/ou l'utilisation d'inhibiteurs de kinase ont mis en évidence l'activation de voies de signalisation dans les 12-48 h suivant l'addition d'AR, temps nécessaire pour la différenciation des cellules (Bastien et al., 2006; Bertagnolo et al., 1999; Gianni et al., 2002b; Hong et al., 2001; Pan et al., 2005; Singh et al., 2003; Yen et al., 1999). Cependant l'utilisation d'inhibiteurs de transcription/traduction a montré que ces effets tardifs mettent en jeu l'activité transcriptionnelle des RAR au niveau du promoteur de certaines kinases telles que les sous-unités p110 $\beta$  et p85 $\alpha$  de la kinase PI3K ou la kinase PKC $\delta$  (Protéine Kinase C delta) (Bastien et al., 2006; Kambhampati et al., 2003; Lopez-Carballo et al., 2002; Uruno et al., 2005).

En fait l'activation des gènes cibles des RAR démarre dès 30 minutes-1 heure après l'addition d'AR (Bruck et al., 2009), d'où l'hypothèse que des kinases pourraient être activées très rapidement (en quelques minutes) par l'AR *via* des mécanismes non génomiques (indépendants de l'activité transcriptionnelle des RAR).

Parmi les cascades kinasiques, les voies MAPK/Erk et PI3K/Akt ont fait l'objet de nombreuses études (Figure 11). La voie MAPK/Erk, impliquée dans la différenciation et la survie cellulaire, est activée quelques minutes après l'addition d'AR dans de nombreux types cellulaires : cellules embryonnaires (ES, P19) (Bost et al., 2002; Gupta et al., 2008), cellules tumorales (HL60, cellules épithéliales bronchiques, cellules épithéliales de la prostate) (Aggarwal et al., 2006; Pasquali et al.,

2005; Yen et al., 1998), cellules germinales (Zanotto-Filho et al., 2008), cellules nerveuses (Alique et al., 2006; Canon et al., 2004; Chen and Napoli, 2008). De même, des travaux récents dont ceux de l'équipe ont montré que la voie de la p38MAPK/MSK1 est aussi activée dans d'autres systèmes cellulaires : cellules de cancer du sein (MCF7) (Bruck et al., 2009), fibroblastes embryonnaires (MEF) (Bruck et al., 2009), carcinomes embryonnaires (F9) et cellules leucémiques (NB4) (Alsayed et al., 2001).

La voie PI3K/Akt est également activée dès 5-30 minutes de traitement par l'AR dans diverses lignées cellulaires : neuroblastomes (Lopez-Carballo et al., 2002; Masia et al., 2007) et fibroblastes (Masia et al., 2007) (Figure 11).



**Figure 11 : Voies de signalisation et phosphorylation de cibles**

En réponse à l'AR ou à d'autres stimuli, différentes voies kinases peuvent être activées, notamment les voies des MAPK (Erk, JNK, p38), PI3K/Akt, PKC, AMPc/PKA. Ces voies contrôlent la transcription des gènes cibles de l'AR en phosphorylant différentes cibles (récepteurs, complexes corépresseurs et coactivateurs, médiateur, GTF). AC = Adenylate Cyclase. RTK = Récepteur Tyrosine Kinase

En conclusion, selon le type cellulaire, des voies kinasiques différentes sont activées en réponse à l'AR. En outre, ces voies peuvent interférer entre elles : inhibition des voies p38MAPK et JNK et activation de la voie MAPK/Erk (Bost et al., 2002; Shinozaki et al., 2007; Yen et al., 1999), inhibition de PI3K/Akt et activation de la p38MAPK (Gianni et al., 2002b). Ces interdépendances et ces spécificités cellulaires pourraient en partie expliquer la diversité des réponses cellulaires (différenciation, prolifération, apoptose) observées suite à l'addition d'AR. Etant donné la rapidité de l'activation des cascades par l'AR, ces observations laissent envisager un(des) mécanisme(s) indépendant(s) de la transcription, au niveau du cytoplasme et/ou de la membrane plasmique, dépendant ou non des RAR (Alsayed et al., 2001; Bruck et al., 2009; Canon et al., 2004; Liao et al., 2004; Valverde and Parker, 2002).

### *b) Deux modèles d'activation des voies kinasiques par l'AR :*

#### *PKC- et/ou RAR-dépendant*

Le mécanisme d'activation rapide des voies kinasiques commence seulement à être appréhendé. Deux théories majeures se sont ainsi échafaudées au cours des années, l'une dépendante des protéines kinases C (PKC) et l'autre dépendante des RAR.

Dans certaines lignées cellulaires, la voie des MAPK/Erk est toujours activée malgré l'utilisation de cocktails agoniste/antagoniste des RAR ou l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre les RAR (Aggarwal et al., 2006; Kim et al., 2007; Liao et al., 2004). Bien que l'efficacité de ces molécules ne soit pas optimale, ceci suggère l'existence d'un mécanisme d'activation des voies kinasiques indépendant des RAR. En outre, des traitements avec des inhibiteurs des PKC abrogent l'activation des Erk (Aggarwal et al., 2006; Nakagawa et al., 2003). Ceci laisse supposer que la PKC joue un rôle en amont des cascades d'activation (Nakagawa et al., 2003). En parallèle, il a été démontré que la PKC, capable de se lier à des phosphoinositides, se lie également à des composés liposolubles comme l'AR (Hoyos et al., 2000; Radomska-Pandya et al., 2000). Le complexe PKC/AR a été cristallisé et une structure tridimensionnelle a été obtenue (Lopez-Andreo et al., 2005). L'AR se fixe au niveau de deux sites de la PKC (Ochoa et al., 2003). Il présente la meilleure affinité pour le site nommé C2 de la PKC et entre ainsi en compétition avec les phosphoinositides (Lopez-Andreo et al., 2005; Ochoa et al., 2003; Radomska-Pandya et al., 2000). Ce modèle moléculaire suggère que l'interaction entre l'AR et la PKC permettrait son activation et ainsi la régulation de voies kinasiques en aval (Radomska-Pandya et al., 2000).

Cependant, d'autres études réalisées avec des cellules invalidées pour l'ensemble des RAR ou pour un sous-type des RAR ont montré que l'activation de certaines voies kinasiques comme celle de

la p38MAPK mettrait en jeu les récepteurs (Bruck et al., 2009). Ainsi, dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), l'activation rapide de la voie p38MAPK/MSK1 nécessite essentiellement le sous-type RAR $\alpha$  (Bruck et al., 2009; Masia et al., 2007). L'implication directe des récepteurs « nucléaires » dans les effets non génomiques est restée longtemps controversée. Cependant, la généralisation de l'activation des voies kinasiques à la plupart des systèmes cellulaires étudiés (Canon et al., 2004; Hughes et al., 2006; Shinozaki et al., 2007) et la mise en évidence de la localisation extranucléaire des RAR a suscité un intérêt grandissant pour l'étude de leur fonctionnalité extranucléaire.

L'isolement des protéines membranaires de cellules neuronales ou de fibroblastes et l'analyse de la localisation des RAR en microscopie confocale ont permis de montrer que dans ces cellules, les RAR sont présents dans le cytosol voire même associés à la membrane plasmique (Aoto et al., 2008; Han et al., 2009b; Masia et al., 2007). D'autre part, de nombreux partenaires des RAR ont été identifiés comme étant des composants des cascades kinasiques. En effet, RAR $\gamma$  et RAR $\alpha$  interagissent directement avec la kinase Src et la sous-unité p85 $\alpha$  de la kinase PI3K respectivement (Dey et al., 2007; Masia et al., 2007; Ohashi et al., 2009). Cependant, le mécanisme d'activation des kinases par l'AR demeure confus : dans certains cas, le récepteur RAR se dissocierait de ces protéines pour permettre leur activation ; dans d'autres cas, c'est l'association rapide du récepteur « ligandé » avec les protéines kinases qui permettrait leur activation.

### *c) Les cibles potentielles des voies kinasiques*

Suivant le type cellulaire et les voies activées, de nombreuses protéines peuvent être les cibles des kinases activées. Ainsi, on trouve des protéines du cytosquelette (Dvorak et al., 2007), des protéines membranaires (Zhu et al., 1999b) mais également des facteurs de transcription comme CREB, p21, cFos et cJun (Aggarwal et al., 2006; Alique et al., 2006; Canon et al., 2004; Kannan-Thulasiraman et al., 2008; Kim et al., 2007; Lopez-Carballo et al., 2002; Lu et al., 2008; Ordonez-Moran and Munoz, 2009; Yen et al., 1998). De manière intéressante, les récepteurs nucléaires eux-mêmes, tels que RAR et TR2, et leurs cofacteurs associées, tel que SRC-3, sont également des cibles de ces kinases (cf. II.B) (Figure 11).

## **B. Modifications post-traductionnelles des RAR et conséquences transcriptionnelles**

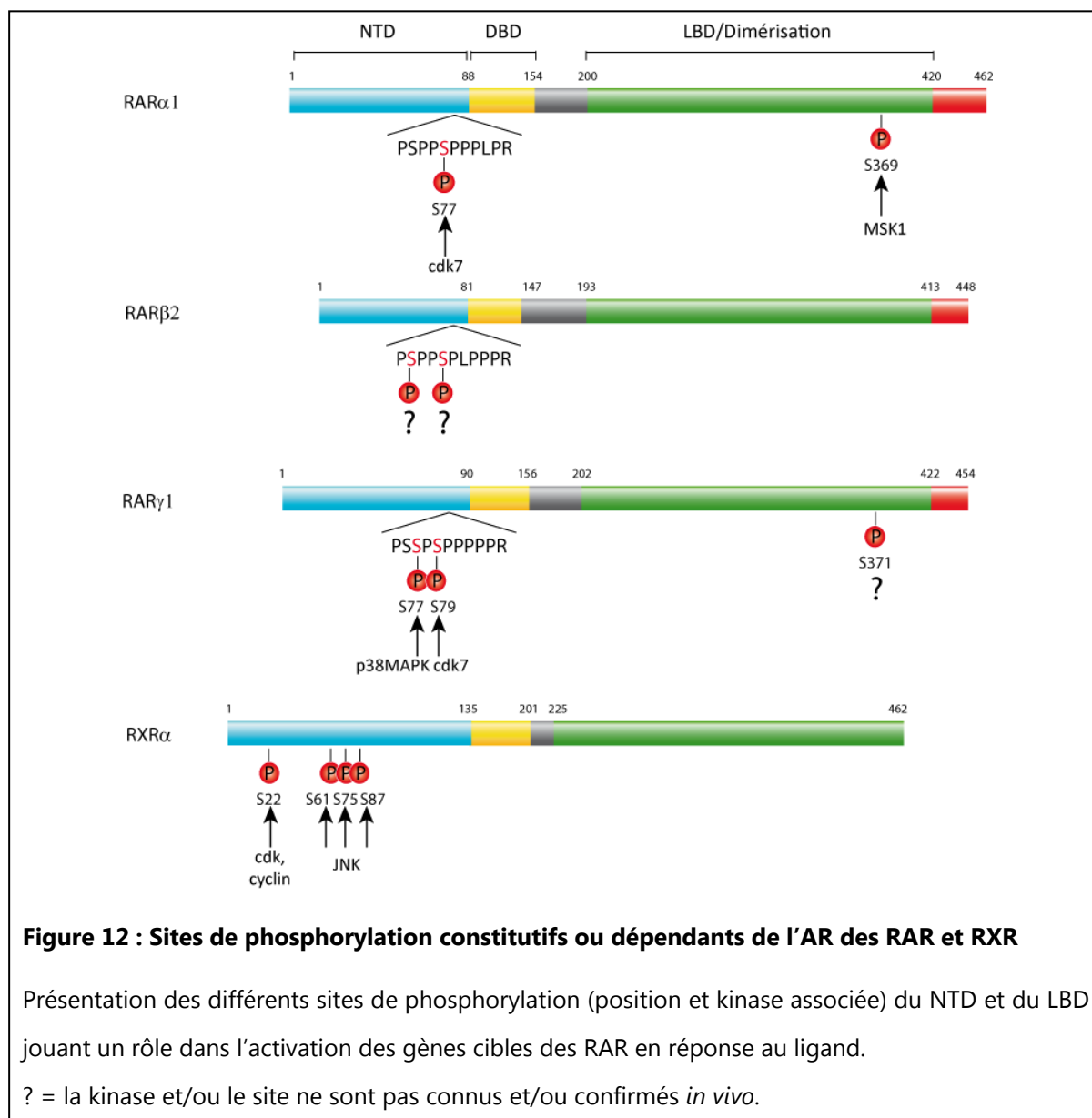
L'activité transcriptionnelle des RAR est modulée par des Modifications Post-Traductionnelles (MPT) des récepteurs eux-mêmes ou des protéines corégulatrices associées. Parmi les MPT, les

phosphorylations des RAR ont fait l'objet de nombreuses études, notamment dans notre équipe. D'autres modifications, telles que méthylation, acétylation et ubiquitination, ont également été répertoriées comme modulant l'activité des RAR, RXR et de leurs corégulateurs. Ces différents modes de régulation révèlent ainsi une complexité sous-estimée de la dynamique de transcription des RAR.

## 1. Phosphorylation en réponse à l'AR et initiation de la transcription

### a) Phosphorylation des RAR par *cdk7*/TFIIH

Les différents sous-types des RAR sont tous des phosphoprotéines (Gaub et al., 1992; Rochette-Egly et al., 1992; Rochette-Egly et al., 1991). En effet, des sites de phosphorylation ont été identifiés dans l'ensemble des domaines des RAR, notamment dans le NTD et le LBD (Figure 12).



Une sérine localisée dans le NTD des RAR a fait l'objet d'une attention particulière : la sérine 77 de RAR $\alpha$ 1 (Rochette-Egly et al., 1997) équivalente à la sérine 79 de RAR $\gamma$ 1 (Bastien et al., 2000) (Figure 12). Cette sérine est présente dans le motif riche en prolines de la région B et correspond à un site de phosphorylation pour la kinase cdk7 associée au complexe TFIIH (cf. Résultats I.A.). Des études récentes réalisées dans notre équipe ont permis d'établir une relation entre la phosphorylation de la sérine 77 localisée dans le NTD de RAR $\alpha$  et l'efficacité du recrutement de TFIIH. En effet l'équipe a montré que la phosphorylation du NTD par cdk7 dépend de son recrutement *via* l'ancrage de la sous-unité associée, la cycline H, au niveau du LBD de RAR $\alpha$  (cf. Résultats I.A.). Cette phosphorylation joue un rôle clé dans la transcription des gènes cibles de l'AR (Bastien et al., 2000; Boudjelal et al., 1997; Rochette-Egly et al., 1997; Rochette-Egly et al., 2000). En effet dans des fibroblastes issus de patients atteints de la maladie Xeroderma Pigmentosum caractérisée par une mutation au niveau d'une sous-unité (XPD) du complexe TFIIH, RAR $\alpha$  est hypophosphorylé au niveau de la sérine 77 et la réponse à l'AR est inhibée (Keriel et al., 2002).

Un autre site de phosphorylation (sérine 369 de RAR $\alpha$ 1) a été localisé au niveau du LBD de RAR $\alpha$  (Rochette-Egly et al., 1995) (Figure 12). C'est un site consensus pour des kinases diverses comme la PKA et MSK1 (Bruck et al., 2009; Rochette-Egly et al., 1995) (Publication 2). Une étude *in vivo* a permis de démontrer l'implication de la phosphorylation de la sérine 369 dans l'initiation d'une cascade de phosphorylation et de recrutement de complexes protéiques (Bruck et al., 2009). En effet, suite à l'activation de la voie p38MAPK/MSK1 par l'AR, la sérine 369 est phosphorylée (Bruck et al., 2009). Cette sérine est localisée dans la boucle entre H9 et H10, à proximité du site d'ancrage de la cycline H (Publication 2). Sa phosphorylation va induire des changements conformationnels qui vont améliorer la fixation de la cycline H (cf. Résultats I.B.). Cet ancrage va permettre le bon positionnement de la kinase cdk7 et ainsi la phosphorylation de la sérine 77 du NTD (Publication 2). Finalement, cette cascade d'évènements va augmenter le recrutement de RAR $\alpha$  au niveau des RARE et permettre l'initiation de la transcription des gènes cibles (Bruck et al., 2009). Il reste cependant à élucider comment la phosphorylation du récepteur peut influencer son recrutement au niveau de l'ADN et/ou le recrutement de partenaires.

La sérine 369 est conservée au sein des différents sous-types de RAR (Figure 12). Cependant, il reste à déterminer si RAR $\gamma$  et RAR $\beta$  sont aussi phosphorylables au niveau de ce résidu en réponse à l'AR. A noter que dans le cas de RAR $\gamma$ , une sérine supplémentaire (sérine 77 présente à proximité du site cdk7) est phosphorylée par la p38MAPK *in vivo* (Bastien et al., 2000; Gianni et al., 2002a). La phosphorylation de cette sérine est également essentielle pour la transcription des gènes cibles de

RAR $\gamma$  (Gianni et al., 2002a; Taneja et al., 1997). Elle jouerait aussi un rôle dans la dégradation du récepteur par le système ubiquitine/protéasome (Gianni et al., 2002a).

Enfin, RAR $\beta$ 2 est également phosphorylable au niveau de son NTD, essentiellement au niveau de résidus tyrosines, mais les sites et les kinases associées n'ont pas encore été identifiés (Rochette-Egly et al., 1992).

### *b) Phosphorylation des partenaires : RXR et corégulateurs*

Pour comprendre le mécanisme d'action des RAR, il est également nécessaire de prendre en compte les MPT pouvant affecter les protéines associées, notamment le partenaire d'hétérodimérisation RXR et les corégulateurs (Figure 11).

Il est connu depuis déjà quelques années que RXR, notamment RXR $\alpha$ , est la cible de nombreuses phosphorylations, qui affectent majoritairement le NTD (Figure 12). Cependant, ces sites sont différents de ceux des RAR. Dans le NTD de RXR $\alpha$ , la phosphorylation constitutive de la sérine 22 et la phosphorylation de trois autres résidus (sérines 61 et 75, et thréonine 87), qui a lieu en réponse à l'AR, coopèrent pour permettre la transactivation maximale des gènes cibles de l'AR et plus largement pour permettre l'effet antiprolifératif de l'AR (Adam-Stitah et al., 1999; Bastien et al., 2002; Bruck et al., 2005; Gianni et al., 2003).

Les corépresseurs et coactivateurs sont également des cibles pour des kinases. Ainsi, la protéine TBLR1, associée au complexe corépresseur, est phosphorylée par la PKC $\delta$  en réponse à l'AR (Perissi et al., 2008). Cette modification induit le recrutement du protéasome et ainsi la dégradation des protéines associées telle que SMRT (Perissi et al., 2008). Ces expériences suggèrent que la dégradation des corépresseurs, en coopération avec les changements conformationnels du LBD, serait impliquée dans leur dissociation.

Le coactivateur, SRC-3, est également phosphorylé par la p38MAPK en réponse à l'AR (Gianni et al., 2006). Cette modification favorise l'interaction avec RAR $\alpha$ , augmentant ainsi l'activité transcriptionnelle du récepteur (Gianni et al., 2006). Dans un second temps, cette phosphorylation serait nécessaire à la dégradation du coactivateur (Gianni et al., 2006). La plupart des protéines impliquées dans l'activation de la transcription des gènes cibles de l'AR sont phosphorylées en réponse au ligand, mais il reste encore à définir les sites et les kinases impliquées ainsi que la dynamique temporelle (Han et al., 2009a; Lefebvre et al., 2006; Tsai et al., 2008; Yang et al., 2001).

Cette vision dynamique de l'effet des MPT sur l'initiation de la transcription des RAR ne pourrait être complète sans prendre en compte l'ensemble des phosphorylations pouvant affecter

les facteurs généraux de la transcription et les histones (Bruck et al., 2009; Lefebvre et al., 2002) (Figure 11). En outre, les phosphorylations sont des processus réversibles. Les phosphatases peuvent ainsi contrôler la dynamique temporelle des phosphorylations mais leur étude reste encore minoritaire (Dowhan and Muscat, 1996; Lefebvre et al., 1995; Li et al., 2008).

## 2. Autres modifications post-traductionnelles : interférence avec la phosphorylation.

En plus des phosphorylations, de nombreuses autres MPT peuvent moduler l'activité des RAR en réponse à l'AR. Une attention toute particulière a été portée sur le rôle de l'ubiquitination dans la dégradation des récepteurs et également sur l'interdépendance phosphorylation/ubiquitination.

### a) Ubiquitination et dégradation des RAR par le protéasome

En réponse au ligand, les RAR ainsi que leurs partenaires RXR et/ou les coactivateurs associés sont dégradés.

La dégradation des RAR a lieu lorsque les hétérodimères sont engagés transcriptionnellement et implique le recrutement de protéines *via* l'hélice H12 (Gianni et al., 2002a; Gianni et al., 2003; Kopf et al., 2000; Osburn et al., 2001; Zhu et al., 1999a). Cependant, le mécanisme de régulation de cette dégradation diffère fondamentalement entre les différents sous-types des RAR. En effet, la dégradation de RAR $\alpha$  est indépendante de la présence du NTD et de son état de phosphorylation (Kopf et al., 2000). Par contre, la dégradation de RAR $\gamma$  dépend de la phosphorylation du NTD et implique une coordination entre phosphorylation et ubiquitination (Gianni et al., 2002a; Kopf et al., 2000). En effet, l'augmentation tardive (24 à 48 heures) de la phosphorylation des deux sérines du NTD (sérines 77 et 79) en réponse à l'AR servirait de point de « nucléation » pour l'ubiquitination du récepteur au niveau d'un site qui n'a pas encore été défini (Gianni et al., 2002a). Puis, le recrutement de SUG-1, une sous-unité du protéasome, au niveau du LBD de RAR $\gamma$  engagerait le récepteur dans le processus de dégradation par le protéasome (Gianni et al., 2002a). La régulation de la demi-vie du récepteur permettrait ainsi de contrôler l'amplitude et la durée du signal de l'AR.

Non seulement les RAR, mais aussi leurs coactivateurs comme SRC-3, sont dégradés par le protéasome en réponse à l'AR (Gianni et al., 2006). Cette dégradation dépend aussi de la phosphorylation de SRC-3 par la p38MAPK activée par l'AR (Gianni et al., 2006). Bien que le(s) site(s) de phosphorylation(s) ne soit(ent) pas encore identifié(s), la(les) phosphorylation(s) serait(ent) le signal pour l'ubiquitination et la dégradation du coactivateur.



En parallèle, de nombreuses études mettent en avant le couplage entre le protéasome et la régulation de la transcription des gènes cibles de l'AR en absence de protéolyse (Ferry et al., 2009) (Revue 1). Les RAR peuvent interagir avec une sous-unité du protéasome, nommée SUG-1 (vom Baur et al., 1996). Suite à son recrutement au niveau du promoteur des gènes cibles, cette sous-unité à activité ATPasique jouerait un rôle dans le remodelage de la chromatine et des complexes régulateurs de l'activité transcriptionnelle tels que SAGA (Ezhkova and Tansey, 2004; Lee et al., 2005). Ainsi le protéasome jouerait un rôle plus large dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des RAR indépendamment de leur dégradation (cf. Résultats).

### *b) Autres MPT et leurs conséquences sur l'activité transcriptionnelle des RAR.*

De nombreuses MPT (méthylation, acétylation,...) découvertes lors de l'étude du « code histone » étaient initialement considérées comme spécifiques de ces protéines (Kouzarides, 2007). Depuis, ces MPT ont été retrouvées dans de nombreuses protéines non-histones et notamment dans les récepteurs nucléaires (O'Malley et al., 2008; Sims and Reinberg, 2008). Il existe un grand nombre de MPT et seules quelques-unes ont jusqu'à présent été mises en évidence ou associées à un effet transcriptionnel des RAR et/ou RXR.

La découverte de modifications post-traductionnelles a été facilitée par l'usage de la spectrométrie de masse (Hoffman et al., 2008). Ainsi trois sites de méthylation ont été identifiés dans RAR $\alpha$  : la lysine 347 localisée dans le LBD qui est triméthylée (Huq et al., 2007), les lysines 109 et 171 localisées dans le DBD et la région charnière respectivement et qui sont monométhylées (Huq et al., 2008). Dans le cas des lysines 109 et 347, la méthylation joue un rôle positif dans la régulation des gènes cibles de l'AR, en augmentant le recrutement de coactivateurs (p160 et p300/CBP) et également en favorisant l'hétérodimérisation avec le partenaire (Huq et al., 2008; Huq et al., 2007). Ceci suggère que la méthylation du DBD pourrait avoir un effet sur la fonction et/ou la structure des domaines adjacents. Le rôle de la méthylation de la lysine 171, les méthylases impliquées et les conséquences structurales de ces méthylations ne sont pas encore clairement définis (Wu and Zhang, 2009).

Enfin, une étude a révélé que le récepteur RAR $\beta$  pourrait être acétylé en présence d'AR et d'inhibiteur de HDACs (De los Santos et al., 2007). L'effet de l'acétylation ainsi que les sites d'acétylation n'ont pas encore été déterminés. A l'inverse, une étude récente a montré que RXR $\alpha$  est acétylé au niveau de la lysine 145 par le coactivateur p300. Cette acétylation, localisée dans le DBD favoriserait la liaison de l'hétérodimère à l'ADN et ainsi la transcription des gènes cibles de l'AR (Zhao

et al., 2007). Enfin, RXR $\alpha$  serait également sumoylé au niveau de la lysine 108 du NTD et cette modification jouerait un rôle inhibiteur sur la transactivation. Une désomoylase, nommée SUSP1 (SUmo-Specific Protease 1) restaurerait l'activité transcriptionnelle du récepteur, ainsi que sa capacité d'hétérodimérisation (Choi et al., 2006).

### 3. Phosphorylation indépendante de l'AR : répression de la transcription

Les RAR et leurs partenaires sont les cibles de nombreuses phosphorylations en réponse à l'AR. Toutefois, d'autres voies de signalisation et d'autres stimuli environnementaux peuvent interférer avec la voie de l'AR en induisant également la phosphorylation des récepteurs.

#### a) RAR, RXR et JNK : « Junk RAR »

Que ce soit en réponse à un facteur environnemental (irradiation aux UV, choc thermique), lors d'inflammations ou dans certains cas de cancers, les organismes ainsi que les cellules sont soumis à des stimuli environnementaux qui aboutissent à l'activation de nombreuses voies kinasiques, notamment la voie des JNK. Parmi les protéines pouvant être les cibles de ces voies, on trouve des facteurs de transcription comme Jun/Fos mais également les récepteurs nucléaires (Rochette-Egly, 2003; Zhu et al., 1997) (Figure 13). De manière générale, bien que les sites de phosphorylation varient selon les agents de stress utilisés, ces modifications aboutissent à la répression de l'expression des gènes cibles de l'AR.

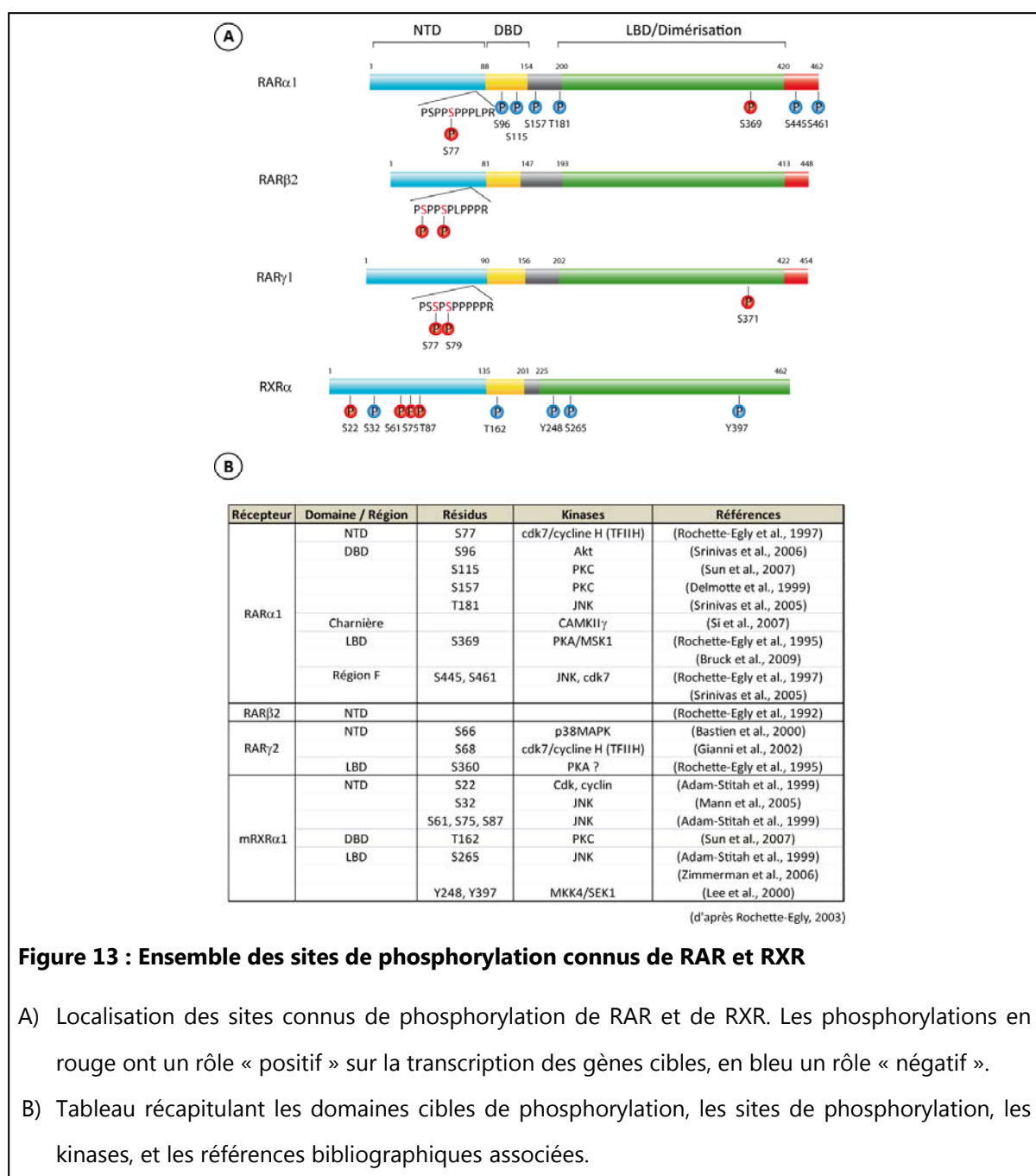
*In vivo*, en réponse aux UV, les JNK sont activées et phosphorylent RXR $\alpha$  au niveau de 3 résidus : la thréonine 181 dans le LBD et les sérines 445 et 461 dans la région F (Srinivas et al., 2005) (Figure 13). Ces phosphorylations conduisent à une ubiquitination du récepteur et à sa dégradation rapide par le protéasome (Srinivas et al., 2005). Le mécanisme de cette dégradation serait différent de celui observé précédemment en réponse à l'acide rétinoïque (Srinivas et al., 2005).

Les UV et d'autres agents de stress tels que l'anisomycine (un agent ribotoxique), ou l'arsenic (agent oxydant) peuvent également induire la phosphorylation des récepteurs RXR *via* les JNK (Figure 13). En effet, *in vivo*, en réponse à ces agents, RXR $\alpha$  est phosphorylé d'une part par les JNK au niveau de nombreuses sérines (sérines 61,75, 87 dans le NTD et sérine 265 dans le LBD) (Adam-Stitah et al., 1999; Bruck et al., 2005; Tarrade et al., 2005) et d'autre part par MKK4/SEK1, une kinase en amont des JNK, au niveau des tyrosines 248 et 397 (Lee et al., 2000). Dans le cas de l'arsenic, composé utilisé conjointement avec l'AR pour le traitement de certaines leucémies, une sérine

supplémentaire (sérine 32) spécifique de la région A de RXR $\alpha$  est phosphorylée par les JNK (Mann et al., 2005).

Les interleukines, cytokines inflammatoires, induisent également la phosphorylation de RXR au niveau du LBD (sérine 265) (Li et al., 2002; Zimmerman et al., 2006).

De manière générale, RXR $\alpha$  n'est pas dégradé en réponse à ces agents de stress (Tarrade et al., 2005). Cependant, la phosphorylation du LBD de RXR $\alpha$  (sérine 265) entraîne une diminution de la transcription des gènes cibles de l'AR en bloquant le recrutement des coactivateurs (Macoritto et al., 2008) et en diminuant l'interaction avec son partenaire RAR (Yoshimura et al., 2007).



**Figure 13 : Ensemble des sites de phosphorylation connus de RAR et RXR**

A) Localisation des sites connus de phosphorylation de RAR et de RXR. Les phosphorylations en rouge ont un rôle « positif » sur la transcription des gènes cibles, en bleu un rôle « négatif ».

B) Tableau récapitulatif des domaines cibles de phosphorylation, les sites de phosphorylation, les kinases, et les références bibliographiques associées.

### **b) Autres voies kinasiques et répression des RAR**

En réponse à des facteurs de croissance, à des neuromédiateurs ou à des hormones comme l'insuline mais également dans le cas de certains cancers, de nombreuses kinases comme la PKC, Akt ou la CAMKII $\gamma$  peuvent être dérégulées. Les RAR sont également des cibles pour ces kinases (Figure 13).

*In vitro*, la PKC phosphoryle le DBD de RAR $\alpha$  au niveau de la sérine 157 (Delmotte et al., 1999). Cette phosphorylation diminue la capacité d'hétérodimérisation de RAR $\alpha$  avec RXR et son affinité pour les RARE, d'où une baisse de son activité transcriptionnelle (Delmotte et al., 1999).

Un autre site, conservé entre de nombreux récepteurs nucléaires, est phosphorylable par la PKC *in vivo* : la sérine 115 de RAR $\alpha$  et la thréonine 162 de RXR $\alpha$  (Sun et al., 2007). La phosphorylation de ces résidus induit la dissociation des récepteurs de l'ADN (Sun et al., 2007). Dans le cas de RXR $\alpha$ , une relocalisation du récepteur a été observée lorsque la thréonine 162 est substituée en acide aspartique, mutation mimant un état phosphorylé (Sun et al., 2007). L'effet de la phosphorylation de la sérine 115 de RAR $\alpha$  sur sa localisation n'a pas encore été étudié.

La kinase Akt phosphoryle également le DBD de RAR $\alpha$  au niveau de la sérine 96, bien que ce résidu n'appartienne pas à un site consensus pour cette kinase (Srinivas et al., 2006). Cette phosphorylation affecte la transactivation des gènes cibles de l'AR mais le mécanisme sous-jacent n'a pas encore été élucidé.

Enfin, la kinase CAMKII $\gamma$  peut se lier au LBD de RAR $\alpha$  *via* un motif LxxLL et ainsi phosphoryler une ou plusieurs thréonines de la région charnière (Si et al., 2007). Ces phosphorylations maintiendraient le récepteur dans une configuration inactive (Si et al., 2007). En réponse au ligand, la kinase se dissocie permettant ainsi la dé-répression des gènes cibles (Si et al., 2007).

## **C. Nouveaux partenaires des RAR et interférence avec d'autres voies de signalisation**

### **1. Phosphorylation et nouveaux partenaires du NTD des RAR**

Les kinases sont parmi les premiers partenaires identifiés pour le NTD des RAR. Ainsi, une interaction a été mise en évidence entre cdk7 et RAR $\gamma$ /RAR $\alpha$  (Bastien et al., 2000; Rochette-Egly et al., 1997). De façon intéressante, l'équipe a démontré que la liaison de cdk7 dépend de l'ancrage de la cycline H au niveau du LBD de RAR $\alpha$  (Publication 1). Le NTD de RAR $\gamma$  étant phosphorylé par

la p38MAPK, on peut supposer que cette kinase interagit aussi avec le récepteur (Bastien et al., 2000; Gianni et al., 2002a).

La phosphorylation du NTD par ces kinases est cruciale pour l'activité transcriptionnelle des RAR (Bastien et al., 2000; Rochette-Egly et al., 1997; Rochette-Egly et al., 2000). Un tel effet peut notamment s'expliquer *via* l'apport de charges et/ou les changements structuraux induits par les phosphorylations, ces effets favorisant ou empêchant l'interaction du NTD avec ses partenaires (Lavery and McEwan, 2005; Warnmark et al., 2003).

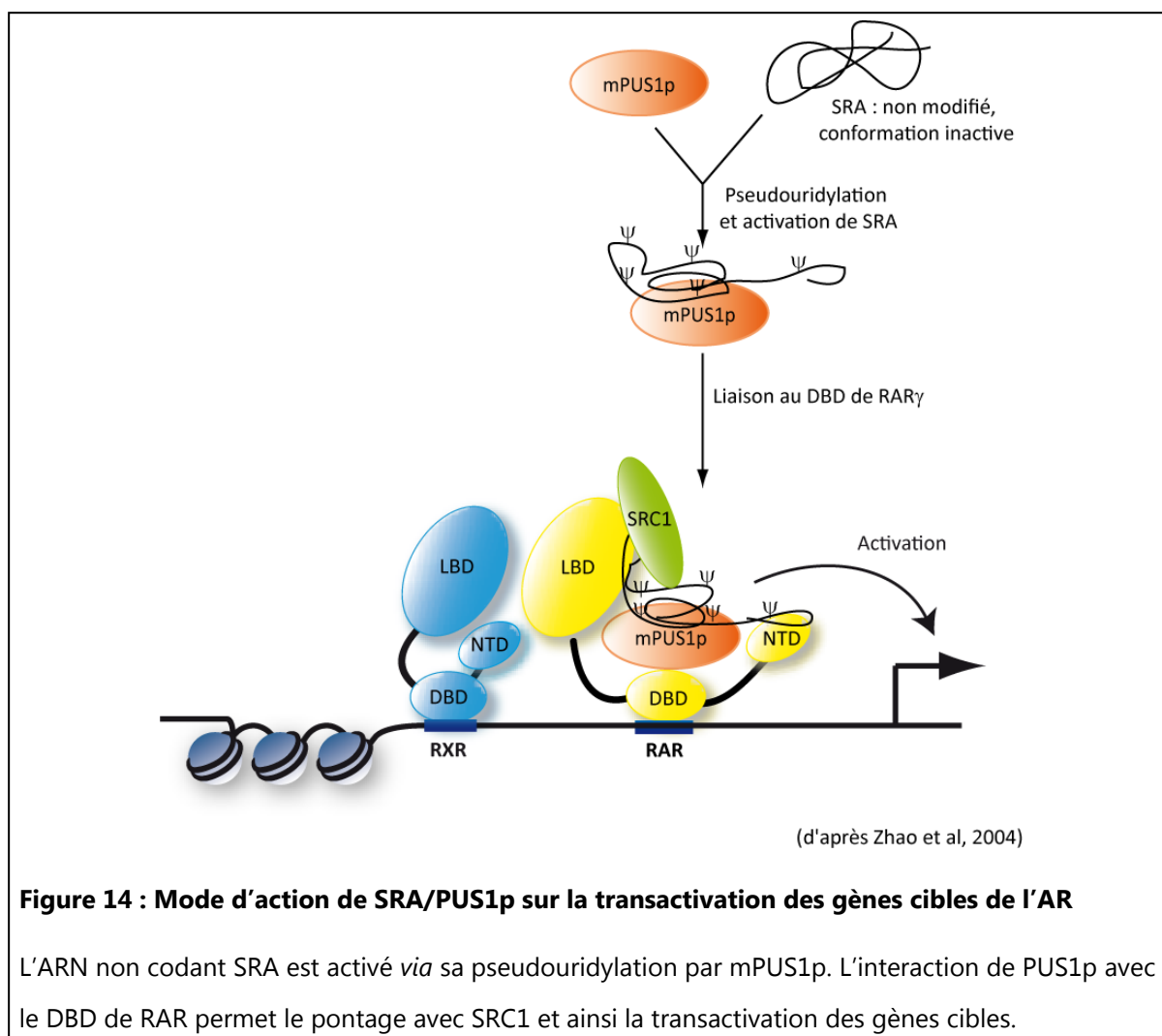
Il est intéressant de noter que les sites de phosphorylation connus du NTD des RAR appartiennent à un motif riche en prolines susceptible d'interagir avec des protéines renfermant des domaines WW ou SH3 (Li, 2005; Mayer, 2001) (Publication 3). Ainsi il a été démontré que le NTD de RAR $\alpha$  a la capacité d'interagir avec Pin1 (proline cis/trans isomérase), une protéine à domaine WW (Brondani et al., 2005; Gianni et al., 2009). Cette molécule est capable de se lier à un motif Ser/Thr-Pro phosphorylé et d'isomériser la proline présente en aval (Lippens et al., 2007; Shaw, 2007). Un tel changement conformationnel sert généralement de signal initiateur pour la dégradation de protéines par le système ubiquitine/protéasome (Lippens et al., 2007; Shaw, 2007; Stanya et al., 2008). Dans le cas de RAR $\alpha$ , Pin-1 interagit avec le récepteur lorsque celui-ci est phosphorylé au niveau de la sérine 77 (Brondani et al., 2005; Gianni et al., 2009). Cependant, aucune donnée indique si les autres sous-types RAR $\beta$  et RAR $\gamma$  peuvent également interagir avec Pin1. A noter que d'autres protéines ont été identifiées comme interagissant avec les récepteurs nucléaires *via* des motifs phosphorylés (Gburcik and Picard, 2006; Weigel and Moore, 2007). Il s'agit des protéines SPBP, SF3a120 et p68 qui interagissent avec ER $\alpha$  lorsque la sérine 118 est phosphorylée (Endoh et al., 1999; Gburcik et al., 2005; Masuhiro et al., 2005; Watanabe et al., 2001). La protéine p68 mettrait ainsi en place un pontage entre le NTD et le LBD *via* une protéine de la famille p160 (Watanabe et al., 2001).

A noter que la phosphorylation peut également empêcher des interactions entre protéines. Ainsi dans le cas de RAR $\gamma$ , nous avons mis en évidence une nouvelle protéine à domaines SH3, la Vinexine  $\beta$  qui interagit avec le NTD, uniquement lorsque ce dernier n'est pas phosphorylé (cf. Résultats). De même, le corépresseur TSG101 se lie au NTD de GR, lorsque celui-ci n'est pas phosphorylé au niveau des sérines 203 et 211 (Hittelman et al., 1999; Ismaili et al., 2005).

## 2. RAR et complexes ribonucléoprotéiques.

L'implication d'ARN non codants ou de protéines ayant la capacité de fixer des ARN comme modulateurs de la transcription des récepteurs nucléaires est suggérée depuis de nombreuses années (Barrandon et al., 2008). Cependant, les preuves sont encore très minces. Une première

preuve a été obtenue en 1999 dans le contexte de PR (Progesterone Receptor) avec la découverte d'un coactivateur de nature ribonucléique nommé SRA (Steroid Receptor RNA Activator) (Lanz et al., 1999). Ce coactivateur interagit avec SRC-1 et son interaction est fortement diminuée en absence du NTD de PR (Lanz et al., 1999). Plus récemment, une étude a mis en évidence une interaction entre RAR $\gamma$  et PUS1p, une pseudouridine synthase qui joue un rôle de coactivateur (Zhao et al., 2004) (Figure 14). PUS1p interagit d'une part avec le premier doigt de zinc du DBD de RAR $\gamma$  et d'autre part avec l'ARN non codant SRA qu'il va pseudouridyle (Zhao et al., 2004) (Figure 14).



Il a également été démontré que les RAR ont la capacité de se lier à des homopolymères d'ARN *via* leur LBD, mais la fonctionnalité de cette liaison reste encore évasive (Lalli et al., 2000). Plus récemment, les RAR ont été trouvés associés à des granules ribonucléoprotéiques (Chen et al., 2008; Maghsoodi et al., 2008). En se liant à des ARN *via* l'hélice H12 et/ou la région F, RAR $\alpha$  inhiberait leur traduction (Poon and Chen, 2008) (cf. II.A.2). La recherche de partenaires des RAR a également mis

en évidence des protéines de type snRNP (small nuclear RiboNucleoProtein) ou protéines intervenant dans l'épissage des ARNm, comme la protéine Pur $\alpha$  (Chen et al., 2008; McNamara et al., 2008).

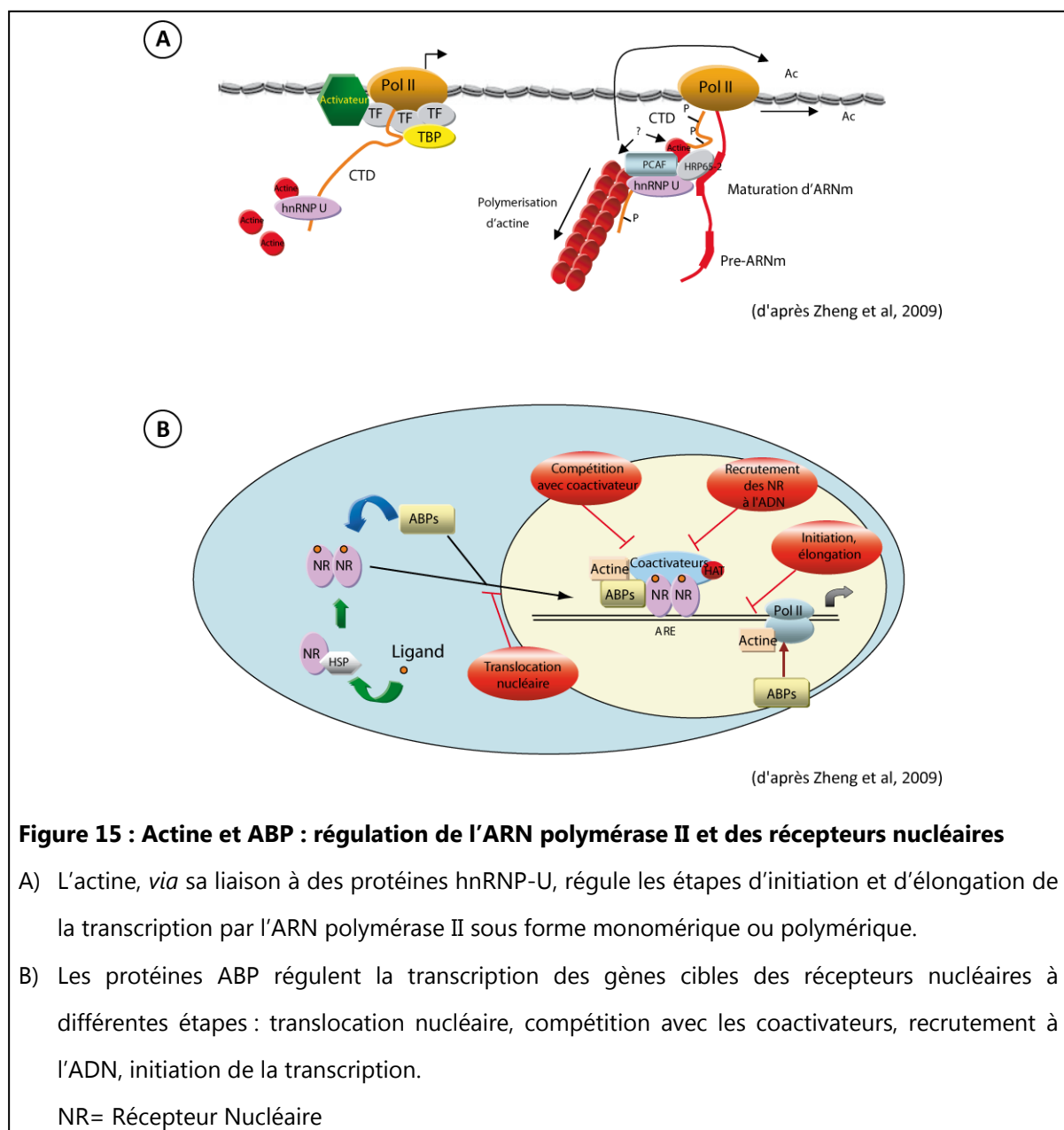
Enfin, Acinus S', protéine appartenant à la famille Acinus (Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus), a été mise en évidence comme nouveau partenaire du NTD de RAR $\beta$  (Vucetic et al., 2008). Cette protéine nucléaire induit la condensation de la chromatine lors de l'apoptose (Vucetic et al., 2008). Elle a également été trouvée associée à des complexes impliqués dans la maturation des ARN, notamment le complexe ASAP (Apoptosis Splicing Associated Protein) (Schwerk et al., 2003) ainsi que dans le complexe de Jonction Exon/Exon (EJC) (Tange et al., 2005). Un autre récepteur, AndR ou Androgen Receptor, est également capable de se lier à des protéines impliquées dans l'épissage des ARN comme ANT1 et PSF (Fan et al., 2006; Ishitani et al., 2003; Zhao et al., 2002). Ces données établissent un lien entre la régulation de l'expression des gènes et la maturation des ARN.

Le rôle de ces protéines et/ou ARN dans la régulation des RAR reste encore flou. SRA, initialement identifié comme un coactivateur (Lanz et al., 1999), a également été identifié comme corépresseur (Hatchell et al., 2006). Il interagirait avec une protéine SLIRP (SRA stem-Loop-Interacting RNA-binding Protein) et serait ainsi recruté dans les complexes corépresseurs (Hatchell et al., 2006). Ceci suggère un rôle plus général des ARN non codants et des protéines associées dans la régulation de la transcription (Barrandon et al., 2008).

### 3. RAR et actine/matrice nucléaire

La présence d'actine dans le noyau et son rôle dans la régulation de la transcription sont débattus depuis une vingtaine d'années (Egly et al., 1984; Percipalle and Visa, 2006). Initialement identifiée comme étant associée à l'ARN polymérase II et essentielle pour la transcription (notamment dans la formation du complexe de préinitiation), l'actine s'avère associée à de nombreux processus nucléaires. En effet, elle joue un rôle dans les complexes de remodelage de la chromatine, elle est présente dans les particules RNP et elle a été trouvée associée aux différentes ARN polymérases (I, II et III) (Hofmann et al., 2004; Percipalle and Visa, 2006; Zheng et al., 2009) (Figure 15A). La difficulté réside cependant dans la mise en évidence du rôle de l'actine nucléaire, connaissant son rôle dans le maintien de la forme de la cellule. Les premières études réalisées en présence d'inhibiteurs de la polymérisation d'actine n'ont pas donné de résultats probants car seuls, l'actine  $\beta$  globulaire ou de courts polymères d'actine seraient présents dans le noyau (Dingova et al., 2009). Par ailleurs, ces inhibiteurs altèrent la morphologie de la cellule et donc amènent à des variations transcriptionnelles indépendantes de l'actine nucléaire. L'utilisation d'anticorps

anti-actine  $\beta$  a cependant permis de montrer que l'actine pouvait être un acteur dans la transcription de certains gènes cibles.



Cependant, jusqu'à présent, il manquait un lien entre actine et récepteurs nucléaires. La découverte du rôle de l'actine dans la transcription a été associée à la mise en évidence de nombreuses protéines capables de se lier à l'actine, nommées ABP (Actin Binding Protein) (Zheng et al., 2009). Parmi ces protéines, certaines, telles que la gelsoline, Fli1, Actinine2 et la cofiline, ont été identifiées comme interagissant avec les récepteurs nucléaires (Gettemans et al., 2005; Huang et al., 2004; Lee et al., 2004; Ting and Chang, 2008).



Plus récemment, une autre ABP, la Vinexine  $\alpha$ , a été mise en évidence comme interagissant avec ER $\alpha$  (Tujague et al., 2004). Finalement, une autre isoforme, la Vinexine  $\beta$ , a été identifiée au laboratoire comme interagissant avec RAR $\gamma$  (cf. Résultats).

Ces ABP peuvent jouer des rôles de coactivateur ou de corépresseur en fonction du récepteur et de la protéine considérée (Gettemans et al., 2005; Zheng et al., 2009) (Figure 15B). En effet, ces protéines moduleraient la fonction des récepteurs nucléaires de différentes façons : dynamique de l'import nucléaire, lien avec la machinerie transcriptionnelle, rapprochement de « territoires » chromosomiques (Zheng et al., 2009) (Figure 15B). La recherche de complexes associés à RAR $\alpha$  a permis la mise en évidence de protéines du cytosquelette telles que la tubuline, l'actine et la vimentine (Chen et al., 2008). Cependant, leur association directe avec les RAR n'a pas encore été confirmée.

D'autres études ont également démontré que RAR $\alpha$  et ER $\alpha$  interagissent des composants de la « matrice nucléaire » tels que les protéines RIF1 et SAFB1/2 respectivement (Jiang et al., 2006; Li et al., 2007). La nature, la composition et l'existence de cette matrice nucléaire restent encore très débattues (Pederson, 2000). Cependant, l'interaction entre RAR $\alpha$  et RIF1 suggère que cette protéine pourrait permettre l'ancrage du récepteur au niveau de la matrice nucléaire (Li et al., 2007). Cette matrice pourrait également jouer un rôle dans la relocalisation des récepteurs en réponse au ligand comme c'est le cas pour PR (Graham et al., 2009).

En conclusion, bien que le lien entre actine nucléaire et RAR ne soit pas encore clairement établi, il existe actuellement de nombreuses preuves démontrant son implication dans la régulation de la fonctionnalité des RAR (Ferrai et al., 2009).

#### **4. Interférence des RAR avec d'autres voies de signalisation**

Les RAR jouent un rôle important durant le développement embryonnaire, notamment dans la mise en place des axes de l'embryon et dans la régionalisation du cerveau, *via* la transcription de gènes cibles tels que les gènes *Hox* (Dolle, 2009; Mark et al., 2009). Il est également admis que les RAR jouent un rôle à l'état adulte, notamment dans l'hippocampe et dans la mise en mémoire des informations (Maden, 2007). Bien que ces fonctions soient régulées majoritairement *via* la transcription des gènes cibles de l'AR, il existe également des modulations *via* l'interaction des RAR avec des protéines spécifiques impliquées dans ces différents processus ou *via* des interférences entre les différents programmes génétiques.

### a) *RAR et développement embryonnaire*

L'une des voies majeures impliquée dans l'embryogenèse est la voie Wnt/ $\beta$ caténine (MacDonald et al., 2009). Etant donné le rôle majeur joué par la voie de l'AR lors du développement, des études ont analysé les connections entre ces deux voies. Des interactions directes entre la  $\beta$ caténine et RAR, ainsi qu'entre la  $\beta$ caténine et RXR, ont été mises en évidence (Easwaran et al., 1999; Han et al., 2008). Ces travaux ont été élargis à d'autres récepteurs nucléaires tels que GR, ER, AR, PPAR et VDR (Mulholland et al., 2005). L'ensemble de ces NR sont capables d'interagir avec la  $\beta$ caténine ou avec un des composants protéiques de la voie Wnt/ $\beta$ caténine/TCF (Mulholland et al., 2005). Dans la majorité des cas, les récepteurs inhibent la voie Wnt/ $\beta$ caténine en réponse à leur ligand (Easwaran et al., 1999; Mulholland et al., 2005). Cependant, le mécanisme d'interférence entre les NR et cette voie est encore mal compris; l'interaction directe entre RAR et la  $\beta$ caténine pourrait inhiber le recrutement du complexe  $\beta$ caténine/TCF au niveau du promoteur des gènes cibles. Une autre hypothèse serait une compétition entre les cofacteurs des NR et ceux recrutés par  $\beta$ caténine/TCF. Enfin, une des cibles potentielles des RAR serait Dab2, qui réprime la cascade Wnt (Jiang et al., 2008).

Parmi les autres partenaires potentiels des RAR, on trouve des protéines impliquées dans le développement précoce de l'embryon. C'est le cas des protéines Polycomb qui jouent un rôle corépresseur dans la régulation des gènes *Hox*. Des interactions ont été mises en évidence entre les protéines de type Polycomb et les protéines de fusion PML-RAR $\alpha$  et PLZF-RAR $\alpha$  (Boukarabila et al., 2009; Villa et al., 2007). PLZF peut également interagir avec RAR (Martin et al., 2003) et cette protéine régulerait l'expression colinéaire des gènes du cluster *Hox* lors du développement (Barna et al., 2000).

Les protéines du groupe Polycomb, comme SUZ12, sont également associées à l'ADN, notamment au niveau du RARE de certains gènes cibles tels que *HoxA1*, *RAR $\beta$ 2* et *CYP26A1* (Gillespie and Gudas, 2007). Ces protéines, qui répriment la transcription des gènes cibles de l'AR, se dissocient des promoteurs en réponse au ligand (Gillespie and Gudas, 2007).

Une interaction a également été mise en évidence entre RAR $\gamma$  et ZAC1, une protéine à activité corépresseur impliquée dans la mise en place du cartilage (Williams et al., 2009). Enfin, RAR peut interagir avec d'autres facteurs de transcription tel que Gata2, un facteur de transcription impliqué dans le développement et dans le lignage des cellules hématopoïétiques (Tsuzuki et al., 2004).

### ***b) RAR et mise en place/maintenance du système nerveux.***

De récentes études ont également mis en évidence le rôle clé de l'AR à l'état adulte dans la maintenance du cerveau et dans la mémoire (Maden, 2007).

De nombreux partenaires ont été découverts comme pouvant jouer un rôle dans la neurogenèse et dans la modulation des synapses. Ainsi la protéine ERAP 140, exprimée uniquement dans les neurones, peut interagir avec RAR $\alpha$  (Shao et al., 2002). Elle joue un rôle lors de stress oxydatifs et sert de coactivateur pour différents récepteurs nucléaires (Shao et al., 2002).

Deux autres protéines spécifiquement exprimées dans le cerveau, NPDC1 et NIX1, interagissent avec de nombreux NR dont les RAR (Greiner et al., 2000; Henry et al., 2003). Ces protéines jouent un rôle de corépresseur et seraient recrutées au niveau du LBD *via* un motif LxxL (Greiner et al., 2000).

Une étude récente a également mis en évidence un rôle majeur de Znf423 dans la régulation du signal rétinoïde (Huang et al., 2009). Cette protéine est associée aux promoteurs de certains gènes cibles et s'associe au complexe RAR/RXR (Huang et al., 2009). Elle jouerait ainsi un rôle de facteur intermédiaire de la transcription, *via* le recrutement d'autres facteurs, lors du développement neuronal chez la souris. Elle servirait également de marqueur de pronostic dans le cas de neuroblastomes (Huang et al., 2009).

Récemment, une interaction a été mise en évidence entre RAR et Neurogenin2, une protéine à domaine bHLH (basic Helix Loop Helix) (Lee et al., 2009). Les protéines à bHLH sont des facteurs cruciaux lors de la neurogenèse. Neurogenin2 se lie à l'ADN au niveau d'éléments de réponse spécifiques (Lee et al., 2009). RAR s'associerait directement à ce facteur transcriptionnel indépendamment de son DBD, permettant ainsi le co-recrutement de CBP (Lee et al., 2009). Ce complexe jouerait un rôle essentiel dans la genèse des motoneurones.

### ***c) Transrépression d'autres gènes***

Les RAR régulent non seulement l'expression de leurs gènes cibles mais aussi d'autres gènes en interférant avec d'autres récepteurs nucléaires ou d'autres facteurs de transcription.

En effet, les RAR peuvent interférer avec d'autres récepteurs nucléaires soit en recrutant des protéines similaires présentes en quantité limitante dans la cellule soit en se liant à des séquences d'ADN identiques ou présentes à proximité l'une de l'autre, d'où des effets synergiques ou antagonistes. Parmi ces exemples, le phénomène de « squelching » est le plus représentatif. Le

recrutement par un récepteur de protéines présentes en quantité limitante va inhiber l'expression d'un autre (Wright et al., 1993).

Des études récentes ont démontré que RAR et un autre récepteur nucléaire, ER $\alpha$ , peuvent se fixer sur des éléments de réponse identiques, voisins ou se chevauchant au sein de promoteurs de gènes et aussi entrer en compétition au niveau du recrutement de partenaires protéiques communs (FoxA1 et GATA3) (Hua et al., 2009). De plus, certains promoteurs peuvent être corégulés par deux récepteurs nucléaires comme RAR et VDR (Vitamin D Receptor), *via* la présence des deux éléments de réponse dans le même promoteur (Bastie et al., 2004; Tavera-Mendoza et al., 2006). Enfin, l'interférence entre deux récepteurs comme RAR et TR2 (Testis Receptor 2) peut avoir lieu *via* des effets non génomiques (Gupta et al., 2008). Dans ce cas, l'AR, *via* l'activation de la voie des Erk/MAPK, va induire la phosphorylation du récepteur TR2, suivie de sa sumoylation (Gupta et al., 2008). Cette modification rapide induit la répression de certains gènes cibles comme Oct4 ainsi que l'arrêt de prolifération des cellules ES (Gupta et al., 2008).

Un autre exemple de transrépression est l'inhibition par l'AR de la transcription des gènes cibles de AP1. AP1 est un hétérodimère de deux partenaires : un partenaire de la famille Fos et un partenaire de la famille Jun. Ce complexe régule l'expression de gènes impliqués dans la transformation oncogénique et la prolifération cellulaire et est régulé par de nombreux processus comme la phosphorylation. Un des mécanismes qui expliquerait l'action transrépressive de l'AR, serait une interaction directe entre RAR et un des membres de la famille Jun/Fos (Germain et al., 2002; Lefebvre et al., 2005). Cependant, d'autres modèles ont également été proposés, comme une compétition entre RAR et AP1 pour la fixation du coactivateur CBP ou l'inhibition des JNK par les RAR (Altucci and Gronemeyer, 2001; Lefebvre et al., 2005).

# OBJECTIFS

## Objectifs

La thématique centrale de l'équipe du Dr Cécile Rochette-Egly est basée sur l'étude des modifications post-traductionnelles des RAR, et plus particulièrement de leurs phosphorylations. Depuis la découverte des RAR comme phosphoprotéines, l'équipe a identifié un certain nombre de sites de phosphorylation ainsi que les kinases associées. Elle a démontré le rôle clé de ces phosphorylations, ainsi que des voies kinases activées en réponse à l'AR, dans la modulation de l'activité transcriptionnelle des RAR.

L'équipe a montré que les phosphorylations ciblent essentiellement deux domaines des RAR : le LBD et le NTD. En effet, le LBD est phosphorylable par la kinase MSK1 au niveau d'une sérine conservée entre les différents sous-types des RAR et localisée au niveau de la boucle située entre les hélices H9 et H10. Il s'agit de la sérine 369 pour RAR $\alpha$ 1 et de la sérine 371 pour RAR $\gamma$ 1. Quant au NTD, il est phosphorylé par une kinase spécifique, cdk7, qui est une des sous-unités du facteur général de transcription TFIID. Cette phosphorylation résulte d'une interaction stable entre les RAR et TFIID, interaction qui ne dépend pas de la fixation du ligand. Les résidus phosphorylés ont été identifiés : il s'agit de la sérine 77 de RAR $\alpha$ 1 et de la sérine 79 de RAR $\gamma$ 1.

La phosphorylation du NTD est cruciale pour l'activité transcriptionnelle des RAR. Cependant, dans le cas particulier de RAR $\gamma$ , cette phosphorylation bien que nécessaire n'est pas suffisante. En effet, pour être transcriptionnellement actif, RAR $\gamma$  doit également être phosphorylé au niveau d'une sérine adjacente (sérine 77 de RAR $\gamma$ 1) par la p38MAPK, qui est activée en réponse aux rétinoïdes. Finalement, l'équipe a montré que, en fin de signal, la phosphorylation des RAR ( $\alpha$  et  $\gamma$ ) est un signal pour leur ubiquitination, ce qui conduit à leur dégradation par le protéasome. Le même processus a été observé dans le cas du coactivateur SRC-3.

L'ensemble de ces données amène à une question centrale : comment une(des) phosphorylation(s) peut(peuvent) moduler le fonctionnement des RAR ? Les phosphorylations sont des modifications post traductionnelles très rapides et réversibles qui peuvent notamment induire des modifications allostériques affectant les domaines adjacents et contrôler la dynamique

d'association/dissociation de corégulateurs. Dans ce contexte, les objectifs majeurs de mon travail de thèse ont été les suivants :

- Caractériser à l'échelle moléculaire comment l'AR induit la phosphorylation du NTD par le complexe cdk7/cycline H de TFIIH
- Déterminer l'influence de la phosphorylation du motif riche en proline du NTD de RAR $\gamma$  sur son association-dissociation avec un partenaire à domaines SH3 : la Vinexine  $\beta$ .
- Déterminer le rôle d'un autre partenaire protéique des RAR, SUG-1, une sous unité ATPasique du protéasome, dans la transcription des gènes cibles de l'AR.

Pour répondre à ces questions, des approches novatrices et pluridisciplinaires ont été mises en place. Ces travaux ont permis l'établissement de collaborations, la mise au point et/ou l'apport de nouvelles techniques dans l'équipe telles que :

- L'implantation de la technique du FRET à l'IGBMC en collaboration avec le service de microscopie (Pascal Kessler/Jean-Luc Vonesch).
- La mise en place d'une collaboration avec l'équipe de RMN de l'IGBMC pour l'étude structurale de l'impact des phosphorylations et de partenaires protéiques sur la conformation du NTD.
- L'apprentissage de la technique de Résonance Plasmonique de Surface en collaboration avec la plateforme « Biocapteurs » de l'UMR 7175 (ESBS, Illkirch).
- La mise en place d'une collaboration avec l'équipe de bioinformatique de l'IGBMC pour la recherche phylogénétique de nouveaux RARE.

# RESULTATS



## Résultats

### Intégration du signal AR :

#### Une seule molécule RAR, différentes dynamiques (conformation, phosphorylation, interaction)

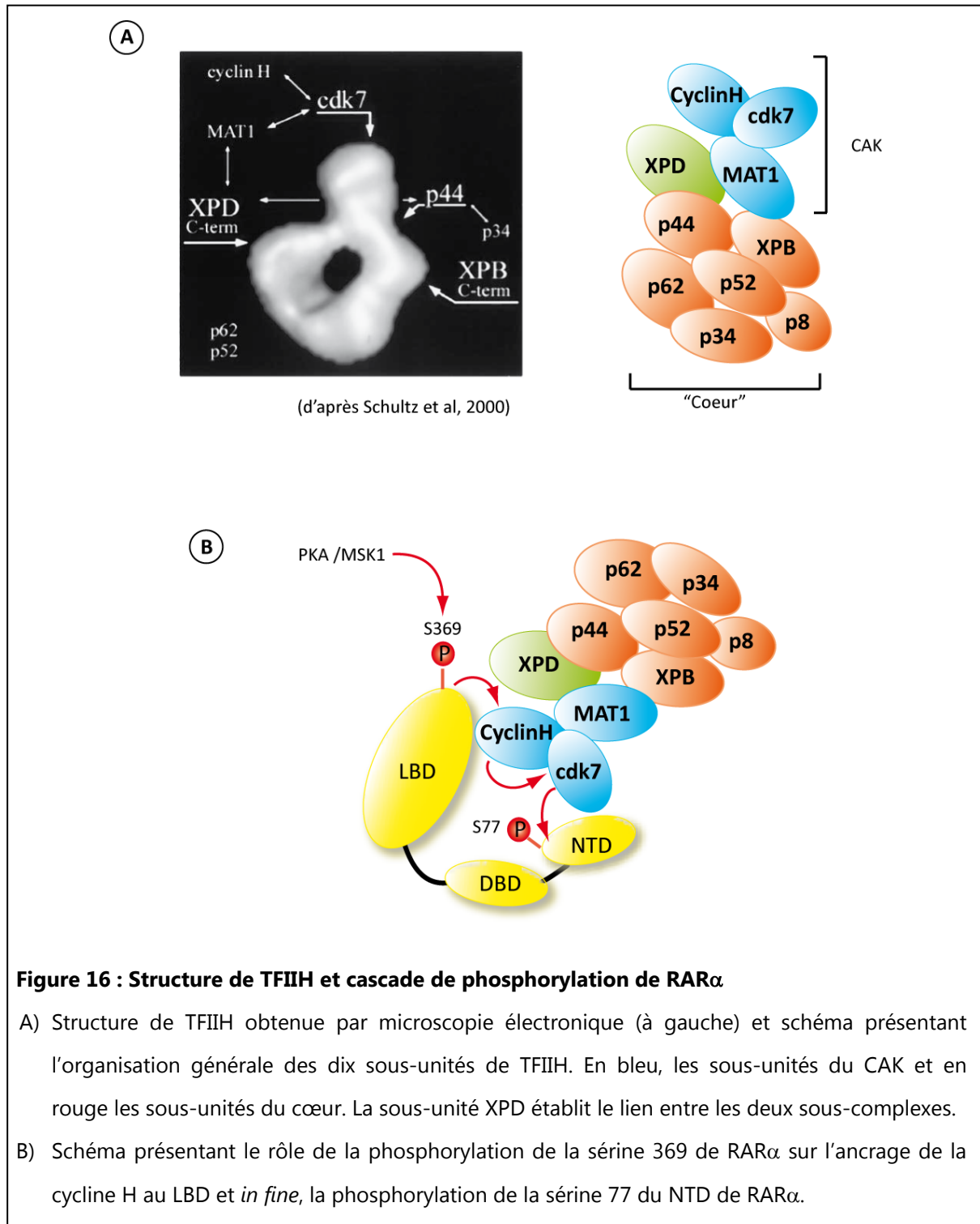
### I. Phosphorylation du LBD et interaction dynamique de cdk7/TFIIH (Publications 1 et 2 et Revue 1)

#### A. Recrutement de cdk7/TFIIH par RAR : synergie LBD/NTD

TFIIH est un facteur indispensable pour la transcription des gènes cibles par l'ARN polymérase II (Zurita and Merino, 2003). Il est également impliqué dans la réparation de l'ADN par excision et re-synthèse de nucléotides (système NER) (Laine and Egly, 2006). Le complexe TFIIH est constitué de 10 sous-unités organisées en deux sous-complexes : le « module » CAK et le « cœur » TFIIH (Coin et al., 2006; Schultz et al., 2000) (Figure 16A). Le CAK existe sous deux formes, associée à TFIIH ou libre. Il est composé de trois sous-unités : la kinase cycline-dépendante cdk7, la cycline associée nommée cycline H et une protéine d'assemblage du dimère nommée MAT1 (Lolli and Johnson, 2005) (Figure 16A). Le CAK, présent à l'état libre, participe à la régulation du cycle cellulaire *via* la phosphorylation d'autres cdk, telles que cdk1, cdk2, cdk4 et cdk6 (Lolli and Johnson, 2005). Par contre, le CAK associé au complexe TFIIH joue un rôle prépondérant lors de la régulation de la transcription en phosphorylant le domaine COOH-terminal ou CTD d'une sous-unité de l'ARN polymérase II, d'autres facteurs généraux de transcription comme TFIIIE, TFIIIF, ainsi que les récepteurs nucléaires comme PPAR, ER, TR et RAR (Lolli and Johnson, 2005).

Il a été démontré dans l'équipe que le NTD des RAR est une cible de la kinase cdk7 en réponse à l'AR (sérine 77 de RAR $\alpha$ 1 et sérine 79 de RAR $\gamma$ 1) (Bastien et al., 2000; Rochette-Egly et al., 1997). Aussi, nous avons voulu identifier la cascade permettant le recrutement de la kinase cdk7 par RAR et conduisant à la phosphorylation du NTD (Figure 16B). Généralement, une kinase va phosphoryler un résidu appartenant à une séquence consensus, spécifique d'un type de kinase mais présente dans de nombreux substrats. A l'heure actuelle, de plus en plus de données démontrent que la spécificité d'une kinase vis-à-vis de son substrat dépend de son ancrage au niveau d'une région adjacente distincte du site de phosphorylation, ou *via* l'ancrage d'un partenaire de la kinase

(Barsyte-Lovejoy et al., 2002; Sheridan et al., 2008). Un tel mécanisme garantirait la phosphorylation d'une(plusieurs) cible(s) spécifique(s) en réponse à l'activation d'une voie de signalisation et augmenterait l'activité catalytique de la kinase.



Nous avons voulu déterminer si l'un des deux partenaires de cdk7 était capable d'interagir avec RAR $\alpha$ . J'ai ainsi participé à la mise en évidence de l'interaction de RAR $\alpha$  avec la sous-unité cycline H du CAK (Publication 1). Tandis que la kinase cdk7 phosphoryle le NTD de RAR $\alpha$ , la cycline H

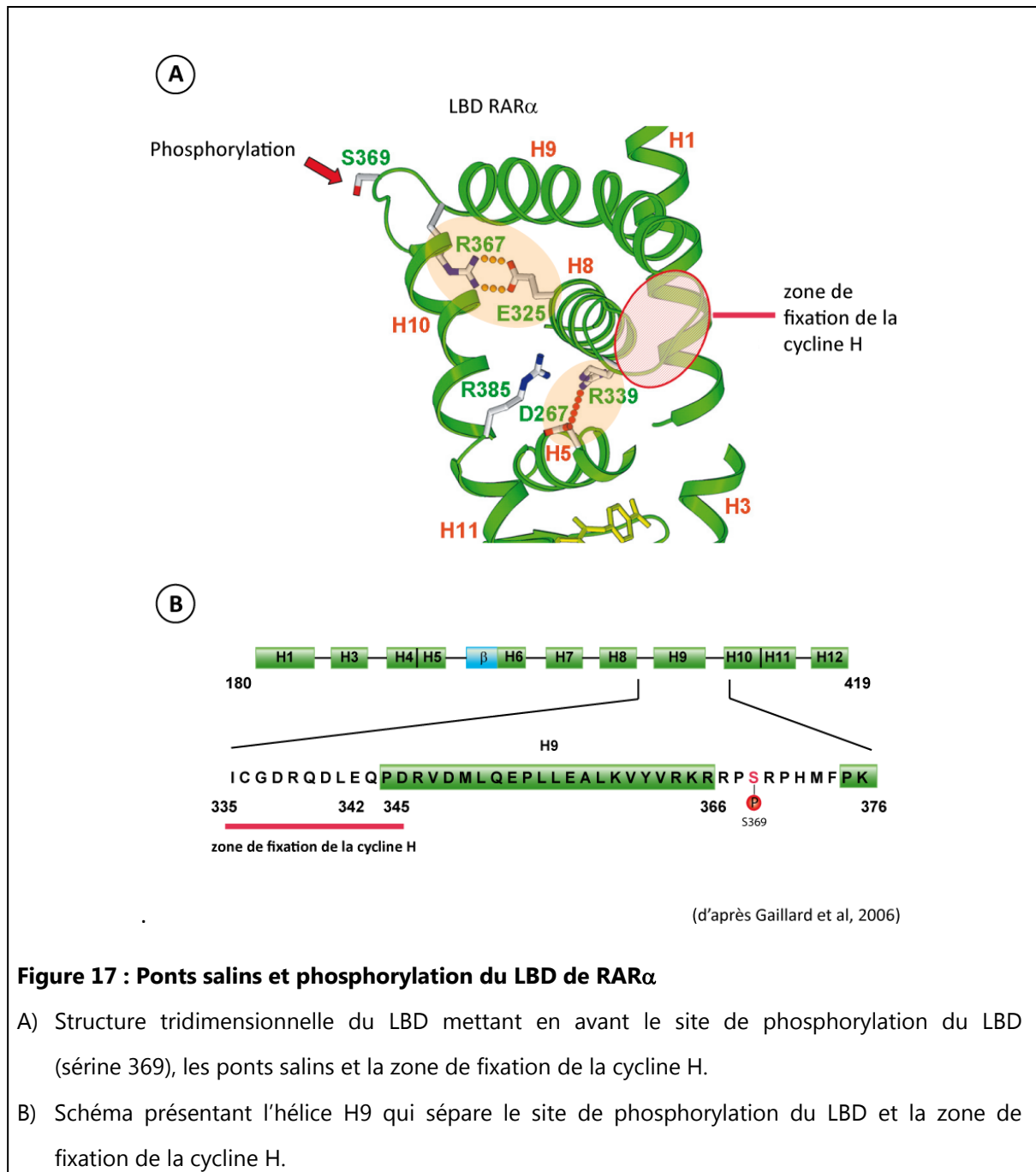
interagit avec une région présente au niveau du LBD (Figure 16B). Une recherche structurale des sites exposés à la surface du LBD de RAR $\alpha$  a permis de prédire la surface d'interaction avec la cycline H (Figure 17A). Des expériences d'immunoprécipitation et de compétition ont confirmé cette région, constituée de la boucle H8-H9 et du début de l'hélice H9 du LBD de RAR $\alpha$  (Publication 1). De manière intéressante, ces résultats suggèrent l'existence d'une synergie entre les deux domaines, le NTD et le LBD, *via* le recrutement d'un complexe protéique composé de cdk7 et Cycline H (au moins) (Figure 16B).

Une synergie entre le LBD et le NTD a déjà été suggérée et/ou démontrée pour de nombreux récepteurs nucléaires pour la transactivation de leurs gènes cibles. Dans le cas du récepteur des androgènes, cette synergie dépend d'une interaction directe entre le NTD et le LBD (He et al., 2004; Schaufele et al., 2005). Par contre pour les autres récepteurs stéroïdiens, elle mettrait en jeu des coactivateurs de la famille p300 et p160, qui interagissent non seulement avec le LBD mais aussi avec le NTD de ces récepteurs (Benecke et al., 2000; Onate et al., 1998; Zennaro et al., 2001). Dans le cas de RAR $\alpha$ , nos travaux sont les premiers à démontrer que la synergie entre le NTD et le LBD relève d'une coopération *via* le recrutement d'un complexe multi-protéique à activité kinasique (Figure 16B). Une autre étude a également suggéré un pontage entre le NTD et le LBD de RAR $\alpha$  mettant en jeu SRC-2 du côté du LBD et un autre intermédiaire protéique du côté du NTD qui reste à identifier (Bommer et al., 2002).

## B. Phosphorylation et dynamique conformationnelle du LBD

L'interaction de RAR $\alpha$  avec la cycline H a lieu au niveau d'une boucle du LBD (Figure 17A). La flexibilité conformationnelle apportée par cette boucle suggère un rôle dynamique dans la régulation de l'interaction. De manière intéressante, nous avons démontré que la réduction de la flexibilité de cette boucle, *via* la substitution de la leucine en position 342 par une thréonine, abroge l'interaction avec la cycline H (Publication 1). A l'inverse, la substitution de la proline et de l'acide aspartique en positions 345 et 346 en glycine et en alanine respectivement augmente la flexibilité conformationnelle de cette boucle et induit une augmentation de l'interaction (Publication 1). Dans tous les cas, l'efficacité de la phosphorylation du NTD par la kinase cdk7 reflète la force d'interaction de la cycline H avec le LBD.

Ces expériences démontrent l'importance de la dynamique conformationnelle du LBD pour le recrutement du complexe Cycline H/ckd7, et par voie de conséquence pour la phosphorylation du NTD par cdk7.



A noter, un autre résidu phosphorylable (sérine 369 de RAR $\alpha$ ) est présent dans le LBD (Figure 17B). Ce résidu appartient à un site consensus de phosphorylation pour les kinases PKA et MSK1 et est présent dans la boucle entre H9 et H10 (Publication 2). Ce résidu, séparé du site d'interaction avec la cycline H uniquement par l'hélice H9, en est donc très proche (Figure 17B). C'est pourquoi nous avons analysé les conséquences éventuelles de la phosphorylation de ce résidu sur l'efficacité de l'ancrage de la cycline H (Publication 2). Nous avons démontré que la phosphorylation de la sérine 369 de RAR $\alpha$  induit une augmentation du recrutement de la cycline H, associée à une augmentation de la phosphorylation du domaine NTD *via* cdk7. L'effet de cette phosphorylation sur un site d'interaction distant pourrait s'expliquer par un changement conformationnel induit. En effet,

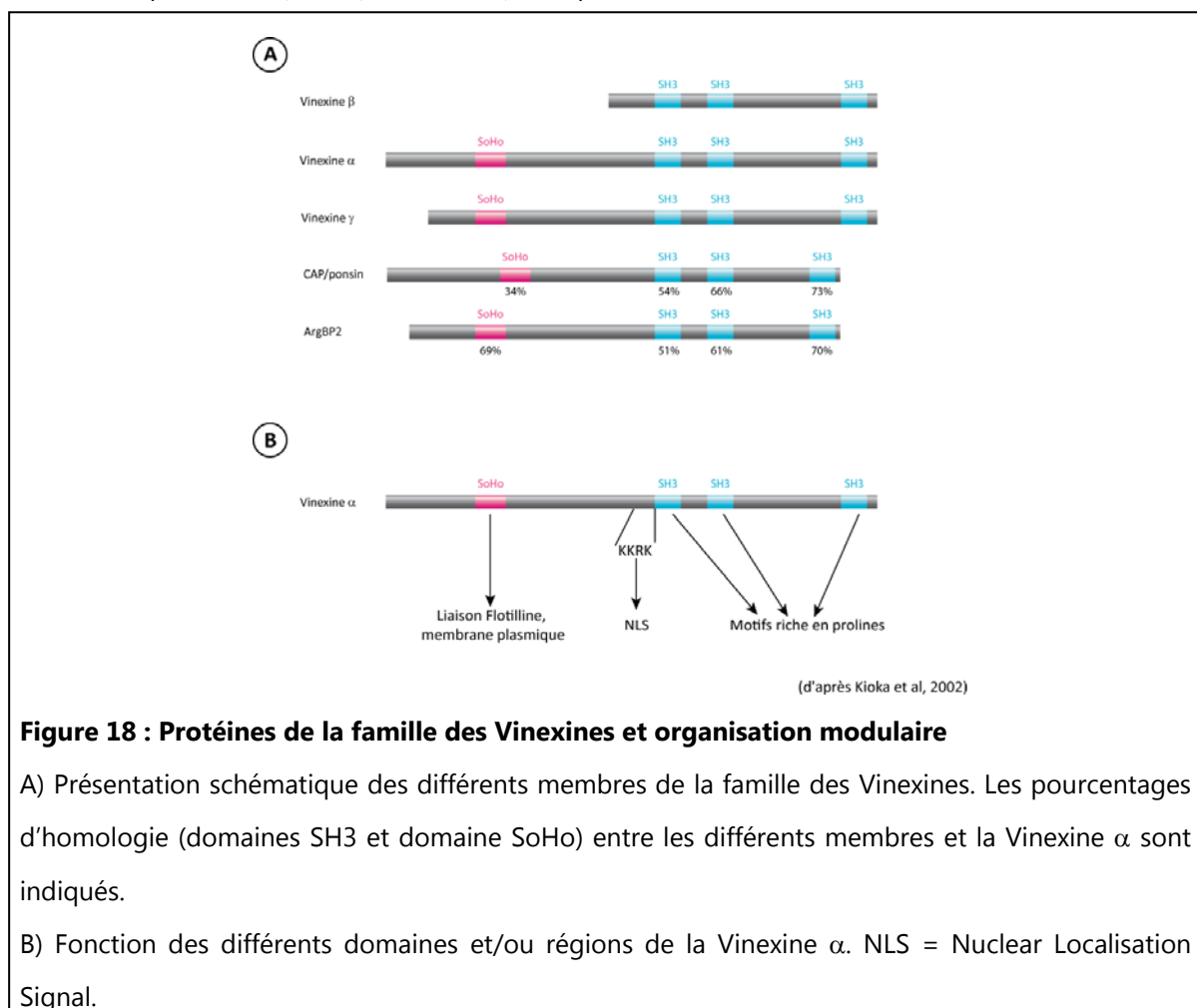
le site de phosphorylation est présent à proximité de ponts salins très conservés au sein de la classe des récepteurs non stéroïdiens qui non seulement maintiennent la structure du LBD mais aussi permettent d'établir un lien énergétique entre les différentes surfaces du LBD (surface d'hétérodimérisation/surface d'ancrage des coactivateurs/LBP) (Brelivet et al., 2004) (Figure 17A). Ainsi, ils pourraient « propager » des effets conformationnels et modifier l'activité du récepteur en réponse à des interactions, des phosphorylations ou suite à la fixation du ligand. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que la fixation du ligand entraîne non seulement le repositionnement de l'hélice H12 mais aussi des changements conformationnels subtils au niveau de la région charnière DBD/LBD et de la boucle  $\Omega$  (entre H1 et H3) (Driscoll et al., 1996).

## II. Phosphorylation du NTD et interaction dynamique avec la Vinexine $\beta$ (Publications 3 et 4 et Revue 1)

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la fonction et le mécanisme d'action du LBD des RAR sont bien connus et de nombreux partenaires ont été identifiés. Au contraire, le NTD, de part sa « structure désordonnée » et sa grande variabilité, reste encore peu exploré. Aussi, nous avons voulu rechercher des partenaires de ce domaine et étudier l'impact des phosphorylations sur ces interactions. Un crible double-hybride a été réalisé par G. Bour dans notre équipe, en utilisant comme appât le NTD non phosphorylé de RAR $\gamma$  (où les deux sérines 77 et 79 ont été substituées par des alanines). Il a ainsi isolé une protéine particulière, la Vinexine  $\beta$  (Publication 3).

### A. Vinexine : découverte, isoformes et structure

La Vinexine a été initialement isolée par Kioka en 1999 en recherchant des partenaires potentiels de la Vinculine, une protéine présente au niveau des adhérences focales et des jonctions adhérentes (Kioka et al., 1999; Kioka et al., 2002).



**Figure 18 : Protéines de la famille des Vinexines et organisation modulaire**

A) Présentation schématique des différents membres de la famille des Vinexines. Les pourcentages d'homologie (domaines SH3 et domaine SoHo) entre les différents membres et la Vinexine  $\alpha$  sont indiqués.

B) Fonction des différents domaines et/ou régions de la Vinexine  $\alpha$ . NLS = Nuclear Localisation Signal.

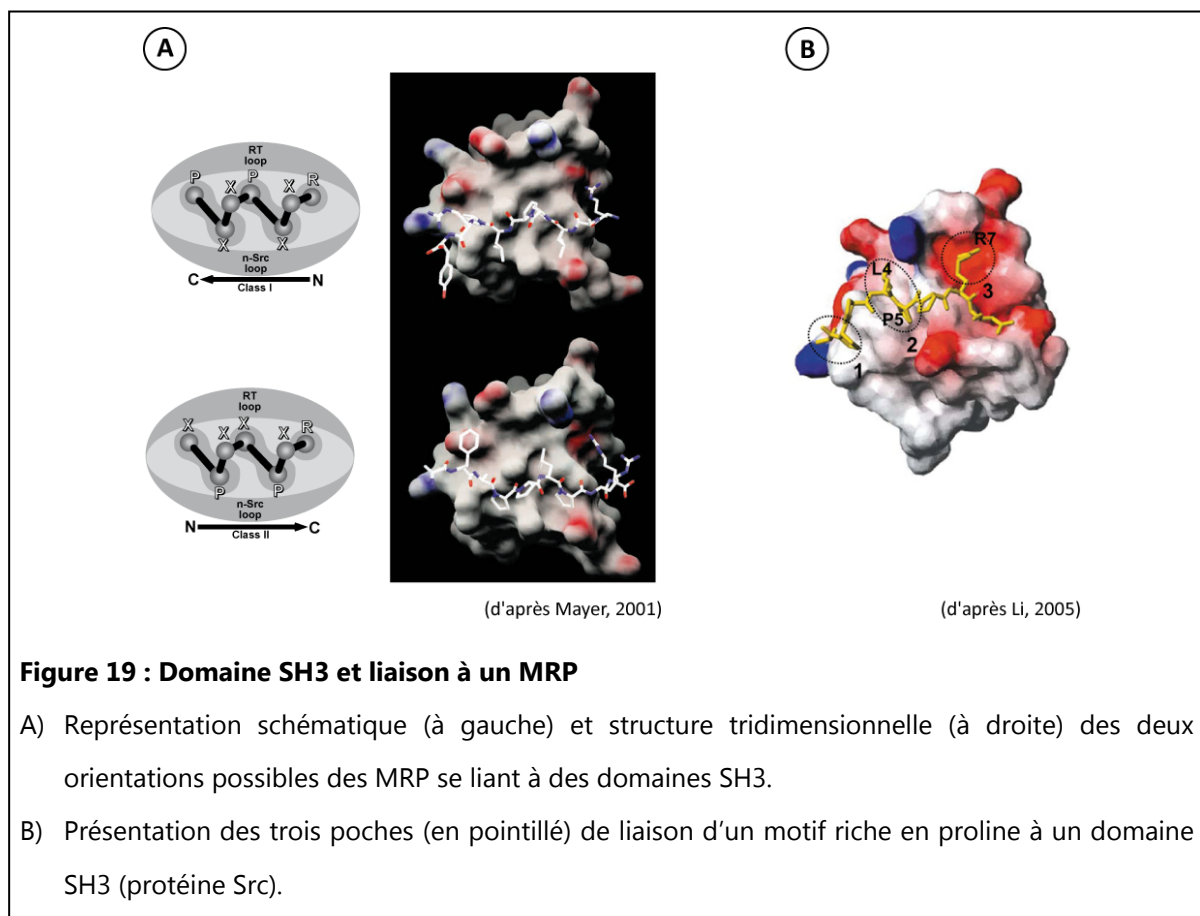
Initialement, deux isoformes ( $\alpha$  et  $\beta$ ) de la Vinexine ont été identifiées (Kioka et al., 1999) (Figure 18A). Une troisième a été identifiée par la suite dans les gonades, nommée Vinexine  $\gamma$  (Matsuyama et al., 2005). Les Vinexines  $\alpha$  et  $\gamma$  diffèrent par l'usage alternatif d'un premier exon. La Vinexine  $\beta$  est plus courte, mais conserve la même partie COOH-terminale que les deux autres isoformes (Figure 18A). Les isoformes sont différemment exprimées en fonction des tissus et des lignées cellulaires considérées. Ainsi, la Vinexine  $\beta$  est majoritairement présente dans les cellules NIH3T3, F9 et HeLa, mais également dans des organes comme le cœur, le cerveau, le placenta, le foie et le pancréas (Kioka et al., 1999). La Vinexine  $\alpha$  est au contraire majoritairement présente dans les muscles squelettiques, le colon, l'intestin grêle, les testicules et la rate (Kawauchi et al., 2001; Kioka et al., 1999).

D'un point de vue fonctionnel, différents domaines ont été identifiés dans les Vinexines : un domaine SoHo et trois domaines SH3 (Figure 18B). Le domaine SoHo, présent en position NH2-terminale, permet l'ancrage de la Vinexine à la membrane plasmique, *via* son interaction avec une protéine membranaire nommée Flotilline (Kimura et al., 2001). Ce domaine, présent dans les Vinexines  $\alpha$  et  $\gamma$ , est cependant absent de la Vinexine  $\beta$ . Les trois domaines SH3 sont présents et conservés dans les trois isoformes. Ils permettent l'interaction de la Vinexine avec des régions riches en proline de nombreux partenaires (cf. Paragraphe suivant). La Vinexine ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque. En fait, *via* le recrutement de différents partenaires, cette protéine jouerait un rôle de protéine adaptatrice ou « scaffold » et interviendrait dans l'établissement de complexes macromoléculaires. Ainsi, les Vinexines ont été définies comme appartenant à une famille de protéines adaptatrices caractérisées par la présence du domaine SoHo et de trois domaines SH3, famille nommée ArgBP2, CAP/Ponsin et Vinexine du nom des trois protéines initialement identifiées dans cette famille (Kioka et al., 2002).

Il est intéressant de noter que la majorité des études réalisées sur les Vinexines ont été réalisées dans le compartiment cytoplasmique ou au niveau de la membrane plasmique, notamment dans le contexte de leurs fonctions de remodelage du cytosquelette (Chen et al., 2005; Mitsushima et al., 2006a; Paternotte et al., 2005; Takahashi et al., 2005). Cependant, bien que les Vinexines soient majoritairement cytoplasmiques, elles présentent également un signal de localisation nucléaire (Kioka et al., 1999) (Figure 18B). Ainsi, plusieurs équipes, dont la nôtre, ont démontré que la Vinexine  $\beta$  (ne présentant pas de domaine SoHo) est localisée dans le noyau d'un certain nombre de types cellulaires (Kioka et al., 1999; Mizutani et al., 2007).

## B. Domaine SH3 de la Vinexine $\beta$ et motif riche en prolines (MRP) de RAR $\gamma$ .

Les domaines SH3 sont des domaines globulaires, de 50 à 70 aminoacides, présents dans de nombreuses protéines eucaryotes (Li, 2005; Mayer, 2001). Ils interagissent en général avec des motifs riches en proline (MRP) et le reconnaissent suivant deux orientations : un motif +xxPxxP (ligand classe I) ou un motif PxxPx+ (ligand classe II), où + signifie un acide aminé basique et x n'importe quel aminoacide (Mayer, 2001) (Figure 19A). La structure typique d'un domaine SH3 révèle trois poches (Li, 2005; Mayer, 2001). Deux sillons hydrophobes vont reconnaître un dipeptide x-P du MRP (où x est préférentiellement un acide aminé hydrophobe) (Figure 19B). La troisième poche reconnaît la chaîne latérale de l'acide aminé basique, qui est généralement une arginine (Figure 19B). Cette dernière apporte la spécificité de reconnaissance. L'affinité entre domaine SH3 et MRP est en général faible (de l'ordre de 1 à 100  $\mu$ M) et la sélectivité entre les deux partenaires est marginale (Li, 2005). Le ligand, une fois lié au domaine SH3, va adopter une conformation spécifique nommée hélice polyproline de type II (PPII), hélice gauche à trois résidus par tour (Li, 2005).





Dans le cadre de ma thèse, j'ai disséqué les domaines et résidus impliqués dans l'interaction entre la Vinexine  $\beta$  et RAR $\gamma$ . J'ai montré que la Vinexine  $\beta$  se lie spécifiquement à RAR $\gamma$  *via* son troisième domaine SH3 COOH-terminal (Publication 4). Les domaines SH3 interagissant généralement avec des MRP, j'ai également entrepris de déterminer les aminoacides de ce motif impliqués dans l'interaction. Une analyse de mutants du MRP présent dans le NTD de RAR $\gamma$  démontre que le domaine SH3 de la Vinexine  $\beta$  se lie à un ligand de classe II, dont le motif est du type PxxPxR. L'affinité entre les deux partenaires a été déterminée par deux techniques biophysiques : la résonance plasmonique de surface (Biacore) et par RMN, et évaluée à 40 – 80  $\mu$ M (Publication 4).

Il est intéressant de noter que le MRP, bien que conservé, présente des variations subtiles (substitution de proline en leucine) d'un sous-type des RAR à un autre. Ces différences pourraient notamment expliquer l'absence d'interaction de la Vinexine  $\beta$  avec RAR $\alpha$ .

D'autres protéines ont été identifiées en tant que partenaires de la Vinexine  $\beta$ . En dehors de la Vinculine initialement utilisée pour l'identification de la Vinexine  $\beta$ , les protéines pouvant interagir avec les domaines SH3 semblent jouer un rôle majeur au niveau du cytosquelette (Kioka et al., 1999; Kioka et al., 2002). Ces protéines, telles que WASP, WAVE, sont connues pour moduler la polymérisation/dépolymérisation du cytosquelette d'actine (Mitsushima et al., 2006a; Mitsushima et al., 2006b; Mitsushima et al., 2006c; Paternotte et al., 2005). La Vinexine servirait également de protéine d'ancrage dans la cascade d'activation de voies kinasiques telle que la voie des MAPK/Erk (Mitsushima et al., 2004; Mitsushima et al., 2007; Mizutani et al., 2007). Son rôle reste encore incertain mais elle pourrait établir un lien entre les différents partenaires de la cascade, et ainsi permettre l'activation des protéines en aval.

### C. Effet de la phosphorylation de RAR $\gamma$ sur l'interaction avec la Vinexine $\beta$

La première proline (proline 80) du MRP impliquée dans l'interaction avec la Vinexine  $\beta$  se trouve à proximité des deux sérines (sérines 77 et 79) phosphorylables de RAR $\gamma$ . Aussi, nous avons entrepris d'analyser si la phosphorylation de ces résidus a un impact sur l'interaction du MRP avec le domaine SH3 de la Vinexine  $\beta$ .

D'après quelques études réalisées avec la Vinexine  $\beta$  et d'autres protéines à domaine SH3, la phosphorylation d'un résidu adjacent au MRP jouerait un rôle négatif dans l'interaction entre les deux partenaires. Ainsi, la Vinexine  $\beta$  interagit avec le MRP de SOS-1, uniquement lorsque celui-ci

n'est pas phosphorylé et la phosphorylation d'une sérine proche du MRP de PAK inhibe son interaction avec le domaine SH3 de PIX (Akamatsu et al., 1999; Zhao et al., 2000).

Pour étudier l'influence de la phosphorylation des sérines 77 et 79 de RAR $\gamma$  sur l'interaction de la Vinexine  $\beta$ , j'ai substitué chacun de ces résidus en alanine, mimant un état non-phosphorylé, ou en acide glutamique, mimant un état phosphorylé (Publication 4). Dans des expériences classiques de GST-pulldown et co-immunoprécipitation, la substitution de la sérine 79 en alanine ou en acide glutamique augmente et abolit respectivement l'interaction avec la Vinexine  $\beta$ . La mutation des deux résidus (77 et 79) affecte l'interaction de la même manière que le simple mutant sur la sérine 79. Au contraire, la mutation de la sérine 77 ne semble pas avoir d'effet sur l'interaction. Ces expériences suggèrent que la phosphorylation de la sérine 79 empêche l'interaction avec la Vinexine  $\beta$ . Ces résultats ont été confirmés « *in cellulo* » par la technique de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (Publication 4).

En raison de la proximité de la sérine 79 avec le motif d'interaction, il est nécessaire de s'assurer que l'effet de la substitution de ce résidu en acide glutamique sur l'interaction n'est pas dû à un encombrement stérique et/ou à un effet allostérique distincts des effets dus à une phosphorylation. Aussi, nous avons utilisé la technique de Résonance Plasmonique de Surface en combinant des peptides de synthèse phosphorylés ou non sur l'une ou les deux sérines, et le troisième domaine SH3 de la Vinexine  $\beta$  (Publication 4). Les résultats confirment les données précédentes obtenues avec les mutants. Cependant, nous avons observé une légère diminution de l'affinité avec le peptide phosphorylé au niveau de la sérine 77 ; une explication pourrait être que cette phosphorylation n'existe pas seule *in cellulo* (cf. Discussion).

#### **D. *In vivo*, phosphorylation de RAR $\gamma$ et dissociation de la Vinexine $\beta$ en réponse à l'AR**

Suite aux résultats précédents, j'ai entrepris d'étudier l'association/dissociation de la Vinexine  $\beta$  en fonction de l'état de phosphorylation de RAR $\gamma$  dans des cellules COS-1 transfectées (Publication 4). En effet, après immunoblotting avec un anticorps reconnaissant spécifiquement RAR $\gamma$  phosphorylé au niveau de la sérine 79, j'ai montré que, à l'état basal, une faible fraction de RAR $\gamma$  est déjà phosphorylée. En outre, la quantité de RAR $\gamma$  phosphorylé au niveau de la sérine 79 augmente rapidement (entre 15 et 30 minutes) après l'addition d'AR. Des expériences de co-immunoprécipitation effectuées en parallèle démontrent que le complexe RAR $\gamma$ /Vinexine  $\beta$  se dissocie très rapidement, dès 5 minutes de traitement à l'AR, et qu'aucune interaction n'est

délectable à partir de 15 minutes et au-delà. Par contre, dans le cas du mutant RAR $\gamma$ S79A qui n'est pas phosphorylable, la Vinexine  $\beta$  interagit efficacement en absence d'AR. Cependant, contrairement à toute attente, on observe une dissociation incomplète en réponse à l'AR. D'où l'hypothèse que la phosphorylation de RAR $\gamma$  en réponse à l'AR serait « nécessaire » mais non « suffisante » pour la dissociation totale de la Vinexine  $\beta$ .

C'est pourquoi des expériences supplémentaires ont été réalisées avec un mutant de RAR $\gamma$ , où l'hélice H12 du LBD a été supprimée (Publication 4). Ce mutant interagit moins efficacement avec la Vinexine  $\beta$  en absence d'AR suggérant que le LBD est impliqué, en plus du NTD, dans l'interaction avec la Vinexine  $\beta$ . Dans ce contexte, il est intéressant de noter qu'en absence d'AR, l'hélice H12 de RAR $\gamma$  interagit avec H3 et présente une conformation « fermée » (cf. Introduction). Cette interaction n'est pas favorable à l'interaction avec les corépresseurs et coactivateurs « classiques » en absence d'AR mais pourrait participer au recrutement de la Vinexine  $\beta$  et/ou d'autres partenaires. En présence d'AR, la Vinexine  $\beta$  ne se dissocie pas du récepteur RAR $\gamma$  $\Delta$ H12. Ceci serait du au fait que ce mutant, pour des raisons qui restent encore à déterminer, n'est pas phosphorylé au niveau de la sérine 79 en réponse à l'AR.

En conclusion, nos résultats suggèrent que la Vinexine  $\beta$  formerait un complexe multiprotéique avec RAR $\gamma$ , en interagissant d'une part avec le NTD du récepteur *via* son troisième domaine SH3 et d'autre part avec le LBD *via* des intermédiaires protéiques qui restent encore à identifier. En effet, deux autres domaines SH3 sont présents au niveau de la Vinexine  $\beta$  et pourraient permettre le pontage *via* le recrutement d'autres partenaires.

### **III. Dynamique de recrutement de RAR $\gamma$ au promoteur : phosphorylé et sans Vinexine $\beta$ (Publications 3 et 4)**

La phosphorylation du NTD de RAR $\gamma$  joue un rôle crucial pour la transcription des gènes cibles de l'AR. Aussi, nous avons étudié l'influence de cette MPT sur le recrutement de RAR $\gamma$  au niveau des promoteurs de gènes cibles de l'AR, notamment RAR $\beta$ 2, ainsi que l'effet de l'interaction de la Vinexine  $\beta$  avec RAR $\gamma$  sur la transcription des gènes cibles.

## A. Recrutement de RAR $\gamma$ et importance de la phosphorylation

Dans un premier temps, le recrutement de RAR $\gamma$  à l'ADN a été analysé à l'aide d'expériences de CHIP (Chromatin ImmunoPrecipitation) réalisées sur le promoteur du gène *RAR $\beta$ 2* en condition endogène avec des cellules F9 (Publication 4). Nous avons montré que, en absence d'AR, RAR $\gamma$  est déjà présent au niveau de l'élément de réponse du gène *RAR $\beta$ 2*, ce qui avait déjà été observé au niveau des RARE d'autres gènes (*CYP26A1* et *HoxA1*). Suite à l'addition d'AR, nous avons observé une augmentation rapide et transitoire du nombre de promoteurs de *RAR $\beta$ 2* occupés. Ces expériences sont en accord avec le modèle classique qui suggère la présence préalable d'hétérodimères RAR/RXR au niveau des promoteurs en absence d'AR (Dilworth and Chambon, 2001). Cependant, il semblerait que la fraction de promoteurs occupés augmente en présence d'AR.

L'anticorps dirigé contre la phosphosérine 79 de RAR $\gamma$  étant utilisable en immunoprécipitation, nous avons voulu étudier le recrutement de la fraction phosphorylée de RAR $\gamma$  au promoteur, ainsi que celui du complexe cdk7/TFIIH nécessaire à la phosphorylation du récepteur et à l'initiation de la transcription (Publication 4). Dans les cellules F9, RAR $\gamma$  présent au niveau du promoteur en absence d'AR est déjà phosphorylé au niveau de la sérine 79. Après addition d'AR, RAR $\gamma$  recruté est aussi phosphorylé. La kinase cdk7 et la cycline H sont recrutées de façon concomitante et présentent la même cinétique de recrutement que RAR $\gamma$ . Ces expériences démontrent que le promoteur de *RAR $\beta$ 2* est majoritairement occupé par RAR $\gamma$  phosphorylé au niveau de la sérine 79 et que le nombre de promoteurs occupés augmente après l'addition d'AR.

Ces données corroborent les résultats obtenus avec l'autre sous-type RAR $\alpha$  (Bruck et al., 2009). En effet, en réponse à l'AR, RAR $\alpha$  est aussi recruté au niveau des promoteurs des gènes cibles de l'AR sous forme phosphorylée et associé(e) au complexe TFIIH (Bruck et al., 2009). En conclusion, l'ensemble de ces résultats confirme l'importance de la phosphorylation de la sérine du NTD par la kinase cdk7 pour le recrutement des RAR au promoteur.

Cependant, le mécanisme sous-jacent n'est pas encore établi. Parmi les hypothèses, on peut suggérer un effet de la phosphorylation sur la conformation du NTD et/ou du DBD adjacent, ou sur l'association/dissociation de protéines modulant l'affinité des RAR pour le RARE (cf. Discussion).

## B. RAR $\gamma$ et Vinexine $\beta$ , une interaction rare au promoteur ?

A ce stade, la question était de savoir si la Vinexine  $\beta$  avait un effet sur l'activité transcriptionnelle de RAR $\gamma$ .

Dans cette optique, nous avons analysé les conséquences de la surexpression ou du « knock-down » par ARN interférence de la Vinexine  $\beta$  sur la transcription des gènes cibles de l'AR dans les cellules F9 (Publications 3 et 4). Dans des clones stables surexprimant la Vinexine  $\beta$ , nous observons une répression des gènes cibles en absence d'AR. A l'inverse, l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre l'ARN codant pour la Vinexine  $\beta$  augmente l'expression du gène cible *RAR $\beta$ 2* en absence d'AR. Ainsi, la Vinexine  $\beta$  associée à RAR $\gamma$  réprime la transcription de ce gène cible.

Suite à ces observations, nous avons entrepris de déterminer si l'interaction de la Vinexine  $\beta$  avec RAR $\gamma$  avait lieu au niveau du promoteur des gènes cibles de l'AR. C'est pourquoi nous avons étudié par CHIP le recrutement de la Vinexine  $\beta$  au promoteur de *RAR $\beta$ 2* avec les cellules F9 (Publication 4). Nous avons observé que la Vinexine  $\beta$  n'occupe pas le promoteur de *RAR $\beta$ 2* ni en absence ni en présence d'AR. Des résultats similaires ont également été obtenus dans le cas d'autres promoteurs de gènes cibles de l'AR (Résultats non présentés). De tels résultats suggèrent que le complexe RAR $\gamma$ /Vinexine  $\beta$  ne serait pas présent au niveau des promoteurs. Ceci est en accord avec le fait que les promoteurs sont occupés par la forme phosphorylée de RAR $\gamma$  qui n'interagit pas avec la Vinexine  $\beta$ .

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons transfecté des cellules COS avec une quantité croissante de Vinexine  $\beta$  sauvage ou « délétée » de son troisième domaine SH3 (Vinexine  $\beta$   $\Delta$ SH3-3) (Publication 4). En absence et en présence d'AR, même surexprimée, la Vinexine  $\beta$  (sauvage et  $\Delta$ SH3-3) n'est pas recrutée au niveau du promoteur de *RAR $\beta$ 2*. En outre, le recrutement de RAR $\gamma$  est diminué suite à la surexpression de la Vinexine  $\beta$  et non de la Vinexine  $\beta$   $\Delta$ SH3-3. Ces expériences suggèrent que la Vinexine  $\beta$  serait associé à RAR $\gamma$  non phosphorylé en dehors de la chromatine.

Ces résultats indiquent que la Vinexine  $\beta$  séquestre un « pool » de RAR $\gamma$  en dehors de la chromatine, réprimant ainsi le recrutement du récepteur au niveau des RARE. La dissociation de la Vinexine  $\beta$  observée en réponse à l'AR, suite à la phosphorylation de RAR $\gamma$ , serait le signal permettant le recrutement de RAR $\gamma$  au promoteur.

## IV. Recherche de nouveaux RARE (Résultats non publiés)

### A. Prologue

L'AR, *via* les RAR, joue un rôle très important durant le développement de l'animal, dès les premiers stades de l'embryon (Dolle, 2009 ; Mark et al., 2009). Les RAR sont également apparus très tôt dans l'évolution (Campo-Paysaa et al., 2008). Enfin, malgré la redondance qui peut exister entre les différents sous-types (notamment RAR $\alpha$  et RAR $\gamma$ ), l'invalidation de ces deux gènes entraîne une létalité embryonnaire précoce démontrant son rôle clé dans l'embryogenèse (Mark et al., 2009). De plus, en raison de ses propriétés antiproliférative et proapoptotique, l'AR est également utilisé dans le traitement de certains types de cancer.

C'est pourquoi l'étude des gènes cibles de l'AR a fait l'objet d'une attention toute particulière. Ainsi, récemment, une étude bibliographique a référencé pas moins de 500 gènes régulés par l'AR (Balmer and Blomhoff, 2002). Ces nombreux gènes ont notamment été découverts par des techniques d'hybridation soustractive et de microarray. Cependant, la difficulté de ce type d'étude réside dans l'évaluation des gènes régulés directement par l'AR (gènes primaires) et dépendants d'un RARE, par rapport aux gènes induits par l'AR suite à une cascade d'activation (gènes secondaires).

Une autre stratégie de recherche des gènes cibles de l'AR est basée sur l'étude des RARE associés à ces gènes. Alors que de nombreux gènes sont régulés par l'AR, très peu de RARE ont été identifiés et bien caractérisés. Parmi les plus étudiés, on trouve les RARE présents dans les promoteurs de gènes régulant le métabolisme ou l'activité de l'AR comme *CYP26A1* (deux RARE, un proximal et un distal), de *RAR $\beta$ 2*, et également de *RAR $\alpha$ 2* et de *RAR $\gamma$ 2* (mais moins bien caractérisés). Enfin, deux autres RARE sont bien connus et positionnés derrière les gènes *HoxA1* et *HoxB1* (Figure 20A).

Dans notre équipe, lors de l'analyse du recrutement de RAR $\gamma$  et de la Vinexine  $\beta$  au niveau des promoteurs de gènes cibles de l'AR, nous avons été confrontés à un certain nombre de problèmes (Publication 4). En effet, peu de RARE sont bien caractérisés et les gènes associés sont parfois non induits (c'est souvent le cas de *RAR $\beta$ 2* en raison de la méthylation du promoteur dans certaines lignées cancéreuses) ou faiblement induits dans certaines lignées cellulaires (par exemple, *CYP26A1* dans la lignée NIH3T3 pour des raisons qui restent encore à déterminer).

Donc, le « pool » de RARE utilisable est très restreint. Aussi, nous avons recherché une méthode rapide et intégrée à l'échelle du génome pour rechercher de nouveaux RARE fonctionnels.

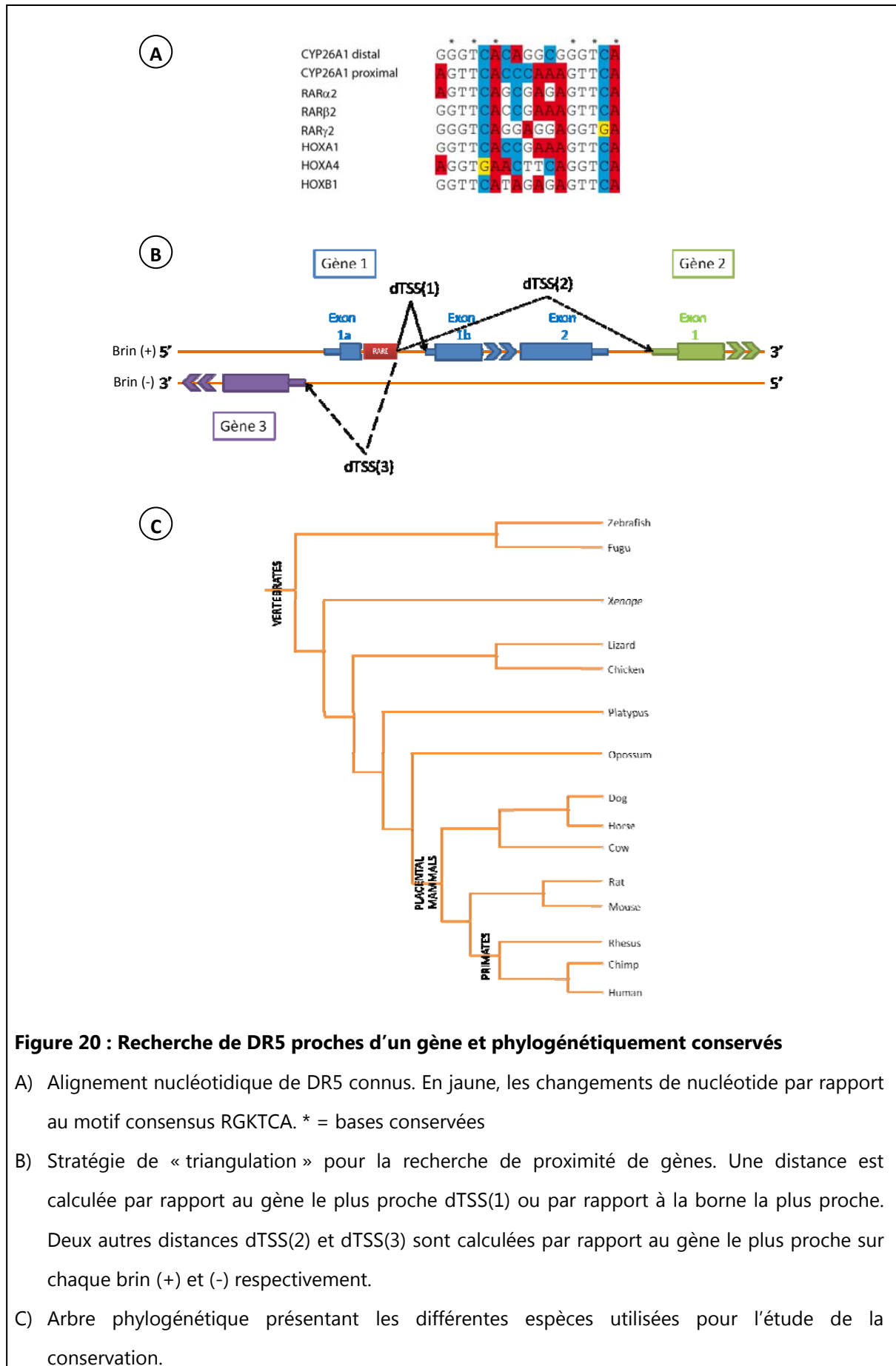
## **B. Choix de la stratégie : bioinformatique, phylogénétique, DR5, RGK TSA**

Pour rechercher des éléments de réponse potentiels, les stratégies « high-throughput » sont actuellement en plein essor. Parmi ces méthodes, les techniques de CHIP-CHIP et de CHIP-sequencing sont les plus utilisées (Hoffman and Jones, 2009; Welboren et al., 2007). Cependant, ces techniques nécessitent une bonne connaissance non seulement de leurs atouts mais aussi de leurs limites. En effet, elles nécessitent une bonne qualité de matériel initial (anticorps utilisables en immunoprécipitation, quantité suffisante d'ADN). De plus, pour révéler la fonctionnalité d'un RARE, il est nécessaire de coupler ces techniques à des microarray pour étudier la transcription des gènes cibles associés. Ainsi, cette stratégie couplée CHIP-sequencing/microarray nécessite beaucoup de matériel et représente un investissement coûteux. Une fois réalisée, elle permet d'obtenir des résultats probants mais généralement restreints à l'étude d'une lignée cellulaire.

Une autre stratégie est l'étude bioinformatique des RARE. De nombreuses données suggèrent que la régulation des gènes cibles de l'AR est très contrôlée et qu'au cours de l'évolution, les RARE fonctionnels ont subi une forte pression de sélection. Récemment, la conservation de quelques RARE, obtenus à partir des données bibliographiques, a été étudiée sur la base d'un alignement de trois génomes, humain, souris et rat (Balmer and Blomhoff, 2005). Malgré le peu d'organismes utilisés, les DR étudiés présentent une bonne conservation entre les trois génomes. D'où l'hypothèse que les RARE seraient conservés phylogénétiquement au niveau de leur séquence nucléotidique et/ou de leur motif et/ou de leur localisation à proximité des gènes cibles de l'AR.

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, il existe différents éléments de réponse pour les RAR : DR5, DR2 et DR1. Les DR1 peuvent fixer non seulement des hétérodimères RAR/RXR, mais aussi des homodimères RXR/RXR et peu de gènes ont été retrouvés sous le contrôle d'un DR2. C'est pourquoi nous avons préféré ne pas étudier ces types de RARE et nous nous sommes focalisés sur les DR5, dont la fonctionnalité semble plus marquée.

Enfin, nous avons basé notre étude sur la recherche d'un motif dont la séquence consensus est (A/G)G(G/T)T(C/G)A ou RGK TSA selon la nomenclature IUPAC. Ce motif diffère en position 5 par rapport au RARE consensus (motif RGK TCA) initialement établi sur la base des études structurales et des analyses des RARE connus. Cependant, une analyse des RARE présents dans les promoteurs de





certaines gènes cibles, comme *RAR $\gamma$ 2* et *HoxA4*, suggère que la position 5 peut être occupée aussi bien par une cytosine que par une guanine (Figure 20A). Cette observation a également été faite dans le cas du récepteur VDR et la fonctionnalité du motif RGKTA a été vérifiée (Wang et al., 2005).

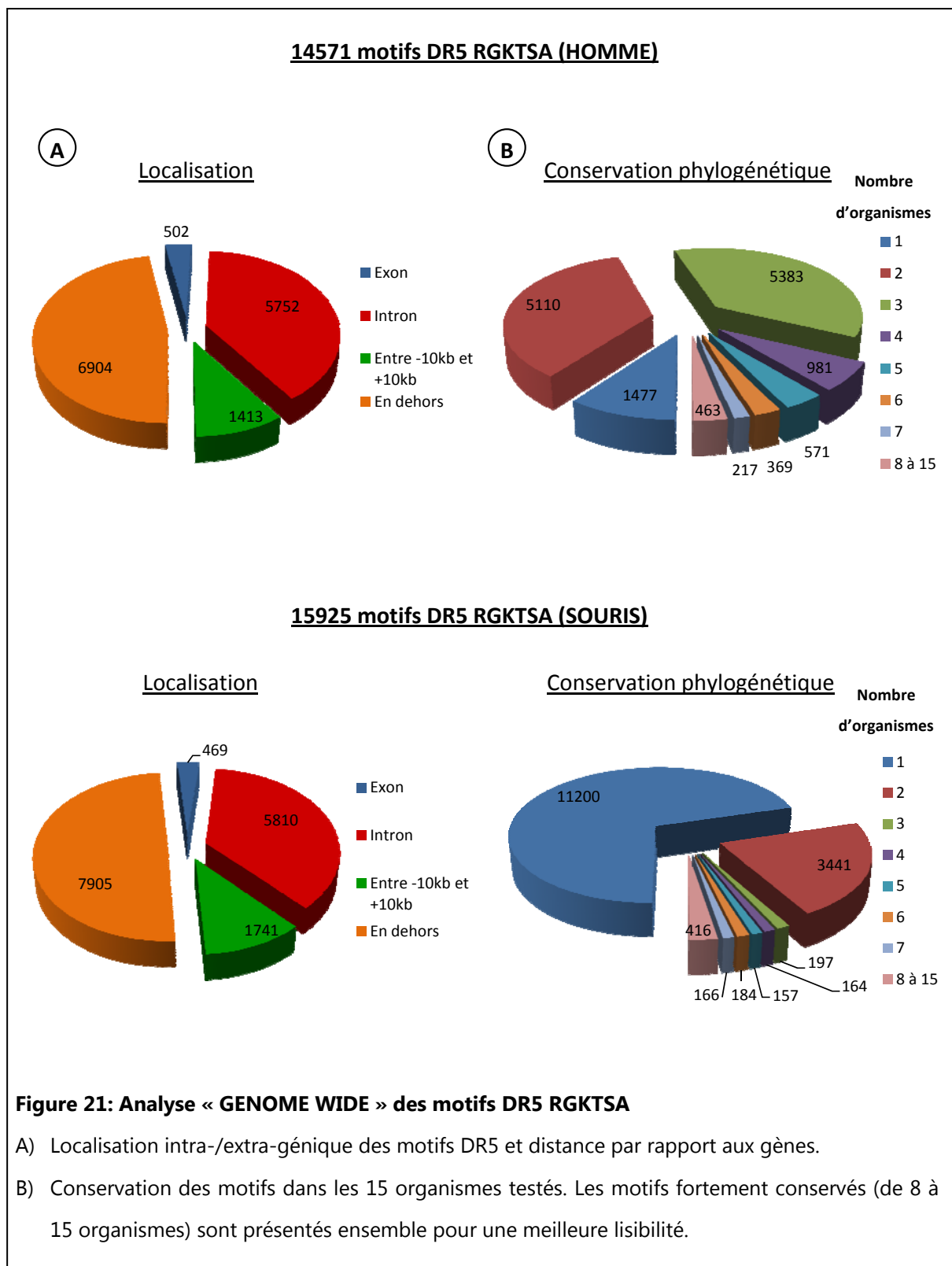
### C. Analyse « genome wide » des motifs DR5 RGKTA chez l'homme et la souris : localisation et conservation

Pour renforcer notre stratégie de recherche de nouveaux RARE, nous avons entrepris de rechercher et d'analyser les RARE dans deux génomes phylogénétiquement éloignés : le génome humain (hg18) et le génome murin (mm9). Ce choix est lié à la qualité du séquençage et de l'annotation des gènes dans les deux génomes.

#### 1. Programmes utilisés et données disponibles

Une collaboration étroite a été mise en place avec l'équipe de Bioinformatique de l'IGBMC. Ainsi, nous avons utilisé différents programmes développés spécialement pour la recherche, la localisation et l'analyse phylogénétique des motifs DR5 RGKTA à l'échelle du génome. Des bases de données ont été créées et sont interrogeables en ligne de commande. Ainsi, on peut : 1) rechercher un pattern RGKTA allant de DR0 à DR6 (programme UNREAL), 2) localiser des sites dans le génome (programme GPS), et 3) étudier la conservation phylogénétique des motifs grâce aux alignements réalisés entre les différents génomes avec le logiciel BlastZ et disponibles à UCSC.

Pour chaque motif, nous avons utilisé un programme développé à l'institut, nommé GPS, qui permet de localiser un motif par rapport à son contexte génique (Figure 20B). Un motif est localisé soit dans un gène (intron ou exon, numéro de l'intron ou exon, région UTR ou région codante) soit dans un espace intergénique. A cette localisation est associée une notion de distance notée dTSS(1). Pour un motif intragénique, la distance est calculée entre la fin du motif et la borne exon/intron la plus proche en aval. Pour un motif intergénique, la distance est calculée soit du TSS du gène le plus proche à la fin du motif si celui-ci est en amont (distance négative) soit de la fin du gène au début du motif si celui-ci est en aval (distance positive). Enfin, pour avoir une idée plus précise du contexte génomique du RARE, le motif va également être localisé par rapport au gène le plus proche sur le brin (+) et le gène le plus proche sur le brin (-), ainsi que leurs distances associées dTSS(2) et dTSS(3) respectivement (Figure 20B). Cette « triangulation » permet de connaître le contexte génique des RARE, notamment lorsqu'ils sont présents dans des promoteurs bidirectionnels, dans des promoteurs d'épissage alternatif ou dans des introns/exons à proximité d'autres gènes (Figure 20B).



En ce qui concerne la conservation phylogénétique, des alignements de séquence ont été réalisés entre le génome humain, le génome murin et 13 autres génomes. Le choix des 13 génomes est basé d'une part sur la qualité du séquençage du génome et d'autre part sur leur répartition à travers le règne animal (de poisson zèbre à chimpanzé) (Figure 20C). Dans le cadre de notre étude, ces alignements ont été affinés à l'échelle du nucléotide afin d'éviter toute erreur future dans l'étude de la conservation. L'étude de la conservation d'un motif DR5 (17 paires de bases) est rendue difficile par le fait que ces motifs sont courts. La conservation a donc fait l'objet d'une attention toute particulière et de nombreux tests préliminaires ont été réalisés pour déterminer la meilleure méthode d'étude de la conservation. Une analyse à l'échelle du nucléotide (alignement base par base) démontre une grande variabilité et une faible conservation entre les différentes espèces.

A l'inverse, l'étude de la conservation à l'échelle du motif RGKTSANNNNRGKTA (recherche globale d'une séquence consensus) permet d'obtenir des résultats tout à fait satisfaisants.

## 2. Recherche et analyse « genome wide » des motifs DR5 RGKTA

La recherche du motif DR5 RGKTA dans les génomes humain et murin a permis d'obtenir 14571 sites dans le génome humain et 15925 sites dans le génome murin.

L'analyse de la localisation des motifs dans l'ensemble du génome démontre que ces sites présentent une répartition similaire dans les deux génomes (Figure 21A). Les sites sont majoritairement présents dans des introns ainsi que dans des régions distantes de plus de 10kb d'un gène. Des études « genome wide » par ChIP-ChIP, par ChIP-sequencing ou *in silico* réalisées avec d'autres facteurs de transcription, notamment d'autres récepteurs nucléaires (VDR, PPAR, ER), ont également confirmé une répartition des sites dans l'ensemble du génome avec des enrichissements similaires dans les régions introniques et distantes (Hamza et al., 2009; Hua et al., 2009; Lin et al., 2007; Nielsen et al., 2008; Wang et al., 2005).

Ces sites ont également été étudiés en fonction de leur conservation au sein des organismes étudiés (Figure 21B). Cependant, dans ce cas, nous avons observé une grande différence entre homme et souris. Dans le cas des 14571 sites mis en évidence dans le génome humain, environ 1500 sites sont présents uniquement chez l'homme, plus de 5000 dans 2 organismes et 5000 autres dans 3 organismes. Il faut souligner que les génomes de chimpanzé et de rhesus sont très proches du génome humain d'un point de vue phylogénétique. Ceci serait à l'origine du biais de conservation observé.

TABLEAU 1 : 47 RARE DR5 RGTKSA sélectionnés chez l’HOMME

Table with 16 columns: Séquence du RARE murin, Description du RARE, Séquence du RARE humain, Conservation, Brin, Brin, Exon / Intron, Numéro exon / intron, CDS / UTR, Nom du gène, Description du gène, dTSS (1), Gène le plus proche sur le brin (+), dTSS (2), Gène le plus proche sur brin (-), dTSS (3). Rows include genes like ACO2, AMOT, BHLHE40, C14orf4, CITED2, CYP26A1, EBF3, ER13, FOXA2, HIC1, HOXA1, HOXA4, HOXB1, HOXC4, IVNS1ABP, MEIS2, MSL1, OSR1, RARB, RXRB, SSPN, TTC27, WT1, miRNA 10a, miRNA 10b, PCBP4, RARA, ZNF503, SEMA3E, CDC42BPA, ELF5, DBX1, FBXW11, LOC441108, C1orf173, LOC402644, POLR1E, piRNAcus66, LOC550631, NHSL2, SGK2, SLC25A23, SP7.

TABLEAU 2 : 44 RARE DR5 RGTKSA sélectionnés chez la SOURIS

Table with 16 columns: Séquence du RARE murin, Description du RARE, Séquence du RARE humain, Conservation, Brin, Brin, Exon / Intron, Numéro exon / intron, CDS / UTR, Nom du gène, Description du gène, dTSS (1), Gène le plus proche sur le brin (+), dTSS (2), Gène le plus proche sur brin (-), dTSS (3). Rows include genes like ACO2, AMOT, BHLHE40, C14orf4, CITED2, CYP26A1, CYP26A1, EBF3, ER13, FOXA2, HIC1, HOXA1, HOXA3, HOXB1, HOXC4, IVNS1ABP, MEIS2, MSL1, OSR1, RARB, RXRB, SSPN, TTC27, WT1, miRNA 10a, miRNA 10b, miRNA 10b, PCBP4, HMBOX1, HOXB3, PRSS27, QKI, GZMK, ISX, PARD3B, PARP8, CCDC157, FRAP1, NHSL2, SGK2, SLC25A23, SP7, SRP68.

En revanche, dans le cas des 15925 sites du génome murin, la majorité (11200) est présente uniquement chez la souris, et environ 3400 sont présents dans 2 organismes. Comme plus haut, cette conservation entre 2 organismes est liée à la proximité phylogénétique entre la souris et le rat.

## D. Analyse de RARE conservés et proches du TSS : comparaison homme/souris

### 1. Critères de sélection des sites conservés et proches du TSS

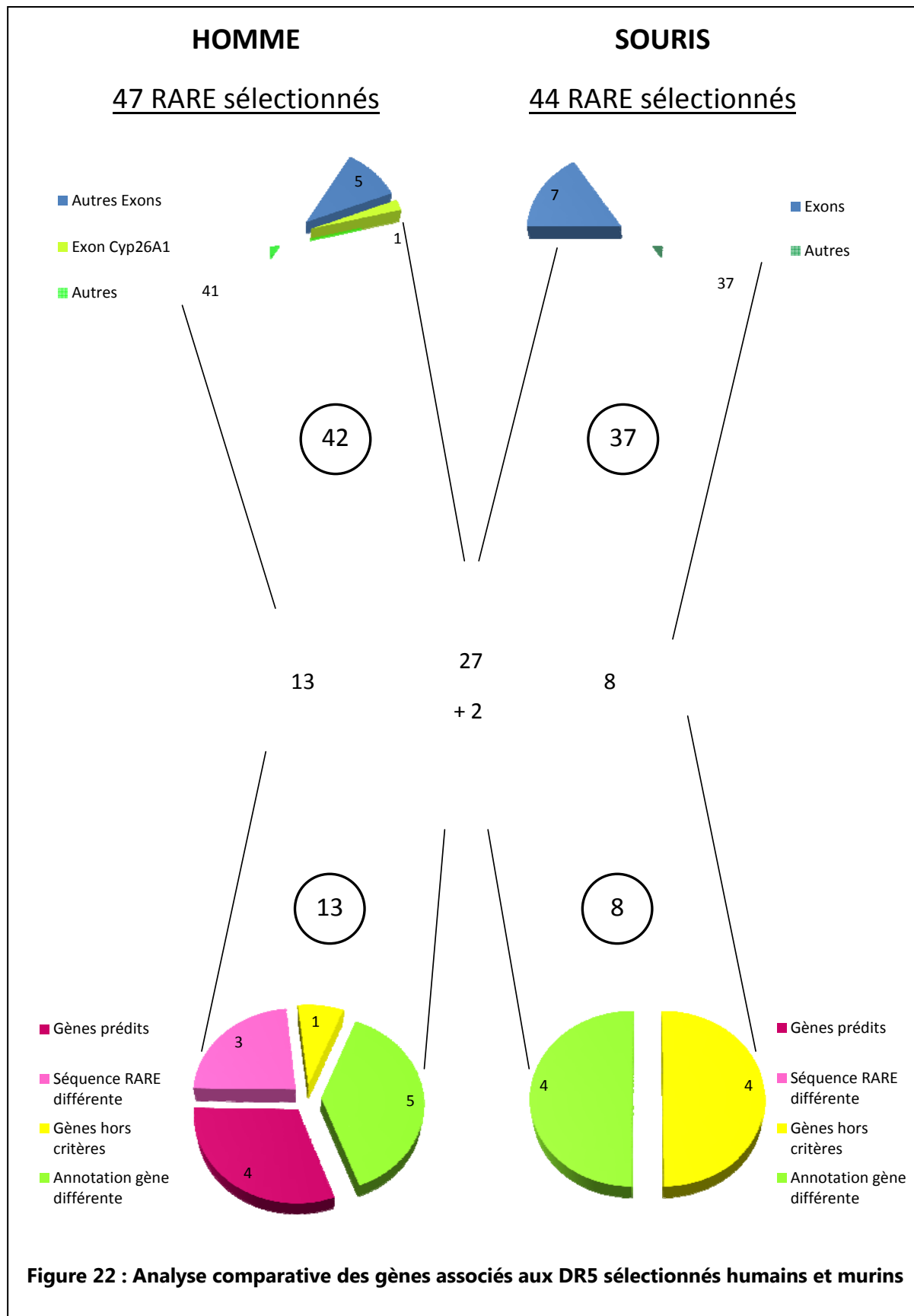
Une analyse des sites les plus conservés (entre 8 et 15 organismes) permet de retrouver les sites déjà connus et largement étudiés, tels que *RAR $\beta$ 2*, *HoxA1*, *HoxB1*, *CYP26A1* ainsi que de nombreux sites décrits dans la littérature mais moins étudiés (Tableaux 1 et 2). Ceci suggère que le critère de conservation peut être utilisé pour retrouver des RARE fonctionnels. Ainsi, environ 500 sites des génomes humain et murin ont été sélectionnés par la suite.

Cependant, l'analyse expérimentale de 500 RARE potentiels étant difficile à réaliser, nous avons ajouté un critère de distance afin de restreindre le « pool » de sites. En effet, la majorité des RARE connus se trouvent à proximité des gènes étudiés, entre -30 pb (*RAR $\beta$ 2*) et 7000 pb (*HoxB1*). Ainsi, nous avons appliqué un critère de distance de -10kb / +10kb autour du gène. Cependant, certains RARE pouvant être assignés à différents gènes (cf. IV.C.), nous avons appliqué le critère de distance de -10kb/+10kb sur les trois données de distance obtenues par « triangulation » de la localisation. Cette méthode permet ainsi de trouver des sites présents dans des séquences géniques à proximité d'un variant d'épissage et/ou d'un autre gène.

### 2. Analyse comparative des RARE humains et murins

Après application des critères de conservation et de distance, nous avons obtenu 47 RARE dans le génome humain et 44 RARE dans le génome murin (Figure 22A et Tableaux 1 et 2).

Parmi ces RARE, nous avons exclu les sites localisés dans les exons. En effet, de tels sites sont a priori conservés au niveau de leur séquence étant donné le rôle fonctionnel des exons mais ne présentent vraisemblablement pas de fonctionnalité associée à l'AR. Cependant, un seul site présent dans un exon a été gardé chez l'homme ; ce site, le RARE proximal de *CYP26A1*, est localisé à la fois dans le premier exon d'une isoforme de *CYP26A1* et dans le promoteur d'une autre isoforme de *CYP26A1* chez l'homme alors qu'il est localisé uniquement dans le promoteur de *CYP26A1* chez la souris. Ainsi, le recoupement entre les deux génomes permet de supposer que la localisation du RARE humain est faussée par une mauvaise annotation du génome.



Une analyse comparative des gènes associés à ces RARE permet de démontrer que 29 sites et gènes associés sont communs aux génomes humain et murin (Figure 22B et Tableaux 1 et 2). Parmi ces 29 sites, 27 sites possèdent une annotation génique identique et 2 sont associés à des gènes différents (nom du « gène » différent : let7a3 ou isoforme non assignée : PCBP4). Ces 29 sites sont considérés comme des RARE potentiels et seront analysés par la suite.

Pour finir, nous avons réalisé une analyse plus approfondie des sites restants (13 dans le génome humain et 8 dans le génome murin) (Figure 22C).

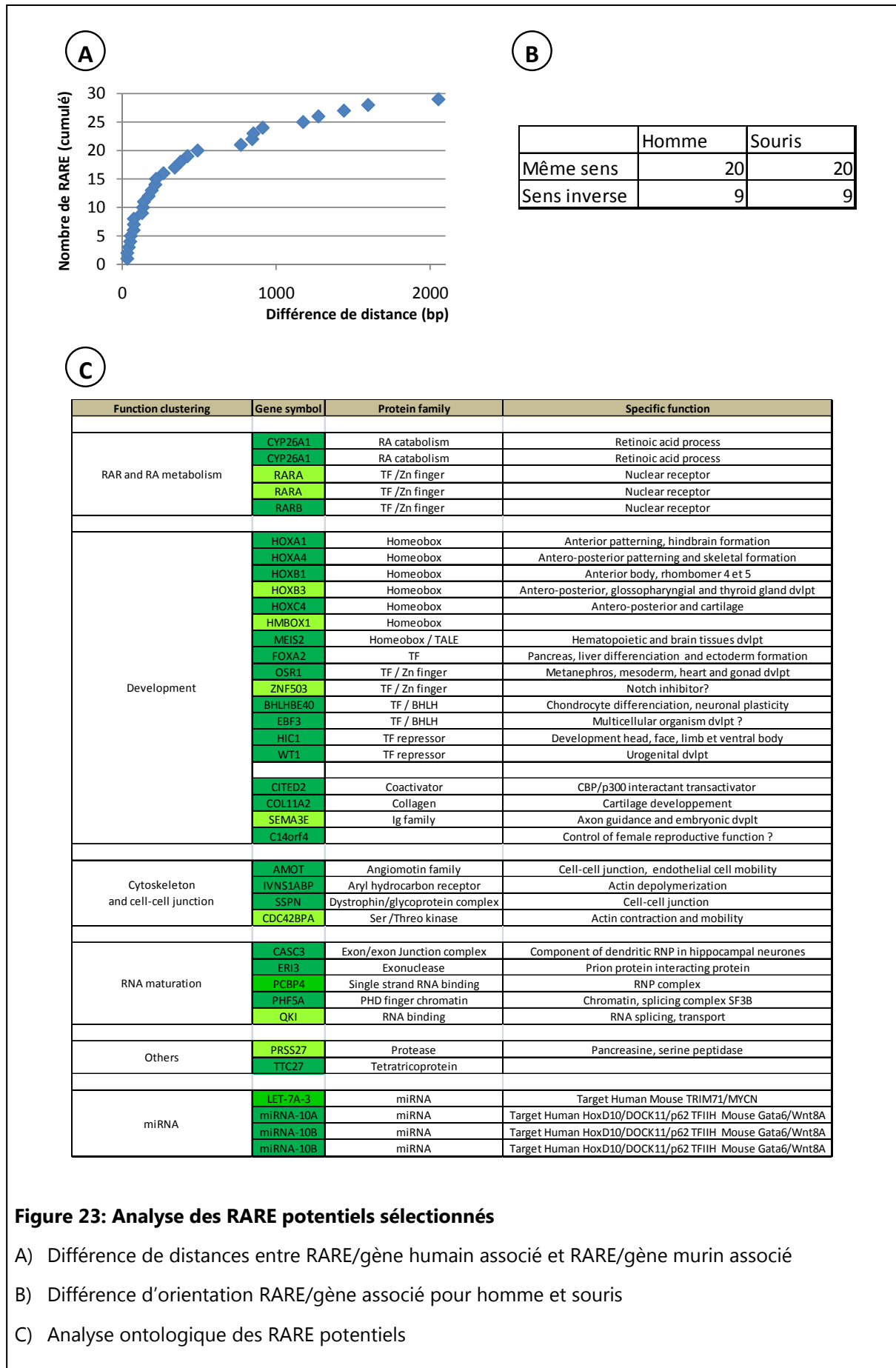
Parmi les 13 sites humains restants, 4 (en fuchsia) sont liés à des gènes prédits, non validés et non vérifiés, donc présents uniquement chez l'homme. 3 autres sites (en rose) sont conservés dans de nombreux organismes mais la séquence du site diffère d'au moins une base dans le génome murin, suggérant que ces gènes pourraient être spécifiques de certains vertébrés.

1 site humain est bien conservé avec la souris mais ce site ne répond pas au critère de distance (supérieur à +10kb ou inférieur à -10kb) ou au critère de conservation (inférieur à 8 organismes). Il en est de même pour 4 sites murins (en jaune).

Enfin, une grande partie des autres sites (5 humains et 4 souris) sont présents dans les deux organismes mais annotés différemment (en vert clair). Ainsi, certains sites sont annotés dans le promoteur d'un gène d'un organisme mais sont localisés dans le premier ou dernier exon du même gène de l'autre organisme. D'autres sites sont présents dans des introns et permettent la régulation de l'expression de certains variants d'épissage mais ces variants sont annotés dans un seul des deux organismes (comme c'est le cas pour *RAR $\alpha$* ). Ces 9 derniers sites doivent donc être pris en considération pour l'analyse de l'expression des gènes dépendants de l'AR et seront donc intégrés dans la liste finale des RARE potentiels. Une telle étude démontre la difficulté d'analyser un site par rapport à sa position génique.

Au final, 29 sites forment un « pool » de RARE potentiels, communs aux deux organismes. A cette liste, il faut ajouter les 9 autres sites, pour lesquels des problèmes d'annotation laissent planer un doute sur leur localisation. Soit un total de 38 sites potentiels à tester pour la suite (Tableaux 1 et 2, en vert).

Conservation de distance, d'orientation et ontologie des gènes associés



**Figure 23: Analyse des RARE potentiels sélectionnés**

- A) Différence de distances entre RARE/gène humain associé et RARE/gène murin associé
- B) Différence d'orientation RARE/gène associé pour homme et souris
- C) Analyse ontologique des RARE potentiels



## E. Analyse des RARE potentiels sélectionnés : conservation de distance, d'orientation et ontologie des gènes associés

### 1. Conservation de distance et d'orientation

Sur les 29 sites bien annotés, nous avons voulu savoir s'il existait des différences de localisation et/ou d'orientation entre les génomes humain et murin (Figure 23).

Pour chaque site, nous avons étudié la distance RARE/gène associé et la différence entre les deux génomes (Figure 23A et tableaux 1 et 2). Pour 20 sites, nous avons observé des variations de distance de moins de 500 pb. Pour quelques RARE seulement, les variations peuvent aller de 500 pb jusqu'à 2000 pb (*HoxB1*). Les variations supérieures à 500 pb, peuvent s'expliquer soit par des problèmes d'annotation soit par l'incorporation de séquences répétées entre le RARE et le gène. Cette analyse suggère cependant que la distance d'un RARE par rapport à son gène serait un critère clé pour la régulation de l'expression de gènes cibles de l'AR.

Sur ces 29 sites, nous avons également étudié l'orientation du RARE par rapport à celle du gène associé dans les deux génomes (Figure 23B et tableaux 1 et 2). Cette comparaison démontre indubitablement que tous les RARE testés possèdent la même orientation par rapport à leur gène dans les deux génomes (que l'orientation soit sens ou reverse). Donc l'orientation serait également conservée au sein des espèces et jouerait un rôle dans la régulation des gènes cibles.

### 2. Ontologie des gènes associés

Enfin, sur le « pool » de 38 RARE potentiels, une analyse ontologique des gènes associés a été réalisée (Figure 23C). Cette analyse reste cependant putative pour 4 gènes (en rouge dans les tableaux : *ACO2/HIC1/MSL1/RXRβ*) car comme nous venons de le voir, un RARE peut être associé à différents gènes (selon le critère de distance).

Différentes fonctions sont associées à ces gènes. On trouve bien évidemment des gènes impliqués dans le métabolisme et/ou la régulation de la réponse à l'AR (*CYP26A1, RARβ2 et RARα*).

Un grand « pool » de gènes est associé au développement. Notamment, on trouve une majorité de RARE dans les clusters de gènes *Hox* ; certains sont bien caractérisés comme *HoxA1, HoxB1*, d'autres ont également été étudiés comme *HoxA4, HoxB3*. On trouve également de nombreux facteurs de transcription impliqués dans l'organogenèse et la neurogenèse. Certains ont été démontrés comme régulés par l'acide rétinoïque et leur RARE a été identifié : *WT1* et *Znf503* (Bollig et al., 2009; Chang et al., 2004). Par contre, d'autres gènes sont connus comme régulés par

l'acide rétinoïque mais sans RARE attribué : c'est le cas de *BHLHE40* (nommé Stra13 ou Stimulated by Retinoic Acid 13 ) (Boudjelal et al., 1997), *HIC1* (Britschgi et al., 2008) et *Meis2* (Oulad-Abdelghani et al., 1997).

Enfin, de nombreux gènes sont associés à des fonctions de maturation, de transport ou de liaison à des ARNm, et également de remodelage du cytosquelette. Quelques miRNA semblent être également régulés par l'acide rétinoïque.

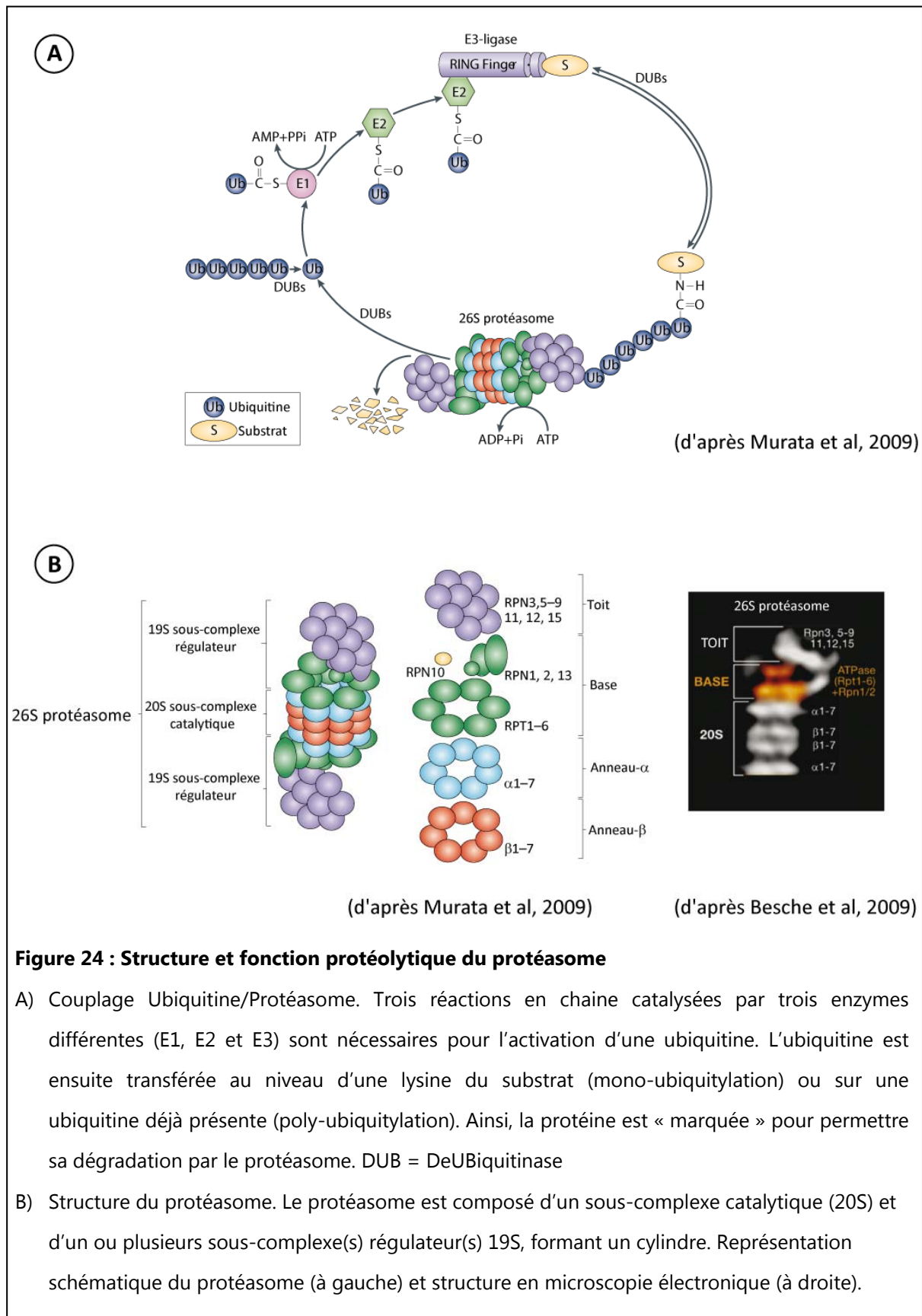
Cette étude nécessitera une validation expérimentale pour confirmer la stratégie utilisée pour la recherche de nouveaux RARE. Cependant, l'analyse préliminaire des gènes associés permet de retrouver quelques gènes cibles régulés par l'acide rétinoïque, notamment des gènes cibles connus dont le RARE n'avait encore jamais été caractérisé.

## V. Régulation du signal AR et recrutement du protéasome (Publication 5 et Revue 1)

### A. Protéasome : structure et fonctions

Dans les cellules eucaryotes, la dégradation contrôlée de la plupart des protéines nécessite le recrutement d'un complexe macromoléculaire, le protéasome, en association avec le système Ubiquitine (Murata et al., 2009) (Figure 24). Ce système est activé *via* une cascade de réactions en trois étapes et permet ainsi de cibler les protéines à engager dans le processus de dégradation *via* la mise en place d'une MPT nommée ubiquitine au niveau d'une lysine de la protéine cible (Murata et al., 2009; Ravid and Hochstrasser, 2008) (Figure 24A). Le signal d'engagement dans la dégradation est généralement lié à la polymérisation linéaire d'une chaîne d'ubiquitine à partir de la MPT initiale et permet alors la reconnaissance de la protéine modifiée par le système de dégradation, le protéasome (Figure 24A). Le protéasome est composé de deux sous-complexes, le 20S à activité catalytique et le 19S à activité régulatrice (Besche et al., 2009; Murata et al., 2009) (Figure 24B). Le sous-complexe 20S est une particule cylindrique composée de 4 anneaux hétéro-heptamériques (Besche et al., 2009) (Figure 24B). Parmi les sous unités, on trouve ainsi différentes protéases qui permettent le clivage de liaisons peptidiques au niveau de résidus acides, basiques ou hydrophobiques. Le sous-complexe 19S, composé d'au moins 19 protéines, est lui-même sous divisé en deux sous parties : la base et le toit (Besche et al., 2009) (Figure 24B). La base est constituée de 3 protéines à activité non-ATPasique et de 6 protéines à activité ATPasique. Ces dernières vont notamment jouer un rôle important pour la dénaturation des protéines cibles et permettre leur orientation vers le centre du sous-complexe 20S, en vue de leur dégradation.

De façon intéressante, en plus de son activité protéolytique, le protéasome joue un rôle dans d'autres mécanismes moléculaires, on parle de fonction non-protéolytique (Chen and Sun, 2009; Collins and Tansey, 2006). Ainsi, de plus en plus de processus cellulaires sont attribués à des phénomènes non-protéolytiques mettant en jeu des sous-unités du protéasome ou des phénomènes d'ubiquitination. On peut citer notamment le rôle de l'ubiquitine (mono- ou poly-) pour le recrutement de partenaires protéiques : elle intervient dans différents mécanismes comme la réparation de l'ADN, l'activation de kinases comme IKK (Chen and Sun, 2009).



---

En plus de réguler le turn-over des coactivateurs et corépresseurs, le protéasome peut également moduler la transcription de gènes en jouant sur de nombreux facteurs, l'initiation de la transcription, l'élongation, les modifications de l'état de la chromatine, mais également *via* les récepteurs nucléaires (Chen and Sun, 2009; Collins and Tansey, 2006). Ainsi, une sous unité ATPasique du sous-complexe 19S nommée SUG-1 a été démontrée comme pouvant interagir avec RAR $\alpha$  (vom Baur et al., 1996). Le protéasome contrôle également le fonctionnement des coactivateurs comme SRC-3 dans le cas du récepteur ER $\alpha$ .

## **B. RAR $\alpha$ , SUG-1 et SRC-3 : à la vie à la mort**

Dans l'équipe, nous avons étudié le rôle de SUG-1 non seulement dans la dégradation de RAR $\alpha$  et de SRC-3, mais également son rôle indépendant de la protéolyse dans la régulation des gènes cibles de l'AR (Publication 5).

Nous avons démontré que SUG-1 interagit spécifiquement avec RAR $\alpha$  ainsi qu'avec SRC-3, et qu'il participe uniquement à la dégradation de SRC-3 en réponse à l'AR. De plus, SUG-1, comme SRC-3, est recruté au niveau du promoteur de certains gènes cibles de l'AR et participe ainsi à leur transcription. Ces résultats montrent le double rôle de SUG-1 dans la réponse à l'AR. Dans un premier temps, SUG-1 intervient dans la transcription des gènes cibles comme un coactivateur, au même titre que SRC-3. Puis de façon plus tardive, SUG-1 ne participe pas à la dégradation de RAR $\alpha$  mais à celle de SRC-3 contribuant ainsi à la fin du signal induit par l'AR.

Ces résultats permettent de démontrer le rôle des coactivateurs et de SUG-1 dans le signal de fin de l'AR.

# DISCUSSION

## Discussion

Mes travaux ont permis de démontrer que les RAR peuvent intégrer le signal du ligand, AR, *via* différentes dynamiques : modification post-traductionnelles, changements conformationnels et association/dissociation de complexes protéiques. En outre, tous ces processus sont intimement liés. Ainsi, des phosphorylations peuvent moduler la structure des RAR afin d'améliorer le recrutement de complexes protéiques ou, à l'inverse, perturber l'association de complexes protéiques voire même indirectement affecter des complexes associés aux RAR. De tels effets subtils ont tous des répercussions sur la transcription des gènes cibles.

Parmi l'ensemble des domaines des RAR, deux domaines présentent des caractéristiques structurales très différentes mais des potentialités d'intégration de nombreux signaux : le NTD, domaine non structuré qui présente un « ensemble » de conformations permettant une grande flexibilité en réponse à différents « stimuli » et le DBD, qui de part sa nature, doit garder une structure conformationnelle nécessaire à la reconnaissance de son ligand, l'ADN, ainsi qu'une flexibilité conformationnelle vis-à-vis des domaines adjacents.

### I. Le MRP du NTD, un Motif Réellement Prometteur (nouveaux partenaires, phosphorylations)

Les travaux de l'équipe ont ainsi souligné l'importance du NTD des RAR et plus particulièrement d'un motif riche en prolines (MRP) situé à son extrémité COOH-terminale (Figure 25). L'intérêt de ce MRP réside dans i) sa capacité à interagir avec des partenaires à domaines SH3 et WW et ii) la présence de résidus sérine qui sont le siège de phosphorylations par des kinases proline dépendantes telles que cdk7 et la p38MAPK (Figure 25). Le NTD est intrinsèquement non structuré mais la phosphorylation du MRP peut modifier la conformation du NTD et/ou avoir un impact sur son interaction avec des partenaires. De même, la fixation de partenaires peut avoir un impact sur la conformation du NTD

#### A. MRP et une nouvelle famille de partenaires

Le crible double-hybride réalisé par G. Bour dans notre équipe a permis d'isoler deux partenaires du NTD non phosphorylé de RAR $\gamma$  : la Vinexine  $\beta$ , protéine à domaine SH3 et une autre

protéine à domaine WW, dont l'interaction n'a pas encore été confirmée. Ces deux types de domaine, SH3 et WW, sont connus pour se lier à des MRP (Li, 2005). La caractéristique de la Vinexine  $\beta$  est d'appartenir à une famille de protéines de liaison à l'actine ou ABP (Zheng et al., 2009). A noter que l'équipe a aussi mis en évidence récemment un nouveau partenaire du MRP du sous-type RAR $\alpha$ , la profiline IIA, qui appartient également à une famille ABP.

Il est maintenant admis que l'actine et les ABP jouent un rôle clé dans la régulation de la transcription et de l'organisation nucléaire (Zheng et al., 2009). Cependant, étant donné la nature de ces protéines, il est encore difficile d'évaluer où et comment elles vont interagir avec les facteurs de transcription et la machinerie transcriptionnelle. Dans le cadre de notre étude, nous avons clairement démontré que l'interaction entre la Vinexine  $\beta$  et RAR $\gamma$  n'avait pas lieu au niveau de l'ADN, mais certainement en dehors de la chromatine (Publication 4). Dans le nucléoplasme, la Vinexine  $\beta$  pourrait alors séquestrer le récepteur non phosphorylé en attente du signal AR ou pourrait être impliquée dans le mouvement intranucléaire des récepteurs. Il est encore très difficile de pouvoir répondre à cette question. Aussi des expériences sont actuellement en cours pour étudier l'interaction dans la fraction « soluble » du noyau. J'ai également réalisé de nombreuses mises au point pour optimiser la culture en suspension des cellules F9, l'utilisation d'anticorps spécifiquement dirigés contre les protéines endogènes et les conditions d'immunoprécipitation et d'élution en vue de rechercher de nouveaux partenaires de RAR $\gamma$  et de la Vinexine  $\beta$  dans ces cellules (spectrométrie de masse).

Bien que l'interaction soit observée dans le noyau, on ne peut pas non plus exclure que la Vinexine  $\beta$ , initialement isolée pour son association avec des protéines membranaires, puisse également jouer un rôle dans les effets non génomiques des RAR. En effet, comme pour de nombreux récepteurs, il a été démontré que les RAR peuvent initier des activations rapides de voies kinasiques mais le mécanisme sous-jacent n'a toujours pas été élucidé. Des protéines adaptatrices, telle que la Vinexine  $\beta$ , pourraient jouer un rôle dans la formation de complexes protéiques impliqués dans la mise en place de ces voies kinasiques en dehors du noyau, mais l'analyse de tels effets nécessitent une isolation très fine des différents compartiments cellulaires et sont souvent difficiles à mettre en évidence dans des conditions endogènes.

## **B. MRP et changements conformationnels**

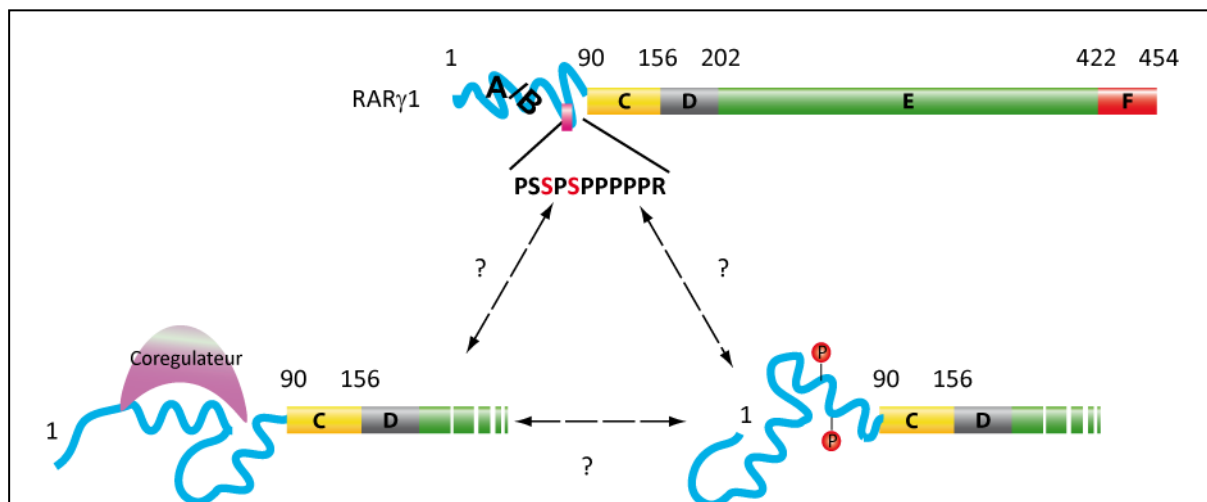
Il est actuellement admis qu'une région non structurée peut adopter (localement ou à l'échelle du domaine) une conformation induite suite à la liaison d'un partenaire (Kumar and



Thompson, 2003; Warnmark et al., 2003) (Figure 25). Notamment, il a été suggéré que l'association d'un domaine SH3 à un MRP induirait la formation d'une hélice polyproline de type II (Li, 2005). Actuellement, nous sommes en train de caractériser par RMN les interactions entre le troisième domaine SH3 de la Vinexine  $\beta$  et un peptide correspondant au MRP de RAR $\gamma$ . Il serait intéressant d'étudier l'impact de la liaison du domaine SH3 sur le NTD entier.

En outre, des changements subtils de la séquence (substitution de proline en leucine) existent entre les différents sous-types et pourraient également avoir des effets sur la conformation de cette région, ainsi que sur la spécificité de reconnaissance de partenaires. Il serait donc intéressant d'élargir cette étude aux autres RAR ( $\alpha$  et  $\beta$ ).

A noter, le NTD du récepteur de la progestérone, PR, présente également un MRP, capable d'interagir avec différentes protéines à domaine SH3, telle que Src (Boonyaratanakornkit et al., 2001). Cependant, l'impact de ces partenaires sur la structure du NTD de PR n'a pas encore été étudié. A l'inverse, le NTD de GR interagit avec la protéine TBP et il a été montré que cette liaison augmente la proportion en hélices  $\alpha$  du NTD et la protection contre la protéolyse (Copik et al., 2006).



**Figure 25 : Flexibilité conformationnelle du NTD**

Le NTD des RAR est non structuré. Cependant, le MRP, présent à la fin du NTD, pourrait adopter une ou plusieurs conformations suite à la liaison de corégulateurs ou suite à des modifications post-traductionnelles (phosphorylation).

Enfin, le MRP de RAR $\gamma$  est le siège de phosphorylations qui peuvent aussi induire des changements de conformation (Gardner and Montminy, 2005; Pufall et al., 2005) (Figure 25). Dans ce cadre, des expériences de RMN ont été initialisées avec des peptides de synthèse correspondant au MRP de RAR $\gamma$ , phosphorylé(s) ou non (Revue 2). Des résultats préliminaires suggèrent que

la(les) phosphorylation(s) de ces peptides pourrait(ent) favoriser un changement conformationnel, notamment l'isomérisation cis/trans d'une proline. Cependant, étant donné la richesse en prolines du MRP de RAR $\gamma$ , il est encore difficile de déterminer quelle proline pourrait être le siège d'un tel changement conformationnel.

### **C. MRP et dynamique d'association/dissociation de partenaires : rôle de la phosphorylation**

Dans le cadre de mes travaux, j'ai montré, grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifiquement dirigé contre RAR $\gamma$  phosphorylé au niveau de la sérine 79, qu'une fraction du récepteur est phosphorylée au niveau de cette sérine en absence de ligand et que cette phosphorylation augmente rapidement suite à un traitement à l'AR. Un anticorps dirigé contre le récepteur phosphorylé au niveau de la sérine 77, adjacente, a également été obtenu et est en cours de validation. De manière intéressante, des expériences préliminaires laissent suggérer que la phosphorylation de cette sérine serait dépendante de la phosphorylation préalable de la sérine 79. Cette hypothèse serait en accord avec des observations réalisées par l'équipe lors de la découverte de ces deux sites de phosphorylation (Bastien et al., 2000). Ainsi, comme pour les histones, les RAR comme d'autres protéines « non histone » présentent également un code de MPT qui contrôlerait leur structure ainsi que leur fonction.

Etant donné que la phosphorylation peut affecter la conformation d'une région, elle peut également avoir un effet sur l'association/dissociation de partenaires. Dans le cadre de mes travaux sur RAR $\gamma$ /Vinexine  $\beta$ , j'ai ainsi montré que les sites de phosphorylation du MRP de RAR $\gamma$  sont à proximité du motif d'interaction du 3<sup>ème</sup> domaine SH3 de la Vinexine  $\beta$ . De plus, j'ai montré que la Vinexine  $\beta$  interagit préférentiellement avec la forme non phosphorylée du MRP et que la phosphorylation de ce motif en réponse à l'AR induit sa dissociation.

Une question reste cependant en suspens : est-il possible de trouver des protéines associées à(aux) forme(s) phosphorylée(s) du MRP des RAR ? Comme nous l'avons vu précédemment (cf. Introduction), quelques protéines comme Pin1 sont susceptibles d'interagir avec des MRP phosphorylés (Brondani et al., 2005), mais existe-t-il une dynamique de recrutement de différents partenaires en fonction de l'état de phosphorylation ?

Actuellement, isoler de tels partenaires présente de réelles difficultés en raison de la labilité et de la dynamique des MPT. Jusqu'à présent, la plupart des études ont été réalisées avec des mutants des sites de phosphorylation substitués en acide glutamique ou acide aspartique qui sont

supposés mimer un état phosphorylé mais ne reproduisent pas exactement le même encombrement stérique qu'un groupement phosphate (Revue 2). Cette technique n'a permis d'isoler qu'un seul partenaire du NTD phosphorylé des récepteurs nucléaires, la protéine SPBP qui interagirait avec le NTD de ER phosphorylé au niveau de la sérine 118 (Gburcik et al., 2005). Aucune étude n'a encore révélé de partenaires phospho-spécifiques pour les autres récepteurs nucléaires.

Cependant, de nouvelles techniques, comme la méthode de SILAC, pourraient jouer un rôle clé dans l'isolement de partenaires phospho-dépendant (Revue 2). En effet, cette technique permet d'étudier par spectrométrie de masse un enrichissement des protéines interagissant préférentiellement avec un peptide phosphorylé par rapport à un peptide non phosphorylé. Bien que cette méthode reste artificielle *via* l'utilisation de peptides et non pas de protéines entières, elle serait certainement envisageable pour l'isolation de protéines interagissant spécifiquement avec le MRP phosphorylé des RAR. Cette méthode a notamment été utilisée pour l'étude de partenaires d'histones modifiés et semble donner des résultats prometteurs (Vermeulen et al., 2007).

## II. DBD, au centre du débat

Jusqu'à présent, chaque domaine des récepteurs nucléaires était isolé et étudié séparément du reste de la protéine. Cependant, d'un point de vue fonctionnel, il existe une synergie entre les différents domaines (Nagpal et al., 1993; Taneja et al., 1997) (Figure 26). Ainsi, la synergie observée entre le LBD et le NTD de la plupart des récepteurs nucléaires mettrait en jeu soit des interactions directes soit des pontages protéiques. Il a également été observé que la liaison du ligand au LBD affecterait non seulement sa conformation, mais pourrait également se propager au niveau des surfaces de dimérisation et de recrutement des coactivateurs voire même au niveau des domaines adjacents comme la région charnière (Brelivet et al., 2004; Driscoll et al., 1996).

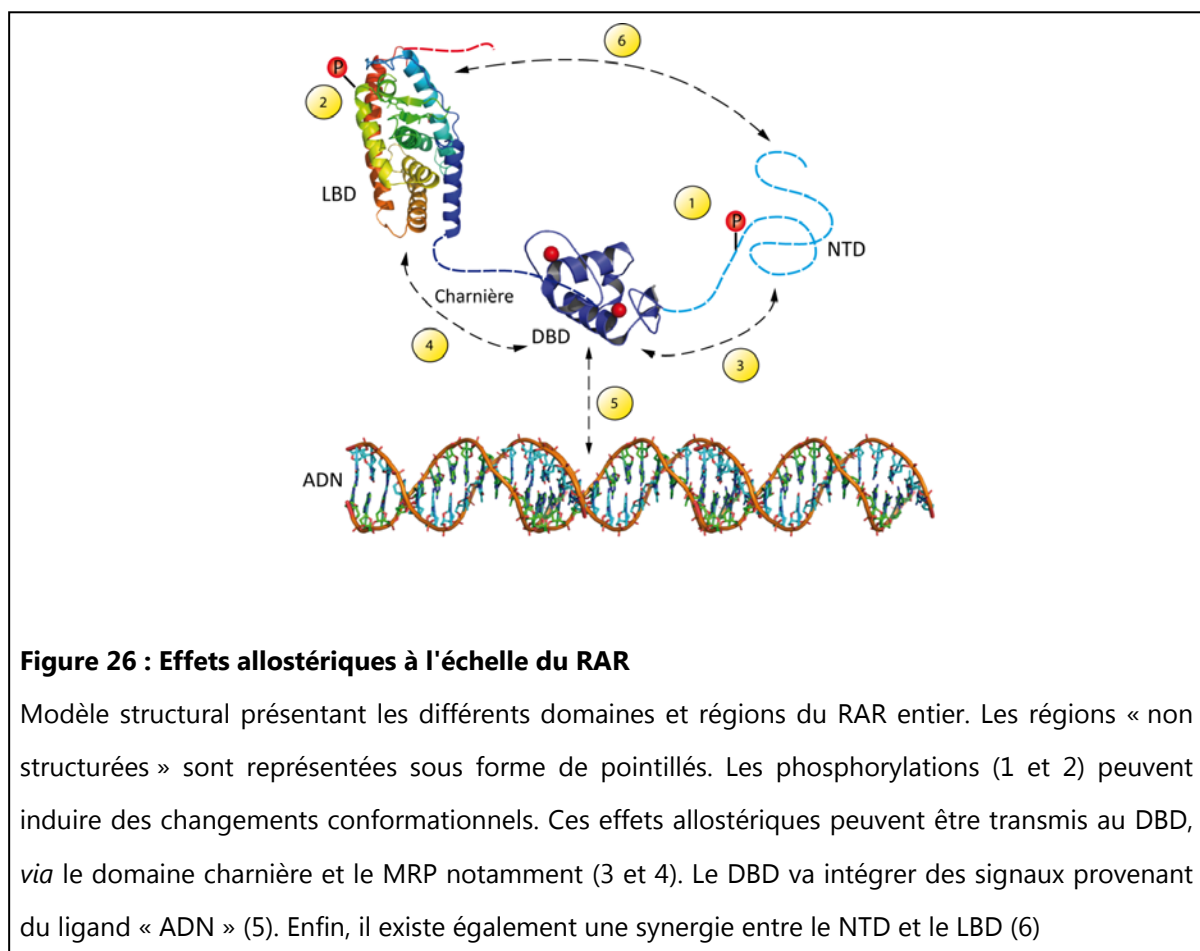
De plus, des expériences réalisées avec le NTD et le DBD de PR démontrent que chaque domaine peut avoir une influence réciproque sur la conformation de l'autre (Takimoto et al., 2003). Ainsi, le DBD, domaine central dans la structure primaire, pourrait également jouer un rôle clé dans l'intégration de l'ensemble de ces signaux.

## A. DBD, intégrateur de changements allostériques

### 1. Phosphorylation, effets allostériques et impact sur le DBD

Actuellement, de plus en plus d'études suggèrent que la phosphorylation d'un résidu peut avoir des effets allostériques sur la conformation du domaine lui-même, mais également sur les domaines adjacents (Gardner and Montminy, 2005; Pufall et al., 2005). Dans ce contexte, l'équipe a montré que la phosphorylation de la sérine 369 localisée dans la boucle L9-10 a des répercussions sur le recrutement de la cycline H au niveau de la boucle L8-9.

Un tel concept a été également démontré dans le cas du facteur Ets-1 (Lee et al., 2008; Pufall et al., 2005). Cependant, suivant la protéine considérée, les effets vont être en faveur d'une stabilisation du domaine ou au contraire vont favoriser sa déstabilisation. La difficulté de telles études réside dans l'obtention d'une quantité suffisante de matériel où la proportion d'un acide aminé phosphorylé soit suffisamment importante pour pouvoir étudier ses conséquences structurales. Ainsi, la majorité des études ont jusqu'à présent été réalisées sur des peptides de synthèse ou sur des domaines où les sérines ont été remplacées par des acides glutamiques, mimant un état phosphorylé, mais n'ayant pas exactement le même effet qu'une réelle phosphorylation (Revue 2).



Cependant, il n'est pas exclu que les effets d'une phosphorylation se propagent à plus longue distance (Figure 26). En effet, les expériences réalisées dans l'équipe démontrent que la phosphorylation du NTD des RAR ( $\alpha$  et  $\gamma$ ) interfère avec le recrutement du récepteur à l'ADN (Publication 4) (Bruck et al., 2009). Bien que l'on ne puisse exclure que ce changement d'affinité avec l'ADN reflète le départ ou le recrutement de complexes protéiques, il est probable, étant donné la proximité du MRP, que la phosphorylation des sérines présentes dans ce motif affecte directement la conformation du DBD et par voie de conséquence son interaction avec l'ADN. Les expériences de CHIP effectuées avec des anticorps dirigés contre les formes phosphorylées de RAR $\alpha$  et de RAR $\gamma$  vont dans ce sens (Publication 4) (Bruck et al., 2009). Des expériences de RMN sont actuellement en cours pour étudier l'effet de la phosphorylation du NTD des RAR sur le DBD.

Etant donné que les expériences réalisées par de nombreuses équipes, dont la nôtre, démontrent que la phosphorylation des récepteurs nucléaires joue un rôle clé sur la transcription de certains de leurs gènes cibles, nos anticorps reconnaissant les formes phosphorylées des RAR devraient nous permettre de corrélérer la dynamique de recrutement de RAR $\alpha$  et de RAR $\gamma$  phosphorylés avec l'effet transcriptionnel observé. Ces anticorps pourraient être aussi utilisés dans des expériences de CHIP-sequencing (Revue 2). *In fine*, de tels projets devraient nous permettre d'établir un modèle d'activation de gènes cibles de l'AR.

## 2. DBD et son ligand « ADN »

Jusqu'à présent, le DBD était perçu comme un domaine se liant passivement à une séquence consensus d'ADN, mais de nombreuses expériences récentes démontrent que l'ADN peut également être considéré comme un second « ligand » pour le récepteur (Holmbeck et al., 1998a; Meijnsing et al., 2009). Les travaux de Yamamoto démontrent clairement que le récepteur GR est capable de se lier à un élément de réponse imparfait, dont un des hémisites est conservé et pas l'autre. Cette « accommodation » se traduit notamment par des changements conformationnels subtils d'une partie du DBD nommée « lever arm » en fonction de la séquence d'ADN reconnue, sans modification de l'affinité entre le DBD et l'élément de réponse considéré (Meijnsing et al., 2009) (Figure 26).

Ces travaux associés à ceux réalisés par Rastinejad pour étudier la structure « entière » d'un hétérodimère PPAR/RXR à l'ADN suggèrent que le ligand ADN et le ligand du LBD ont tout deux des effets sur la conformation globale de la protéine, la capacité d'hétérodimérisation, le recrutement d'autres complexes protéiques ainsi que sur le recrutement d'un récepteur à l'ADN (Chandra et al., 2008; Meijnsing et al., 2009). En effet, la structure tridimensionnelle du complexe démontre l'importance de résidus présents dans le DBD, notamment une phénylalanine, pour le contact direct

---

avec le LBD du partenaire. De plus, la mutation de ce résidu affecte aussi bien la liaison à l'ADN que la liaison du ligand au LBD démontrant l'interdépendance entre LBD et DBD (Chandra et al., 2008). Enfin, la structure révèle également des changements conformationnels induits par les deux ligands au niveau de la région CTE du DBD et de la région charnière (Figure 26). Cette région adopte notamment une conformation en hélice  $\alpha$  permettant un ancrage supplémentaire du DBD dans un sillon mineur flanquant l'élément de réponse consensus mais apporte également la flexibilité nécessaire pour permettre la transmission d'effets allostériques entre les différents domaines (Chandra et al., 2008).

## B. Quand le DBD met le RARE sous contrainte...

*In fine*, la régulation de la transcription des gènes cibles de l'AR va dépendre de l'intégration des données par le DBD et donc de son recrutement au niveau de séquences spécifiques. Bien que les études actuelles démontrent la « flexibilité » du DBD vis-à-vis de la séquence d'ADN reconnue (Chandra et al., 2008), il n'en reste pas moins qu'elle impose une spécificité de reconnaissance.

En effet, la recherche phylogénétique de nouveaux RARE a permis de démontrer que les RARE DR5 fonctionnels connus sont parmi les mieux conservés (12 à 15 organismes) au cours de l'évolution. Certains RARE connus, comme celui de *RAR $\gamma$ 2*, n'ont pas été retrouvés lors de notre sélection, mais ils sont retrouvés avec des critères moins sélectifs (conservation entre 7 organismes du RARE de *RAR $\gamma$ 2*). Cette étude a également été élargie à la recherche de DR2 RGKTSA conservés.

Les premiers résultats semblent également encourageants, notamment avec la découverte d'un troisième RARE conservé présent en aval du gène *CYP26A1* et récemment découvert dans des expériences de CHIP-sequencing (Hua et al., 2009). En outre, une étude récente par CHIP a également démontré que les RAR pouvaient être présents au niveau d'éléments de réponse DR2 RGKTCA présents au sein d'éléments répétés (Laperriere et al., 2007). Les validations des gènes et des RARE potentiels obtenus par cette méthode de conservation phylogénétique sont en cours.

L'ensemble de ces données démontre que les récepteurs sont capables de se lier à des sites consensus conservés mais également à des séquences proches du site consensus. Nous sommes actuellement en train d'étudier bioinformatiquement l'hypothèse d'une conservation de ces sites non-consensus. Il est également possible que le RARE soit plus contraint au niveau de sa séquence que le GRE. Cette situation pourrait notamment s'expliquer par le fait que ces deux récepteurs appartiennent à des classes de récepteurs différentes (stéroïdiens et non stéroïdiens) et agissent donc en homodimère pour GR et en hétérodimère pour RAR/RXR. Cette différence de classe pourrait

expliquer la nécessité d'une contrainte supplémentaire sur la séquence reconnue pour permettre une meilleure spécificité de reconnaissance, RXR pouvant être un partenaire de nombreux hétérodimères.

# BIBLIOGRAPHIE



## Références

- 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**, 18932-41.
- Aggarwal, S., Kim, S. W., Cheon, K., Tabassam, F. H., Yoon, J. H. and Koo, J. S.** (2006). Nonclassical action of retinoic acid on the activation of the cAMP response element-binding protein in normal human bronchial epithelial cells. *Mol Biol Cell* **17**, 566-75.
- Akamatsu, M., Aota, S., Suwa, A., Ueda, K., Amachi, T., Yamada, K. M., Akiyama, S. K. and Kioka, N.** (1999). Vinexin forms a signaling complex with Sos and modulates epidermal growth factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activities. *J Biol Chem* **274**, 35933-7.
- Akmal, K. M., Dufour, J. M., Vo, M., Higginson, S. and Kim, K. H.** (1998). Ligand-dependent regulation of retinoic acid receptor alpha in rat testis: in vivo response to depletion and repletion of vitamin A. *Endocrinology* **139**, 1239-48.
- Alique, M., Moreno, V., Kitamura, M., Xu, Q. and Lucio-Cazana, F. J.** (2006). Kinase-dependent, retinoic acid receptor-independent up-regulation of cyclooxygenase-2 by all-trans retinoic acid in human mesangial cells. *Br J Pharmacol* **149**, 215-25.
- Alland, L., Muhle, R., Hou, H., Jr., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N. and DePinho, R. A.** (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature* **387**, 49-55.
- Alsayed, Y., Uddin, S., Mahmud, N., Lekmine, F., Kalvakolanu, D. V., Minucci, S., Bokoch, G. and Platanias, L. C.** (2001). Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to all-trans-retinoic acid. *J Biol Chem* **276**, 4012-9.
- Altucci, L. and Gronemeyer, H.** (2001). The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer* **1**, 181-93.
- Andrau, J. C., van de Pasch, L., Lijnzaad, P., Bijma, T., Koerkamp, M. G., van de Peppel, J., Werner, M. and Holstege, F. C.** (2006). Genome-wide location of the coactivator mediator: Binding without activation and transient Cdk8 interaction on DNA. *Mol Cell* **22**, 179-92.
- Aoto, J., Nam, C. I., Poon, M. M., Ting, P. and Chen, L.** (2008). Synaptic signaling by all-trans retinoic acid in homeostatic synaptic plasticity. *Neuron* **60**, 308-20.
- Balmer, J. E. and Blomhoff, R.** (2002). Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* **43**, 1773-808.
- Balmer, J. E. and Blomhoff, R.** (2005). A robust characterization of retinoic acid response elements based on a comparison of sites in three species. *J Steroid Biochem Mol Biol* **96**, 347-54.
- Barna, M., Hawe, N., Niswander, L. and Pandolfi, P. P.** (2000). Plzf regulates limb and axial skeletal patterning. *Nat Genet* **25**, 166-72.
- Barrandon, C., Spiluttini, B. and Bensaude, O.** (2008). Non-coding RNAs regulating the transcriptional machinery. *Biol Cell* **100**, 83-95.
- Barsyte-Lovejoy, D., Galanis, A. and Sharrocks, A. D.** (2002). Specificity determinants in MAPK signaling to transcription factors. *J Biol Chem* **277**, 9896-903.
- Bastie, J. N., Balitrand, N., Guidez, F., Guillemot, I., Larghero, J., Calabresse, C., Chomienne, C. and Delva, L.** (2004). 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 transrepresses retinoic acid transcriptional activity via vitamin D receptor in myeloid cells. *Mol Endocrinol* **18**, 2685-99.

- Bastie, J. N., Despouy, G., Balitrand, N., Rochette-Egly, C., Chomienne, C. and Delva, L.** (2001). The novel co-activator CRABP II binds to RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$  *via* two nuclear receptor interacting domains and does not require the AF-2 'core'. *FEBS Lett* **507**, 67-73.
- 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**, 28683-9.
- Bastien, J., Adam-Stitah, S., Riedl, T., Egly, J. M., Chambon, P. and Rochette-Egly, C.** (2000). TFIID interacts with the retinoic acid receptor  $\gamma$  and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7. *J Biol Chem* **275**, 21896-904.
- Bastien, J., Plassat, J. L., Payrastre, B. and Rochette-Egly, C.** (2006). The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway is essential for the retinoic acid-induced differentiation of F9 cells. *Oncogene* **25**, 2040-7.
- Bastien, J. and Rochette-Egly, C.** (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* **328**, 1-16.
- Benecke, A., Chambon, P. and Gronemeyer, H.** (2000). Synergy between estrogen receptor  $\alpha$  activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO Rep* **1**, 151-7.
- Bertagnolo, V., Neri, L. M., Marchisio, M., Mischiati, C. and Capitani, S.** (1999). Phosphoinositide 3-kinase activity is essential for all-trans-retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 cells. *Cancer Res* **59**, 542-6.
- Besche, H. C., Peth, A. and Goldberg, A. L.** (2009). Getting to first base in proteasome assembly. *Cell* **138**, 25-8.
- Bielska, A. A. and Zondlo, N. J.** (2006). Hyperphosphorylation of tau induces local polyproline II helix. *Biochemistry* **45**, 5527-37.
- Black, B. E., Holaska, J. M., Rastinejad, F. and Paschal, B. M.** (2001). DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Curr Biol* **11**, 1749-58.
- Bollig, F., Perner, B., Besenbeck, B., Kothe, S., Ebert, C., Taudien, S. and Englert, C.** (2009). A highly conserved retinoic acid responsive element controls wt1a expression in the zebrafish pronephros. *Development* **136**, 2883-92.
- Bommer, M., Benecke, A., Gronemeyer, H. and Rochette-Egly, C.** (2002). TIF2 mediates the synergy between RAR $\alpha$  1 activation functions AF-1 and AF-2. *J Biol Chem* **277**, 37961-6.
- Boonyaratanakornkit, V., Scott, M. P., Ribon, V., Sherman, L., Anderson, S. M., Maller, J. L., Miller, W. T. and Edwards, D. P.** (2001). Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell* **8**, 269-80.
- Bost, F., Caron, L., Marchetti, I., Dani, C., Le Marchand-Brustel, Y. and Binetruy, B.** (2002). Retinoic acid activation of the ERK pathway is required for embryonic stem cell commitment into the adipocyte lineage. *Biochem J* **361**, 621-7.
- Boudjelal, M., Taneja, R., Matsubara, S., Bouillet, P., Dolle, P. and Chambon, P.** (1997). Overexpression of Stra13, a novel retinoic acid-inducible gene of the basic helix-loop-helix family, inhibits mesodermal and promotes neuronal differentiation of P19 cells. *Genes Dev* **11**, 2052-65.
- Boukarabila, H., Saurin, A. J., Batsche, E., Mossadegh, N., van Lohuizen, M., Otte, A. P., Pradel, J., Muchardt, C., Sieweke, M. and Duprez, E.** (2009). The PRC1 Polycomb group complex interacts with PLZF/RARA to mediate leukemic transformation. *Genes Dev* **23**, 1195-206.

- Bourguet, W., Germain, P. and Gronemeyer, H.** (2000a). Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends Pharmacol Sci* **21**, 381-8.
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Moras, D.** (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature* **375**, 377-82.
- Bourguet, W., Vivat, V., Wurtz, J. M., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Moras, D.** (2000b). Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. *Mol Cell* **5**, 289-98.
- Brand, N., Petkovich, M., Krust, A., Chambon, P., de The, H., Marchio, A., Tiollais, P. and Dejean, A.** (1988). Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature* **332**, 850-3.
- Braun, K. W., Tribley, W. A., Griswold, M. D. and Kim, K. H.** (2000). Follicle-stimulating hormone inhibits all-trans-retinoic acid-induced retinoic acid receptor alpha nuclear localization and transcriptional activation in mouse Sertoli cell lines. *J Biol Chem* **275**, 4145-51.
- Braun, K. W., Vo, M. N. and Kim, K. H.** (2002). Positive regulation of retinoic acid receptor alpha by protein kinase C and mitogen-activated protein kinase in sertoli cells. *Biol Reprod* **67**, 29-37.
- Brelivet, Y., Kammerer, S., Rochel, N., Poch, O. and Moras, D.** (2004). Signature of the oligomeric behaviour of nuclear receptors at the sequence and structural level. *EMBO Rep* **5**, 423-9.
- Britschgi, C., Jenal, M., Rizzi, M., Mueller, B. U., Torbett, B. E., Andres, A. C., Tobler, A., Fey, M. F. and Tschan, M. P.** (2008). HIC1 tumour suppressor gene is suppressed in acute myeloid leukaemia and induced during granulocytic differentiation. *Br J Haematol* **141**, 179-87.
- Brondani, V., Schefer, Q., Hamy, F. and Klimkait, T.** (2005). The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 regulates phospho-Ser77 retinoic acid receptor alpha stability. *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 6-13.
- Bruck, N., Bastien, J., Bour, G., Tarrade, A., Plassat, J. L., Bauer, A., Adam-Stitah, S. and Rochette-Egly, C.** (2005). Phosphorylation of the retinoid x receptor at the omega loop, modulates the expression of retinoic-acid-target genes with a promoter context specificity. *Cell Signal* **17**, 1229-39.
- Bruck, N., Vitoux, D., Ferry, C., Duong, V., Bauer, A., de The, H. and Rochette-Egly, C.** (2009). A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RARalpha to target promoters. *Embo J* **28**, 34-47.
- Budhu, A., Gillilan, R. and Noy, N.** (2001). Localization of the RAR interaction domain of cellular retinoic acid binding protein-II. *J Mol Biol* **305**, 939-49.
- Budhu, A. S. and Noy, N.** (2002). Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol Cell Biol* **22**, 2632-41.
- Campo-Paysaa, F., Marletaz, F., Laudet, V. and Schubert, M.** (2008). Retinoic acid signaling in development: tissue-specific functions and evolutionary origins. *Genesis* **46**, 640-56.
- Canon, E., Cosgaya, J. M., Scsucova, S. and Aranda, A.** (2004). Rapid effects of retinoic acid on CREB and ERK phosphorylation in neuronal cells. *Mol Biol Cell* **15**, 5583-92.
- Cavaillès, V., Dauvois, S., L'Horset, F., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P. J. and Parker, M. G.** (1995). Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *Embo J* **14**, 3741-51.
- Chakravarti, N., Lotan, R., Diwan, A. H., Warneke, C. L., Johnson, M. M. and Prieto, V. G.** (2007). Decreased expression of retinoid receptors in melanoma: entailment in tumorigenesis and prognosis. *Clin Cancer Res* **13**, 4817-24.
- Chambon, P.** (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* **10**, 940-54.

- Chandra, V., Huang, P., Hamuro, Y., Raghuram, S., Wang, Y., Burris, T. P. and Rastinejad, F.** (2008). Structure of the intact PPAR-gamma-RXR-alpha nuclear receptor complex on DNA. *Nature*, 350-356.
- Chang, C. W., Tsai, C. W., Wang, H. F., Tsai, H. C., Chen, H. Y., Tsai, T. F., Takahashi, H., Li, H. Y., Fann, M. J., Yang, C. W. et al.** (2004). Identification of a developmentally regulated striatum-enriched zinc-finger gene, *Nolz-1*, in the mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2613-8.
- Chen, H., Cohen, D. M., Choudhury, D. M., Kioka, N. and Craig, S. W.** (2005). Spatial distribution and functional significance of activated vinculin in living cells. *J Cell Biol* **169**, 459-70.
- Chen, H., Lin, R. J., Schiltz, R. L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M. L., Nakatani, Y. and Evans, R. M.** (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* **90**, 569-80.
- Chen, J. D. and Evans, R. M.** (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**, 454-7.
- 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**, 1187-97.
- Chen, N. and Napoli, J. L.** (2008). All-trans-retinoic acid stimulates translation and induces spine formation in hippocampal neurons through a membrane-associated RARalpha. *Faseb J* **22**, 236-45.
- Chen, N., Onisko, B. and Napoli, J. L.** (2008). The nuclear transcription factor RARalpha associates with neuronal RNA granules and suppresses translation. *J Biol Chem* **283**, 20841-7.
- Chen, Z. J. and Sun, L. J.** (2009). Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. *Mol Cell* **33**, 275-86.
- Choi, S. J., Chung, S. S., Rho, E. J., Lee, H. W., Lee, M. H., Choi, H. S., Seol, J. H., Baek, S. H., Bang, O. S. and Chung, C. H.** (2006). Negative modulation of RXRalpha transcriptional activity by small ubiquitin-related modifier (SUMO) modification and its reversal by SUMO-specific protease SUSP1. *J Biol Chem* **281**, 30669-77.
- Coin, F., Proietti De Santis, L., Nardo, T., Zlobinskaya, O., Stefanini, M. and Egly, J. M.** (2006). p8/TTD-A as a repair-specific TFIIH subunit. *Mol Cell* **21**, 215-26.
- Collins, G. A. and Tansey, W. P.** (2006). The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr Opin Genet Dev* **16**, 197-202.
- Copik, A. J., Webb, M. S., Miller, A. L., Wang, Y., Kumar, R. and Thompson, E. B.** (2006). Activation function 1 of glucocorticoid receptor binds TATA-binding protein in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* **20**, 1218-30.
- Darimont, B. D., Wagner, R. L., Apriletti, J. W., Stallcup, M. R., Kushner, P. J., Baxter, J. D., Fletterick, R. J. and Yamamoto, K. R.** (1998). Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev* **12**, 3343-56.
- de Lera, A. R., Bourguet, W., Altucci, L. and Gronemeyer, H.** (2007). Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 811-20.
- De los Santos, M., Zambrano, A., Sanchez-Pacheco, A. and Aranda, A.** (2007). Histone deacetylase inhibitors regulate retinoic acid receptor beta expression in neuroblastoma cells by both transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Mol Endocrinol* **21**, 2416-26.
- de The, H., Vivanco-Ruiz, M. M., Tiollais, P., Stunnenberg, H. and Dejean, A.** (1990). Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. *Nature* **343**, 177-80.

- Delmotte, M. H., Tahayato, A., Formstecher, P. and Lefebvre, P.** (1999). Serine 157, a retinoic acid receptor alpha residue phosphorylated by protein kinase C in vitro, is involved in RXR.RARalpha heterodimerization and transcriptional activity. *J Biol Chem* **274**, 38225-31.
- Delva, L., Bastie, J. N., Rochette-Egly, C., Kraiba, R., Balitrand, N., Despouy, G., Chambon, P. and Chomienne, C.** (1999). Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol Cell Biol* **19**, 7158-67.
- Despouy, G., Bastie, J. N., Deshaies, S., Balitrand, N., Mazharian, A., Rochette-Egly, C., Chomienne, C. and Delva, L.** (2003). Cyclin D3 is a cofactor of retinoic acid receptors, modulating their activity in the presence of cellular retinoic acid-binding protein II. *J Biol Chem* **278**, 6355-62.
- Dey, N., De, P. K., Wang, M., Zhang, H., Dobrota, E. A., Robertson, K. A. and Durden, D. L.** (2007). CSK controls retinoic acid receptor (RAR) signaling: a RAR-c-SRC signaling axis is required for neurogenic differentiation. *Mol Cell Biol* **27**, 4179-97.
- 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**, 3047-54.
- Dingova, H., Fukalova, J., Maninova, M., Philimonenko, V. V. and Hozak, P.** (2009). Ultrastructural localization of actin and actin-binding proteins in the nucleus. *Histochem Cell Biol* **131**, 425-34.
- Dolle, P.** (2009). Developmental expression of retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal* **7**, e006.
- 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**, 4465-75.
- Dowhan, D. H. and Muscat, G. E.** (1996). Characterization of the AB (AF-1) region in the muscle-specific retinoid X receptor-gamma: evidence that the AF-1 region functions in a cell-specific manner. *Nucleic Acids Res* **24**, 264-71.
- Driscoll, J. E., Seachord, C. L., Lupisella, J. A., Darveau, R. P. and Reczek, P. R.** (1996). Ligand-induced conformational changes in the human retinoic acid receptor detected using monoclonal antibodies. *J Biol Chem* **271**, 22969-75.
- Dufour, J. M. and Kim, K. H.** (1999). Cellular and subcellular localization of six retinoid receptors in rat testis during postnatal development: identification of potential heterodimeric receptors. *Biol Reprod* **61**, 1300-8.
- Dupe, V., Davenne, M., Brocard, J., Dolle, P., Mark, M., Dierich, A., Chambon, P. and Rijli, F. M.** (1997). In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* **124**, 399-410.
- Durand, B., Saunders, M., Leroy, P., Leid, M. and Chambon, P.** (1992). All-trans and 9-cis retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs. *Cell* **71**, 73-85.
- Dvorak, Z., Vrzal, R., Ulrichova, J., Macejova, D., Ondkova, S. and Brtko, J.** (2007). Expression, protein stability and transcriptional activity of retinoic acid receptors are affected by microtubules interfering agents and all-trans-retinoic acid in primary rat hepatocytes. *Mol Cell Endocrinol* **267**, 89-96.
- Dyson, H. J. and Wright, P. E.** (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 197-208.
- Easwaran, V., Pishvaian, M., Salimuddin and Byers, S.** (1999). Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Curr Biol* **9**, 1415-8.

- Egea, P. F., Rochel, N., Birck, C., Vachette, P., Timmins, P. A. and Moras, D.** (2001). Effects of ligand binding on the association properties and conformation in solution of retinoic acid receptors RXR and RAR. *J Mol Biol* **307**, 557-76.
- Egly, J. M., Miyamoto, N. G., Moncollin, V. and Chambon, P.** (1984). Is actin a transcription initiation factor for RNA polymerase B? *Embo J* **3**, 2363-71.
- Elmlund, H., Baraznenok, V., Lindahl, M., Samuelsen, C. O., Koeck, P. J., Holmberg, S., Hebert, H. and Gustafsson, C. M.** (2006). The cyclin-dependent kinase 8 module sterically blocks Mediator interactions with RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15788-93.
- Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S. and Kato, S.** (1999). Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. *Mol Cell Biol* **19**, 5363-72.
- Epping, M. T., Wang, L., Edel, M. J., Carlee, L., Hernandez, M. and Bernardis, R.** (2005). The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell* **122**, 835-47.
- Ezhkova, E. and Tansey, W. P.** (2004). Proteasomal ATPases link ubiquitylation of histone H2B to methylation of histone H3. *Mol Cell* **13**, 435-42.
- Faist, F., Short, S., Kneale, G. G. and Sharpe, C. R.** (2009). Alternative splicing determines the interaction of SMRT isoforms with nuclear receptor-DNA complexes. *Biosci Rep* **29**, 143-9.
- Fan, S., Goto, K., Chen, G., Morinaga, H., Nomura, M., Okabe, T., Nawata, H. and Yanase, T.** (2006). Identification of the functional domains of ANT-1, a novel coactivator of the androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **341**, 192-201.
- 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**, 2844-58.
- Farboud, B. and Privalsky, M. L.** (2004). Retinoic acid receptor-alpha is stabilized in a repressive state by its C-terminal, isotype-specific F domain. *Mol Endocrinol* **18**, 2839-53.
- Farooqui, M., Franco, P. J., Thompson, J., Kagechika, H., Chandraratna, R. A., Banaszak, L. and Wei, L. N.** (2003). Effects of retinoid ligands on RIP140: molecular interaction with retinoid receptors and biological activity. *Biochemistry* **42**, 971-9.
- Feng, W., Ribeiro, R. C., Wagner, R. L., Nguyen, H., Apriletti, J. W., Fletterick, R. J., Baxter, J. D., Kushner, P. J. and West, B. L.** (1998). Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* **280**, 1747-9.
- Ferrai, C., Naum-Ongania, G., Longobardi, E., Palazzolo, M., Disanza, A., Diaz, V. M., Crippa, M. P., Scita, G. and Blasi, F.** (2009). Induction of HoxB transcription by retinoic acid requires actin polymerization. *Mol Biol Cell* **20**, 3543-51.
- Ferry, C., Gianni, M., Lalevee, S., Bruck, N., Plassat, J. L., Raska, I., Jr., Garattini, E. and Rochette-Egly, C.** (2009). SUG-1 plays proteolytic and non-proteolytic roles in the control of retinoic acid target genes via its interaction with SRC-3. *J Biol Chem* **284**, 8127-35.
- Flajollet, S., Lefebvre, B., Rachez, C. and Lefebvre, P.** (2006). Distinct roles of the steroid receptor coactivator 1 and of MED1 in retinoid-induced transcription and cellular differentiation. *J Biol Chem* **281**, 20338-48.
- Folkers, G. E., van der Leede, B. J. and van der Saag, P. T.** (1993). The retinoic acid receptor-beta 2 contains two separate cell-specific transactivation domains, at the N-terminus and in the ligand-binding domain. *Mol Endocrinol* **7**, 616-27.

- Fukunaka, K., Saito, T., Wataba, K., Ashihara, K., Ito, E. and Kudo, R.** (2001). Changes in expression and subcellular localization of nuclear retinoic acid receptors in human endometrial epithelium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* **7**, 437-46.
- Gardner, K. H. and Montminy, M.** (2005). Can you hear me now? Regulating transcriptional activators by phosphorylation. *Sci STKE* **2005**, pe44.
- Gaub, M. P., Rochette-Egly, C., Lutz, Y., Ali, S., Matthes, H., Scheuer, I. and Chambon, P.** (1992). Immunodetection of multiple species of retinoic acid receptor alpha: evidence for phosphorylation. *Exp Cell Res* **201**, 335-46.
- Gburcik, V., Bot, N., Maggiolini, M. and Picard, D.** (2005). SPBP is a phosphoserine-specific repressor of estrogen receptor alpha. *Mol Cell Biol* **25**, 3421-30.
- Gburcik, V. and Picard, D.** (2006). The cell-specific activity of the estrogen receptor alpha may be fine-tuned by phosphorylation-induced structural gymnastics. *Nucl Recept Signal* **4**, e005.
- Gehin, M., Vivat, V., Wurtz, J. M., Losson, R., Chambon, P., Moras, D. and Gronemeyer, H.** (1999). Structural basis for engineering of retinoic acid receptor isotype-selective agonists and antagonists. *Chem Biol* **6**, 519-29.
- Germain, P., Chambon, P., Eichele, G., Evans, R. M., Lazar, M. A., Leid, M., De Lera, A. R., Lotan, R., Mangelsdorf, D. J. and Gronemeyer, H.** (2006a). International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacol Rev* **58**, 712-25.
- Germain, P., Chambon, P., Eichele, G., Evans, R. M., Lazar, M. A., Leid, M., De Lera, A. R., Lotan, R., Mangelsdorf, D. J. and Gronemeyer, H.** (2006b). International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev* **58**, 760-72.
- Germain, P., Iyer, J., Zechel, C. and Gronemeyer, H.** (2002). Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy. *Nature* **415**, 187-92.
- 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**, 877-82.
- Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M. and Laudet, V.** (2006c). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* **58**, 685-704.
- Gettemans, J., Van Impe, K., Delanote, V., Hubert, T., Vandekerckhove, J. and De Corte, V.** (2005). Nuclear actin-binding proteins as modulators of gene transcription. *Traffic* **6**, 847-57.
- 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 RAR gamma degradation and transactivation. *Embo J* **21**, 3760-9.
- Gianni, M., Boldetti, A., Guarnaccia, V., Rambaldi, A., Parrella, E., Raska, I., Jr., Rochette-Egly, C., Del Sal, G., Rustighi, A., Terao, M. et al.** (2009). Inhibition of the peptidyl-prolyl-isomerase Pin1 enhances the responses of acute myeloid leukemia cells to retinoic acid *via* stabilization of RARalpha and PML-RARalpha. *Cancer Res* **69**, 1016-26.
- 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**, 24859-62.
- Gianni, M., Parrella, E., Raska, I., Jr., Gaillard, E., Nigro, E. A., Gaudon, C., Garattini, E. and Rochette-Egly, C.** (2006). P38MAPK-dependent phosphorylation and degradation of SRC-3/AIB1 and RARalpha-mediated transcription. *Embo J* **25**, 739-51.

- 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**, 34458-66.
- Gillespie, R. F. and Gudas, L. J.** (2007). Retinoid regulated association of transcriptional co-regulators and the polycomb group protein SUZ12 with the retinoic acid response elements of Hoxa1, RARbeta(2), and Cyp26A1 in F9 embryonal carcinoma cells. *J Mol Biol* **372**, 298-316.
- Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G.** (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* **14**, 121-41.
- Goodson, M., Jonas, B. A. and Privalsky, M. A.** (2005a). Corepressors: custom tailoring and alterations while you wait. *Nucl Recept Signal* **3**, e003.
- Goodson, M. L., Jonas, B. A. and Privalsky, M. L.** (2005b). Alternative mRNA splicing of SMRT creates functional diversity by generating corepressor isoforms with different affinities for different nuclear receptors. *J Biol Chem* **280**, 7493-503.
- Graham, J. D., Hanson, A. R., Croft, A. J., Fox, A. H. and Clarke, C. L.** (2009). Nuclear matrix binding is critical for progesterone receptor movement into nuclear foci. *Faseb J* **23**, 546-56.
- Greiner, E. F., Kirfel, J., Greschik, H., Huang, D., Becker, P., Kapfhammer, J. P. and Schule, R.** (2000). Differential ligand-dependent protein-protein interactions between nuclear receptors and a neuronal-specific cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7160-5.
- Guenther, M. G., Barak, O. and Lazar, M. A.** (2001). The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol Cell Biol* **21**, 6091-101.
- Guenther, M. G., Lane, W. S., Fischle, W., Verdin, E., Lazar, M. A. and Shiekhattar, R.** (2000). A core SMRT corepressor complex containing HDAC3 and TBL1, a WD40-repeat protein linked to deafness. *Genes Dev* **14**, 1048-57.
- Gupta, P., Ho, P. C., Huq, M. M., Ha, S. G., Park, S. W., Khan, A. A., Tsai, N. P. and Wei, L. N.** (2008). Retinoic acid-stimulated sequential phosphorylation, PML recruitment, and SUMOylation of nuclear receptor TR2 to suppress Oct4 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 11424-9.
- Gurevich, I., Flores, A. M. and Aneskievich, B. J.** (2007). Corepressors of agonist-bound nuclear receptors. *Toxicol Appl Pharmacol* **223**, 288-98.
- Hamy, F., Verwaerde, P., Helbecque, N., Formstecher, P. and Henichart, J. P.** (1991). Nuclear targeting of a viral-cointernalized protein by a short signal sequence from human retinoic acid receptors. *Bioconjug Chem* **2**, 375-8.
- Hamza, M. S., Pott, S., Vega, V. B., Thomsen, J. S., Kandhadayar, G. S., Ng, P. W., Chiu, K. P., Pettersson, S., Wei, C. L., Ruan, Y. et al.** (2009). De-novo identification of PPARgamma/RXR binding sites and direct targets during adipogenesis. *PLoS One* **4**, e4907.
- Han, A., Tong, C., Hu, D., Bi, X. and Yang, W.** (2008). A direct protein-protein interaction is involved in the suppression of beta-catenin transcription by retinoid X receptor alpha in colorectal cancer cells. *Cancer Biol Ther* **7**, 454-9.
- Han, S. J., Lonard, D. M. and O'Malley, B. W.** (2009a). Multi-modulation of nuclear receptor coactivators through posttranslational modifications. *Trends Endocrinol Metab* **20**, 8-15.
- Han, Y. H., Zhou, H., Kim, J. H., Yan, T. D., Lee, K. H., Wu, H., Lin, F., Lu, N., Liu, J., Zeng, J. Z. et al.** (2009b). A Unique Cytoplasmic Localization of Retinoic Acid Receptor- $\gamma$  and Its Regulations. *J Biol Chem* **284**, 18503-14.



- Hartman, H. B., Yu, J., Alenghat, T., Ishizuka, T. and Lazar, M. A.** (2005). The histone-binding code of nuclear receptor co-repressors matches the substrate specificity of histone deacetylase 3. *EMBO Rep* **6**, 445-51.
- Hatchell, E. C., Colley, S. M., Beveridge, D. J., Epis, M. R., Stuart, L. M., Giles, K. M., Redfern, A. D., Miles, L. E., Barker, A., MacDonald, L. M. et al.** (2006). SLIRP, a small SRA binding protein, is a nuclear receptor corepressor. *Mol Cell* **22**, 657-68.
- 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**, 373-85.
- He, B., Gampe, R. T., Jr., Kole, A. J., Hnat, A. T., Stanley, T. B., An, G., Stewart, E. L., Kalman, R. I., Minges, J. T. and Wilson, E. M.** (2004). Structural basis for androgen receptor interdomain and coactivator interactions suggests a transition in nuclear receptor activation function dominance. *Mol Cell* **16**, 425-38.
- Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S. and Parker, M. G.** (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* **387**, 733-6.
- Heinzel, T., Lavinsky, R. M., Mullen, T. M., Soderstrom, M., Laherty, C. D., Torchia, J., Yang, W. M., Brard, G., Ngo, S. D., Davie, J. R. et al.** (1997). A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* **387**, 43-8.
- Henry, I. K., Spencer, M. L., Theodosiou, M., Lou, D. and Noonan, D. J.** (2003). A neuronal-specific differentiation protein that directly modulates retinoid receptor transcriptional activation. *Nucl Recept* **1**, 7.
- Hittelman, A. B., Burakov, D., Iniguez-Lluhi, J. A., Freedman, L. P. and Garabedian, M. J.** (1999). Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation *via* AF-1-associated proteins. *Embo J* **18**, 5380-8.
- Hoffman, B. G. and Jones, S. J.** (2009). Genome-wide identification of DNA-protein interactions using chromatin immunoprecipitation coupled with flow cell sequencing. *J Endocrinol* **201**, 1-13.
- Hoffman, M. D., Sniatynski, M. J. and Kast, J.** (2008). Current approaches for global post-translational modification discovery and mass spectrometric analysis. *Anal Chim Acta* **627**, 50-61.
- Hofmann, W. A., Stojiljkovic, L., Fuchsova, B., Vargas, G. M., Mavrommatis, E., Philimonenko, V., Kysela, K., Goodrich, J. A., Lessard, J. L., Hope, T. J. et al.** (2004). Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* **6**, 1094-101.
- Hoftijzer, H. C., Liu, Y. Y., Morreau, H., van Wezel, T., Pereira, A. M., Corssmit, E. P., Romijn, J. A. and Smit, J. W.** (2009). Retinoic acid receptor and retinoid X receptor subtype expression for the differential diagnosis of thyroid neoplasms. *Eur J Endocrinol* **160**, 631-8.
- Holmbeck, S. M., Dyson, H. J. and Wright, P. E.** (1998a). DNA-induced conformational changes are the basis for cooperative dimerization by the DNA binding domain of the retinoid X receptor. *J Mol Biol* **284**, 533-9.
- Holmbeck, S. M., Foster, M. P., Casimiro, D. R., Sem, D. S., Dyson, H. J. and Wright, P. E.** (1998b). High-resolution solution structure of the retinoid X receptor DNA-binding domain. *J Mol Biol* **281**, 271-84.
- Hong, H., Kohli, K., Garabedian, M. J. and Stallcup, M. R.** (1997). GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol Cell Biol* **17**, 2735-44.
- Hong, H. Y., Varvayanis, S. and Yen, A.** (2001). Retinoic acid causes MEK-dependent RAF phosphorylation through RARalpha plus RXR activation in HL-60 cells. *Differentiation* **68**, 55-66.

- Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K. et al. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**, 397-404.
- Hoyos, B., Imam, A., Chua, R., Swenson, C., Tong, G. X., Levi, E., Noy, N. and Hammerling, U. (2000). The cysteine-rich regions of the regulatory domains of Raf and protein kinase C as retinoid receptors. *J Exp Med* **192**, 835-45.
- Hsu, M. H., Palmer, C. N., Song, W., Griffin, K. J. and Johnson, E. F. (1998). A carboxyl-terminal extension of the zinc finger domain contributes to the specificity and polarity of peroxisome proliferator-activated receptor DNA binding. *J Biol Chem* **273**, 27988-97.
- Hu, X. and Lazar, M. A. (1999). The CoNRN motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* **402**, 93-6.
- Hua, S., Kittler, R. and White, K. P. (2009). Genomic antagonism between retinoic acid and estrogen signaling in breast cancer. *Cell* **137**, 1259-71.
- Huang, H., Wei, H., Zhang, X., Chen, K., Li, Y., Qu, P., Zhang, X., Chen, J., Liu, Y., Yang, L. et al. (2008). Changes in the expression and subcellular localization of RARalpha in the rat hippocampus during postnatal development. *Brain Res* **1227**, 26-33.
- Huang, S., Laoukili, J., Epping, M. T., Koster, J., Holzel, M., Westerman, B. A., Nijkamp, W., Hata, A., Asgharzadeh, S., Seeger, R. C. et al. (2009). ZNF423 is critically required for retinoic acid-induced differentiation and is a marker of neuroblastoma outcome. *Cancer Cell* **15**, 328-40.
- Huang, S. M., Huang, C. J., Wang, W. M., Kang, J. C. and Hsu, W. C. (2004). The enhancement of nuclear receptor transcriptional activation by a mouse actin-binding protein, alpha actinin 2. *J Mol Endocrinol* **32**, 481-96.
- Hughes, P. J., Zhao, Y., Chandraratna, R. A. and Brown, G. (2006). Retinoid-mediated stimulation of steroid sulfatase activity in myeloid leukemic cell lines requires RARalpha and RXR and involves the phosphoinositide 3-kinase and ERK-MAP kinase pathways. *J Cell Biochem* **97**, 327-50.
- Huq, M. D., Ha, S. G. and Wei, L. N. (2008). Modulation of retinoic acid receptor alpha activity by lysine methylation in the DNA binding domain. *J Proteome Res* **7**, 4538-45.
- Huq, M. D., Tsai, N. P., Khan, S. A. and Wei, L. N. (2007). Lysine trimethylation of retinoic acid receptor-alpha: a novel means to regulate receptor function. *Mol Cell Proteomics* **6**, 677-88.
- Ishitani, K., Yoshida, T., Kitagawa, H., Ohta, H., Nozawa, S. and Kato, S. (2003). p54nrb acts as a transcriptional coactivator for activation function 1 of the human androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **306**, 660-5.
- Ismaili, N., Blind, R. and Garabedian, M. J. (2005). Stabilization of the unliganded glucocorticoid receptor by TSG101. *J Biol Chem* **280**, 11120-6.
- Jepsen, K., Gleiberman, A. S., Shi, C., Simon, D. I. and Rosenfeld, M. G. (2008). Cooperative regulation in development by SMRT and FOXP1. *Genes Dev* **22**, 740-5.
- Jepsen, K., Hermanson, O., Onami, T. M., Gleiberman, A. S., Lunnyak, V., McEvelly, R. J., Kurokawa, R., Kumar, V., Liu, F., Seto, E. et al. (2000). Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. *Cell* **102**, 753-63.
- Jiang, S., Meyer, R., Kang, K., Osborne, C. K., Wong, J. and Oesterreich, S. (2006). Scaffold attachment factor SAFB1 suppresses estrogen receptor alpha-mediated transcription in part via interaction with nuclear receptor corepressor. *Mol Endocrinol* **20**, 311-20.
- Jiang, Y., Prunier, C. and Howe, P. H. (2008). The inhibitory effects of Disabled-2 (Dab2) on Wnt signaling are mediated through Axin. *Oncogene* **27**, 1865-75.

- Jokic, N., Ling, Y. Y., Ward, R. E., Michael-Titus, A. T., Priestley, J. V. and Malaspina, A. (2007). Retinoid receptors in chronic degeneration of the spinal cord: observations in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* **103**, 1821-33.
- Jonas, B. A., Varlakhanova, N., Hayakawa, F., Goodson, M. and Privalsky, M. L. (2007). Response of SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) and N-CoR (nuclear receptor corepressor) corepressors to mitogen-activated protein kinase kinase cascades is determined by alternative mRNA splicing. *Mol Endocrinol* **21**, 1924-39.
- Kambhampati, S., Li, Y., Verma, A., Sassano, A., Majchrzak, B., Deb, D. K., Parmar, S., Giafis, N., Kalvakolanu, D. V., Rahman, A. et al. (2003). Activation of protein kinase C delta by all-trans-retinoic acid. *J Biol Chem* **278**, 32544-51.
- Kannan-Thulasiraman, P., Dolniak, B., Kaur, S., Sassano, A., Kalvakolanu, D. V., Hay, N. and Platanias, L. C. (2008). Role of the translational repressor 4E-BP1 in the regulation of p21(Waf1/Cip1) expression by retinoids. *Biochem Biophys Res Commun* **368**, 983-9.
- Kastner, P., Perez, A., Lutz, Y., Rochette-Egly, C., Gaub, M. P., Durand, B., Lanotte, M., Berger, R. and Chambon, P. (1992). Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor alpha fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins. *Embo J* **11**, 629-42.
- Katsuki, H., Kurimoto, E., Takemori, S., Kurauchi, Y., Hisatsune, A., Isohama, Y., Izumi, Y., Kume, T., Shudo, K. and Akaike, A. (2009). Retinoic acid receptor stimulation protects midbrain dopaminergic neurons from inflammatory degeneration via BDNF-mediated signaling. *J Neurochem* **110**, 707-18.
- Kawauchi, T., Ikeya, M., Takada, S., Ueda, K., Shirai, M., Takihara, Y., Kioka, N. and Amachi, T. (2001). Expression of vinexin alpha in the dorsal half of the eye and in the cardiac outflow tract and atrioventricular canal. *Mech Dev* **106**, 147-50.
- 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**, 125-35.
- Khorasanizadeh, S. and Rastinejad, F. (2001). Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem Sci* **26**, 384-90.
- Kim, S. W., Hong, J. S., Ryu, S. H., Chung, W. C., Yoon, J. H. and Koo, J. S. (2007). Regulation of mucin gene expression by CREB via a nonclassical retinoic acid signaling pathway. *Mol Cell Biol* **27**, 6933-47.
- Kimura, A., Baumann, C. A., Chiang, S. H. and Saltiel, A. R. (2001). The sorbin homology domain: a motif for the targeting of proteins to lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9098-103.
- Kioka, N., Sakata, S., Kawauchi, T., Amachi, T., Akiyama, S. K., Okazaki, K., Yaen, C., Yamada, K. M. and Aota, S. (1999). Vinexin: a novel vinculin-binding protein with multiple SH3 domains enhances actin cytoskeletal organization. *J Cell Biol* **144**, 59-69.
- Kioka, N., Ueda, K. and Amachi, T. (2002). Vinexin, CAP/ponsin, ArgBP2: a novel adaptor protein family regulating cytoskeletal organization and signal transduction. *Cell Struct Funct* **27**, 1-7.
- Klaholz, B. P., Mitschler, A. and Moras, D. (2000). Structural basis for isotype selectivity of the human retinoic acid nuclear receptor. *J Mol Biol* **302**, 155-70.
- Kliwer, S. A., Umesono, K., Mangelsdorf, D. J. and Evans, R. M. (1992). Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* **355**, 446-9.
- Knegtel, R. M., Katahira, M., Schilthuis, J. G., Bonvin, A. M., Boelens, R., Eib, D., van der Saag, P. T. and Kaptein, R. (1993). The solution structure of the human retinoic acid receptor-beta DNA-binding domain. *J Biomol NMR* **3**, 1-17.

- 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**, 33280-8.
- Kouzarides, T.** (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705.
- Krust, A., Kastner, P., Petkovich, M., Zelent, A. and Chambon, P.** (1989). A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5310-4.
- Kumar, R. and Thompson, E. B.** (2003). Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol Endocrinol* **17**, 1-10.
- Kumar, S., Saradhi, M., Chaturvedi, N. K. and Tyagi, R. K.** (2006). Intracellular localization and nucleocytoplasmic trafficking of steroid receptors: an overview. *Mol Cell Endocrinol* **246**, 147-56.
- Laine, J. P. and Egly, J. M.** (2006). When transcription and repair meet: a complex system. *Trends Genet* **22**, 430-6.
- Lalli, E., Ohe, K., Hindelang, C. and Sassone-Corsi, P.** (2000). Orphan receptor DAX-1 is a shuttling RNA binding protein associated with polyribosomes via mRNA. *Mol Cell Biol* **20**, 4910-21.
- Lanz, R. B., McKenna, N. J., Onate, S. A., Albrecht, U., Wong, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W.** (1999). A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* **97**, 17-27.
- Laperriere, D., Wang, T. T., White, J. H. and Mader, S.** (2007). Widespread Alu repeat-driven expansion of consensus DR2 retinoic acid response elements during primate evolution. *BMC Genomics* **8**, 23.
- Laudet, V. and Gronemeyer, H.** (2002). The nuclear receptors factsbook. London: Academic Press.
- Lavery, D. N. and McEwan, I. J.** (2005). Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochem J* **391**, 449-64.
- Lazar, M. A.** (2003). Nuclear receptor corepressors. *Nucl Recept Signal* **1**, e001.
- Le Douarin, B., Zechel, C., Garnier, J. M., Lutz, Y., Tora, L., Pierrat, P., Heery, D., Gronemeyer, H., Chambon, P. and Losson, R.** (1995). The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *Embo J* **14**, 2020-33.
- Lee, C. H. and Wei, L. N.** (1999). Characterization of receptor-interacting protein 140 in retinoid receptor activities. *J Biol Chem* **274**, 31320-6.
- Lee, D., Ezhkova, E., Li, B., Pattenden, S. G., Tansey, W. P. and Workman, J. L.** (2005). The proteasome regulatory particle alters the SAGA coactivator to enhance its interactions with transcriptional activators. *Cell* **123**, 423-36.
- Lee, G. M., Pufall, M. A., Meeker, C. A., Kang, H. S., Graves, B. J. and McIntosh, L. P.** (2008). The affinity of Ets-1 for DNA is modulated by phosphorylation through transient interactions of an unstructured region. *J Mol Biol* **382**, 1014-30.
- 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**, 32193-9.
- Lee, M. S., Kliewer, S. A., Provencal, J., Wright, P. E. and Evans, R. M.** (1993). Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding. *Science* **260**, 1117-21.

- Lee, S., Lee, B., Lee, J. W. and Lee, S. K. (2009). Retinoid signaling and neurogenin2 function are coupled for the specification of spinal motor neurons through a chromatin modifier CBP. *Neuron* **62**, 641-54.
- Lee, Y. H., Campbell, H. D. and Stallcup, M. R. (2004). Developmentally essential protein flightless I is a nuclear receptor coactivator with actin binding activity. *Mol Cell Biol* **24**, 2103-17.
- Lefebvre, B., Brand, C., Flajollet, S. and Lefebvre, P. (2006). Down-regulation of the tumor suppressor gene retinoic acid receptor beta2 through the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway. *Mol Endocrinol* **20**, 2109-21.
- Lefebvre, B., Ozato, K. and Lefebvre, P. (2002). Phosphorylation of histone H3 is functionally linked to retinoic acid receptor beta promoter activation. *EMBO Rep* **3**, 335-40.
- Lefebvre, P., Gaub, M. P., Tahayato, A., Rochette-Egly, C. and Formstecher, P. (1995). Protein phosphatases 1 and 2A regulate the transcriptional and DNA binding activities of retinoic acid receptors. *J Biol Chem* **270**, 10806-16.
- Lefebvre, P., Martin, P. J., Flajollet, S., Dedieu, S., Billaut, X. and Lefebvre, B. (2005). Transcriptional activities of retinoic acid receptors. *Vitam Horm* **70**, 199-264.
- Leid, M., Kastner, P. and Chambon, P. (1992). Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci* **17**, 427-33.
- Li, C., Liang, Y. Y., Feng, X. H., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (2008). Essential phosphatases and a phospho-degron are critical for regulation of SRC-3/AIB1 coactivator function and turnover. *Mol Cell* **31**, 835-49.
- Li, D., Zimmerman, T. L., Thevananther, S., Lee, H. Y., Kurie, J. M. and Karpen, S. J. (2002). Interleukin-1 beta-mediated suppression of RXR:RAR transactivation of the Ntcp promoter is JNK-dependent. *J Biol Chem* **277**, 31416-22.
- Li, H. J., Haque, Z. K., Chen, A. and Mendelsohn, M. (2007). RIF-1, a novel nuclear receptor corepressor that associates with the nuclear matrix. *J Cell Biochem* **102**, 1021-35.
- Li, J., Wang, J., Wang, J., Nawaz, Z., Liu, J. M., Qin, J. and Wong, J. (2000). Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *Embo J* **19**, 4342-50.
- Li, S. S. (2005). Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J* **390**, 641-53.
- Li, Y., Lambert, M. H. and Xu, H. E. (2003). Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics. *Structure* **11**, 741-6.
- Liao, Y. P., Ho, S. Y. and Liou, J. C. (2004). Non-genomic regulation of transmitter release by retinoic acid at developing motoneurons in *Xenopus* cell culture. *J Cell Sci* **117**, 2917-24.
- Lin, Z., Reierstad, S., Huang, C. C. and Bulun, S. E. (2007). Novel estrogen receptor-alpha binding sites and estradiol target genes identified by chromatin immunoprecipitation cloning in breast cancer. *Cancer Res* **67**, 5017-24.
- Liou, J. C., Ho, S. Y., Shen, M. R., Liao, Y. P., Chiu, W. T. and Kang, K. H. (2005). A rapid, nongenomic pathway facilitates the synaptic transmission induced by retinoic acid at the developing synapse. *J Cell Sci* **118**, 4721-30.
- Lippens, G., Landrieu, I. and Smet, C. (2007). Molecular mechanisms of the phospho-dependent prolyl cis/trans isomerase Pin1. *Febs J* **274**, 5211-22.
- Lolli, G. and Johnson, L. N. (2005). CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? *Cell Cycle* **4**, 572-7.

- Lopez-Andreo, M. J., Torrecillas, A., Conesa-Zamora, P., Corbalan-Garcia, S. and Gomez-Fernandez, J. C.** (2005). Retinoic acid as a modulator of the activity of protein kinase Calpha. *Biochemistry* **44**, 11353-60.
- 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**, 25297-304.
- Loudig, O., Babichuk, C., White, J., Abu-Abed, S., Mueller, C. and Petkovich, M.** (2000). Cytochrome P450RAI(CYP26) promoter: a distinct composite retinoic acid response element underlies the complex regulation of retinoic acid metabolism. *Mol Endocrinol* **14**, 1483-97.
- Lu, T. C., Wang, Z., Feng, X., Chuang, P., Fang, W., Chen, Y., Neves, S., Maayan, A., Xiong, H., Liu, Y. et al.** (2008). Retinoic acid utilizes CREB and USF1 in a transcriptional feed-forward loop in order to stimulate MKP1 expression in human immunodeficiency virus-infected podocytes. *Mol Cell Biol* **28**, 5785-94.
- MacDonald, B. T., Tamai, K. and He, X.** (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* **17**, 9-26.
- Mackem, S., Baumann, C. T. and Hager, G. L.** (2001). A glucocorticoid/retinoic acid receptor chimera that displays cytoplasmic/nuclear translocation in response to retinoic acid. A real time sensing assay for nuclear receptor ligands. *J Biol Chem* **276**, 45501-4.
- Macoritto, M., Nguyen-Yamamoto, L., Huang, D. C., Samuel, S., Yang, X. F., Wang, T. T., White, J. H. and Kremer, R.** (2008). Phosphorylation of the human retinoid X receptor alpha at serine 260 impairs coactivator(s) recruitment and induces hormone resistance to multiple ligands. *J Biol Chem* **283**, 4943-56.
- Maden, M.** (2007). Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* **8**, 755-65.
- Mader, S., Chen, J. Y., Chen, Z., White, J., Chambon, P. and Gronemeyer, H.** (1993a). The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains. *Embo J* **12**, 5029-41.
- Mader, S., Leroy, P., Chen, J. Y. and Chambon, P.** (1993b). 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.
- Maghsoodi, B., Poon, M. M., Nam, C. I., Aoto, J., Ting, P. and Chen, L.** (2008). Retinoic acid regulates RARalpha-mediated control of translation in dendritic RNA granules during homeostatic synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16015-20.
- Mangelsdorf, D. J. and Evans, R. M.** (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**, 841-50.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. et al.** (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-9.
- Mangelsdorf, D. J., Umesono, K., Kliewer, S. A., Borgmeyer, U., Ong, E. S. and Evans, R. M.** (1991). A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* **66**, 555-61.
- Mann, K. K., Padovani, A. M., Guo, Q., Colosimo, A. L., Lee, H. Y., Kurie, J. M. and Miller, W. H., Jr.** (2005). Arsenic trioxide inhibits nuclear receptor function *via* SEK1/JNK-mediated RXRalpha phosphorylation. *J Clin Invest* **115**, 2924-33.

- Mark, M., Ghyselinck, N. B. and Chambon, P.** (2009). Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nucl Recept Signal* **7**, e002.
- Martin, P. J., Delmotte, M. H., Formstecher, P. and Lefebvre, P.** (2003). PLZF is a negative regulator of retinoic acid receptor transcriptional activity. *Nucl Recept* **1**, 6.
- 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**, 12425-32.
- Masia, S., Alvarez, S., de Lera, A. R. and Baretino, D.** (2007). Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Mol Endocrinol* **21**, 2391-402.
- Masui, Y., Mezaki, Y., Sakari, M., Takeyama, K., Yoshida, T., Inoue, K., Yanagisawa, J., Hanazawa, S., O'Malley B. W. and Kato, S.** (2005). Splicing potentiation by growth factor signals *via* estrogen receptor phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8126-31.
- Matsuyama, M., Mizusaki, H., Shimono, A., Mukai, T., Okumura, K., Abe, K., Shimada, K. and Morohashi, K.** (2005). A novel isoform of Vinexin, Vinexin gamma, regulates Sox9 gene expression through activation of MAPK cascade in mouse fetal gonad. *Genes Cells* **10**, 421-34.
- Mayer, B. J.** (2001). SH3 domains: complexity in moderation. *J Cell Sci* **114**, 1253-63.
- McEwan, I. J., Lavery, D., Fischer, K. and Watt, K.** (2007). Natural disordered sequences in the amino terminal domain of nuclear receptors: lessons from the androgen and glucocorticoid receptors. *Nucl Recept Signal* **5**, e001.
- McNamara, S., Wang, H., Hanna, N. and Miller, W. H., Jr.** (2008). Topoisomerase IIbeta negatively modulates retinoic acid receptor alpha function: a novel mechanism of retinoic acid resistance. *Mol Cell Biol* **28**, 2066-77.
- Meijsing, S. H., Pufall, M. A., So, A. Y., Bates, D. L., Chen, L. and Yamamoto, K. R.** (2009). DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science* **324**, 407-10.
- Mey, J., Schrage, K., Wessels, I. and Vollpracht-Crijns, I.** (2007). Effects of inflammatory cytokines IL-1beta, IL-6, and TNFalpha on the intracellular localization of retinoid receptors in Schwann cells. *Glia* **55**, 152-64.
- Mezaki, Y., Yamaguchi, N., Yoshikawa, K., Miura, M., Imai, K., Itoh, H. and Senoo, H.** (2009). Insoluble, speckled cytosolic distribution of retinoic acid receptor alpha protein as a marker of hepatic stellate cell activation *in vitro*. *J Histochem Cytochem* **57**, 687-99.
- Mitsushima, M., Sezaki, T., Akahane, R., Ueda, K., Suetsugu, S., Takenawa, T. and Kioka, N.** (2006a). Protein kinase A-dependent increase in WAVE2 expression induced by the focal adhesion protein vinexin. *Genes Cells* **11**, 281-92.
- Mitsushima, M., Suwa, A., Amachi, T., Ueda, K. and Kioka, N.** (2004). Extracellular signal-regulated kinase activated by epidermal growth factor and cell adhesion interacts with and phosphorylates vinexin. *J Biol Chem* **279**, 34570-7.
- Mitsushima, M., Takahashi, H., Shishido, T., Ueda, K. and Kioka, N.** (2006b). Abl kinase interacts with and phosphorylates vinexin. *FEBS Lett* **580**, 4288-95.
- Mitsushima, M., Ueda, K. and Kioka, N.** (2006c). Vinexin beta regulates the phosphorylation of epidermal growth factor receptor on the cell surface. *Genes Cells* **11**, 971-82.
- Mitsushima, M., Ueda, K. and Kioka, N.** (2007). Involvement of phosphatases in the anchorage-dependent regulation of ERK2 activation. *Exp Cell Res* **313**, 1830-8.

- Mizutani, K., Ito, H., Iwamoto, I., Morishita, R., Deguchi, T., Nozawa, Y., Asano, T. and Nagata, K. I.** (2007). Essential roles of ERK-mediated phosphorylation of vimentin in cell spreading, migration and anchorage-independent growth. *Oncogene* **26**, 7122-31.
- Moras, D. and Gronemeyer, H.** (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 384-91.
- Mulholland, D. J., Dedhar, S., Coetzee, G. A. and Nelson, C. C.** (2005). Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr Rev* **26**, 898-915.
- Murata, S., Yashiroda, H. and Tanaka, K.** (2009). Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 104-15.
- Nagpal, S., Friant, S., Nakshatri, H. and Chambon, P.** (1993). RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *Embo J* **12**, 2349-60.
- Nagpal, S., Saunders, M., Kastner, P., Durand, B., Nakshatri, H. and Chambon, P.** (1992). Promoter context- and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. *Cell* **70**, 1007-19.
- Nagy, L., Kao, H. Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., Schreiber, S. L. and Evans, R. M.** (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* **89**, 373-80.
- Nagy, L., Kao, H. Y., Love, J. D., Li, C., Banayo, E., Gooch, J. T., Krishna, V., Chatterjee, K., Evans, R. M. and Schwabe, J. W.** (1999). Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev* **13**, 3209-16.
- 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 C $\alpha$  and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase. *Mol Carcinog* **38**, 106-16.
- Nervi, C., Grippo, J. F., Sherman, M. I., George, M. D. and Jetten, A. M.** (1989). Identification and characterization of nuclear retinoic acid-binding activity in human myeloblastic leukemia HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5854-8.
- Nielsen, R., Pedersen, T. A., Hagenbeek, D., Moulos, P., Siersbaek, R., Megens, E., Denissov, S., Borgesen, M., Francoijs, K. J., Mandrup, S. et al.** (2008). Genome-wide profiling of PPAR $\gamma$ :RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis. *Genes Dev* **22**, 2953-67.
- Nolte, R. T., Wisely, G. B., Westin, S., Cobb, J. E., Lambert, M. H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M. G., Willson, T. M., Glass, C. K. and Milburn, M. V.** (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *Nature* **395**, 137-43.
- O'Malley, B. W., Qin, J. and Lanz, R. B.** (2008). Cracking the coregulator codes. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 310-5.
- Ochoa, W. F., Torrecillas, A., Fita, I., Verdaguer, N., Corbalan-Garcia, S. and Gomez-Fernandez, J. C.** (2003). Retinoic acid binds to the C2-domain of protein kinase C $\alpha$ . *Biochemistry* **42**, 8774-9.
- Ohashi, E., Kogai, T., Kagechika, H. and Brent, G. A.** (2009). Activation of the PI3 kinase pathway by retinoic acid mediates sodium/iodide symporter induction and iodide transport in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* **69**, 3443-50.



- Onate, S. A., Boonyaratanakornkit, V., Spencer, T. E., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., Edwards, D. P. and O'Malley, B. W.** (1998). The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *J Biol Chem* **273**, 12101-8.
- Ordenez-Moran, P. and Munoz, A.** (2009). Nuclear receptors: genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle* **8**, 1675-80.
- 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**, 4909-18.
- Oulad-Abdelghani, M., Chazaud, C., Bouillet, P., Sapin, V., Chambon, P. and Dolle, P.** (1997). Meis2, a novel mouse Pbx-related homeobox gene induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Dev Dyn* **210**, 173-83.
- Pan, J., Kao, Y. L., Joshi, S., Jeetendran, S., Dipette, D. and Singh, U. S.** (2005). Activation of Rac1 by phosphatidylinositol 3-kinase in vivo: role in activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways and retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells. *J Neurochem* **93**, 571-83.
- Pasquali, D., Chieffi, P., Deery, W. J., Nicoletti, G., Bellastella, A. and Sinisi, A. A.** (2005). Differential effects of all-trans-retinoic acid (RA) on Erk1/2 phosphorylation and cAMP accumulation in normal and malignant human prostate epithelial cells: Erk1/2 inhibition restores RA-induced decrease of cell growth in malignant prostate cells. *Eur J Endocrinol* **152**, 663-9.
- Paternotte, N., Zhang, J., Vandenbroere, I., Backers, K., Blero, D., Kioka, N., Vanderwinden, J. M., Pirson, I. and Erneux, C.** (2005). SHIP2 interaction with the cytoskeletal protein Vinexin. *Febs J* **272**, 6052-66.
- Pavri, R., Lewis, B., Kim, T. K., Dilworth, F. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., de Murcia, G., Evans, R., Chambon, P. and Reinberg, D.** (2005). PARP-1 determines specificity in a retinoid signaling pathway via direct modulation of mediator. *Mol Cell* **18**, 83-96.
- Pederson, T.** (2000). Half a century of "the nuclear matrix". *Mol Biol Cell* **11**, 799-805.
- Percipalle, P. and Visa, N.** (2006). Molecular functions of nuclear actin in transcription. *J Cell Biol* **172**, 967-71.
- Perissi, V., Aggarwal, A., Glass, C. K., Rose, D. W. and Rosenfeld, M. G.** (2004). A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell* **116**, 511-26.
- Perissi, V. and Rosenfeld, M. G.** (2005). Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 542-54.
- Perissi, V., Scafoglio, C., Zhang, J., Ohgi, K. A., Rose, D. W., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G.** (2008). TBL1 and TBLR1 phosphorylation on regulated gene promoters overcomes dual CtBP and NCoR/SMRT transcriptional repression checkpoints. *Mol Cell* **29**, 755-66.
- Perissi, V., Staszewski, L. M., McInerney, E. M., Kurokawa, R., Krones, A., Rose, D. W., Lambert, M. H., Milburn, M. V., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G.** (1999). Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev* **13**, 3198-208.
- Perlmann, T., Rangarajan, P. N., Umesono, K. and Evans, R. M.** (1993). Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. *Genes Dev* **7**, 1411-22.
- 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**, 444-50.

- Pogenberg, V., Guichou, J. F., Vivat-Hannah, V., Kammerer, S., Perez, E., Germain, P., de Lera, A. R., Gronemeyer, H., Royer, C. A. and Bourguet, W.** (2005). 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* **280**, 1625-33.
- Poon, M. M. and Chen, L.** (2008). Retinoic acid-gated sequence-specific translational control by RARalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20303-8.
- Privalsky, M. L.** (2004). The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol* **66**, 315-60.
- Prufer, K. and Barsony, J.** (2002). Retinoid X receptor dominates the nuclear import and export of the unliganded vitamin D receptor. *Mol Endocrinol* **16**, 1738-51.
- Pufall, M. A., Lee, G. M., Nelson, M. L., Kang, H. S., Velyvis, A., Kay, L. E., McIntosh, L. P. and Graves, B. J.** (2005). Variable control of Ets-1 DNA binding by multiple phosphates in an unstructured region. *Science* **309**, 142-5.
- Qian, A., Cai, Y., Magee, T. R. and Wan, Y. J.** (2000). Identification of retinoic acid-responsive elements on the HNF1alpha and HNF4alpha genes. *Biochem Biophys Res Commun* **276**, 837-42.
- Rachez, C., Sautiere, P., Formstecher, P. and Lefebvre, P.** (1996). Identification of amino acids critical for the DNA binding and dimerization properties of the human retinoic acid receptor alpha. Importance of lysine 360, lysine 365, and valine 361. *J Biol Chem* **271**, 17996-8006.
- Radomska-Pandya, A., Chen, G., Czernik, P. J., Little, J. M., Samokyszyn, V. M., Carter, C. A. and Nowak, G.** (2000). Direct interaction of all-trans-retinoic acid with protein kinase C (PKC). Implications for PKC signaling and cancer therapy. *J Biol Chem* **275**, 22324-30.
- Rastinejad, F.** (2001). Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 33-8.
- Rastinejad, F., Wagner, T., Zhao, Q. and Khorasanizadeh, S.** (2000). Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. *Embo J* **19**, 1045-54.
- Ravid, T. and Hochstrasser, M.** (2008). Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 679-90.
- Reddy, A. P., Chen, J. Y., Zacharewski, T., Gronemeyer, H., Voorhees, J. J. and Fisher, G. J.** (1992). Characterization and purification of human retinoic acid receptor-gamma 1 overexpressed in the baculovirus-insect cell system. *Biochem J* **287** ( Pt 3), 833-40.
- Reichrath, J., Mittmann, M., Kamradt, J. and Muller, S. M.** (1997). Expression of retinoid-X receptors (-alpha,-beta,-gamma) and retinoic acid receptors (-alpha,-beta,-gamma) in normal human skin: an immunohistological evaluation. *Histochem J* **29**, 127-33.
- Renaud, J. P. and Moras, D.** (2000). Structural studies on nuclear receptors. *Cell Mol Life Sci* **57**, 1748-69.
- Renaud, J. P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Moras, D.** (1995). Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* **378**, 681-9.
- Richter, F., Joyce, A., Fromowitz, F., Wang, S., Watson, J., Watson, R., Irwin, R. J., Jr. and Huang, H. F.** (2002). Immunohistochemical localization of the retinoic Acid receptors in human prostate. *J Androl* **23**, 830-8.
- Rochette-Egly, C.** (2003). Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal* **15**, 355-66.

- Rochette-Egly, C.** (2005). Dynamic combinatorial networks in nuclear receptor-mediated transcription. *J Biol Chem* **280**, 32565-8.
- 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., Gaub, M. P., Lutz, Y., Ali, S., Scheuer, I. and Chambon, P.** (1992). Retinoic acid receptor-beta: immunodetection and phosphorylation on tyrosine residues. *Mol Endocrinol* **6**, 2197-209.
- Rochette-Egly, C. and Germain, P.** (2009). Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal* **7**, e005.
- Rochette-Egly, C., Lutz, Y., Saunders, M., Scheuer, I., Gaub, M. P. and Chambon, P.** (1991). Retinoic acid receptor gamma: specific immunodetection and phosphorylation. *J Cell Biol* **115**, 535-45.
- 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**, 860-71.
- Rochette-Egly, C., Plassat, J. L., Taneja, R. and Chambon, P.** (2000). The AF-1 and AF-2 activating domains of retinoic acid receptor-alpha (RARalpha) and their phosphorylation are differentially involved in parietal endodermal differentiation of F9 cells and retinoid-induced expression of target genes. *Mol Endocrinol* **14**, 1398-410.
- Rosenfeld, M. G., Lunyak, V. V. and Glass, C. K.** (2006). Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* **20**, 1405-28.
- Schaufele, F., Carbonell, X., Guerbodot, M., Borngraeber, S., Chapman, M. S., Ma, A. A., Miner, J. N. and Diamond, M. I.** (2005). The structural basis of androgen receptor activation: intramolecular and intermolecular amino-carboxy interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9802-7.
- Schultz, P., Fribourg, S., Poterszman, A., Mallouh, V., Moras, D. and Egly, J. M.** (2000). Molecular structure of human TFIID. *Cell* **102**, 599-607.
- Schwerk, C., Prasad, J., Degenhardt, K., Erdjument-Bromage, H., White, E., Tempst, P., Kidd, V. J., Manley, J. L., Lahti, J. M. and Reinberg, D.** (2003). ASAP, a novel protein complex involved in RNA processing and apoptosis. *Mol Cell Biol* **23**, 2981-90.
- Shao, W., Halachmi, S. and Brown, M.** (2002). ERAP140, a conserved tissue-specific nuclear receptor coactivator. *Mol Cell Biol* **22**, 3358-72.
- Shaw, P. E.** (2007). Peptidyl-prolyl cis/trans isomerases and transcription: is there a twist in the tail? *EMBO Rep* **8**, 40-5.
- Sheridan, D. L., Kong, Y., Parker, S. A., Dalby, K. N. and Turk, B. E.** (2008). Substrate discrimination among mitogen-activated protein kinases through distinct docking sequence motifs. *J Biol Chem* **283**, 19511-20.
- Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A. and Greene, G. L.** (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* **95**, 927-37.
- Shinozaki, Y., Sato, Y., Koizumi, S., Ohno, Y., Nagao, T. and Inoue, K.** (2007). Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-mediated cell death by inhibition of c-jun-N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Neuroscience* **147**, 153-63.

- Si, J., Mueller, L. and Collins, S. J.** (2007). CaMKII regulates retinoic acid receptor transcriptional activity and the differentiation of myeloid leukemia cells. *J Clin Invest* **117**, 1412-21.
- Sims, R. J., 3rd and Reinberg, D.** (2008). Is there a code embedded in proteins that is based on post-translational modifications? *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 815-20.
- 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**, 391-9.
- Skafar, D. F. and Zhao, C.** (2008). The multifunctional estrogen receptor-alpha F domain. *Endocrine* **33**, 1-8.
- Smith, W. C., Nakshatri, H., Leroy, P., Rees, J. and Chambon, P.** (1991). A retinoic acid response element is present in the mouse cellular retinol binding protein I (mCRBPI) promoter. *Embo J* **10**, 2223-30.
- Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C. D., Zhou, J., Mizzen, C. A., McKenna, N. J., Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. et al.** (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* **389**, 194-8.
- 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**, 1054-69.
- Srinivas, H., Xia, D., Moore, N. L., Uray, I. P., Kim, H., Ma, L., Weigel, N. L., Brown, P. H. and Kurie, J. M.** (2006). Akt phosphorylates and suppresses the transactivation of retinoic acid receptor alpha. *Biochem J* **395**, 653-62.
- Stanya, K. J. and Kao, H. Y.** (2009). New insights into the functions and regulation of the transcriptional corepressors SMRT and N-CoR. *Cell Div* **4**, 7.
- Stanya, K. J., Liu, Y., Means, A. R. and Kao, H. Y.** (2008). Cdk2 and Pin1 negatively regulate the transcriptional corepressor SMRT. *J Cell Biol* **183**, 49-61.
- 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**, 329-59.
- Sun, K., Montana, V., Chellappa, K., Brelivet, Y., Moras, D., Maeda, Y., Parpura, V., Paschal, B. M. and Sladek, F. M.** (2007). Phosphorylation of a conserved serine in the deoxyribonucleic acid binding domain of nuclear receptors alters intracellular localization. *Mol Endocrinol* **21**, 1297-311.
- Tahayato, A., Lefebvre, P., Formstecher, P. and Dautrevaux, M.** (1993). A protein kinase C-dependent activity modulates retinoic acid-induced transcription. *Mol Endocrinol* **7**, 1642-53.
- Takahashi, H., Mitsushima, M., Okada, N., Ito, T., Aizawa, S., Akahane, R., Umemoto, T., Ueda, K. and Kioka, N.** (2005). Role of interaction with vinculin in recruitment of vinxins to focal adhesions. *Biochem Biophys Res Commun* **336**, 239-46.
- Takimoto, G. S., Tung, L., Abdel-Hafiz, H., Abel, M. G., Sartorius, C. A., Richer, J. K., Jacobsen, B. M., Bain, D. L. and Horwitz, K. B.** (2003). Functional properties of the N-terminal region of progesterone receptors and their mechanistic relationship to structure. *J Steroid Biochem Mol Biol* **85**, 209-19.
- Taneja, R., Rochette-Egly, C., Plassat, J. L., Penna, L., Gaub, M. P. and Chambon, P.** (1997). Phosphorylation of activation functions AF-1 and AF-2 of RAR alpha and RAR gamma is indispensable for differentiation of F9 cells upon retinoic acid and cAMP treatment. *Embo J* **16**, 6452-65.
- Tange, T. O., Shibuya, T., Jurica, M. S. and Moore, M. J.** (2005). Biochemical analysis of the EJC reveals two new factors and a stable tetrameric protein core. *Rna* **11**, 1869-83.

- 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**, 2277-88.
- Tate, B. F., Allenby, G., Perez, J. R., Levin, A. A. and Grippo, J. F.** (1996). A systematic analysis of the AF-2 domain of human retinoic acid receptor alpha reveals amino acids critical for transcriptional activation and conformational integrity. *Faseb J* **10**, 1524-31.
- Tavera-Mendoza, L., Wang, T. T., Lallemand, B., Zhang, R., Nagai, Y., Bourdeau, V., Ramirez-Calderon, M., Desbarats, J., Mader, S. and White, J. H.** (2006). Convergence of vitamin D and retinoic acid signalling at a common hormone response element. *EMBO Rep* **7**, 180-5.
- Tiefenbach, J., Novac, N., Ducasse, M., Eck, M., Melchior, F. and Heinzl, T.** (2006). SUMOylation of the corepressor N-CoR modulates its capacity to repress transcription. *Mol Biol Cell* **17**, 1643-51.
- Ting, H. J. and Chang, C.** (2008). Actin associated proteins function as androgen receptor coregulators: an implication of androgen receptor's roles in skeletal muscle. *J Steroid Biochem Mol Biol* **111**, 157-63.
- Torchia, J., Rose, D. W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G.** (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* **387**, 677-84.
- Tsai, L. N., Ku, T. K., Salib, N. K. and Crowe, D. L.** (2008). Extracellular signals regulate rapid coactivator recruitment at AP-1 sites by altered phosphorylation of both CREB binding protein and c-jun. *Mol Cell Biol* **28**, 4240-50.
- 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**, 6824-36.
- Tujague, M., Thomsen, J. S., Mizuki, K., Sadek, C. M. and Gustafsson, J. A.** (2004). The focal adhesion protein vinexin alpha regulates the phosphorylation and activity of estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* **279**, 9255-63.
- 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**, 1255-66.
- Urano, A., Sugawara, A., Kanatsuka, H., Kagechika, H., Saito, A., Sato, K., Kudo, M., Takeuchi, K. and Ito, S.** (2005). Upregulation of nitric oxide production in vascular endothelial cells by all-trans retinoic acid through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Circulation* **112**, 727-36.
- Valverde, M. A. and Parker, M. G.** (2002). Classical and novel steroid actions: a unified but complex view. *Trends Biochem Sci* **27**, 172-3.
- Vermeulen, M., Carrozza, M. J., Lasonder, E., Workman, J. L., Logie, C. and Stunnenberg, H. G.** (2004). In vitro targeting reveals intrinsic histone tail specificity of the Sin3/histone deacetylase and N-CoR/SMRT corepressor complexes. *Mol Cell Biol* **24**, 2364-72.
- Vermeulen, M., Mulder, K. W., Denissov, S., Pijnappel, W. W., van Schaik, F. M., Varier, R. A., Baltissen, M. P., Stunnenberg, H. G., Mann, M. and Timmers, H. T.** (2007). Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell* **131**, 58-69.
- Villa, R., Pasini, D., Gutierrez, A., Morey, L., Occhionorelli, M., Vire, E., Nomdedeu, J. F., Jenuwein, T., Pelicci, P. G., Minucci, S. et al.** (2007). Role of the polycomb repressive complex 2 in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Cell* **11**, 513-25.
- Voegel, J. J., Heine, M. J., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P. and Gronemeyer, H.** (1998). The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *Embo J* **17**, 507-19.

- Voegel, J. J., Heine, M. J., Zechel, C., Chambon, P. and Gronemeyer, H.** (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *Embo J* **15**, 3667-75.
- vom Baur, E., Zechel, C., Heery, D., Heine, M. J., Garnier, J. M., Vivat, V., Le Douarin, B., Gronemeyer, H., Chambon, P. and Losson, R.** (1996). Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *Embo J* **15**, 110-24.
- Vucetic, Z., Zhang, Z., Zhao, J., Wang, F., Soprano, K. J. and Soprano, D. R.** (2008). Acinus-S<sup>1</sup> represses retinoic acid receptor (RAR)-regulated gene expression through interaction with the B domains of RARs. *Mol Cell Biol* **28**, 2549-58.
- Wang, T. T., Tavera-Mendoza, L. E., Laperriere, D., Libby, E., MacLeod, N. B., Nagai, Y., Bourdeau, V., Konstorum, A., Lallemant, B., Zhang, R. et al.** (2005). Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol* **19**, 2685-95.
- Warnmark, A., Treuter, E., Wright, A. P. and Gustafsson, J. A.** (2003). Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol* **17**, 1901-9.
- Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Takeyama, K., Ogawa, S., Arai, Y., Suzawa, M., Kobayashi, Y., Yano, T., Yoshikawa, H. et al.** (2001). A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor alpha coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *Embo J* **20**, 1341-52.
- Weigel, N. L. and Moore, N. L.** (2007). Steroid receptor phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions. *Mol Endocrinol* **21**, 2311-9.
- 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**, 345-56.
- Welboren, W. J., Stunnenberg, H. G., Sweep, F. C. and Span, P. N.** (2007). Identifying estrogen receptor target genes. *Mol Oncol* **1**, 138-43.
- White, J. H., Fernandes, I., Mader, S. and Yang, X. J.** (2004). Corepressor recruitment by agonist-bound nuclear receptors. *Vitam Horm* **68**, 123-43.
- Williams, J. A., Kondo, N., Okabe, T., Takeshita, N., Pilchak, D. M., Koyama, E., Ochiai, T., Jensen, D., Chu, M. L., Kane, M. A. et al.** (2009). Retinoic acid receptors are required for skeletal growth, matrix homeostasis and growth plate function in postnatal mouse. *Dev Biol* **328**, 315-27.
- Wright, A. P., Zilliacus, J., McEwan, I. J., Dahlman-Wright, K., Almlöf, T., Carlstedt-Duke, J. and Gustafsson, J. A.** (1993). Structure and function of the glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* **47**, 11-9.
- Wright, P. E. and Dyson, H. J.** (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol* **293**, 321-31.
- Wright, P. E. and Dyson, H. J.** (2009). Linking folding and binding. *Curr Opin Struct Biol* **19**, 31-8.
- Wu, S. C. and Zhang, Y.** (2009). Minireview: role of protein methylation and demethylation in nuclear hormone signaling. *Mol Endocrinol* **23**, 1323-34.
- Wurtz, J. M., Bourguet, W., Renaud, J. P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D. and Gronemeyer, H.** (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol* **3**, 206.

- Xu, H. E., Stanley, T. B., Montana, V. G., Lambert, M. H., Shearer, B. G., Cobb, J. E., McKee, D. D., Galardi, C. M., Plunket, K. D., Nolte, R. T. et al. (2002). Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. *Nature* **415**, 813-7.
- Yang, W., Hong, Y. H., Shen, X. Q., Frankowski, C., Camp, H. S. and Leff, T. (2001). Regulation of transcription by AMP-activated protein kinase: phosphorylation of p300 blocks its interaction with nuclear receptors. *J Biol Chem* **276**, 38341-4.
- Yao, T. P., Ku, G., Zhou, N., Scully, R. and Livingston, D. M. (1996). The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10626-31.
- Yen, A., Roberson, M. S. and Varvayanis, S. (1999). Retinoic acid selectively activates the ERK2 but not JNK/SAPK or p38 MAP kinases when inducing myeloid differentiation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **35**, 527-32.
- 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**, 3163-72.
- Yoon, H. G., Chan, D. W., Huang, Z. Q., Li, J., Fondell, J. D., Qin, J. and Wong, J. (2003). Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: the roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1. *Embo J* **22**, 1336-46.
- Yoshimura, K., Muto, Y., Shimizu, M., Matsushima-Nishiwaki, R., Okuno, M., Takano, Y., Tsurumi, H., Kojima, S., Okano, Y. and Moriwaki, H. (2007). Phosphorylated retinoid X receptor alpha loses its heterodimeric activity with retinoic acid receptor beta. *Cancer Sci* **98**, 1868-74.
- Yu, J., Li, Y., Ishizuka, T., Guenther, M. G. and Lazar, M. A. (2003). A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the histone code and promotes histone deacetylation. *Embo J* **22**, 3403-10.
- Zanotto-Filho, A., Cammarota, M., Gelain, D. P., Oliveira, R. B., Delgado-Canedo, A., Dalmolin, R. J., Pasquali, M. A. and Moreira, J. C. (2008). Retinoic acid induces apoptosis by a non-classical mechanism of ERK1/2 activation. *Toxicol In Vitro* **22**, 1205-12.
- Zechel, C., Shen, X. Q., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1994a). Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements. *Embo J* **13**, 1414-24.
- Zechel, C., Shen, X. Q., Chen, J. Y., Chen, Z. P., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1994b). The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *Embo J* **13**, 1425-33.
- Zennaro, M. C., Souque, A., Viengchareun, S., Poisson, E. and Lombes, M. (2001). A new human MR splice variant is a ligand-independent transactivator modulating corticosteroid action. *Mol Endocrinol* **15**, 1586-98.
- Zhang, J., Kalkum, M., Chait, B. T. and Roeder, R. G. (2002). The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2. *Mol Cell* **9**, 611-23.
- Zhao, W. X., Tian, M., Zhao, B. X., Li, G. D., Liu, B., Zhan, Y. Y., Chen, H. Z. and Wu, Q. (2007). Orphan receptor TR3 attenuates the p300-induced acetylation of retinoid X receptor-alpha. *Mol Endocrinol* **21**, 2877-89.
- Zhao, X., Patton, J. R., Davis, S. L., Florence, B., Ames, S. J. and Spanjaard, R. A. (2004). Regulation of nuclear receptor activity by a pseudouridine synthase through posttranscriptional modification of steroid receptor RNA activator. *Mol Cell* **15**, 549-58.

- Zhao, Y., Goto, K., Saitoh, M., Yanase, T., Nomura, M., Okabe, T., Takayanagi, R. and Nawata, H.** (2002). Activation function-1 domain of androgen receptor contributes to the interaction between subnuclear splicing factor compartment and nuclear receptor compartment. Identification of the p102 U5 small nuclear ribonucleoprotein particle-binding protein as a coactivator for the receptor. *J Biol Chem* **277**, 30031-9.
- Zhao, Z. S., Manser, E. and Lim, L.** (2000). Interaction between PAK and nck: a template for Nck targets and role of PAK autophosphorylation. *Mol Cell Biol* **20**, 3906-17.
- Zhelyaznik, N. and Mey, J.** (2006). Regulation of retinoic acid receptors alpha, beta and retinoid X receptor alpha after sciatic nerve injury. *Neuroscience* **141**, 1761-74.
- Zheng, B., Han, M., Bernier, M. and Wen, J. K.** (2009). Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *Febs J* **276**, 2669-85.
- Zhu, J., Gianni, M., Kopf, E., Honore, N., Chelbi-Alix, M., Koken, M., Quignon, F., Rochette-Egly, C. and de The, H.** (1999a). 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**, 14807-12.
- Zhu, J., Koken, M. H., Quignon, F., Chelbi-Alix, M. K., Degos, L., Wang, Z. Y., Chen, Z. and de The, H.** (1997). Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3978-83.
- Zhu, W. Y., Jones, C. S., Amin, S., Matsukuma, K., Haque, M., Vuligonda, V., Chandraratna, R. A. and De Luca, L. M.** (1999b). Retinoic acid increases tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* **59**, 85-90.
- Zimmerman, T. L., Thevananther, S., Ghose, R., Burns, A. R. and Karpen, S. J.** (2006). Nuclear export of retinoid X receptor alpha in response to interleukin-1beta-mediated cell signaling: roles for JNK and SER260. *J Biol Chem* **281**, 15434-40.
- Zurita, M. and Merino, C.** (2003). The transcriptional complexity of the TFIID complex. *Trends Genet* **19**, 578-84.



**PUBLICATION n°1**

Signalement bibliographique ajouté par :

**L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**  
**Service Commun de la Documentation**

**Cyclin H binding to the RAR $\alpha$  activation function (AF)-2 domain directs phosphorylation of the AF-1 domain by cyclin-dependent kinase 7**

Gaétan BOUR, Émilie GAILLARD, Nathalie BRUCK, Sébastien LALEVÉE, Jean-Luc PLASSAT, Jean-Pierre SAMAMA and Cécile ROCHETTE-EGLY

**PNAS, 2005, vol. 102, no. 46, p. 16608-16613**

*Copyright © 2005, The National Academy of Sciences*

**Publication n° 1 :**

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0505556102>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

**PUBLICATION n°2**

Signalement bibliographique ajouté par :

**l'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**  
**Service Commun de la Documentation**

**Phosphorylation by PKA potentiates retinoic acid receptor  $\alpha$  activity by means of increasing interaction with and phosphorylation by cyclin H/cdk7**

Émilie GAILLARD, Nathalie BRUCK, Gaétan BOUR, Annie BAUER, Sébastien LALEVÉE, Olivier POCH, Dino MORAS and Cécile ROCHETTE-EGLY

**PNAS, 2006, vol. 103, no. 25, p. 9548-9553**

*Copyright © 2006 by The National Academy of Sciences of the USA*

**Publication n° 2 :**

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0509717103>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

**PUBLICATION n°3**

Signalement bibliographique ajouté par :

**L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**  
**Service Commun de la Documentation**

**Vinexin  $\beta$  Interacts with the Non-phosphorylated AF-1 Domain of Retinoid Receptor  $\gamma$  (RAR $\gamma$ ) and Represses RAR $\gamma$ -mediated Transcription**

Gaétan BOUR, Jean-Luc PLASSAT, Annie BAUER, Sébastien LALEVÉE, and Cécile ROCHETTE-EGLY

**The Journal of Biological Chemistry, 2005, vol. 280, n° 17, p. 17027-17037**

*Copyright © 2009 by American Society for Biochemistry and Molecular Biology*

**Publication n° 3 :**

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M501344200>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

**PUBLICATION n°4**

8/09/09

**Phosphorylation controls the interaction of the N-terminal proline-rich motif of Retinoic Acid Receptor gamma (RAR $\gamma$ ) with vinexin $\beta$ .**

**Sébastien Lalevée, Gaétan Bour\*, Marc Vitorino, Pascal Kessler, Marc Quinternet, Jean-Luc Vonesch, Bruno Kieffer and Cécile Rochette-Egly \*\***

**IGBMC** (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), **INSERM**, U596; **CNRS**, UMR7104; **Université de Strasbourg**, 1 rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch Cedex, France.

**\* present address: IRCAD, 67000 Strasbourg**

**\*\* Corresponding author. Tel. (33) 3 88 65 34 59; Fax. (33) 3 88 65 32 01; E-Mail: [cegly@igbmc.fr](mailto:cegly@igbmc.fr)**

**Running title: RAR $\gamma$  phosphorylation and interaction with vinexin $\beta$**



**ABSTRACT**

Nuclear retinoic acid (RA) receptors (RARs) activate gene expression through a network of coregulators, the association/dissociation of which is directed by the Ligand-Binding Domain (LBD). Recently it emerged that the N-terminal Domain (NTD) of RARs also plays a role through a conserved proline-rich motif, which contains phosphorylation sites. We previously reported that vinexin $\beta$ , a cytoskeleton adaptor protein with three SH3 domains, represses the transcription of RA-target genes via its interaction with the NTD of RAR $\gamma$ . Here we combined classical molecular and cellular approaches to biophysical techniques and we demonstrated that the third C-terminal SH-3 domain of vinexin $\beta$  binds the PxxPxR motif within the NTD of RAR $\gamma$  with a Kd around 80 $\mu$ M. In addition, phosphorylation of a serine residue adjacent to this motif induces the dissociation of vinexin $\beta$ . Finally, we defined the link between RAR $\gamma$  phosphorylation and vinexin $\beta$  for the regulation of RA-target genes. We show that in the absence of RA, vinexin $\beta$  interacts with the non-phosphorylated form of RAR $\gamma$  and sequesters the receptor in an inactive form out of the promoters of the target genes. Then in response to RA, RAR $\gamma$  becomes phosphorylated, leading to the dissociation of vinexin $\beta$  and RAR $\gamma$  recruitment to the promoters. These results highlight a new functional relationship between RARs and cytoskeleton proteins

Phosphorylation; Retinoic Acid Receptors; Transcription; Vinexin $\beta$

## INTRODUCTION

Retinoic Acid (RA) influences the differentiation, proliferation and apoptosis of a variety of cell types through modifications in the expression of target genes (Bour et al., 2006). The RA response is mediated by two classes of nuclear receptors, the RARs ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) and the RXRs ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ), which function as ligand-dependent heterodimeric RAR/RXR transcription activators (Germain et al., 2006a; Germain et al., 2006b). Gene induction by RAR/RXR heterodimers relies on a complex network of dynamic interactions with coregulatory proteins (For review see (Rochette-Egly and Germain, 2009)). Indeed, following the RA signal, RAR/RXR heterodimers bound at RA response elements (RAREs) initiate an ordered and coordinated dissociation and/or recruitment of a series of coregulator complexes with different enzymatic activities including Histone Acetyl and Methyl Transferases, and DNA-dependent ATPases. At the end, these events alter the chromatin structure surrounding the promoter of target genes and pave the way for the recruitment of the transcription machinery including RNA Polymerase II and the General Transcription Factors. This network is directed by the C-terminal AF-2 domain, which is located in the ligand-binding domain (LBD) and undergoes major structural rearrangements upon RA binding.

In addition to this scenario, it recently emerged that the N-terminal domain (NTD) of RARs also plays a role, adding more complexity to our understanding of RAR-mediated transcription. In contrast to the DNA binding domain (DBD) and the LBD, the NTDs of RARs are of naturally disordered structure (Dyson and Wright, 2005; Lavery and McEwan, 2005; Liu et al., 2006). However they depict a conserved proline-rich motif (PRM), which corresponds to region B and contains phosphorylation sites. In the case of the RAR $\gamma$ 1 subtype, there are two phosphorylation sites, (i) serine 79, which is phosphorylated by cdk7 the activity of which depends on its association with cyclin H and MAT1 to form the ternary cyclin-dependent kinase (CDK)-activating kinase (CAK) complex of the general transcription factor TFIIH (Bastien et al., 2000; Rochette-Egly et al., 1997) and (ii) serine 77 which is phosphorylated by p38MAPK (Gianni et al., 2002).

Most importantly, proline-rich motifs can bind proteins with modules such as the Src-homology 3 (SH3) domains, the WWdomains, the EVH1 domains, the GYF domains (also known as CD2-binding domains), the UEV domains, and the single-domain profilin proteins (Ball et al., 2005; Kay et al., 2000). In many cases phosphorylation prevents or favors the interaction (Kay et al., 2000; Macias et al., 2002; Sudol et al., 2001; Zarrinpar and Lim,

2000). Recently, we isolated a new partner of the RAR $\gamma$  NTD, vinexin $\beta$ , which belongs to the vinexin/CAP/Ponsin/ArgBP2 family of adaptor proteins and contains three SH3 domains (Kioka et al., 2002). Vinexin $\beta$  has been shown to be generally associated as a scaffolding protein to complexes involved in cytoskeleton organization and signal transduction (Kioka et al., 2002). However, vinexin $\beta$  is also one of a growing number of actin-binding proteins that are also present in the nucleus and modulate transcription (Bour et al., 2007; Zheng et al., 2009).

We demonstrated that vinexin $\beta$  interacts with the non-phosphorylated NTD of RAR $\gamma$  and represses RAR $\gamma$ -mediated transcription (Bour et al., 2005b). Here, we aimed at identifying the underlying mechanism of this interaction. By combining molecular, cellular and biophysical approaches, we characterized the residues involved in the interaction. We also demonstrated that in response to RA, RAR $\gamma$  phosphorylation at the cdk7 site located in the PRM induces the dissociation of vinexin $\beta$ . Finally, we defined the link between vinexin $\beta$  and RAR $\gamma$  for the activation of RA-target genes.

## RESULTS

### **The third C-terminal SH3 domain of vinexin $\beta$ interacts with the proline-rich motif of RAR $\gamma$ .**

Vinexin $\beta$  being characterized by the presence of three SH3 domains (Figure 1A), we first investigated which one is involved in the interaction with RAR $\gamma$ . Vinexin $\beta$  mutants deleted for each SH3 domain (Figure 1A) were analyzed for their ability to interact with GST-RAR $\gamma$ 1 (Figure 1B). We found that the interaction involves the third C-terminal SH3 domain of vinexin $\beta$ . Indeed deletion of this domain (in vinexin $\beta$ - $\Delta$ SH3-3) abrogated the interaction (Figure 1B, lane 9) while that of the first or second N-terminal SH3 domains (in vinexin $\beta$ - $\Delta$ SH3-1 and  $\Delta$ SH3-2) had no effect (Figure 1B, lanes 7 and 8). These results were confirmed in coimmunoprecipitation experiments performed with extracts from COS-1 cells over expressing RAR $\gamma$ 1 and the same FLAG-vinexin $\beta$  deletion mutants (Figure 1C).

Given that SH3 domains are known to interact with proline-rich motifs (PRMs) (Ball et al., 2005) and that the NTD of RAR $\gamma$ 1 contains such a PRM, we also investigated which residues within this motif are involved in the interaction. Interestingly, though well conserved between RARs, the PRM of RAR $\gamma$  differs from that of RAR $\alpha$  and RAR $\beta$  at one residue within a pentaproline segment. Indeed, prolines 81 and 83 in RAR $\gamma$ 1 are substituted by a leucine residue in RAR $\beta$  and RAR $\alpha$  respectively (Figure 1D). Therefore in a first step we analyzed whether such substitutions affected vinexin $\beta$  binding. We found that GST-RAR $\alpha$  did not interact with vinexin $\beta$  while GST-RAR $\beta$  retained the ability to interact with vinexin $\beta$  (Figure 1E). This suggests that proline in position 83 is required for the interaction. Then we substituted individually all the other proline residues (from P78 to P84) as well as the flanking basic R and K residues at positions 85 and 88, with alanine residues. Substitution of proline 80 and arginine 85 abrogated the interaction of vinexin $\beta$  (Figure 1F, lanes 4 and 7). Altogether these results indicate that vinexin $\beta$  interacts with RAR $\gamma$  via a PxxPxR motif with corresponds to a typical class II ligand for SH3 domains (Ball et al., 2005). Note that vinexin $\beta$  interacted as efficiently with the RAR $\gamma$ 2 isoform, which differs from RAR $\gamma$ 1 at the N-terminal A region and in which the B region containing the PRM is conserved (data not shown).

**Phosphorylation of the RAR $\gamma$  PRM at serine 79 prevents vinexin $\beta$  binding.**

The RAR $\gamma$ 1 PxxPxR motif involved in the interaction with vinexin $\beta$  is flanked at the N-terminal end by two serine residues (S77 and S79) (Figure 2A) and we previously demonstrated that these serines can be phosphorylated by p38MAPK and the cdk7/cyclin H/MAT1 sub complex of the general transcription factor TFIIH, respectively (Bastien et al., 2000; Gianni et al., 2002). Therefore we aimed at investigating whether phosphorylation of these serine residues modulates the interaction of RAR $\gamma$  with vinexin $\beta$ .

GST-RAR $\gamma$ 1 mutants with each serine (S77 and/or S79) substituted with a glutamic acid that mimics a phosphorylated residue (Figure 2A) were constructed and compared to GST-RAR $\gamma$ 1WT for their interaction with vinexin $\beta$ . When expressed in *E.coli*, GST-RAR $\gamma$ 1WT is not phosphorylated and interacts with vinexin $\beta$  (Figure 2B, lane 3). GST-RAR $\gamma$ S77E interacted as efficiently as the WT receptor (Figure 2B, lane 4). However, the S79E mutant did not interact at all with vinexin $\beta$  (Figure 2B, lane 5). The double S77E/S79E mutant did not interact either (Figure 2B, lane 6). These results indicate that phosphorylation of S79 prevents the interaction of RAR $\gamma$  with vinexin $\beta$ . They were confirmed in coimmunoprecipitation experiments performed with extracts from COS-1 cells over expressing vinexin $\beta$  and the same RAR $\gamma$ 1 S77E, S79E or S77E/S79E mutants (Figure 2C). Interestingly, RAR $\gamma$ 1 with S79 substituted with an alanine residue which mimics a non-phosphorylated form, interacted more efficiently with vinexin $\beta$  than RAR $\gamma$ 1WT, in coimmunoprecipitation experiments (Figure 2C, lanes 5 and 6), suggesting that in transfected cells, a fraction of the RAR $\gamma$ 1 pool would be already phosphorylated at this residue.

Then we used imaging Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) to examine direct RAR $\gamma$ -vinexin $\beta$  interactions in living cells. COS-1 cells were transfected with a CFP-RAR $\gamma$  vector along with the SH3-3 domain of vinexin $\beta$  fused in C-terminal of the YFP fluorochrome [YFP-V (SH3-3)]. A significant FRET signal was produced in nuclei coexpressing CFP-RAR $\gamma$  and YFP-V (SH3-3) (Figure 2D, lane 7). The FRET signal was higher when S79 within the PRM of RAR $\gamma$  was substituted with an alanine (Figure 2D, lane 5), but decreased significantly when the same serine residue was substituted by a glutamic acid (Figure 2D, lane 8). Similar results were obtained with the AB regions of RAR $\gamma$  fused to CFP [CFP-RAR $\gamma$ (AB)S79A] (Figure 2D, lane 3) and when the CFP fluorochrome was fused at the C-terminal end of RAR $\gamma$  (Figure 2D, lanes 4 and 6). As a positive control, COS-1 cells were transfected with a CFP-YFP construct in which CFP and YFP were linked via 10 amino acids (Figure 2D, lane 1). Negative FRET controls have been also established with cells co-

transfected independently with CFP and YFP (Figure 2D, lane 2). Collectively these data suggest that phosphorylation of S79 impedes the interaction of RAR $\gamma$  with vinexin $\beta$ .

### **Affinity and molecular mechanism of the interaction between the SH3-3 domain of vinexin $\beta$ and the PRM of RAR $\gamma$ .**

We used surface plasmon resonance (SPR) to measure the equilibrium affinity and kinetic parameters of interaction of the SH3-3 domain of vinexin $\beta$  (V-SH3-3) with synthetic peptides corresponding to the PRM of RAR $\gamma$  (Table 1 and Figure 3A). Affinity between V-SH3-3 and peptide PI121 that corresponds to the non-phosphorylated form was calculated with the simple Langmuir 1:1 model and the Biacore T100 evaluation software (v 1.1.1), and found to be 80 $\mu$ M. Affinity for peptide PI120 in which S77 is phosphorylated is 5 times weaker. The weakest affinity was found for peptides PI119 (phosphorylated at S79), PI118 (phosphorylated at both S77 and S79) and PI80, which corresponds to the proline-rich motif of RAR $\alpha$ .

The affinity of the proline-rich peptides targeting the SH3.3 domain was further investigated using  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  heteronuclear NMR. The titration of  $^{15}\text{N}$  labeled SH3.3 domain with increasing amount of peptides led to a progressive shift of the correlation peaks in a  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum (Figure 3B), as expected for weak affinity ligands. In this situation, the resonance frequencies are weighted averages of the frequencies characterizing the free and peptide-bound forms of the protein, allowing the determination of an accurate Kd value from the analysis of the frequency shifts as a function of peptide concentrations (Figure 3C). The Kd for the interaction between SH3.3 and the non-phosphorylated PI121 peptide was found to be 36  $\mu$ M, a value which is compatible with biacore experiments, although slightly lower. The affinity for the peptide phosphorylated at S77 position is 4 times weaker, whereas peptides phosphorylated at S79 and at both sites displayed a significant decrease in affinity (by a factor of 8 and 15 respectively).

### **Vinexin $\beta$ dissociates from RAR $\gamma$ after RA addition**

Then we investigated whether vinexin $\beta$  binding is affected in response to RA that has been shown to induce rapidly RARs phosphorylation (Bruck et al., 2009). Indeed in transfected COS-1 cells, RAR $\gamma$ 1 becomes rapidly phosphorylated at S79 within minutes following RA addition, as assessed by immunoblotting after immunoprecipitation of RAR $\gamma$  with a monoclonal antibody recognizing specifically RAR $\gamma$  phosphorylated at this residue

(Figure 4A and Figures 4B and C, lanes 1-5). No signal was observed with the RAR $\gamma$ S79A mutant confirming the specificity of the antibody (Figure 4B, lanes 6-10).

We found that less vinexin $\beta$  interacted with RAR $\gamma$  in RA-treated cells compared to untreated cells. Indeed, in coimmunoprecipitation experiments, the amount of vinexin $\beta$  bound to RAR $\gamma$  decreased as soon as 5 minutes following RA addition and was completely abrogated at 15-30 minutes (Figure 4A, lanes 1-5). Unexpectedly, the interaction of vinexin $\beta$  with the RAR $\gamma$ S79A mutant, which cannot be phosphorylated in response to RA, also decreased at 5 minutes but was not abrogated at 15-30 minutes (Figure 4A, lanes 6-10). These results indicate that S79 phosphorylation is necessary but not sufficient for the complete dissociation of vinexin $\beta$ . In other words, other RA-induced events might be involved due to the interaction of vinexin $\beta$  with other domains of RAR $\gamma$ .

Therefore we investigated whether the C-terminal helix 12, the conformation of which changes in response to RA, plays a role in the association-dissociation of vinexin $\beta$ . RAR $\gamma$  deleted for helix 12 (RAR $\gamma$  $\Delta$ H12) was analyzed for its ability to interact with vinexin $\beta$  in the absence and presence of RA. According to the coimmunoprecipitation experiments shown in Figure 4C (lane 6), in the absence of RA, less vinexin $\beta$  interacted with RAR $\gamma$  $\Delta$ H12 compared to RAR $\gamma$ WT. This suggests that helix 12 would also contribute to vinexin $\beta$  binding. In line with this, it must be noted that, in the absence of ligand, the C-terminal helix 12 of the RAR $\gamma$  subtype interacts with H3 and adopts a constitutively closed conformation that creates a surface which is not compatible with the binding of the classical corepressors and coactivators (Farboud et al., 2003; Hauksdottir et al., 2003; Privalsky, 2004). Of note is that, in response to RA, vinexin $\beta$  did not dissociate from the RAR $\gamma$  $\Delta$ H12 mutant (Figure 4C, lanes 6-10), most probably due to the fact that this mutant was not phosphorylated at S79 both in the absence and in the presence of RA (Figure 4C, lanes 6-10) for reasons that remain to be determined. Thus one can propose that vinexin $\beta$ , which is an adaptor with three SH3 domains, interacts not only with the PRM of RAR $\gamma$  through its third C-terminal SH3 domain, but also with the LBD of RAR $\gamma$  through other proteins with PRMs, recruited by the two other SH3 domains, thereby forming a multiprotein complex bridging the LBD to the NTD of RAR $\gamma$ .

### **Vinexin $\beta$ does not interact with RAR $\gamma$ at the promoters of RA-target genes.**

In a previous study, we demonstrated that vinexin $\beta$  represses the transcription of RAR $\gamma$ -target genes. Indeed in transfected COS-1 cells, overexpression of vinexin $\beta$  inhibits the RA-induced expression of a CAT reporter gene under the control of the natural mRAR $\beta$ 2

promoter (Bour et al., 2005b). To further understand how vinexin $\beta$  controls transcription in cooperation with RAR $\gamma$ , ChIP experiments were performed with COS-1 cells transfected with the same CAT reporter gene, along with RAR $\gamma$ 1 and/or vinexin $\beta$ . The *RAR $\beta$ 2* gene promoter contains one DR5 RARE at position -60 (de The et al., 1990) and antibodies directed against RAR $\gamma$  or vinexin $\beta$  were used to immunoprecipitate RAR $\gamma$ - or vinexin $\beta$ -bound DNA fragments which were further analyzed by quantitative PCR using specific pairs of primers spanning the RARE (Figure 5).

In the absence of RA, endogenous RAR $\gamma$  and vinexin $\beta$  were hardly detected at the promoter (Figure 5A, lanes 1 and 6). Upon overexpression of RAR $\gamma$ , some promoters became occupied by the receptor in the absence of RA (Figure 5A, lane 2) and this occupancy increased significantly in response to RA (Figure 5B). In contrast, no variations in vinexin $\beta$  occupancy were observed upon its overexpression either in the absence (Figure 5A, lane 7) or in the presence of RA (Figure 5C). Overexpression of RAR $\gamma$  did not affect significantly this pattern (Figure 5A, lane 8 and data not shown). Note that the RAR $\gamma$ S79A mutant, which interacts preferentially with vinexin $\beta$ , did not occupy significantly the promoter either in the absence or presence of RA (Figure 5A, lane 4 and data not shown) and had no effect on vinexin $\beta$  occupancy (Figure 5A, lane 9).

Interestingly, upon vinexin $\beta$  overexpression, the RAR $\gamma$  occupancy of the RARE was decreased in the absence of RA (Figure 5A, lane 3). The RA-induced recruitment of RAR $\gamma$  was also abrogated (Figure 5B). In contrast, vinexin $\beta$  deleted of the SH3-3 domain had no effect (Figure 5D). Collectively these results suggest that vinexin $\beta$  does not interact with DNA-bound RAR $\gamma$  and that vinexin $\beta$  rather impedes RAR $\gamma$  recruitment to the promoters.

**In F9 cells, RAR $\gamma$  bound at the promoters of RA-target genes is phosphorylated and not associated with vinexin $\beta$ .**

To corroborate such an hypothesis, additional experiments were performed with mouse embryo carcinoma cells (F9 cell line), which constitute a well-established model system for investigating RA signaling (Bour et al., 2006). These cells coexpress vinexin $\beta$  and the RAR $\gamma$ 2 subtype in their nucleus (Figure 6A). Moreover the amount of RAR $\gamma$ 2 phosphorylated at S68 (S79 in RAR $\gamma$ 1 (Bastien et al., 2000)) increases rapidly within minutes after RA treatment (Figure 6B).

In F9 cells, several genes such as the *RAR $\beta$ 2* gene are rapidly induced in response to RA (Bour et al., 2006). In a stable cell line overexpressing vinexin $\beta$ , the V $\beta$ (8) cell line, the RA-



induced expression of the *RARβ2* gene was significantly lower than in the parental F9 WT cell line, confirming that vinexinβ is a repressor of RARγ transcriptional activity (Figure 6C).

We assessed the RARγ and vinexinβ occupancy of the *RARβ2* promoter regions in ChIP experiments performed at 1-h intervals after RA addition to F9 cells. The specificity of our experimental conditions was checked in the absence of antibodies and with the promoter of the control 36B4 gene, which does not contain any RARE (Figure 7A), and with RARγ<sup>-/-</sup> cells.

In the absence of RA, the *RARβ2* promoter region was significantly occupied by RARγ (Figure 7B) in line with other studies (Gillespie and Gudas, 2007a; Gillespie and Gudas, 2007b). Then at 1.5 h after RA addition there was a rapid and transient enrichment of RARγ bound at the promoter regions, which came back close to the initial values at 2 h (Figure 7C). No additional variations were detected up to 10h (Figure 7C) and 24h (data not shown). In contrast, vinexinβ was hardly detected either in absence (Figure 7B) or presence of RA (Figure 7D), corroborating the above hypothesis that vinexinβ does not occupy the promoters of RARγ-target genes.

Given that RARγ phosphorylation prevents vinexinβ binding, ChIP experiments were performed with our antibodies recognizing specifically RARγ phosphorylated at the cdk7 site (S79 in RARγ1 and S68 in RARγ2). In the absence of RA, DNA-bound RARγ was found to be phosphorylated (Figure 7E). At 1.5h following RA addition, RARγ recruited to the promoter was also phosphorylated (Figure 7E). We also examined the recruitment of the cdk7 and cyclin H subunits of TFIIH, which are involved in RARs phosphorylation (Bastien et al., 2000; Bruck et al., 2009). In response to RA, there was an enrichment of cdk7 and cyclin H bound to the promoters, which reached a peak at 1.5 h and was concomitant with that of phosphorylated RARγ2 (Figure 7D). Altogether, these results indicate that in F9 cells, RARγ that is phosphorylated and not associated with vinexinβ occupies the promoters of RA-target genes. They also corroborate our hypothesis that vinexinβ would interact with the non-phosphorylated form of RARγ out of the gene promoters thereby impeding the recruitment of RARγ at the DNA.

## DISCUSSION

In this study, we demonstrated that the induction of RAR $\gamma$ -target genes is repressed by vinexin $\beta$ , which belongs to the vinexin/CAP/Ponsin, ArgBP2 vinexin family of adaptor proteins (Kioka et al., 2002). We outlined a new paradigm in which, in the absence of RA, vinexin $\beta$  is associated to the non-phosphorylated form of RAR $\gamma$  and sequesters RAR $\gamma$  out of the promoters of the target genes. Then in response to RA, RAR $\gamma$  becomes phosphorylated at a serine residue close to the interaction motif, leading to the dissociation of vinexin $\beta$  and finally to promoter recruitment of RAR $\gamma$ . To our knowledge, this is the first report of a RAR corepressor association/dissociation regulated by phosphorylation processes and occurring out of the promoter. It was unexpected and shed light on a new level of complexity in the fine-tuning of RAR $\gamma$ -mediated transcription.

Vinexin $\beta$  is a protein with three SH3 domains. The unique property of such domains is to recognize proline-rich motifs (PRM) without requiring high affinities (Ball et al., 2005). Such a PRM is present in the NTD of the RAR $\gamma$  subtype and contains phosphorylation sites. Here we combined classical molecular and cellular approaches to biophysical techniques in order to decipher the parameters of the interaction. We have shown that the third C-terminal domain of vinexin $\beta$  (SH3-3) is involved in the interaction with the PRM of RAR $\gamma$ . This SH3-3 domain of vinexin $\beta$  binds the consensus PxxPxR motif (a classical class II ligand) within the PRM of RAR $\gamma$ . Interestingly, though well conserved between RARs, the PRM of the RAR $\alpha$  subtype differs from that of RAR $\gamma$  at one residue within the PxxPxR motif. Such a discrepancy might be at the basis of the specificity of the interaction of vinexin $\beta$  with the PRM of RAR $\gamma$ . Interestingly this interaction fulfills the classical criteria of interactions between PRM and their binding partners. Indeed the SH3-3 domain of vinexin $\beta$  interacts with the target PRM with typical K<sub>d</sub> values around 35-80 $\mu$ M, in line with the idea that the interaction is reversible. Accordingly we found that phosphorylation of RAR $\gamma$  at a serine residue (S79) adjacent to the PxxPxR motif abrogates the interactio

An unexpected finding in this study is that, in the absence of RA, vinexin $\beta$  interacts not only with the PRM of RAR $\gamma$  through its third C-terminal SH3 domain, but also with the LBD of RAR $\gamma$  through a surface involving helix 12. Given that vinexin $\beta$  is an adaptor with three SH3 domains, this suggests that vinexin $\beta$  would interact with the LBD through a multiprotein complex recruited by the two other SH3 domains and thereby bridging the LBD to the NTD of RAR $\gamma$ . Corroborating such a model, helix 12 of RAR $\gamma$  has been shown to adopt, even in the

absence of ligand, a constitutively closed conformation that approximates the conformation of liganded RAR $\alpha$ , but is not compatible with the binding of the classical corepressors and coactivators (Farboud et al., 2003; Hauksdottir et al., 2003; Privalsky, 2004). The characterization of the proteins involved in this multimeric complex is in progress.

The other novelty is that in response to RA, vinexin $\beta$  dissociates from RAR $\gamma$ . The main point is that it requires the phosphorylation of RAR $\gamma$  at the serine residue adjacent to the PxxPxR motif involved in vinexin $\beta$  binding. Accordingly we found that the amount of RAR $\gamma$  phosphorylated at serine 79 increases rapidly in response to RA, as recently described for RAR $\alpha$  (Bruck et al., 2009). Given that S79 is located in close proximity of the SH3-3 binding surface, it can be proposed that phosphorylation of this residue propagates a signal to this surface, allowing the dissociation of vinexin $\beta$ . Note however that the dissociation of vinexin $\beta$  also involves some RA-induced events affecting the LBD.

Then the question is how the association/dissociation of vinexin $\beta$  influences the transcriptional activity of RAR $\gamma$ . Vinexin $\beta$  was previously characterized as a repressor of RAR $\gamma$ -mediated transcription (Bour et al., 2005b) but nothing was known about the underlying mechanism. In the present study, we found that in the absence of RA, RAR $\gamma$  already occupies some response elements located in the promoters of RA target genes, in agreement with other reports (Gillespie and Gudas, 2007a; Gillespie and Gudas, 2007b). However no significant amounts of vinexin $\beta$  could be detected at these promoters. This suggests that vinexin $\beta$  would act as an adaptor between RAR $\gamma$  and other proteins, potentially forming a complex maintaining the non-phosphorylated form of RAR $\gamma$  in an inactive state out of the DNA. Given that, in contrast to RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  interacts poorly with the classical SMRT and NCOR corepressors (Farboud et al., 2003; Privalsky, 2004), the vinexin $\beta$ -based complexes might be an alternative for controlling negatively the transcriptional activity of the receptor. The PxxPxR motif of RAR $\gamma$  involved in the interaction being close to the DBD, one can suggest that bound vinexin $\beta$  impedes DNA binding through steric hindrance. Another possibility might be that vinexin $\beta$  binding induces conformational modifications of the PRM with allosteric consequences on the nearby DBD. Experiments are in progress to address these hypotheses.

Then in response to RA, there is a rapid and transient enrichment of RAR $\gamma$  bound at the promoters. Interestingly the RAR $\gamma$  pool that is recruited is phosphorylated at S79. Given the close proximity of the phosphorylation site to the DBD, it is possible that phosphorylation increases the affinity of RAR $\gamma$  for DNA response elements by an allosteric effect (Pufall et

8/09/09

al., 2005) that has yet to be understood. Experiments are also in progress to address this hypothesis.

In conclusion, the present work highlighted a new functional relationship between RAR $\gamma$  and vinexin $\beta$ , a cytoskeleton adaptor protein with unique highly dynamic binding properties that direct RA signaling. Ultimately the challenge is to determine whether the other RAR subtypes, which do not interact with vinexin $\beta$  (Bour et al., 2005b), interact with other cytoskeleton adapter proteins playing a role in transcription (Zheng et al., 2009).

## METHODS.

**Plasmids.** The following plasmids have been previously described (Bastien et al., 2000; Bour et al., 2005b): hRAR $\gamma$ 1WT, S79A, S77A and S77A/S79A in pSG5, hRAR $\gamma$ 1, hRAR $\alpha$ 1 and hRAR $\beta$ 2 in pGEX-2T and Flag-vinexin  $\beta$  in the pCX vector. The vectors encoding vinexin $\beta$  deleted for each SH3 domain and the GST-RAR $\gamma$  S77E, S79E and S77E/S79E chimera were constructed by double PCR amplification. The pSG5 RAR $\gamma$ S77E, RAR $\gamma$ S79E and RAR $\gamma$ S77E/S79E vectors were obtained by subcloning each mutant from pGEX2T to pSG5. GST-V-SH3-3 was constructed by subcloning the SH3-3 domain of vinexin $\beta$  amplified by PCR into the BamHI site of pGEX2T.

CFP-RAR $\gamma$  and YFP-vinexin $\beta$  constructs were made by introducing first the fragment corresponding to the fluorochromes into the BamHI site of the HA-FLAG-pCX vector. Then the SH3-3 domain of vinexin $\beta$ , RAR $\gamma$ WT, RAR $\gamma$ S79A, RAR $\gamma$ S79E or the AB regions of RAR $\gamma$ S79A were amplified by PCR and ligated in frame at the C-terminal end of the fluorochrome. RAR $\gamma$ S79A and RAR $\gamma$ (AB)S79A were also introduced at the N-terminal end of CFP.

**Antibodies:** Polyclonal and monoclonal antibodies recognizing RAR $\gamma$  [RP $\gamma$ (F), Mab2 $\gamma$ (F) and Mab10 $\gamma$ (A) (Bastien et al., 2000) as well as monoclonal antibodies against vinexin $\beta$  (Bour et al., 2005b) have been described. Polyclonal antibodies against  $\beta$ -actin and the p89 subunit of TFIID (S-19) were from Santa Cruz. Anti Flag monoclonal antibodies were from Sigma. Monoclonal antibodies recognizing specifically RAR $\gamma$  phosphorylated at position S79 (RAR $\gamma$ -P-S79) were generated by immunization of Balb/c mice with synthetic phosphopeptides coupled to ovalbumin. Spleen cells were isolated and fused with myeloma cells. Cultured supernatants were screened with using differential ELISA in which the phosphopeptide, the corresponding non-phosphopeptide and an irrelevant phosphopeptide were employed. Positive supernatants were tested by immunoblotting on extracts of RA-treated COS-1 cells transfected with the pSG5 RAR $\gamma$  constructs described above. Specific hybridomas were cloned twice on soft agar. For ascite fluid production, 2x10<sup>6</sup> cells were injected in pristane primed BALB/c mice.

**GST Pull-down Assays:** Equimolar GST, GST-RAR $\gamma$ 1, RAR $\alpha$ 1 and GST-RAR $\beta$ 2 fusion proteins were purified on glutathione-Sepharose 4B beads and incubated with COS-1 cell extracts expressing the FLAG-vinexin $\beta$  proteins as described (Bour et al., 2005b).

**Surface plasmon resonance measurements.** SRP experiments were carried out with a BIAcore T100 instrument and research grade CM5 sensorchips (Altschuh et al., 2006). The ligand (GST-V-SH3-3) was captured via anti-GST antibodies that were immobilized on the sensor surface using standard amine coupling procedures and following the manufacturer's instructions. Synthetic peptides corresponding to the proline-rich motif of RAR $\alpha$  or RAR $\gamma$  (with S77 and/or S79 phosphorylated or not) were diluted in running buffer (HBS EP: 10 mM Hepes (pH 7.4), 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005% (v/v) surfactant P20) and injected over the surface in a continuous flow at 25°C.

**Fluorescence Resonance Energy transfer (FRET) :** COS-1 cells coexpressing CFP-RAR $\gamma$  and YFP-V(SH3-3) were imaged on a confocal SP2 AOBS MP microscope (Leica). FRET was measured by using the Sensitized Emission method. For each sample, three images were acquired : one for the donor (donor excitation, donor emission), one for the acceptor (acceptor excitation, acceptor emission) and one for the FRET channel (donor excitation, acceptor emission). The CFP and YFP images of cells were collected after excitation with 458 nm and 514 nm laser lights respectively. Samples were analyzed using the LEICA Application Wizard for FRET Sensitized Emission. For each sample, the efficiency of FRET was measured using the following formula :  $E_{fret} = (B - A \times b - C \times (c - a \times b)) / C$ .  $E_{fret}$  is the apparent FRET efficiency. A, B, C correspond to the intensities of the 3 channels (donor, FRET and acceptor) and a, b, c are the calibration factors generated by acceptor only and donor only references. For the donor only sample, the correction of donor crosstalk in the FRET image is calculated as  $b = B/A$ . For the acceptor only sample, the two correction factors a and c are calculated :  
 $c = B/C$  and  $a = A/C$ .

**NMR spectroscopy:** Several  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  HSQC spectra were recorded to follow the titration of V-SH3.3 with synthetic peptides corresponding to the proline-rich motif of RAR $\gamma$  or RAR $\alpha$ . All peptides were first desalted and recovered in 100 mM Phosphate buffer, pH 7.0 using NAP-5 columns (Pharmacia Biotech). Uniformly,  $^{15}\text{N}$ -labeled GST-V-SH3.3 was prepared in Tris 20 mM, NaCl 100 mM at pH 7.0. A concentration equal to 54  $\mu\text{M}$  of  $^{15}\text{N}$ -labeled GST-V-SH3.3 was used for titration with peptides PI118, PI119 and PI120 and equal to 100  $\mu\text{M}$  for titration with peptide PI121. Protein and peptide concentrations were

determined by UV spectroscopy using absorbance values at 280 nm. The final NMR samples contained 4 mM Tris, 20 mM NaCl and 80 mM Phosphate buffer. NMR experiments were performed in 50  $\mu$ L capillaries at 300K on a Bruker DRX600 spectrometer equipped with a cryoprobe. Composite  $^{15}\text{N}$  and  $^1\text{H}$  chemical shifts were used as described in (Williamson et al., 1997), using the five most perturbed  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  correlations that were added for averaging of statistical errors in the Kd calculations. Non-linear curve fitting was performed using in-house Python scripts. The statistical errors were estimated from Monte-Carlo simulations.

**Cell lines, immunoblotting and immunoprecipitation :** COS-1 cells were cultured and transiently transfected as in (Bour et al., 2005a). Extracts were prepared and immunoblotted as described (Bour et al., 2005b). Immunoprecipitations were performed in 20mM Tris-HCl pH 7.8 containing 100-500 mM KCl, 10% glycerol and 0,1 mM EDTA and bound proteins were analyzed by immunoblotting (Bour et al., 2005b).

The different F9 cell lines were described previously (Bour et al., 2005b). When 80-90% confluent, cells were treated with RA ( $10^{-7}\text{M}$ ) after 24 h in a medium containing 1% dextran-charcoal-treated fetal calf serum. Stable F9 cell lines overexpressing vinexin $\beta$  were established by electroporating the FLAG-vinexin $\beta$  construct along with a plasmid conferring neomycin resistance. The cells well selected with neomycin and analyzed as described (Bour et al., 2005b). Several clones were isolated and one, V $\beta$ (8) was selected and used in the experiments.

### **Chromatin and nuclear extracts preparation**

The cytosolic, soluble nucleoplasmic and insoluble native chromatin fractions were prepared according to the protocol described in (Aygün et al., 2008). Cells were lysed with cytoplasmic lysis buffer [10 mM Tris·HCl (pH 7.9), 0.34 M sucrose, 3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM magnesium acetate, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% Nonidet P-40 and protease inhibitors], and intact nuclei were pelleted by centrifugation at  $3,500 \times g$  for 15 min. Nuclei were washed with cytoplasmic lysis buffer without Nonidet P-40 and then lysed with nuclear lysis buffer [20 mM HEPES (pH 7.9), 3 mM EDTA, 10% glycerol, 150 mM potassium acetate, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 0.1% Nonidet P-40, and protease inhibitors] by homogenization. The nucleoplasmic fraction was cleared by centrifugation at  $15,000 \times g$  for 30 min. The chromatin-enriched pellet was then resuspended in nuclease incubation buffer [150 mM Hepes (pH 7.9), 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 150 mM KOAc, 10% glycerol, and protease inhibitors], and

DNA and RNA in the suspension were digested with 0.15 unit/ $\mu$ l benzonase. The sample was cleared by centrifugation at  $20,000 \times g$  for 30 min, and the supernatant containing the solubilized native chromatin proteins was collected.

**RNA isolation and quantitative RT-PCR** were performed as in (Bour et al., 2005b).

**ChIP experiments.** Subconfluent cells were treated with RA ( $10^{-7}$ M) and ChIP experiments were performed as previously described (Bruck et al., 2009). Control ChIPs were performed without antibodies. RAR $\gamma$  was immunoprecipitated with RPy(F) purified on sulfolink gel columns (Pierce, USA) coupled to the corresponding immunizing peptide. Immunoprecipitated DNA was amplified by qPCR with primers for RAR $\beta$ 2 : 5'-CGATCCCAAGT TCTCCCTTC-3' and 5'-CAGACTGGT TGGGTCATTTG-3'; 36B4 : 5'-TTTGCTGTACT GACTCGGTGA-3' and 5'-CCTC CCACAACAAAACAACC-3'. Occupancy of the promoters was calculated by normalizing the PCR signals from the IP samples to the signals obtained from the input DNA.



## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Dr. Kioka for the gift of the vinexin $\beta$  vector and M. Oulad Abdelghani for the mouse monoclonal antibodies against vinexin $\beta$ . We also thank D. Altschuh and the Biacore platform (UMR 7100 Illkirch). Many thanks also to Julie Goepp, Hussein Raad, Xiaojun.G and members of the cell culture facilities for help. Marc-André Delsuc is acknowledged for fruitful discussions.

This work was supported by funds from CNRS, INSERM, the Agence Nationale pour la Recherche (N° ANR-05-BLAN-0390-02), the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC-07-1-3169) and the Institut National du Cancer (INCa-PL06-095 and PL07-96099). SL was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and ARC.

## REFERENCES

- Altschuh, D., Oncul, S. and Demchenko, A.P. (2006) Fluorescence sensing of intermolecular interactions and development of direct molecular biosensors. *J Mol Recognit*, **19**, 459-477.
- Aygun, O., Svejstrup, J. and Liu, Y. (2008) A RECQ5-RNA polymerase II association identified by targeted proteomic analysis of human chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 8580-8584.
- Ball, L.J., Kuhne, R., Schneider-Mergener, J. and Oschkinat, H. (2005) Recognition of Proline-Rich Motifs by Protein-Protein-Interaction Domains. *Angew Chem Int Ed Engl*, **44**, 2852-2869.
- 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.
- Bour, G., Gaillard, E., Bruck, N., Lalevee, S., Plassat, J.L., Busso, D., Samama, J.P. and Rochette-Egly, C. (2005a) Cyclin H binding to the RAR{alpha} activation function (AF)-2 domain directs phosphorylation of the AF-1 domain by cyclin-dependent kinase 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 16608-16613.
- Bour, G., Lalevee, S. and Rochette-Egly, C. (2007) Protein kinases and the proteasome join in the combinatorial control of transcription by nuclear retinoic acid receptors. *Trends Cell Biol*, **17**, 302-309.
- Bour, G., Plassat, J.L., Bauer, A., Lalevee, S. and Rochette-Egly, C. (2005b) 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.
- Bour, G., Taneja, R. and Rochette-Egly, C. (2006) Mouse Embryocarcinoma F9 cells and Retinoic Acid. A model to study the molecular mechanisms of endodermal differentiation. In Taneja, R. (ed.), *Nuclear Receptors in development*. Elsevier Press Inc, Vol. 16, pp. 211-253.
- Bruck, N., Vitoux, D., Ferry, C., Duong, V., Bauer, A., de The, H. and Rochette-Egly, C. (2009) A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RARalpha to target promoters. *Embo J*, **28**, 34-47.
- de The, H., Vivanco-Ruiz, M.M., Tiollais, P., Stunnenberg, H. and Dejean, A. (1990) Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. *Nature*, **343**, 177-180.
- Dyson, H.J. and Wright, P.E. (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 197-208.
- 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.
- Germain, P., Chambon, P., Eichele, G., Evans, R.M., Lazar, M.A., Leid, M., De Lera, A.R., Lotan, R., Mangelsdorf, D.J. and Gronemeyer, H. (2006a) International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacol Rev*, **58**, 712-725.
- Germain, P., Chambon, P., Eichele, G., Evans, R.M., Lazar, M.A., Leid, M., De Lera, A.R., Lotan, R., Mangelsdorf, D.J. and Gronemeyer, H. (2006b) International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev*, **58**, 760-772.

- Gianni, M., Bauer, A., Garattini, E., Chambon, P. and Rochette-Egly, C. (2002) Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR $\gamma$  degradation and transactivation. *EMBO J*, **21**, 3760-3769.
- Gillespie, R.F. and Gudas, L.J. (2007a) Retinoic acid receptor isotype specificity in F9 teratocarcinoma stem cells results from the differential recruitment of coregulators to retinoic response elements. *J Biol Chem*, **282**, 33421-33434.
- Gillespie, R.F. and Gudas, L.J. (2007b) Retinoid regulated association of transcriptional coregulators and the polycomb group protein SUZ12 with the retinoic acid response elements of Hoxa1, RARbeta(2), and Cyp26A1 in F9 embryonal carcinoma cells. *J Mol Biol*, **372**, 298-316.
- 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.
- Kay, B.K., Williamson, M.P. and Sudol, M. (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *Faseb J*, **14**, 231-241.
- Kioka, N., Ueda, K. and Amachi, T. (2002) Vinexin, CAP/ponsin, ArgBP2: a novel adaptor protein family regulating cytoskeletal organization and signal transduction. *Cell Struct Funct*, **27**, 1-7.
- Lavery, D.N. and McEwan, I.J. (2005) Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochem J*, **391**, 449-464.
- Liu, J., Perumal, N.B., Oldfield, C.J., Su, E.W., Uversky, V.N. and Dunker, A.K. (2006) Intrinsic disorder in transcription factors. *Biochemistry*, **45**, 6873-6888.
- Macias, M.J., Wiesner, S. and Sudol, M. (2002) WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett*, **513**, 30-37.
- Privalsky, M.L. (2004) The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol*, **66**, 315-360.
- Pufall, M.A., Lee, G.M., Nelson, M.L., Kang, H.S., Velyvis, A., Kay, L.E., McIntosh, L.P. and Graves, B.J. (2005) Variable control of Ets-1 DNA binding by multiple phosphates in an unstructured region. *Science*, **309**, 142-145.
- 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. and Germain, P. (2009) Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors. *Nuclear Receptor Signaling*, **7**, e005.
- Sudol, M., Sliwa, K. and Russo, T. (2001) Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS Lett*, **490**, 190-195.
- Williamson, R.A., Carr, M.D., Frenkiel, T.A., Feeney, J. and Freedman, R.B. (1997) Mapping the binding site for matrix metalloproteinase on the N-terminal domain of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 by NMR chemical shift perturbation. *Biochemistry*, **36**, 13882-13889.
- Zarrinpar, A. and Lim, W.A. (2000) Converging on proline: the mechanism of WW domain peptide recognition. *Nat Struct Biol*, **7**, 611-613.

8/09/09

Zheng, B., Han, M., Bernier, M. and Wen, J.K. (2009) Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *Febs J*, **276**, 2669-2685.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1. The third C-terminal SH3 domain of vinexin $\beta$ interacts with the proline-rich motif of RAR $\gamma$ .**

A. Schematic representation of vinexin $\beta$  and the mutants lacking the SH3 domains. B. Extracts from COS-1 cells overexpressing Flag-vinexin $\beta$  WT or lacking the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> or 3<sup>rd</sup> SH3 domain, were incubated with GST or GST-RAR $\gamma$ 1 immobilized on Gluthatione-sepharose beads. Bound vinexin $\beta$  was analyzed by immunoblotting with FLAG antibodies. C. COS-1 cells were transfected with the RAR $\gamma$ 1 vector along with the different FLAG-vinexin $\beta$  deletion mutants and nuclear extracts were incubated with FLAG antibodies and Protein G-sepharose beads. The immunocomplexes were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with RAR $\gamma$ (F) and FLAG antibodies. The two lower panels correspond to 5% of the amount of immunoprecipitated extracts. D. Aminoacid sequence of the proline-rich motifs of RAR $\gamma$ 1, RAR $\alpha$ 1 and RAR $\beta$ 2. E. Immobilized GST, GST-RAR $\gamma$ 1, GST-RAR $\alpha$ 1 or GST-RAR $\beta$ 2 were incubated with extracts from COS-1 cells overexpressing Flag-vinexin $\beta$ . Bound vinexin $\beta$  was analyzed by immunoblotting as in B. F. COS-1 cells were transfected with the FLAG-vinexin $\beta$  vector along with RAR $\gamma$  either WT or with each residue of the proline-rich motif substituted with an alanine. Nuclear extracts were immunoprecipitated with FLAG antibodies as in C.

### **Figure 2 : RAR $\gamma$ phosphorylation at serine 79 located in proline-rich motif prevents vinexin $\beta$ binding.**

A. Schematic representation of the RAR $\gamma$  proline-rich domain with S77 and/or S79 substituted with alanine or glutamic acid residues. B. Extracts from COS-1 cells overexpressing Flag-vinexin $\beta$  were incubated with immobilized GST or GST-RAR $\gamma$ 1 either WT, S77E, S79E or S77E/S79E. Bound vinexin $\beta$  was analyzed by immunoblotting with FLAG antibodies. C. Coimmunoprecipitation experiments showing that in transfected COS-1 cells, substitution of RAR $\gamma$  S79 with a glutamic acid or an alanine residue abrogates and increases respectively the interaction with vinexin $\beta$ . D. FRET analysis of interaction between YFP-V(SH3-3) and CFP-RAR $\gamma$  in COS-1 cells. The highest and lowest FRET efficiencies were observed with RAR $\gamma$ S79A and RAR $\gamma$ S79E respectively. The efficiency was slightly decreased with RAR $\gamma$ WT, compared to RAR $\gamma$ S79A. Similar results were obtained with CFP fused at the C-terminal end of RAR $\gamma$ . Lanes 1 and 2 correspond to positive and negative FRET controls.

**Figure 3 : Affinity and molecular mechanism of the interaction between the SH3-3 domain of vinexin $\beta$  and the proline-rich motif of RAR $\gamma$ .**

A. SPR analysis of interaction between GST-V(SH3-3) and synthetic peptides corresponding to the phosphorylated or non-phosphorylated proline-rich motif of RAR $\gamma$  and RAR $\alpha$ . GST and GST-V(SH3-3) were immobilized on a sensor chip. The peptides were injected at various concentrations (0.5 to 5  $10^{-4}$  M) for 60 s. The GST signal (relative units, RU) was subtracted from the GST-V(SH3-3) signals. Non-linear curve fitting of the equilibrium responses versus peptides concentration was used to derive equilibrium Kd values. B. Extract of SH3.3  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra recorded upon addition of increasing amounts of PI121 peptide. C. Non-linear curve fitting and Kd values obtained for the non-phosphorylated RAR $\gamma$  PI121 peptide, the peptides phosphorylated on S77 (PI120) or S79 (PI119) or at both positions (PI118).

**Figure 4: Vinexin $\beta$  dissociates from RAR $\gamma$  after RA addition**

A. In transfected COS-1 cells, RA induces the rapid phosphorylation of RAR $\gamma$ 1 at S79. Phosphorylated RAR $\gamma$  was immunoprecipitated with monoclonal antibodies recognizing specifically RAR $\gamma$  phosphorylated at S79 and immunoblotted with RP $\gamma$ (F). B. Coimmunoprecipitation experiments showing that after RA addition vinexin $\beta$  dissociates from RAR $\gamma$ WT but less efficiently from the RAR $\gamma$ S79A mutant. C. Vinexin $\beta$  interacts less efficiently with RAR $\gamma$  $\Delta$ H12 and does not dissociate from this mutant in coimmunoprecipitation experiments.

**Figure 5 : Vinexin $\beta$  does not occupy the promoters of RA target genes and impedes the recruitment of RAR $\gamma$**

COS-1 cells were co-transfected with the RAR $\beta$ 2-CAT reporter gene along with RAR $\gamma$ 1 (WT or S79A) in the absence or presence of vinexin $\beta$  WT or  $\Delta$ SH3-3. A. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments determining the basal (in the absence of RA) occupancy of the promoter by RAR $\gamma$  and vinexin $\beta$ . Values (% of the inputs) are the means  $\pm$ sd of triplicates performed on two separate chromatin preparations. B. Kinetic ChIP experiments determining the recruitment of RAR $\gamma$  after RA addition in the absence and presence of overexpressed vinexin $\beta$ . Values correspond to a representative experiment among three. C. Kinetic ChIP experiments showing that vinexin $\beta$  does not occupy the promoter after RA addition. D. Kinetic ChIP experiments showing that vinexin $\beta$  $\Delta$ SH3-3 does not impede the

recruitment of RAR $\gamma$  at the promoter. E. RAR $\gamma$  and vinexin $\beta$  expression were checked by immunoblotting.

**Figure 6: F9 cells: a model to study the interplay between RAR $\gamma$  and vinexin $\beta$**

A. Immunoblotting and immunoprecipitation experiments showing the expression of RAR $\gamma$  and vinexin $\beta$  respectively in nuclear and cytosolic fractions of F9 cells. B. In F9 cells, RA induces the rapid phosphorylation of RAR $\gamma$ 1 at S79 as shown by immunoprecipitation with a monoclonal antibody recognizing specifically RAR $\gamma$  phosphorylated at this residue. C. F9 WT and a stable transformant F9 clone overexpressing vinexin $\beta$  (V $\beta$ 8) were RA-treated for the indicated times and transcripts for RAR $\beta$ 2 were analyzed by quantitative RT-PCR. The results are the mean  $\pm$ SD of two individual experiments. Vinexin $\beta$  overexpression was checked by immunoblotting (insert).

**Figure 7: In F9 cells, RAR $\gamma$  bound at the promoters of RA-target genes is phosphorylated and not associated with vinexin $\beta$ .**

A. Schematic representation of the promoters from the *RAR $\beta$ 2* and *36B4* genes with the RAREs and the primers used for PCR amplification. B. CHIP analysis of the basal (in the absence of RA) occupancy of these promoters by RAR $\gamma$  and vinexin $\beta$ . The specificity of our experimental conditions was checked in the absence of antibodies, with RAR $\gamma$ <sup>-/-</sup> cells and with the promoter of the control 36B4 gene, which does not contain any RARE. Values (% of the inputs) are the mean  $\pm$ SD of triplicates performed on three separate chromatin preparations. C. Kinetic CHIP experiments determining the RAR $\gamma$  occupancy of the RAR $\beta$ 2 promoter in RA-treated F9 cells. Values correspond to a representative experiment among three. D. CHIP experiments showing that vinexin $\beta$  does not occupy the RAR $\beta$ 2 promoter. E. Kinetic experiments determining the recruitment of phosphorylated RAR $\gamma$ , cdk7 and cyclin H at the RAR $\beta$ 2 promoter.

**Table 1 : Aminoacid sequence (single letter code) of the synthetic peptides corresponding to the phosphorylated or non phosphorylated proline-rich motifs of RAR $\gamma$  and RAR $\alpha$ .**

<b>Peptide</b>	<b>Amino acid sequence</b>	
<b>PI121</b>	<p style="text-align: center;">77 79     EEMVPS<b>SP</b>PPPPRVYK</p>	Non phosphorylated PRM of RAR $\gamma$
<b>PI120</b>	<p style="text-align: center;">EEMVPS<b>SP</b> PPPPPRVYK   <b>P</b></p>	PRM of RAR $\gamma$ phosphorylated at S77
<b>PI119</b>	<p style="text-align: center;">EEMVPS<b>SP</b>PPPPRVYK   <b>P</b></p>	PRM of RAR $\gamma$ phosphorylated at S79
<b>PI118</b>	<p style="text-align: center;">EEMVPS<b>SP</b>PPPPRVYK     <b>P P</b></p>	PRM of RAR $\gamma$ phosphorylated at S77 and S79
<b>PI80</b>	<p style="text-align: center;">77   EEIVSPP<b>SP</b>PLPRIYK</p>	Non phosphorylated PRM of RAR $\alpha$



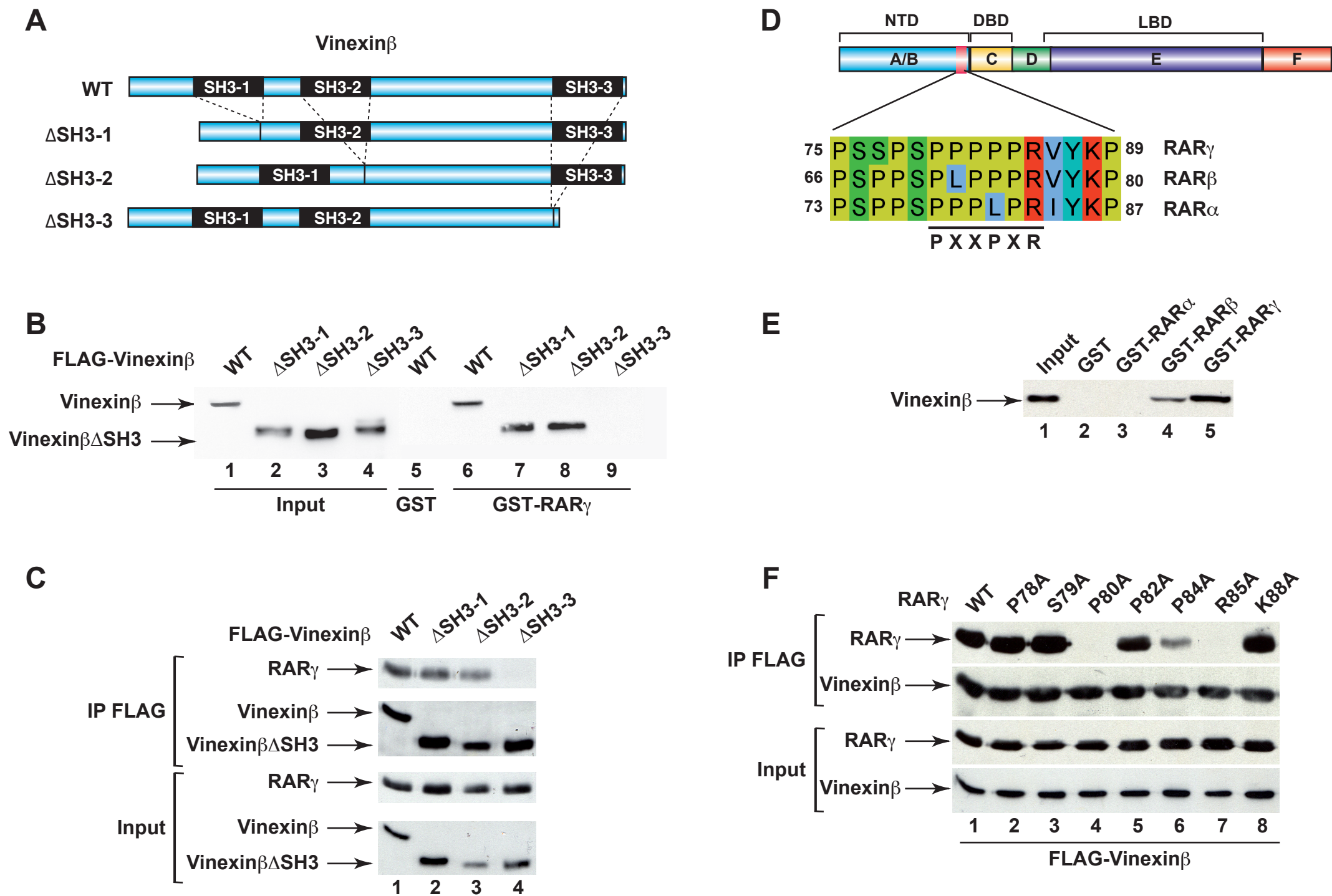


Figure 1

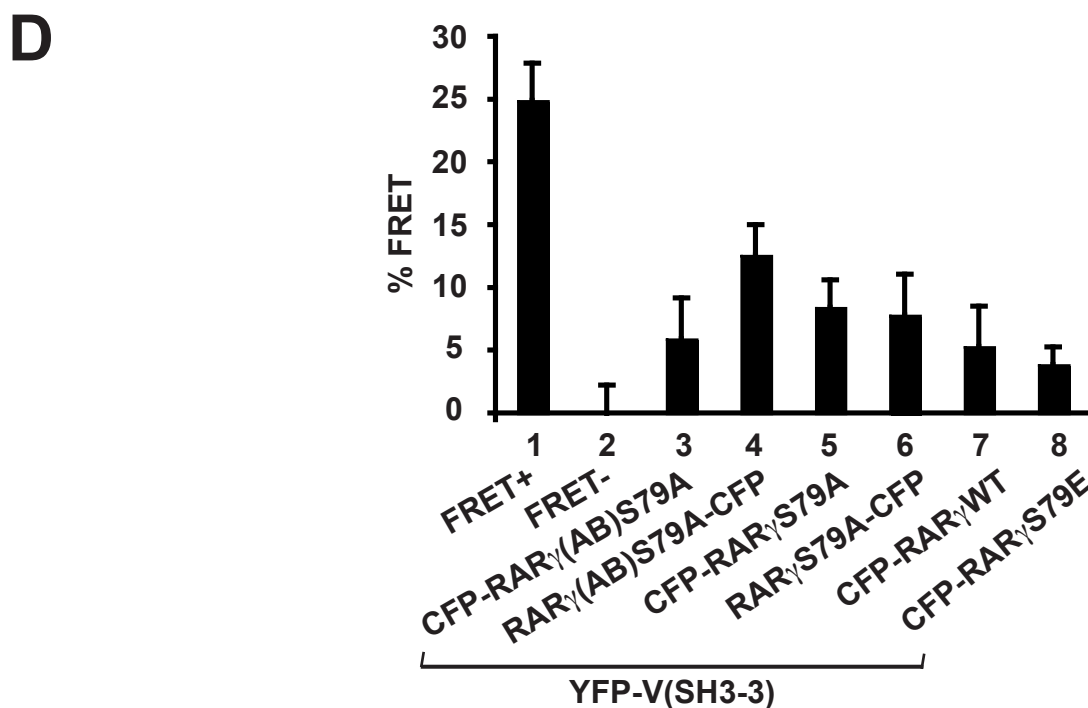
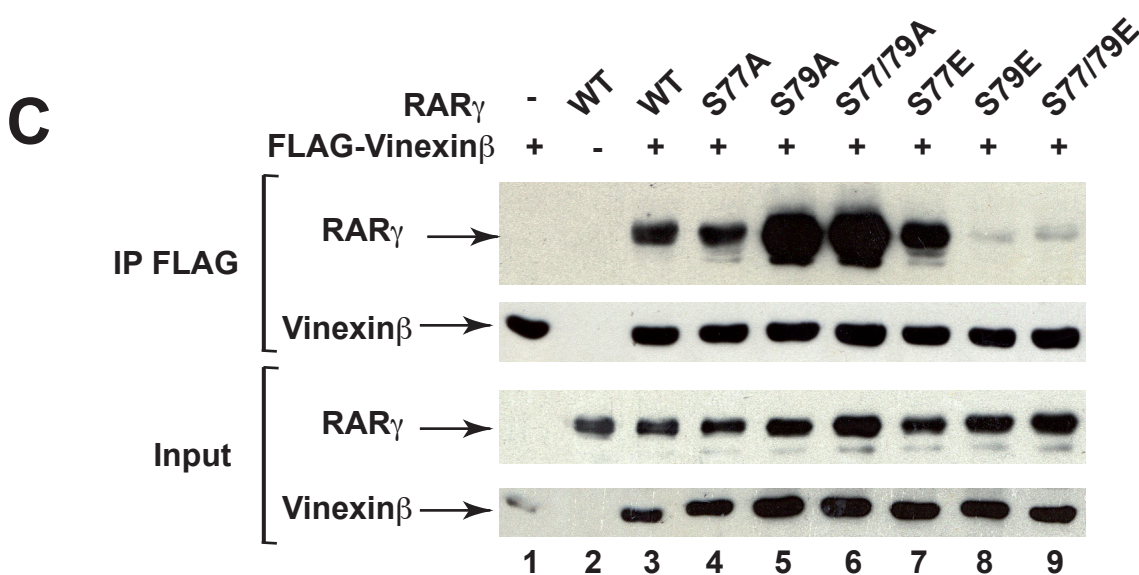
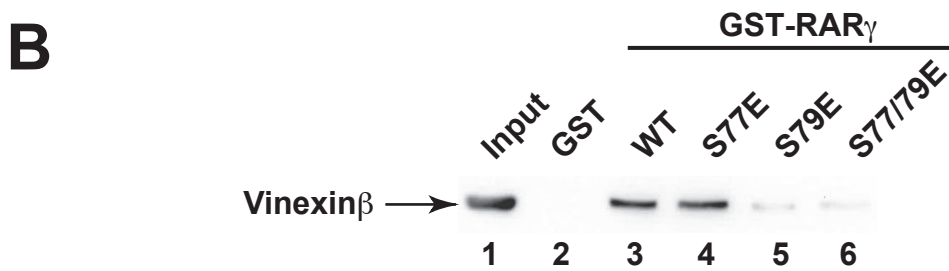
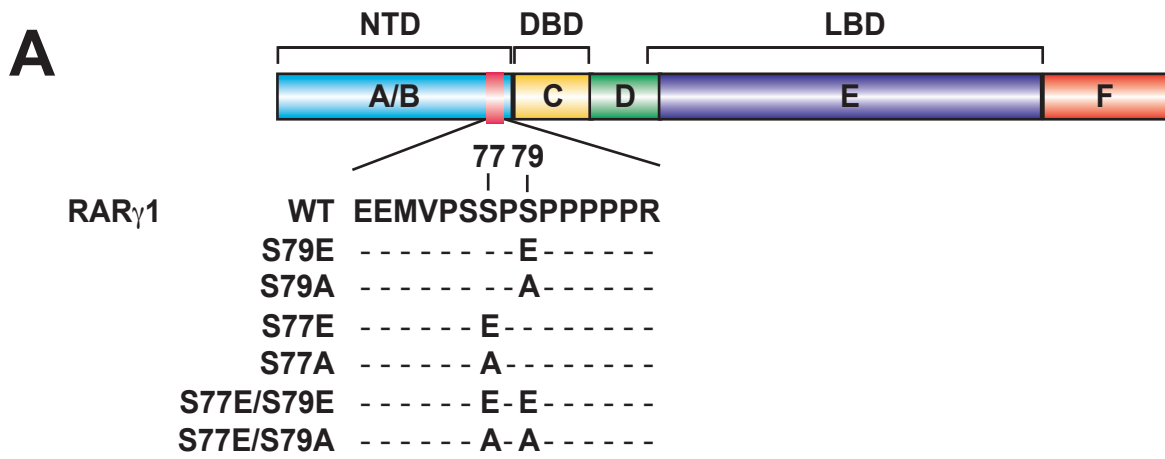
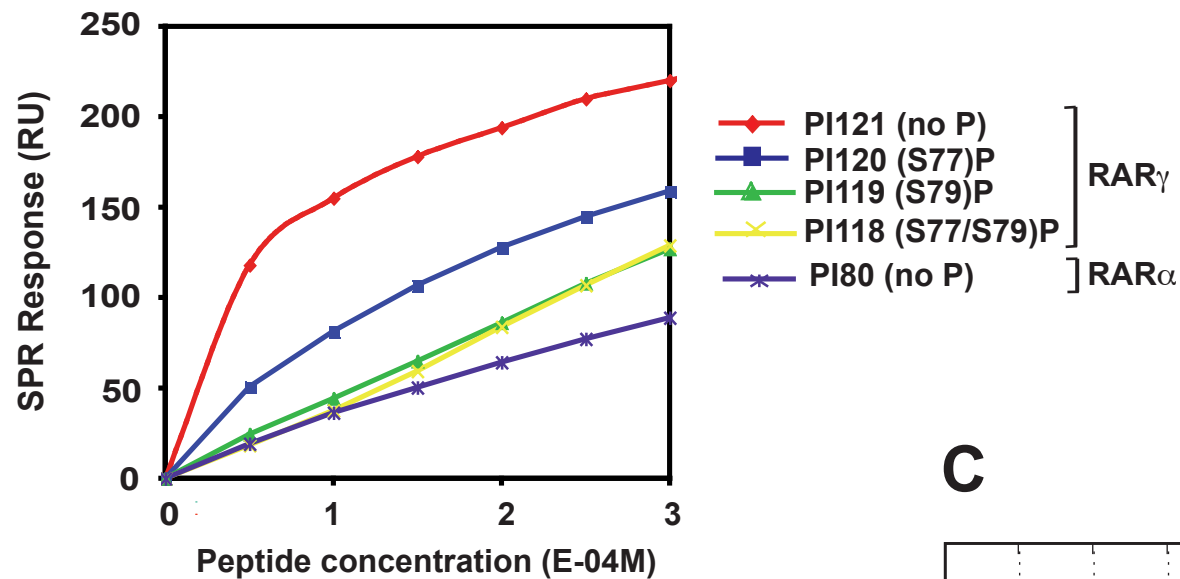
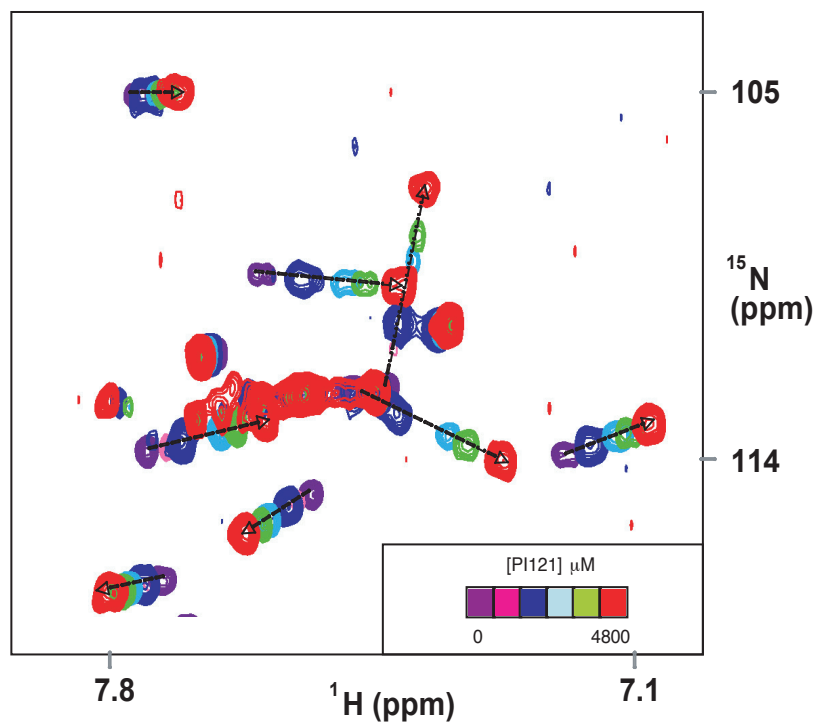
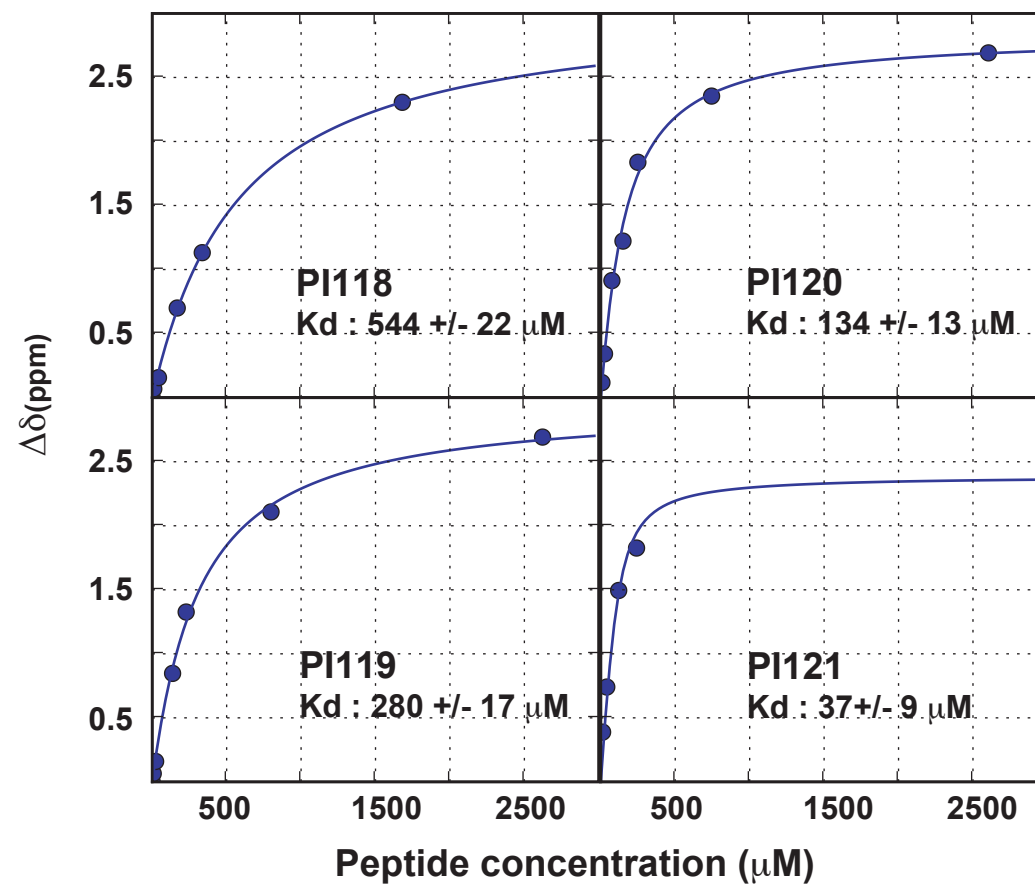


Figure 2

**A****B****C**

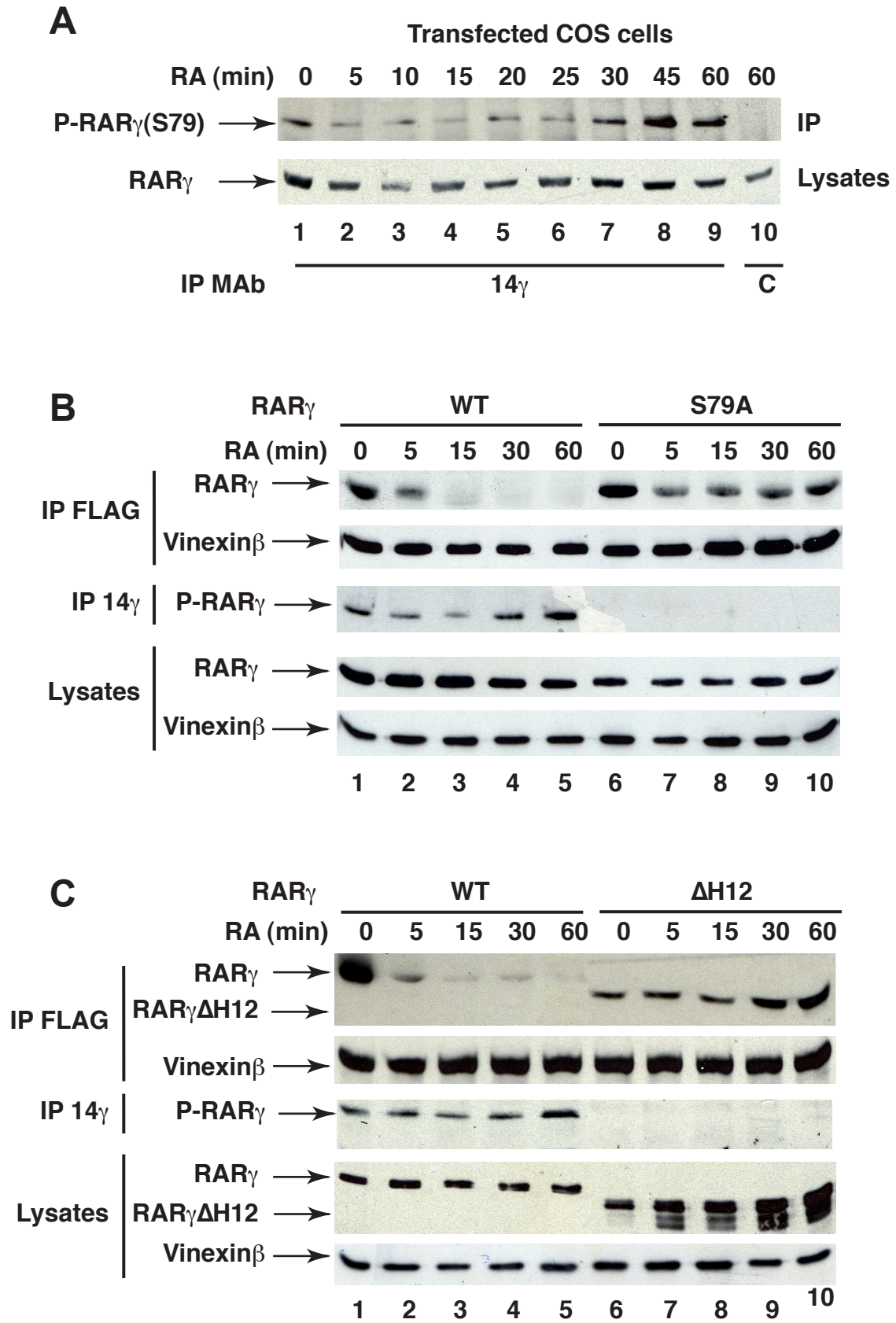
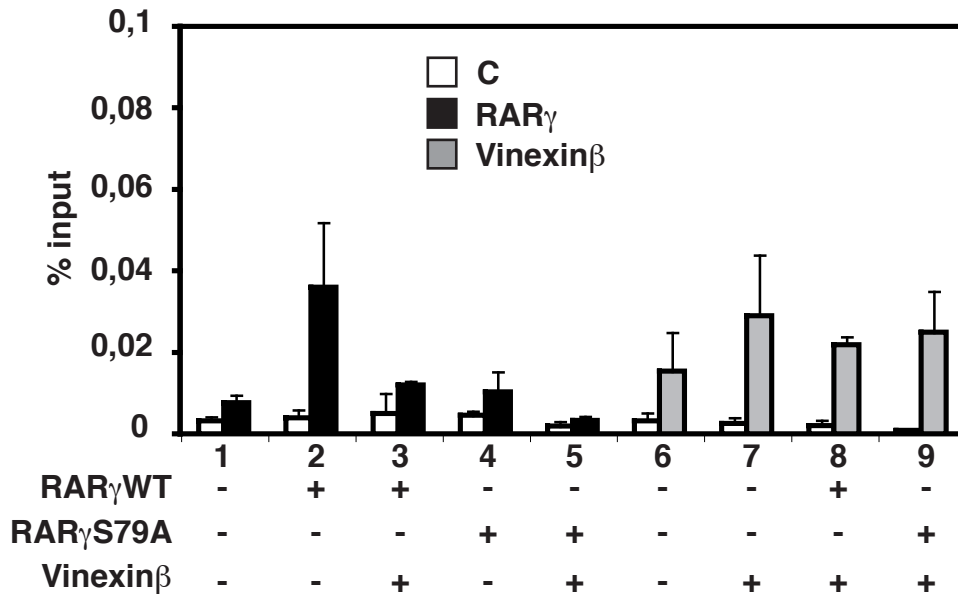


Figure 4

RAR $\beta$ 2 promoter

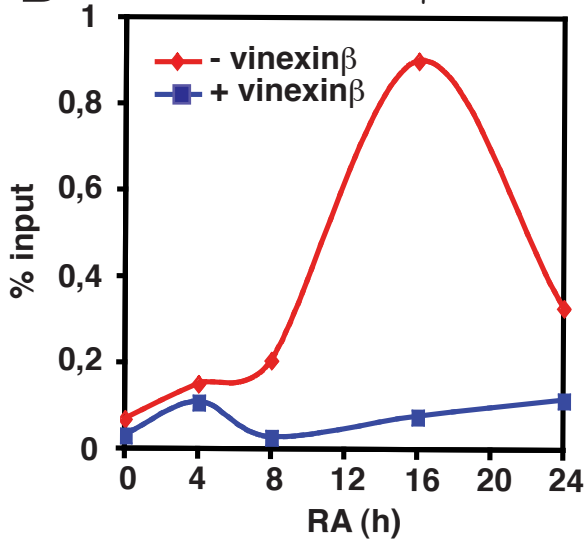
**A**

ChIP assays in the absence of RA



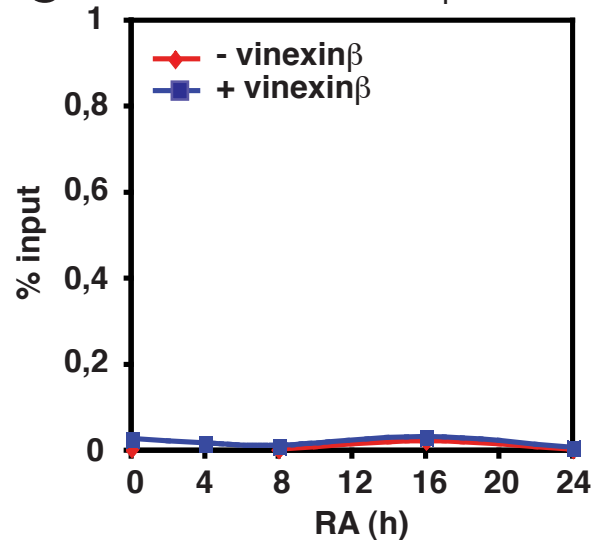
**B**

ChIP RAR $\gamma$



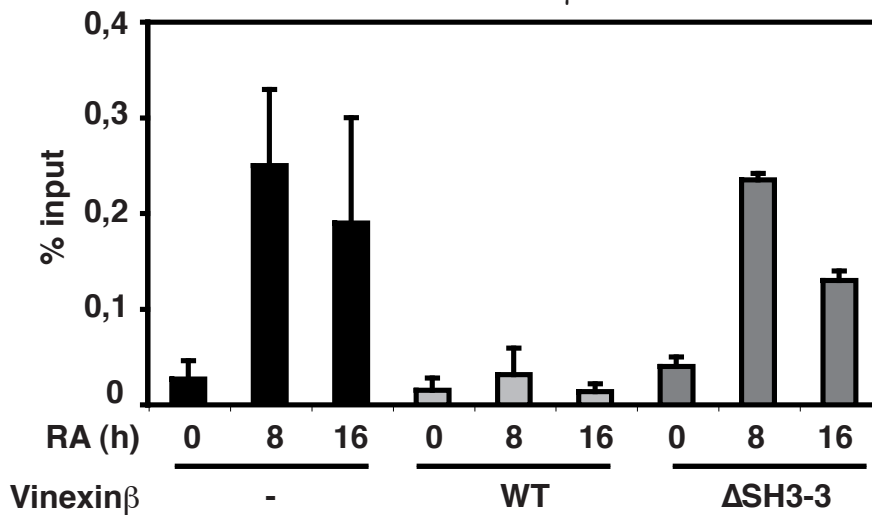
**C**

ChIP Vinexin $\beta$



**D**

ChIP RAR $\gamma$

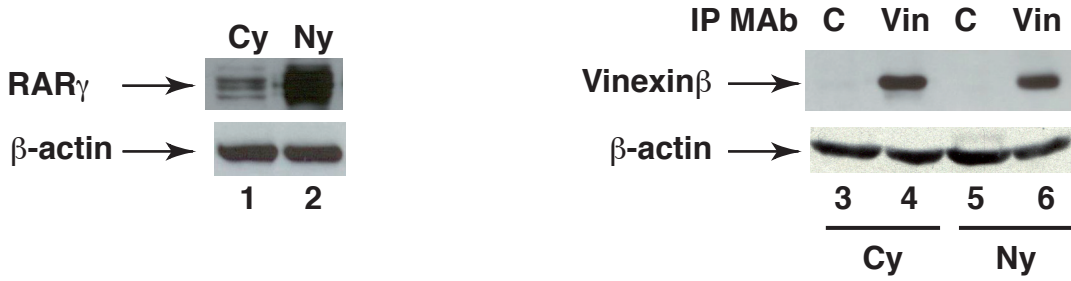


**E**

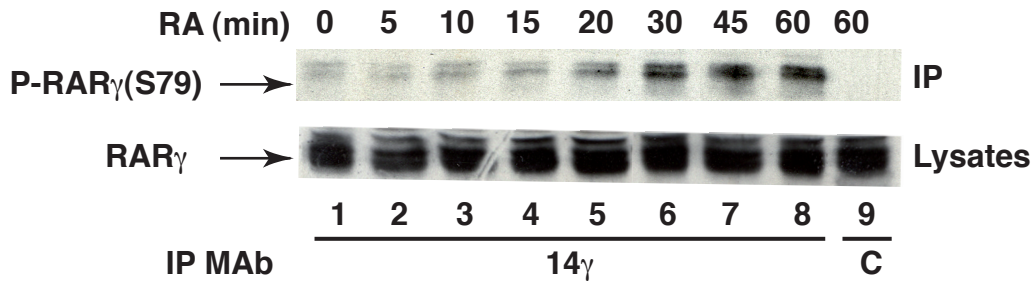


Figure 5

**A** F9 cells



**B** F9 cells



**C** RAR $\beta$ 2 expression

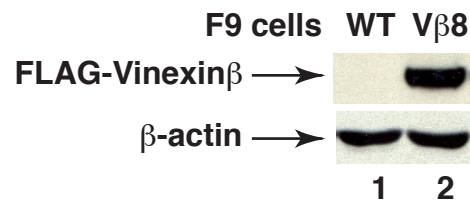
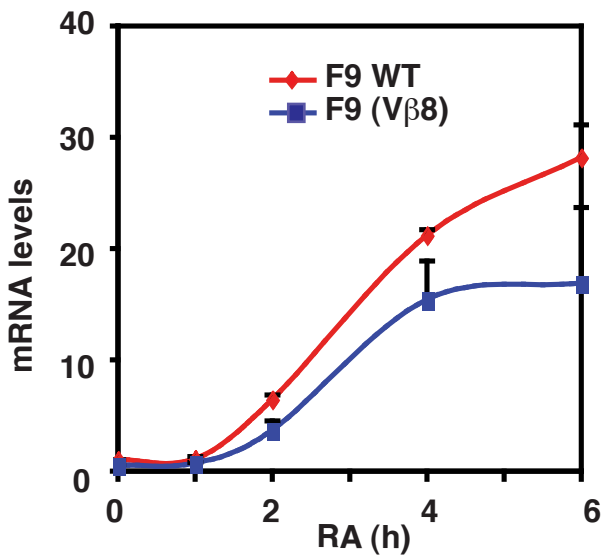


Figure 6

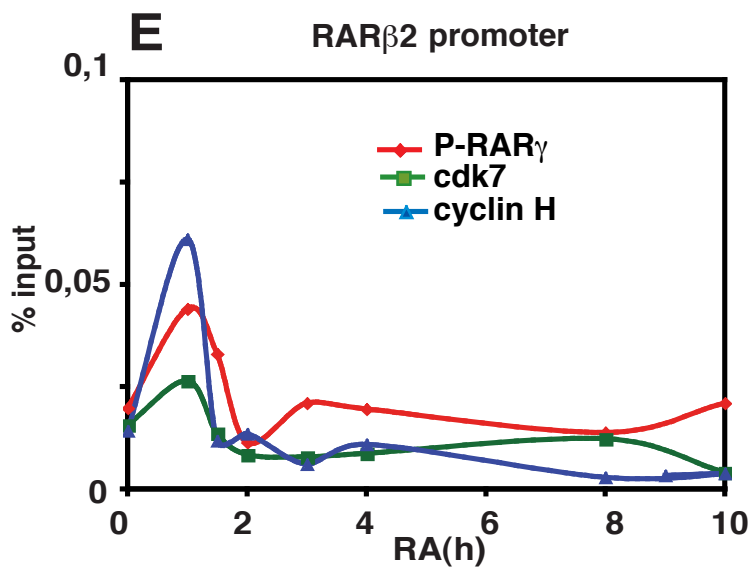
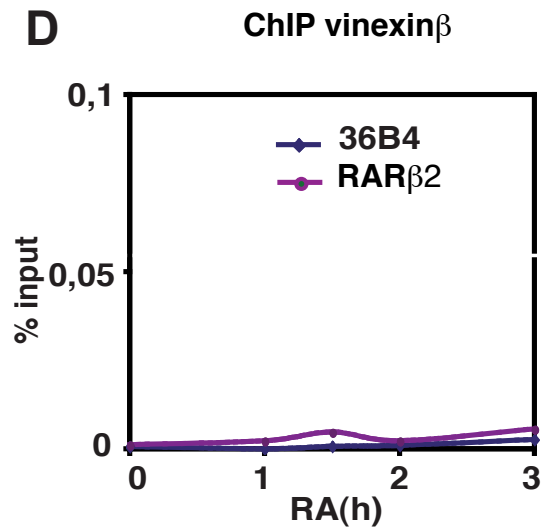
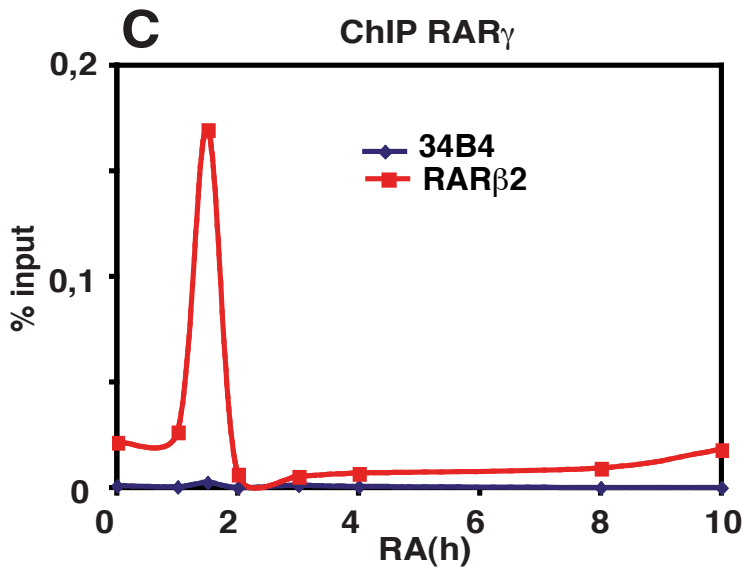
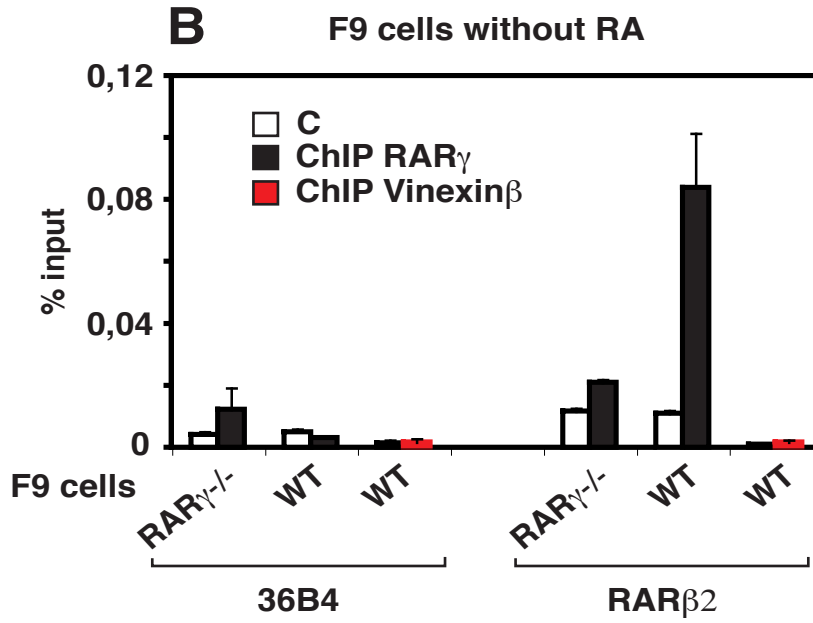
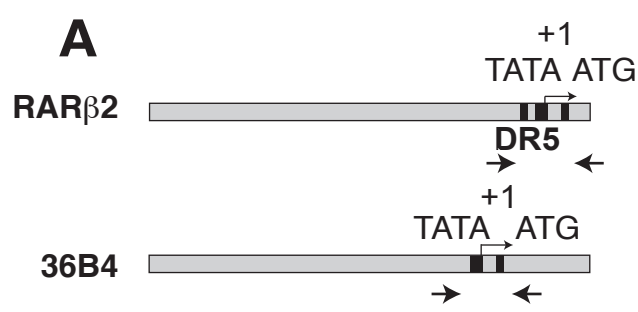


Figure 7

**PUBLICATION n°5**



Signalement bibliographique ajouté par :

**l'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**  
**Service Commun de la Documentation**

**SUG-1 Plays Proteolytic and Non-proteolytic Roles in the Control of Retinoic Acid Target Genes via Its Interaction with SRC-3\***

Christine FERRY, Maurizio GIANNI, Sébastien LALEVÉE, Nathalie BRUCK, Jean-Luc PLASSAT, Ivan RASKA, Jr., Enrico GARATTINI and Cécile ROCHETTE-EGLY

**The Journal of Biological Chemistry, 2009, vol. 284, n° 12, p. 8127-8135**

*Copyright © 2009 by American Society for Biochemistry and Molecular Biology*

**Publication n° 5 :**

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M808815200>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

REVUE n°1

Signalement bibliographique ajouté par :

**l'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**  
**Service Commun de la Documentation**

**Protein kinases and the proteasome join in the combinatorial control of transcription by nuclear retinoic acid receptors**

Gaétan BOUR, Sébastien LALEVÉE and Cécile ROCHETTE-EGLY

**Trends in Cell Biology, 2007, Volume 17, Numéro 6, pages 302-309**

*Copyright © 2009 Elsevier B. V.*

**Revue n° 1**

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2007.04.003>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://scd.unistra.fr/services/peb/>

**REVUE n°2**

## **Phosphorylation control of nuclear receptors**

**Sébastien Lalevée<sup>1</sup>, Christine Ferry<sup>1</sup> and Cécile Rochette-Egly¶**

Department of Functional Genomics, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire. CNRS/INSERM/ULP, UMR 7104, BP 10142, 67404 ILLKIRCH Cedex, FRANCE

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work

¶ Address correspondence to Dr. C. Rochette-Egly, IGBMC, BP 10142, 67404, Illkirch Cedex, CU de Strasbourg, FRANCE; Phone: (33) 3 88 65 34 59; Fax: (33) 3 88 65 32 01; E-Mail: [cegly@igbmc.u-strasbg.fr](mailto:cegly@igbmc.u-strasbg.fr)

**Running title: Nuclear receptors phosphorylation**

**Abstract**

Most transcription factors including nuclear receptors (NRs) act as sensors of the extracellular and intracellular compartments. As such, NRs serve as integrating platforms for a variety of stimuli and are targets for posttranslational modifications such as phosphorylations. During the last decade, knowledge of NRs phosphorylation advanced considerably due to the emergence of new technologies. Indeed, the development of a wide range of phosphorylation site databases, high accuracy mass spectrometry and phospho-specific antibodies allowed the identification of multiple novel phosphorylation sites in NRs. New and improved methods also emerge to connect these data with the downstream consequences of phosphorylation on NRs structure (computational prediction, NMR), intracellular localization (FRAP), interaction with coregulators (proteomics, FRET, FLIM) and affinity for DNA (ChIP, ChIP-seq, FRAP). In the future, such integrated strategies should provide data with a treasure-trove of information about the integration of numerous signaling events by NRs.

**Key words**

Phosphorylation, Nuclear receptors, phosphoproteomics, mass spectrometry, Phosphorylation sites databases, Phosphorylation site-specific antibodies, FRAP, ChIP

## **1-Introduction**

Protein phosphorylation is one of the most relevant and ubiquitous post-translational modifications. It is an integral part of cell signaling and is involved in virtually all-eukaryotic cellular processes. It has been estimated that 30% of cellular proteins are phosphorylated at a given time, representing the phosphoproteome and that over 100 000 potential sites of phosphorylation exist in the human proteome (1). Phosphorylation is a rapid and reversible modification that critically regulates most cellular events through altering protein structure, protein-protein interactions, protein's activity, localization and stability. Moreover aberrant phosphorylation has been linked to a variety of disease states. Thus the elucidation of protein phosphorylation is of great value to understand signaling mechanisms and cellular networks in most biological systems and to reveal potential drug targets.

Among the phosphoproteome there are nuclear receptors (NRs), which are members of a large superfamily of evolutionarily related DNA-binding transcription factors (2,3). In humans, 48 members of the family have been identified, 24 being ligand-dependent receptors (4). They include the nuclear receptors for steroid hormones such as the estrogen receptor (ER), the androgen receptor (AR), the progesterone receptor (PR), the glucocorticoid receptor (GR) and the mineralocorticoid receptor (MR) as well as for non steroidal ligands such as the vitamin D receptor (VDR), the thyroid hormone receptors (TRs), the retinoid receptors (RARs and RXRs) and the peroxysome proliferator activated receptors (PPARs). NRs share a well-defined organization, consisting mainly of a central DNA-binding domain (DBD) linked to a C-terminal Ligand-Binding domain (LBD) and an N-terminal domain (NTD), each domain containing phosphosites. Both the DBD and the LBD are highly folded with structures which have been determined by nuclear magnetic resonance (NMR) and crystallographic studies. The phosphorylation sites identified in these domains are located in flexible regions such as loops, which are more accessible for molecular recognition and modifications (5,6). In contrast, the NTD is natively unstructured (7,8) and therefore contains the majority of the phosphorylation sites identified to date (9-12).

In this chapter, we will present an overview on how NR phosphorylation sites can be identified and how the consequences of phosphorylation on NRs activity can be analyzed. As most phosphorylation studies have been performed with ligand-dependent NRs, we will focus essentially on these receptors.

## **2- Identification of nuclear receptors phosphorylation sites**

The analysis of NRs phosphorylation has been revealed as a challenging task due not only to its highly dynamic nature but also to the low ratio of phosphorylated versus non-phosphorylated NRs found *in vivo*. Early studies of NRs phosphorylation used radiolabeling, immunoprecipitation, 2D-PAGE, phosphoamino acid mapping, phosphopeptide mapping, protein sequencing and site-directed mutagenesis to identify candidate sites. Such classical approaches are clearly depicted and reviewed in details in (13-16). These classical approaches have resulted in the identification of multiple phosphorylation sites in steroid nuclear receptors (ER, PR, GR, AR) as well as in non steroid receptors (RARs, RXR, PPAR, etc), most of them being located in the N-terminal domain (9-12). However, though informative, they are technically limited as they require radioactive material and large amounts of recombinant NRs overexpressed in cultured cells or of bacterially expressed NRs purified and phosphorylated *in vitro* with different kinases. Therefore they are not efficient for identifying phosphorylation of endogenous NRs in response to their cognate ligand or to signaling pathways.

Over the past 5 years, the emergence of new phosphoproteomic tools such as mass spectrometry-based analytical methods has exploded the field and many excellent reviews have been written on the subject (17,18). Briefly, large scale and high throughput analysis of the phosphoproteome by high performance tandem mass spectrometry (MS/MS) combined with methods for enrichment of samples at the phosphoprotein [immunoprecipitation with phosphospecific antibodies] or at the phosphopeptide levels [immobilized metal affinity (IMAC) or titanium dioxide chromatography (19)] and for fractionation of the enriched samples [nanoHPLC or capillary electrophoresis (17,20)], allowed unambiguously to obtain large-scale phosphorylation data sets.

A limitation of MS-based techniques is the requirement of large amounts of material due to the low stoichiometry of protein phosphorylation. However, when coupled to stable-isotope labeling, it presents the advantage of being a fundamental tool for quantifying changes in phosphopeptide abundance (1,18,21). Nevertheless new and improved methods to conduct unbiased analysis of protein phosphorylation and for detecting phosphorylated residues emerge every month.

An updated summary of the locations and proposed functions of experimentally verified phosphorylation sites can be found at several phosphorylation site data bases such as <http://www.phosphosite.org> and <http://phospho.elm.eu.org> Most of them have been incorporated in the Swiss-prot data base (<http://ca.expasy.org/sprot>) (22). In addition, a wide range of computational servers have been developed for prediction of phosphorylation sites



for some kinase families and are available on Internet: Scansite ([http://scansite.mit.edu/motifscan\\_seq.phtml](http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml)) (23), Predikin (<http://predikin.biosci.uq.edu.au>) (24,25), NetPhosK (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK>), Pred Phospho (<http://pred.ngri.re.kr/PredPhospho.htm>) and KinasePhos (<http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw>).

More recently, developments in large-scale and high confidence quantitative MS-based phosphoproteomics allowed to extract thousands novel phosphorylation sites as well as novel motifs for specific kinases (21,26). Therefore new phosphorylation site databases such as Phosida (<http://www.phosida.com>) (27,28), have been developed and can match kinase motifs to thousands of phosphosites. They also integrate structural and evolutionary information on each phosphosite.

MS/MS analysis coupled with optimized database search strategies has allowed the discovery of novel phosphorylation sites with low abundance in ER (29), PR (30) and AR (31). However it must be kept in mind that, before considered valid, the predicted phosphorylation sites must be experimentally verified using mutation of phosphorylated residues and/or phosphorylation site-specific antibodies (29,32-35). Such antibodies provide promising tools to evaluate in immunoprecipitation and/or immunoblotting experiments the phosphorylation profile of individual sites in response to a particular stimulus or during disease processes (33,36,37) and to reveal intricate interplays between the different phosphorylation sites within a NR (33).

### **3- Identification of protein kinases involved in NRs phosphorylation.**

The kinase family responsible for the phosphorylation of a serine, threonine or tyrosine residue can be predicted by analysis of the sequence containing the phosphosite, using the prediction servers mentioned above. However, several individual NR phosphorylation sites can be potentially modified by multiple kinases. Indeed, serine or threonine residues followed by a proline match a consensus motif recognized by either mitogen-activated protein kinases (MAPKs) or cyclin-dependent kinases (CDKs). Moreover both kinases families are large and include several members that respond to a variety of different stimuli. As an example, *in vivo*, phosphorylation of ER $\alpha$  at serine 118 (38,39) and of RAR $\alpha$  at serine 77 (40) can involve either cyclinH/cdk7 in response to the ligand or p42/p44 MAPKs in some cancer cells independently of the ligand.

In early *in vivo* studies, the search for the kinases involved in NRs phosphorylation was performed using pharmacological inhibitors that target specifically the different proline-

directed kinases (33,37,39,40). However experiments with such inhibitors are sometimes controversial and may lack specificity. Today the development of new tools such as small interfering RNAs (41) coupled to kinase assays and microarrays improved significantly the identification of the kinases involved in NRs phosphorylation (33). High throughput screening of the kinases using siRNAs banks targeting the kinome can also be performed (Flexiplate siRNA gene family lists provided by Qiagen, for example). Such an approach requires automated cell transfection coupled to fluorescence microscopy analysis of NRs using phosphospecific antibodies.

#### **4- Dynamics of NRs phosphorylation**

Phosphorylation is a dynamic and cell-specific process. Therefore, equally challenging as the identification of the phosphosites is the comparison of phosphorylation profiles in response to the ligand or to specific signaling pathways. When combined with stable-isotope-labeling by amino acid in cell culture (SILAC) or stable-isotope-tagged amine-reactive reagents (iTRAQ), MS can follow the dynamics of phosphorylation (1,18,21). Albeit such a strategy provided valuable information concerning the regulation of phosphorylation sites, only the most abundant sites are generally monitored, due to loss of the phosphate groups during collision-induced dissociation (CID). More efficient fragmentation techniques such as electron capture dissociation (ECD) or electron transfer dissociation (ECD) should represent improvement to assign more precisely phosphosites in low abundance peptides with multiple charges (17).

Now experiments such as flow cytometry can be designed to analyze signaling networks in single cells following stimulation in complex samples containing multiple cell types. This technique can analyze ten thousands fixed cells per second and measure up to 19 fluorescent parameters simultaneously, using antibodies to cell type specific surface markers and to phosphorylation sites-specific antibodies (21,42). It provided a dynamic picture of STATs phosphorylation in acute myeloid leukemia cells in response to different treatments. Due to the increasing number of NR phosphospecific antibodies available, flow cytometry should indicate how NRs respond to their cognate ligand and/or to different signaling pathways.

#### **5- Phosphorylation and NRs subcellular localization**

In general, nuclear receptors are located in the nucleus, but some of them such as AR, GR and MR are cytoplasmic and undergo a ligand-induced nuclear import. These NRs also

share the property of undergoing cycles of nucleocytoplasmic shuttling. Finally, NRs not only move between nuclear and cytosolic compartments but also within the nucleus between transcriptionally active or inactive clusters. A number of studies provided evidence that these movements would be controlled by phosphorylation.

Immunofluorescence experiments performed with GFP-tagged NRs (either WT or mutated at the phosphorylation sites) indicated that phosphorylation of specific sites enhances nuclear localization while phosphorylation of others increases nuclear export (11,43,44). However, forcing the localization of NRs to the nucleus or the cytoplasm upon fusion to a nuclear localization signal or a nuclear export signal, followed by analysis with phosphosite-specific antibodies revealed that phosphorylation of certain sites would be compartment sensitive whereas phosphorylation of other ones is not (45). Such approaches coupled to the use of kinase pharmacological inhibitors or siRNAs should establish correlations between NRs localization and pathologies characterized by aberrant kinase activities (46).

During the last years, Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) improved considerably and allowed the researcher to visualize the dynamic behavior of NRs in a live-cell scenario. It has been used to examine nucleocytoplasmic shuttling using GFP-tagged AR or MR (47,48). FRAP also proved to be a strong approach to study the intranuclear dynamics of NRs (49-51). Similar approaches using phospho-mutants should confirm the role of phosphorylation in these movements (52).

## **6- NRs phosphorylation and transcription regulation.**

Initial studies of the role of NR phosphorylation in the regulation of NR-dependent transcription relied on transient transfection assays using receptors with alanine substitutions for the phosphorylation sites and reporters for artificial promoters containing hormone response elements (16,40). In some cases, aspartic or glutamic acid substitutions have been used to mimic the negative charge of a phosphate. However, changes in structure as a result of the size of the phosphate group are not always reproduced by an acidic residue. Moreover overexpressed mutants can work as dominant negatives competing with the endogenous receptors.

To circumvent such inconvenient, a good alternative is to stably express the NR of interest in cells that are negative for the receptor. In line with this, stable HeLa cells expressing ER $\alpha$  WT or mutated at the phosphorylation sites have been established (53). Another alternative is to stably reintroduce the WT or mutated NRs in cells that have been invalidated for the receptor by homologous recombination (33,54). Such cell lines are now

used to study the effect of phosphorylation on gene expression by measuring variations in mRNA levels of endogenous established NR-target genes by quantitative RT-PCR, using gene-specific primer pairs (33,37).

## **7- How phosphorylation regulates NR transcriptional activity**

Despite the huge amount of research related to phosphorylation, the detailed role that specific phosphosites play in the function of NRs as of most individual proteins remains poorly understood. This is a challenging task as phosphorylation can alter either the structure of NRs, ligand binding, NRs interaction with coregulators or their affinity for DNA.

### **7-1- Phosphorylation and NRs structure**

In general, the phosphorylation sites are located in the functional domains of NRs, the well structured Ligand and DNA binding domains or the highly unstructured N-terminal domain. The motifs that are associated with phosphorylation sites occur predominantly within flexible regions (5,6) such as loops between the LBD helices (55) or within intrinsically disordered regions such as the NTD (56). Unfortunately, no structural information is available on conformational changes due to phosphorylation due in part to the difficulty of obtaining sufficient purified phosphorylated NRs. However nuclear magnetic resonance (NMR), electron paramagnetic resonance (EPR) and circular dichroism (CD) experiments should provide some information (57). Indeed such approaches indicated that phosphorylation of unstructured flexible domains within other transcription factors may induce changes in the structural properties of the domain with profound impact on its interaction with coregulators (5) and/or on the dynamics of adjacent structured domains (58).

Recently, databases of 3D structures of protein phosphorylation sites have been developed (59) such as Phospho3D (<http://cbm.bio.uniroma2.it/phospho3d>) (60) and DISPHOS (<http://core.ist.temple.edu/pred/pred.html>) (6). Therefore computational studies started to play a central role to predict how phosphorylation can induce relatively small conformational changes (61). Simulations performed with peptides bearing a phosphorylated versus non-phosphorylated serine have shown that phosphorylation stabilizes alpha-helix formation when located at the N-terminus while it destabilizes at the interior (62). Phosphorylation can also induce cis-trans isomerization of the proline residues following phosphorylated serines (61,63). Within peptides with random conformation (37,59), phosphorylation rather confers a more structured conformation. One of the major determinants of stabilization might be the formation of hydrogen bonds between the

phosphate moiety on the serine and side chains of basic adjacent residues (37,59).

### **7-2- NR phosphorylation and ligand binding**

Ligand binding acts as a switch on and therefore is one of the most important events in the control of NRs activity. In general ligand binding is analyzed in *in vitro* equilibrium-based ligand binding assays, using tritiated or fluoresceine-conjugated hormones (36,64). Phosphorylation was found to differentially modulate affinity for the ligand, depending on the phosphorylated domain. As an example, phosphorylation of the ER $\alpha$  LBD was found to increase affinity for estradiol (11,36), while phosphorylation of the PPAR $\gamma$  NTD rather reduces ligand binding (64). No molecular or structural mechanisms have been correlated yet to the former effect, but the latter has been correlated to phosphorylation-dependent modifications of the LBD conformation.

### **7-3- Phosphorylation and coregulators interactions**

As the NTD contains most phosphorylation sites, the challenge was to isolate coregulators interacting specifically with the phosphorylated or non-phosphorylated domain. Unfortunately the classical Yeast Two Hybrid screening (65) could not be efficiently used, due to the intrinsic transcriptional activity of this domain. Therefore researchers rather used pull down experiments or phage display screens with immobilized GST-tagged NTDs (66,67) or far western blotting with biotin-tagged NTD probes (68). Such strategies allowed the isolation of several phospho-dependent interactants for the NTD of ER $\alpha$  (66-68), RAR $\alpha$  (69) or GR (37). Coregulators interacting specifically with the non-phosphorylated NTD have been also isolated (70). Note that for such coregulators, phosphorylation impedes or disrupts the interaction.

Now mass spectrometry is again the tool of choice to identify proteins that bind to the NTD of NRs in a phosphorylation-dependent manner. Such interactions can be determined by peptide pull downs where the unmodified and modified peptides are immobilized on a resin and each incubated with extracts derived from cells of interest (71). Quantification is also possible when combined to SILAC. Together with software advances, these new strategies should give rise to the discovery of a battery of new phosphorylation-dependent coregulators.

Once such partners are isolated, the influence of phosphorylation on their interaction with NRs has to be further validated. Today, the standard GST-pull down and co-immunoprecipitation experiments using receptors with alanine or phosphomimetic

substitutions are not recommended due to steric hindrance and charge differences between a phosphate group and an acidic residue. Now, real time biophysical techniques are preferred such as Plasmon resonance (Biacore) (72), provided that the coregulator or its interacting domain can be covalently immobilized or captured to the sensor surface in the active form. Then synthetic peptides in which the serine (threonine or tyrosine) residue is phosphorylated or not, are injected. The inconvenient of this technique is the requirement of highly purified coregulators. However it has the advantage of determining in real time the kinetic and affinity parameters of the interaction (73).

Finally, a recent and unique approach to monitor the dynamic association-dissociation of proteins within living cells is Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), associated to Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM). These techniques are based on energy transfer from a fluorophore in an electronic excited state serving as a donor to an acceptor chromophore, using pairs of CFP-YFP or GFP-DsRed tagged molecules. It becomes increasingly used to study NR domain interactions with cofactors motifs (50,74) and will be promising to analyze the influence of phosphorylation on coregulators binding (36).

In contrast to the NTD, the LBD interacts with a huge number of coregulators and for most of them the interaction relies on ligand-induced conformational changes of the interacting surface. However, according to recent studies, phosphosites located in flexible regions of the LBD such as loops, do not seem to control directly the binding of coregulators to the domain but rather have profound effects on coregulators binding at adjacent regions very likely through allosteric control. As an example, phosphorylation of RXR $\alpha$  at a residue located in the omega loop alters the conformation of the nearby coactivator's interaction surface, and therefore impedes the recruitment of coactivators (75). In contrast, phosphorylation of RAR $\alpha$  at S369 in loop 9-10 increases the binding of the cyclin H subunit of the general transcription factor TFIIH at the nearby N-terminal end of H9 (33,55). It must be noted that these phosphorylation sites are not conserved between NRs indicating the existence of receptor specific, phosphorylation-dependent fine-tuning.

#### **7-4- Phosphorylation and NRs DNA binding**

NRs regulate gene expression through binding to specific response elements located in the promoters of target genes. While steroid receptors bind DNA exclusively as homodimers, non-steroid receptors bind as heterodimers with RXRs. Whether phosphorylation plays a role in NRs binding to DNA was initially studied in Electro Mobility Shift Assays (EMSA) using a radiolabelled oligopeptide corresponding to a response element and recombinant NRs

phosphorylated with several kinases either *in vitro* or in transfected cells. In some cases, the results were corroborated in super shifts experiments performed with phosphosite-specific antibodies (55). Such approaches indicated that phosphorylation of serine residues involved in the recognition of the cognate response elements or located within the DBD or LBD dimerization surfaces decrease DNA binding (76-78). In contrast, phosphorylation of residues located in other domains such as the NTD rather increased the receptor-DNA interaction (36,55), highlighting the possibility of interdomain communication. Recent investigations using Fluorescein-labeled oligonucleotides and increasing concentrations of control ER or phosphorylated ER suggested that phosphorylation of these residues might alter the conformation or apparent size of the NR-DNA complex (36).

However such assays do not take into account the need to modify the chromatin of target genes integrated in the genome nor interactions with other transcription factors. Therefore chromatin immunoprecipitation experiments (ChIP) are now used to study the recruitment of different phospho NRs at endogenous genes promoters using antibodies against total NRs or phosphorylated NRs. Using NR null or negative cells expressing NRs mutated at the phosphorylation sites often completes such a strategy. Such approaches indicated that phosphorylation controls the recruitment of RAR $\alpha$ , ER $\alpha$  and GR to target promoters (33,79,80).

There is increasing evidence that phosphorylation controls the expression of NRs target genes with a promoter context dependence (54). However, there are no data indicating whether this promoter specificity reflects differences in NR interactions with response elements. Currently the most commonly used high-throughput method for identifying NR binding sites is chromatin immunoprecipitation followed by microarray hybridization (ChIP-chip) (81). However, new methods have recently been developed to take advantage of the next-generation highthroughput sequencing technologies. In one such method, ChIP-seq, immunoprecipitated DNA fragments are directly sequenced and the short sequence reads are then mapped to the reference genome (82,83). Combined with the use of phosphosite-specific antibodies, ChIP-seq should be a promising technique for the identification of DNA sequences binding specifically the phosphorylated NRs.

Finally, it is now possible to study in real time the dynamics of the interaction of NRs with a DNA template taking advantage of the FRAP technology (50,84). The use of fluorescently tagged GR combined with that of cells containing tandem arrays of the MMTV promoter with GR binding sites, permitted to visualize the rapid exchange rates of GR with specific DNA binding sites (49,85). The FRAP strategy should address the influence of

phosphorylation at specific sites or of pharmacological kinase or phosphatase inhibitors on most NRs dynamics.

### **8- Phosphorylation and other NR modifications**

NRs are also targets for other modifications such as ubiquitination, sumoylation, acetylation and methylation (9,86,87). Today it is admitted that interplay between different posttranslational modifications is an important mechanism to achieve an integrated regulation of NRs activity. Only a few studies reported the influence of phosphorylation on sumoylation (88) and acetylation (89). However the best example of cross-talk between modifications is the phosphorylation-dependent ubiquitination and subsequent proteasomal degradation of most NRs such as ER, PR, GR and RAR (56,90). At the basis of this function of phosphorylation was the observation that NRs with the phosphorylation sites substituted with alanine residues are more stable. Additionally these mutants exhibit reduced ubiquitination and degradation by the 26S proteasome upon cognate ligand binding. The influence of phosphorylation on ubiquitination was originally investigated in NR immunoprecipitation experiments followed by immunoblotting analysis of ubiquitin. Today, the increasing number of phosphosite-specific antibodies should facilitate the investigations. Whether phosphorylation controls the recruitment of the ubiquitin-proteasome machinery directly or indirectly through conformational changes requires further investigations taking advantage of the recent MS-based strategies described above.

### **9- Conclusion**

Since the original classical experiments, considerable progress has been made in the identification of NRs phosphorylation sites and in our understanding of the role of these modifications in the control of NRs activity. Indeed, new technologies such as chromatography for phosphopeptide enrichment and high accuracy mass spectrometry allowed the identification of multiple phosphorylation sites in NRs, with some residues being constitutively phosphorylated, while others become phosphorylated in response to the ligand or to specific cell signaling pathways. It also allowed to decipher fine-tuned interplays between some phosphorylation sites. Indeed, phosphorylation of each site can occur separately from the others or depend on a priming phosphorylation event. In the future, improvement of the purification and quantification methods, combined with advances in automation and with development of more robust and specific software tools, should allow the identification of numerous new NR phosphorylation sites, even with low abundance.



Today, an integrated strategy for analysis of a phospho NR would include the following consecutive steps: prediction by computational analysis, phosphorylation (*in vivo* or *in vitro* by activated kinases), separation of the phosphorylated receptor followed by tandem MS/MS analysis of the phosphosites and finally validation of the phosphorylation sites (22) (Figure 1). Such an integrated strategy should provide data with a treasure-trove of information about the integration of numerous signaling events by NRs.

Now the future challenges are to connect these data directly with new highly sensitive, real time or large-scale technologies, in order to get novel critical information about the influence of each phosphosite on the regulation of NRs activity (Figure 1). New biophysical approaches such as NMR, FRET, FRAP and FLIM are promising tools to investigate how phosphorylation fine-tunes the structure and the intracellular localization of NRs as well as their interactions with new coregulators. Large-scale microarrays, ChIP-seq and quantitative proteomics should also provide interesting information about the downstream gene-expression and protein complexes changes controlled by NRs phosphorylation. Finally large-scale and quantitative phosphorylation screens of NRs combined with other large-scale data sets should pave the way to breakthroughs in disease-related research.

## 10- References

1. Smith, J.C. and Figeys, D. (2008) Recent developments in mass spectrometry-based quantitative phosphoproteomics. *Biochem Cell Biol*, **86**, 137-148.
2. McEwan, I.J. (2009) Nuclear receptors: one big family. *Methods Mol Biol*, **505**, 3-18.
3. Laudet, V. and Gronemeyer, H. (2001) *Nuclear Receptor Factsbook*. Academic Press, London.
4. Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M. and Laudet, V. (2006) Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*, **58**, 685-704.
5. Dyson, H.J. and Wright, P.E. (2005) Elucidation of the protein folding landscape by NMR. *Methods Enzymol*, **394**, 299-321.
6. Iakoucheva, L.M., Radivojac, P., Brown, C.J., O'Connor, T.R., Sikes, J.G., Obradovic, Z. and Dunker, A.K. (2004) The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res*, **32**, 1037-1049.
7. Lavery, D.N. and McEwan, I.J. (2005) Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochem J*, **391**, 449-464.
8. Lavery, D.N. and McEwan, I.J. (2008) Structural characterization of the native NH2-terminal transactivation domain of the human androgen receptor: a collapsed disordered conformation underlies structural plasticity and protein-induced folding. *Biochemistry*, **47**, 3360-3369.
9. Faus, H. and Haendler, B. (2006) Post-translational modifications of steroid receptors. *Biomed Pharmacother*, **60**, 520-528.
10. Lannigan, D.A. (2003) Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids*, **68**, 1-9.

11. Weigel, N.L. and Moore, N.L. (2007) Steroid receptor phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions. *Mol Endocrinol*, **21**, 2311-2319.
12. Rochette-Egly, C. (2003) Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal*, **15**, 355-366.
13. 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.
14. Kamps, M.P. (1991) Determination of phosphoamino acid composition by acid hydrolysis of protein blotted to Immobilon. *Methods Enzymol*, **201**, 21-27.
15. Luo, K.X., Hurley, T.R. and Sefton, B.M. (1991) Cyanogen bromide cleavage and proteolytic peptide mapping of proteins immobilized to membranes. *Methods Enzymol*, **201**, 149-152.
16. Ali, S., Metzger, D., Bornert, J.M. and Chambon, P. (1993) Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. *Embo J*, **12**, 1153-1160.
17. Paradela, A. and Albar, J.P. (2008) Advances in the analysis of protein phosphorylation. *J Proteome Res*, **7**, 1809-1818.
18. Witze, E.S., Old, W.M., Resing, K.A. and Ahn, N.G. (2007) Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nat Methods*, **4**, 798-806.
19. Schilling, M. and Knapp, D.R. (2008) Enrichment of phosphopeptides using biphasic immobilized metal affinity-reversed phase microcolumns. *J Proteome Res*, **7**, 4164-4172.
20. Beausoleil, S.A., Villen, J., Gerber, S.A., Rush, J. and Gygi, S.P. (2006) A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization. *Nat Biotechnol*, **24**, 1285-1292.
21. Ptacek, J. and Snyder, M. (2006) Charging it up: global analysis of protein phosphorylation. *Trends Genet*, **22**, 545-554.
22. Hjerrild, M. and Gammeltoft, S. (2006) Phosphoproteomics toolbox: computational biology, protein chemistry and mass spectrometry. *FEBS Lett*, **580**, 4764-4770.
23. Obenaus, J.C., Cantley, L.C. and Yaffe, M.B. (2003) Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3635-3641.
24. Saunders, N.F., Brinkworth, R.I., Huber, T., Kemp, B.E. and Kobe, B. (2008) Predikin and PredikinDB: a computational framework for the prediction of protein kinase peptide specificity and an associated database of phosphorylation sites. *BMC Bioinformatics*, **9**, 245.
25. Saunders, N.F. and Kobe, B. (2008) The Predikin webserver: improved prediction of protein kinase peptide specificity using structural information. *Nucleic Acids Res*, **36**, W286-290.
26. Villen, J., Beausoleil, S.A., Gerber, S.A. and Gygi, S.P. (2007) Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 1488-1493.
27. Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P. and Mann, M. (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*, **127**, 635-648.
28. Gnad, F., Ren, S., Cox, J., Olsen, J.V., Macek, B., Oroshi, M. and Mann, M. (2007) PHOSIDA (phosphorylation site database): management, structural and evolutionary investigation, and prediction of phosphosites. *Genome Biol*, **8**, R250.
29. Britton, D.J., Scott, G.K., Schilling, B., Atsriku, C., Held, J.M., Gibson, B.W., Benz, C.C. and Baldwin, M.A. (2008) A novel serine phosphorylation site detected in the N-

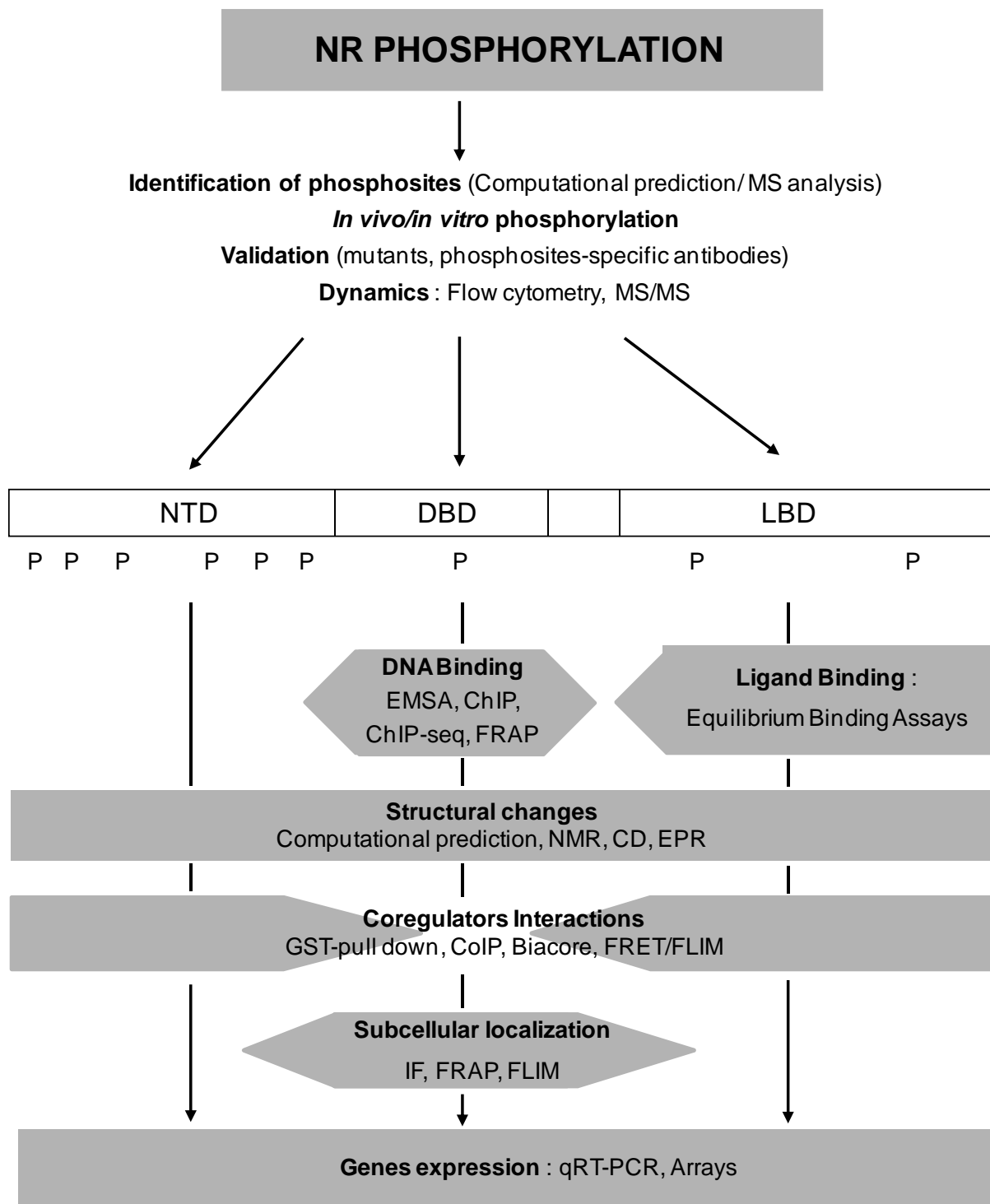
- terminal domain of estrogen receptor isolated from human breast cancer cells. *J Am Soc Mass Spectrom*, **19**, 729-740.
30. Knotts, T.A., Orkiszewski, R.S., Cook, R.G., Edwards, D.P. and Weigel, N.L. (2001) Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *J Biol Chem*, **276**, 8475-8483.
  31. Gioeli, D., Ficarro, S.B., Kwiek, J.J., Aaronson, D., Hancock, M., Catling, A.D., White, F.M., Christian, R.E., Settlage, R.E., Shabanowitz, J. *et al.* (2002) Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem*, **277**, 29304-29314.
  32. Al-Dhaheri, M.H. and Rowan, B.G. (2006) Application of phosphorylation site-specific antibodies to measure nuclear receptor signaling: characterization of novel phosphoantibodies for estrogen receptor alpha. *Nucl Recept Signal*, **4**, e007.
  33. Bruck, N., Vitoux, D., Ferry, C., Duong, V., Bauer, A., de The, H. and Rochette-Egly, C. (2009) A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RARalpha to target promoters. *Embo J*, **28**, 34-47.
  34. Torra, I.P., Staverosky, J.A., Ha, S., Logan, S.K. and Garabedian, M.J. (2009) Development of phosphorylation site-specific antibodies to nuclear receptors. *Methods Mol Biol*, **505**, 221-235.
  35. Chen, D., Washbrook, E., Sarwar, N., Bates, G.J., Pace, P.E., Thirunuvakkarasu, V., Taylor, J., Epstein, R.J., Fuller-Pace, F.V., Egly, J.M. *et al.* (2002) Phosphorylation of human estrogen receptor alpha at serine 118 by two distinct signal transduction pathways revealed by phosphorylation-specific antisera. *Oncogene*, **21**, 4921-4931.
  36. Likhite, V.S., Stossi, F., Kim, K., Katzenellenbogen, B.S. and Katzenellenbogen, J.A. (2006) Kinase-specific phosphorylation of the estrogen receptor changes receptor interactions with ligand, deoxyribonucleic acid, and coregulators associated with alterations in estrogen and tamoxifen activity. *Mol Endocrinol*, **20**, 3120-3132.
  37. Chen, W., Dang, T., Blind, R.D., Wang, Z., Cavasotto, C.N., Hittelman, A.B., Rogatsky, I., Logan, S.K. and Garabedian, M.J. (2008) Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *Mol Endocrinol*, **22**, 1754-1766.
  38. Chen, D., Riedl, T., Washbrook, E., Pace, P.E., Coombes, R.C., Egly, J.M. and Ali, S. (2000) Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIID and participation of CDK7. *Mol Cell*, **6**, 127-137.
  39. Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H. *et al.* (1995) Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*, **270**, 1491-1494.
  40. 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.
  41. Curtis, C.D. and Nardulli, A.M. (2009) Using RNA interference to study protein function. *Methods Mol Biol*, **505**, 187-204.
  42. Krutzik, P.O., Irish, J.M., Nolan, G.P. and Perez, O.D. (2004) Analysis of protein phosphorylation and cellular signaling events by flow cytometry: techniques and clinical applications. *Clin Immunol*, **110**, 206-221.
  43. Sun, K., Montana, V., Chellappa, K., Brelivet, Y., Moras, D., Maeda, Y., Parpura, V., Paschal, B.M. and Sladek, F.M. (2007) Phosphorylation of a conserved serine in the

- deoxyribonucleic acid binding domain of nuclear receptors alters intracellular localization. *Mol Endocrinol*, **21**, 1297-1311.
44. Lombardi, M., Castoria, G., Migliaccio, A., Barone, M.V., Di Stasio, R., Ciociola, A., Bottero, D., Yamaguchi, H., Appella, E. and Auricchio, F. (2008) Hormone-dependent nuclear export of estradiol receptor and DNA synthesis in breast cancer cells. *J Cell Biol*, **182**, 327-340.
  45. Kesler, C.T., Gioeli, D., Conaway, M.R., Weber, M.J. and Paschal, B.M. (2007) Subcellular localization modulates activation function 1 domain phosphorylation in the androgen receptor. *Mol Endocrinol*, **21**, 2071-2084.
  46. Skliris, G.P., Leygue, E., Watson, P.H. and Murphy, L.C. (2008) Estrogen receptor alpha negative breast cancer patients: estrogen receptor beta as a therapeutic target. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **109**, 1-10.
  47. Walther, R.F., Atlas, E., Carrigan, A., Rouleau, Y., Edgecombe, A., Visentin, L., Lamprecht, C., Addicks, G.C., Hache, R.J. and Lefebvre, Y.A. (2005) A serine/threonine-rich motif is one of three nuclear localization signals that determine unidirectional transport of the mineralocorticoid receptor to the nucleus. *J Biol Chem*, **280**, 17549-17561.
  48. Shank, L.C., Kelley, J.B., Gioeli, D., Yang, C.S., Spencer, A., Allison, L.A. and Paschal, B.M. (2008) Activation of the DNA-dependent protein kinase stimulates nuclear export of the androgen receptor in vitro. *J Biol Chem*, **283**, 10568-10580.
  49. George, A.A., Schiltz, R.L. and Hager, G.L. (2009) Dynamic access of the glucocorticoid receptor to response elements in chromatin. *Int J Biochem Cell Biol*, **41**, 214-224.
  50. van Royen, M.E., Dinant, C., Farla, P., Trapman, J. and Houtsmuller, A.B. (2009) FRAP and FRET methods to study nuclear receptors in living cells. *Methods Mol Biol*, **505**, 69-96.
  51. Stenoien, D.L., Patel, K., Mancini, M.G., Dutertre, M., Smith, C.L., O'Malley, B.W. and Mancini, M.A. (2001) FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent. *Nat Cell Biol*, **3**, 15-23.
  52. Picard, N., Charbonneau, C., Sanchez, M., Licznar, A., Busson, M., Lazennec, G. and Tremblay, A. (2008) Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-associated protein ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol*, **22**, 317-330.
  53. Tharakan, R., Lepont, P., Singleton, D., Kumar, R. and Khan, S. (2008) Phosphorylation of estrogen receptor alpha, serine residue 305 enhances activity. *Mol Cell Endocrinol*, **295**, 70-78.
  54. Taneja, R., Rochette-Egly, C., Plassat, J.L., Penna, L., Gaub, M.P. and Chambon, P. (1997) Phosphorylation of activation functions AF-1 and AF-2 of RAR alpha and RAR gamma is indispensable for differentiation of F9 cells upon retinoic acid and cAMP treatment. *Embo J*, **16**, 6452-6465.
  55. Gaillard, E., Bruck, N., Brelivet, Y., Bour, G., Lalevee, S., Bauer, A., Poch, O., Moras, D. and Rochette-Egly, C. (2006) Phosphorylation by PKA potentiates retinoic acid receptor alpha activity by means of increasing interaction with and phosphorylation by cyclin H/cdk7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 9548-9553.
  56. Bour, G., Lalevee, S. and Rochette-Egly, C. (2007) Protein kinases and the proteasome join in the combinatorial control of transcription by nuclear retinoic acid receptors. *Trends Cell Biol*, **17**, 302-309.
  57. Watt, K. and McEwan, I.J. (2009) Using intrinsic fluorescence emission spectroscopy to study steroid receptor and coactivator protein conformation dynamics. *Methods Mol Biol*, **505**, 205-218.

58. Lee, G.M., Pufall, M.A., Meeker, C.A., Kang, H.S., Graves, B.J. and McIntosh, L.P. (2008) The affinity of Ets-1 for DNA is modulated by phosphorylation through transient interactions of an unstructured region. *J Mol Biol*, **382**, 1014-1030.
59. Kitchen, J., Saunders, R.E. and Warwicker, J. (2008) Charge environments around phosphorylation sites in proteins. *BMC Struct Biol*, **8**, 19.
60. Zanzoni, A., Ausiello, G., Via, A., Gherardini, P.F. and Helmer-Citterich, M. (2007) Phospho3D: a database of three-dimensional structures of protein phosphorylation sites. *Nucleic Acids Res*, **35**, D229-231.
61. Groban, E.S., Narayanan, A. and Jacobson, M.P. (2006) Conformational changes in protein loops and helices induced by post-translational phosphorylation. *PLoS Comput Biol*, **2**, e32.
62. Andrew, C.D., Warwicker, J., Jones, G.R. and Doig, A.J. (2002) Effect of phosphorylation on alpha-helix stability as a function of position. *Biochemistry*, **41**, 1897-1905.
63. Shaw, P.E. (2007) Peptidyl-prolyl cis/trans isomerases and transcription: is there a twist in the tail? *EMBO Rep*, **8**, 40-45.
64. Shao, D., Rangwala, S.M., Bailey, S.T., Krakow, S.L., Reginato, M.J. and Lazar, M.A. (1998) Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature*, **396**, 377-380.
65. Le Douarin, B., Heery, D.M., Gaudon, C., vom Baur, E. and Losson, R. (2001) Yeast two-hybrid screening for proteins that interact with nuclear hormone receptors. *Methods Mol Biol*, **176**, 227-248.
66. Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S. and Kato, S. (1999) Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. *Mol Cell Biol*, **19**, 5363-5372.
67. Gburcik, V., Bot, N., Maggiolini, M. and Picard, D. (2005) SPBP is a phosphoserine-specific repressor of estrogen receptor alpha. *Mol Cell Biol*, **25**, 3421-3430.
68. Masuhiro, Y., Mezaki, Y., Sakari, M., Takeyama, K., Yoshida, T., Inoue, K., Yanagisawa, J., Hanazawa, S., O'Malley B, W. and Kato, S. (2005) Splicing potentiation by growth factor signals via estrogen receptor phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 8126-8131.
69. Brondani, V., Schefer, Q., Hamy, F. and Klimkait, T. (2005) The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 regulates phospho-Ser77 retinoic acid receptor alpha stability. *Biochem Biophys Res Commun*, **328**, 6-13.
70. 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 (RARgamma) and represses RARgamma-mediated transcription. *J Biol Chem*, **280**, 17027-17037.
71. Vermeulen, M., Hubner, N.C. and Mann, M. (2008) High confidence determination of specific protein-protein interactions using quantitative mass spectrometry. *Curr Opin Biotechnol*, **19**, 331-337.
72. Lavery, D.N. (2009) Binding affinity and kinetic analysis of nuclear receptor/co-regulator interactions using surface plasmon resonance. *Methods Mol Biol*, **505**, 171-186.
73. Chen, Y., Kerimo, A., Khan, S. and Wei, L.N. (2002) Real-time analysis of molecular interaction of retinoid receptors and receptor-interacting protein 140 (RIP140). *Mol Endocrinol*, **16**, 2528-2537.

74. Jeyakumar, M., Webb, P., Baxter, J.D., Scanlan, T.S. and Katzenellenbogen, J.A. (2008) Quantification of ligand-regulated nuclear receptor corepressor and coactivator binding, key interactions determining ligand potency and efficacy for the thyroid hormone receptor. *Biochemistry*, **47**, 7465-7476.
75. Macoritto, M., Nguyen-Yamamoto, L., Huang, D.C., Samuel, S., Yang, X.F., Wang, T.T., White, J.H. and Kremer, R. (2008) Phosphorylation of the human retinoid X receptor alpha at serine 260 impairs coactivator(s) recruitment and induces hormone resistance to multiple ligands. *J Biol Chem*, **283**, 4943-4956.
76. Yoshimura, K., Muto, Y., Shimizu, M., Matsushima-Nishiwaki, R., Okuno, M., Takano, Y., Tsurumi, H., Kojima, S., Okano, Y. and Moriwaki, H. (2007) Phosphorylated retinoid X receptor alpha loses its heterodimeric activity with retinoic acid receptor beta. *Cancer Sci*, **98**, 1868-1874.
77. Chen, D., Pace, P.E., Coombes, R.C. and Ali, S. (1999) Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol Cell Biol*, **19**, 1002-1015.
78. Delmotte, M.H., Tahayato, A., Formstecher, P. and Lefebvre, P. (1999) Serine 157, a retinoic acid receptor alpha residue phosphorylated by protein kinase C in vitro, is involved in RXR.RARalpha heterodimerization and transcriptional activity. *J Biol Chem*, **274**, 38225-38231.
79. Blind, R.D. and Garabedian, M.J. (2008) Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **109**, 150-157.
80. Valley, C.C., Metivier, R., Solodin, N.M., Fowler, A.M., Mashek, M.T., Hill, L. and Alarid, E.T. (2005) Differential regulation of estrogen-inducible proteolysis and transcription by the estrogen receptor alpha N terminus. *Mol Cell Biol*, **25**, 5417-5428.
81. Carroll, J.S. and Brown, M. (2006) Estrogen receptor target gene: an evolving concept. *Mol Endocrinol*, **20**, 1707-1714.
82. Dietz, S.C. and Carroll, J.S. (2008) Interrogating the genome to understand oestrogen-receptor-mediated transcription. *Expert Rev Mol Med*, **10**, e10.
83. Zhang, Z.D., Rozowsky, J., Snyder, M., Chang, J. and Gerstein, M. (2008) Modeling ChIP sequencing in silico with applications. *PLoS Comput Biol*, **4**, e1000158.
84. Metivier, R., Reid, G. and Gannon, F. (2006) Transcription in four dimensions: nuclear receptor-directed initiation of gene expression. *EMBO Rep*, **7**, 161-167.
85. Becker, M., Baumann, C., John, S., Walker, D.A., Vigneron, M., McNally, J.G. and Hager, G.L. (2002) Dynamic behavior of transcription factors on a natural promoter in living cells. *EMBO Rep*, **3**, 1188-1194.
86. Le Romancer, M., Treilleux, I., Leconte, N., Robin-Lespinasse, Y., Sentis, S., Bouchekioua-Bouzaghrou, K., Goddard, S., Gobert-Gosse, S. and Corbo, L. (2008) Regulation of estrogen rapid signaling through arginine methylation by PRMT1. *Mol Cell*, **31**, 212-221.
87. Popov, V.M., Wang, C., Shirley, L.A., Rosenberg, A., Li, S., Nevalainen, M., Fu, M. and Pestell, R.G. (2007) The functional significance of nuclear receptor acetylation. *Steroids*, **72**, 221-230.
88. Tremblay, A.M., Wilson, B.J., Yang, X.J. and Giguere, V. (2008) Phosphorylation-dependent sumoylation regulates estrogen-related receptor-alpha and -gamma transcriptional activity through a synergy control motif. *Mol Endocrinol*, **22**, 570-584.
89. Cui, Y., Zhang, M., Pestell, R., Curran, E.M., Welshons, W.V. and Fuqua, S.A.W. (2004) Phosphorylation of Estrogen Receptor alpha blocks its acetylation and regulates estrogen sensitivity. *Cancer Res*, **64**, 9199-9208

90. Dennis, A.P. and O'Malley, B.W. (2005) Rush hour at the promoter: how the ubiquitin-proteasome pathway polices the traffic flow of nuclear receptor-dependent transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **93**, 139-151.



**Figure 1: Strategies for integrated analysis of nuclear receptors phosphorylation**



## Résumé :

Les rétinoïdes (dérivés actifs de la vitamine A) agissent *via* deux familles de récepteurs nucléaires : les RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) et les RXR ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). *In vivo*, le signal rétinoïque est transmis par des hétérodimères du type RAR/RXR qui se comportent comme des facteurs de transcription inductibles par leur ligand et se lient à des éléments de réponse (RARE) situés au niveau du promoteur des gènes cibles. L'équipe a démontré que des processus de phosphorylation ciblent deux domaines des RAR, le domaine N-terminal (NTD) et le domaine de liaison du ligand (LBD), et jouent un rôle clé dans l'activité transcriptionnelle des récepteurs. Pour comprendre l'impact des phosphorylations sur le fonctionnement des RAR, je me suis particulièrement intéressé à étudier les dynamiques d'association/dissociation des RAR ( $\alpha$  et  $\gamma$ ) avec différents partenaires protéiques en fonction de leur état de phosphorylation.

Dans le cas de RAR $\alpha$ , j'ai participé à la mise en évidence des conséquences de la phosphorylation du LBD au niveau de la sérine 369, localisée à proximité du domaine de fixation de la cycline H. *Via* des changements conformationnels, cette phosphorylation améliore le recrutement de la cycline H associée à la kinase cdk7 du facteur général de transcription TFIIH. Cet effet est à la base d'une cascade aboutissant à la phosphorylation par cdk7 du NTD de RAR $\alpha$ . J'ai aussi participé à l'étude d'un autre partenaire de RAR $\alpha$ , SUG-1, qui est une sous-unité du protéasome. SUG-1 joue un rôle double dans la transcription des gènes cibles de RAR $\alpha$  en régulant la dynamique de la transcription en absence de protéolyse, et en signalisant sa fin *via* la dégradation du coactivateur SRC-3.

Dans le cas de RAR $\gamma$ , j'ai démontré que le motif riche en prolines (MRP) du NTD interagit directement avec un des domaines SH3 d'une protéine adaptatrice, la Vinexine  $\beta$ . Cette association a lieu uniquement lorsque le MRP n'est pas phosphorylé et maintient le récepteur en dehors de la chromatine. En réponse à l'AR, une des sérines du MRP devient phosphorylée, induisant la dissociation de la Vinexine  $\beta$  et finalement le recrutement de RAR $\gamma$  phosphorylé au niveau des promoteurs des gènes cibles de l'AR. Dans ce contexte, j'ai également effectué une recherche bioinformatique de nouveaux RARE fonctionnels à l'échelle du génome.

## Summary :

The effects of Retinoids (active derivatives of Vitamin A) are mediated by two families of nuclear receptors, RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) and RXR ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ). *In vivo*, the RA signal is transmitted by RAR/RXR heterodimers, which function as ligand-dependent transcriptional regulators and bind to RARE (Retinoic Acid Response Element) at the promoters of target genes. Our team demonstrated that two domains of RARs, the NTD (N-terminal Domain) and the LBD (Ligand Binding Domain), are targets for phosphorylation processes that control RAR transcription. In order to decipher how phosphorylation controls RARs functions, I analyzed the dynamics of RAR ( $\alpha$  and  $\gamma$ ) association/dissociation with different protein partners depending on RARs phosphorylation state.

In the case of RAR $\alpha$ , I highlighted the consequences of LBD phosphorylation at serine 369, localized in close vicinity to the cyclin H docking site. This phosphorylation, *via* conformational changes, influences the recruitment of cyclin H associated to the cdk7 kinase of the general transcription factor TFIIH. This effect is at the basis of a cascade leading to the phosphorylation of the NTD by cdk7. I also participated to the study of another RAR $\alpha$  partner, SUG-1, a subunit of the proteasome. SUG-1 plays a dual role in RAR $\alpha$  target gene transcription by regulating the dynamic of transcription without proteolysis and by signaling the end of the RA response *via* the degradation of its coactivator, SRC-3.

In the case of RAR $\gamma$ , I demonstrated that the PRM (Proline Rich Motif) of the NTD interacts directly with one SH3 domain of Vinexin  $\beta$ , an adaptor protein. This association occurs only when the PRM is not phosphorylated and maintains the receptor outside of the chromatin. After RA addition, one of the serine of the PRM becomes phosphorylated, inducing the dissociation of Vinexin  $\beta$ , and finally the recruitment of phosphorylated RAR $\gamma$  to RA target-genes. In this context, I also realized a "genome wide" bioinformatic search for finding new functional RAREs.