

Université de Montréal

- L'IMPLICATION DE LA PHOSPHORYLATION DE RXR α DANS LA
RÉSISTANCE DE LIGNÉES CELLULAIRES CANCÉREUSES À L'ACIDE
RÉTINOÏQUE -

par
Émilie Pepin

Programme de Biologie Moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M. Sc. en
Biologie Moléculaire

Mai 2005

© Émilie Pepin, 2005



QH

506

U54

2005

V. 023

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
- L'IMPLICATION DE LA PHOSPHORYLATION DE RXR α DANS LA
RÉSISTANCE DE LIGNÉES CELLULAIRES CANCÉREUSES À L'ACIDE
RÉTINOÏQUE -

présenté par :
Émilie Pepin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

D^r Richard Bertrand
président-rapporteur

D^r Edward C. Bradley
directeur de recherche

D^{re} Isabelle Royal
membre du jury

Résumé

Introduction : Le récepteur à l'acide rétinoïque β (RAR β) est un gène supresseur de tumeur dont le produit hétérodimérise avec les récepteurs aux rétinoïdes X (RXR). Cette dimérisation permet la transmission du signal induit par l'acide rétinoïque. Cependant, RAR β semble promouvoir la carcinogénèse dans certaines lignées cellulaires cancéreuses où il est exprimé. Des travaux effectués par le groupe du D^r Kremer (McGill, Montréal) démontrent que la phosphorylation du résidu sérine 260 (S260) du domaine de liaison au ligand (LBD) de RXR α serait responsable d'une insensibilité des cellules d'hépatocarcinome à la vitamine D. Nous tentons d'évaluer l'implication de la Ser 260 de RXR α dans la résistance des lignées Hs-578t (cancer du sein) et A-549 (cancer du poumon) à l'acide rétinoïque all-trans (atRA).

Méthodes/Résultats: Des essais de prolifération sur les lignées cancéreuses A-549 et HS-578T, utilisant l'inhibiteur des MAPK PD98059 et atRA, suggèrent que l'inhibition de la voie des MAPK pourrait re-sensibiliser les cellules à l'effet anti-prolifératif de AtRA. Une autre série d'essais de prolifération utilise l'inhibiteur de EGFR, Iressa, utilisé comme traitement contre le cancer du poumon NSCLC. Nos résultats démontrent que EGFR n'aurait pas d'effet sur la sensibilité des cellules à atRA. Une expérience antérieure de micropuce a identifié les gènes RAR β , ID3, ICAM-1, IL-1 β , Survivin, Endothelin-1 and COX-2 comme gènes affectés par l'atRA dans la lignée A-549. Afin de mieux comprendre le rôle de la Ser 260 de RXR α sur la signalisation par atRA, nous avons transfecté les cellules A-549 et Hs-578T de façon transitoire avec RXR α^{wt} ou RXR α^{S260A} . Les amplifications semi-quantitatives par RT-PCR effectuées sur les gènes cibles semblent indiquer que l'acide aminé Ser 260 de RXR α ne serait pas impliqué dans la résistance des lignées à l'atRA.

Conclusion : Nos résultats démontrent que la voie de Erk1/2, via une voie indépendante de EGFR, pourrait jouer un rôle dans la résistance de certaines lignées cancéreuses à l'effet anti-prolifératif de atRA.

Mots Clés : Acide rétinoïque *all-trans*, RXR α , Erk1/2, phosphorylation, RA résistance

Abstract

Introduction: The retinoic acid receptor (RAR β) is a tumor suppressor gene which product heterodimerizes with the retinoic X receptors (RXR). This dimer is activated by the binding of retinoic acid (RA) and allows the transmission of the RA signal. However, in some cancer cell lines, RAR β seems to act more like an oncogene, promoting cancer progression. Previous works done by Dr Kremer (McGill, Montreal) show that phosphorylation of ser 260 in the ligand binding domain (LBD) of RXR α would be responsible for the resistance of hepatocarcinoma cells to vitamin D. We are trying to evaluate the implication of Ser 260 of RXR α in the atRA resistance of Hs-578T (breast cancer cell line) and A-549 (lung adenocarcinoma cell line).

Methods/Results: Proliferation assays have been done on A-549 and Hs-578T cancer cell lines using the MAPK inhibitor, PD98059, alone or in combination with atRA. The assay shows that inhibition of the signalling by the MAPK pathway somewhat resensitizes the cells to the antiproliferative effect of atRA. Other proliferation assays done with an EGFR inhibitor, Iressa, suggest that this receptor would not be involved in RA-resistance. Moreover, a microarray experiment done in the past identified the genes RAR β , ID3, ICAM-1, IL-1 β , Survivin, Endothelin-1 and Cox-2 as genes induced by RA. In order to understand better the role of the Ser260 of RXR α in the RA signalling, we transiently transfected the cell lines A-549 and Hs-578T with RXR α ^{wt} and RXR α ^{S260A}. Semi-quantitative RT-PCR amplifications done on the target genes are not conclusive concerning the implication of this phosphorylation on the signalling by atRA. On the contrary, they somewhat indicate that this amino acid would not be the cause of the atRA resistance of those cell lines to atRA.

Conclusion: Our results show that the MAPK pathway could be responsible in part for the RA resistance of the cell lines A-549 and Hs-578t, independently of the EGFP pathway. Furthermore, the S260 of RXR α would not be the target of the MAPK pathway.

Keywords: retinoic acid *all-trans*, RXR α , Erk1/2, phosphorylation, RA resistance

Table des Matières

Chapitre 1 : Introduction 1

1	La superfamille des récepteurs nucléaires :	3
1.1	<i>Le groupe I</i> :	3
1.2	<i>Le groupe II</i> :	3
1.3	<i>Les groupes III et IV</i> :	4
1.4	<i>Les groupes V et VI</i> :	4
2.	Les récepteurs aux rétinoïdes :	4
2.1	<i>Métabolisme de l'acide rétinoïque</i> :	5
2.2	<i>La structure des récepteurs aux rétinoïdes</i> :	6
2.2.1	<i>Domaine de liaison à l'ADN (DBD - Région C)</i> :	6
2.2.2	<i>Le domaine de liaison au ligand (LBD - Faisant partie de la région E)</i> :	8
2.2.3	<i>Domaines d'activation de la transcription (AF-1-Région A/B et AF-2-Région E)</i> :	9
2.2.4	<i>Région Charnière (Région D)</i> :	10
2.2.5	<i>Région F</i> :	10
2.3	<i>Activation de la transcription par l'hétérodimère RAR-RXR</i> :	10
2.4	<i>Phosphorylation des récepteurs aux rétinoïdes</i> :	11
2.4.1	<i>Phosphorylation des RARs</i> :	11
2.4.1.1	<i>Phosphorylation de RARγ</i> :	11
2.4.1.2	<i>Phosphorylation de RARα</i> :	12
2.4.2	<i>Phosphorylation des RXRs</i> :	13
3.	La résistance à l'acide rétinoïque :	14
3.1	<i>La résistance à l'acide rétinoïque dans différents cancers</i> :	14
3.1.1	<i>Mécanismes cellulaires impliqués dans la résistance à atRA</i> :	14
3.1.1.1	<i>Localisation aberrante de RXRα</i> :	15
3.1.1.2	<i>Dissociation de l'hétérodimère RXRα - RARα</i> :	15
3.1.1.3	<i>Surexpression de HER2/neu</i> :	15
3.1.2	<i>Résistance à l'acide rétinoïque dans la leucémie promyéloïde aigüe</i> : ..	16
3.1.2.1	<i>Mutation dans PML-RARα</i> :	17
3.1.2.2	<i>Protéine tronquée PML-RARα</i> :	17
3.1.2.3	<i>Promotion de la différenciation par des thérapies combinées</i> :	17
3.1.3	<i>Résistance à l'acide rétinoïque dans le cancer du poumon</i> :	18

3.1.3.1	L'implication du gène RAR β :	18
3.1.3.2	L'implication de la protéine COUP-TF :	19
4.	La voie des MAP kinases :	20
5.	Hypothèses de travail et but du projet :	23

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes 27

Culture cellulaire.....	28
Vecteurs	28
Génération de clones stables.....	28
Essais de prolifération.....	29
Synthèse de l'ADN complémentaire	29
Expériences de RT-PCR semi-quantitatif.....	30
Extraction des protéines.....	30
Immunobuvardage de type Western	31

Chapitre 3 : Résultats 32

1. L'inhibition de la voie des MAPK sensibilise les lignées Hs-578T et A-549 à atRA	33
1.1 Les lignées Hs-578T et A-549 sont insensibles à l'atRA	33
1.2 La voie des MAPK serait responsable de l'insensibilité de A-549 et Hs-578T à l'atRA.....	34
1.3 La voie des EGFR pourrait être impliquée dans la sensibilité des cellules A-549 et Hs-578T à atRA.....	34
2. Établissement de lignées exprimant des mutants de phosphorylation de RXR α et RAR β	35

3. Abolir la phosphorylation par les MAPK ne semble pas sensibiliser les cellules à atRA	36
--	----

Chapitre 4 :Discussion 45

1. Implication de la voie MAPK/ERK dans la résistance à l'acide rétinoïque	46
2. Génération de clones stables	48
3. Effet du mutant de phosphorylation de RXR α sur la signalisation par les rétinoïdes	49
4. Conclusions et perspectives :	54

Table des Figures

Chapitre 1 : Introduction

Figure 1 : Métabolisme du rétinol et de l'acide rétinoïque.....	5
Figure 2 : Structure générale des récepteurs nucléaires	7
Figure 3 : Position des récepteurs RXRs et RARs sur les différents motifs de RARE	8
Figure 4 : Cascade des MAPKs.....	22

Chapitre 3 : Résultats

Figure 1 : L'inhibition de la voie des MAPKs sensibilise les lignées HS-578T, A-549 et LCT à l'atRA.....	39
Figure 2 : La voie des EGFR pourrait être impliquée dans la sensibilité des cellules à atRA	40
Figure 3 : Analyse de l'ADN et de l'ARNm des clones provenant des cellules Hs-578T et A-549.....	41
Figure 4 : Transfection transitoire et vérification d'expression des gènes exogènes.....	42
Figure 5 : Le mutant de phosphorylation de RXR α ne semble pas modifier la signalisation de l'acide rétinoïque par RAR β	43–44

Liste des abréviations

9-cisRA : Acide rétinoïque 9-*cis*
ADN : Acide déoxyribonucléique
AF-1 et AF-2 : Domaines d'activation de la transcription
AtRA : Acide rétinoïque *all-trans*
cdk7 : Cyclin-dependent kinase 7
Cox-2 : Cyclooxygenase 2
CRABP I et II : Cellular retinoic acid binding protein I et II
CRBP I et II: Cellular retinol binding protein I et II
DBD : Domaine de liaison à l'ADN
DR : Répétitions directes
GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GCNF: Germ cell nuclear factor
G-CSF: Granulocyte colony-stimulation factor
GEF : Guanine-nucleotide exchange factor
HAT : Histone acétyl transférase
Her2/neu: Human epidermal growth factor receptor 2
IAP-4: Inhibitors of apoptosis protein-4
ICAM-1: Intercellulaire adhesion molecule 1 (CD54)
ID-3 : Inhibitor of DNA binding 3
IGF-1: Insulin-like growth factor-1
IGF-BP3 : Insulin-like growth factor binding protein 3
IL-1 β : Interleukin-1 β
IRES: Internal Ribosome Entry Site
JNK1 et 2 : c-Jun NH₂-terminal kinase 1 et 2
LBD : Domaine de liaison au ligand
LRAT: Lecithin retinol acyl transferase
MAPK : Mitogen-activated-protein-kinase
MEK : MAPK/ERK kinase
NcoR: Nuclear receptor co-repressor
NSCLC : Non Small-Cell Lung carcinoma
p38MAPK : p-38 mitogen-activated-protein-kinase
PKC : Protein kinase C
PML : Promyelocytic leukaemia
PP2A : Protein phosphatase 2A
RalDH :Retinal dehydrogenase
RAR: Récepteur à l'acide rétinoïque
RARE : Élément de réponse aux rétinoïdes
RBP: Retinol binding protein
RoDH : Retinol dehydrogenase
RXR: Récepteurs aux rétinoïdes X
SF-1: Steroïdogenic factor-1
SFC: Splicing factor compartment
SMRT: Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
SOS: Son of sevenless

TBP : TATA box-binding protein
TFIIH: General Transcription Factor II H
UV: Ultra violets

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr W. Edward C. Bradley, pour son appui tout le long de ma maîtrise et son expertise dans le domaine des récepteurs à l'acide rétinoïque. Je lui serai toujours reconnaissante de la confiance et la liberté qu'il m'a accordé tout au cours de mon projet. Il a su communiquer sa passion pour la recherche fondamentale et m'apprendre comment elle pouvait aider les malades par nos efforts constants.

Merci aussi mille fois à mes parents, Louise et Gilles Pepin, pour leur compréhension inconditionnelle et le support moral qu'ils m'ont prodigué pendant ces dernières années. Leur contribution à cet ouvrage est bien plus grande qu'ils ne peuvent le croire. À Catherine, pour les encouragements, la correction et l'inspiration.

Merci aux membres de l'Institut du Cancer de Montréal, auprès de qui j'ai trouvé une deuxième famille qui a rendu bien plus faciles les difficultés de la vie scientifique. En particulier à toi, Claudiane, une chance que tu es là !

Finalement, à Jorane, Dave Matthews Band, les Cowboys Fringants et Tryo, merci pour la trame sonore des derniers mois.

Chapitre 1 : Introduction

Le cancer est une maladie caractérisée par la prolifération incontrôlée des cellules. Selon le stage de la maladie, les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par trois caractéristiques : (1) l'immortalisation (durée de vie illimitée), (2) la transformation (l'absence de réponse à des facteurs régulateurs de la croissance) et (3) la métastase (la capacité à envahir les tissus environnants). La surexpression d'oncogènes et/ou l'inhibition d'expression des gènes suppresseurs de tumeurs est en partie responsable du développement de la maladie (ref. B). Ces expressions génétiques aberrantes peuvent être dues à des mutations ponctuelles, des délétions et amplification chromosomiques, ou à des translocations génétiques entraînant la production d'une protéine de fusion. Ces changements génétiques peuvent être causés par des stress environnementaux (tels les radiation UV, l'exposition à des substances chimiques mutagènes, etc.) ou à des défauts génétiques de réparation lors de la réplication de l'ADN.

Le cancer est aujourd'hui traité par différentes approches. Les cancers hormono-dépendants peuvent être traités à l'aide d'inhibiteurs des récepteurs hormonaux. La chimiothérapie et la radiothérapie sont aussi des traitement grandement utilisés pour enrayer la maladie. De façon générale, le traitement tue la majorité des cellules cancéreuses. Cependant, peu importe l'approche choisie, une grande majorité des cancers finissent par développer une résistance au traitement. Ainsi, les cellules qui survivent sont celles qui ont acquis génétiquement (par inactivation ou surexpression d'un ou plusieurs gènes) la capacité de surmonter cette susceptibilité (ref. A).

L'acide rétinoïque est une molécule aux propriétés anti-prolifératives (*Graham, 1984; Lotan, 1980; Rearick et al., 1989*). Elle est utilisée pour guérir certaines lésions pré-cancéreuses et certains cancers. Son action est médiée par les récepteurs nucléaires RARs et RXRs (*Chambon, 1996*). Les travaux du laboratoire se sont penchés principalement sur l'implication du récepteur RAR β dans la carcinogénèse du poumon. Celui-ci est connu comme gène supresseur de tumeur dans les cellules normales, par sa transmission du signal anti-prolifératif de l'acide rétinoïque (*Houle et al., 1993*). Ainsi, l'expression du gène est réprimée dans plusieurs cancers (*Suh et al., 2002*). Cependant, les cancers qui l'expriment toujours seraient plus agressifs, et RAR β y ferait la

promotion de la carcinogénèse, agissant ainsi comme un oncogène (*Pappas et al*, résultats non publiés).

Les récepteurs nucléaires transmettent les signaux hormonaux ou métaboliques à la cellule et ce, en modulant l'expression génique par activation ou répression de gènes cibles (*Chambon*, 1996). Habituellement, la transmission du signal est directe, n'ayant recours à aucun intermédiaire, comme une cascade protéique. Elle est généralement efficace étant donné la non-polarité des ligands de ces récepteurs (hormones ou métabolites) qui leur permet de diffuser librement à travers la couche bilipidique de la membrane plasmique. Les récepteurs nucléaires ont tout d'abord été identifiés comme récepteurs intracellulaires liant des molécules stéroïdiennes (*Nagy et al.*, 2004). Les récepteurs de type "classique" sont activés par une seule molécule et la liaison est de très haute affinité, au contraire des récepteurs de type "métabolique" qui peuvent être activés par plusieurs molécules différentes. Cependant, la liaison de ces molécules est de basse affinité. En revanche, certains récepteurs ne possèdent pas de domaine de liaison au ligand. Ils seraient donc régulés par une voie alternative à la voie traditionnelle récepteur-ligand (*Nagy et al.*, 2004; *Napoli*, 1996).

1 La superfamille des récepteurs nucléaires :

Les récepteurs nucléaires forment une superfamille qui est divisée en différents groupes selon leurs caractéristiques structurales et leurs ligands (*Ahuja et al.*, 2003).

1.1 Le groupe I :

Le groupe I rassemble les récepteurs qui sont activés par la liaison à leurs ligands et qui ne peuvent être actifs qu'en hétérodimérisant avec les récepteurs aux rétinoïdes X (RXR). Les récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR) et le récepteur aux hormones thyroïdienne font partie de ce groupe (*Ahuja et al.*, 2003).

1.2 Le groupe II :

Les membres du groupe II (ex. : RXR et COUP-TF) se caractérisent par leurs capacités à former des homodimères fonctionnels. Ils peuvent aussi hétérodimériser avec les membres du groupe I ou du groupe IV (*Ahuja et al.*, 2003).

1.3 Les groupes III et IV :

Le groupe III contient les récepteurs des hormones stéroïdiennes classiques (actifs en homodimères). Quant au groupe IV, il englobe les récepteurs actifs comme monomères et certains autres pouvant hétérodimériser avec les RXRs (Ahuja et al., 2003).

1.4 Les groupes V et VI :

Le groupe V comprend les récepteurs apparentés aux récepteurs de la drosophile (FTX-F1) et au récepteur orphelin SF-1 (*steroidogenic factor-1*). Quant au groupe VI, il compte un seul membre, le récepteur orphelin GCNF (*germ cell nuclear factor*) (Ahuja et al., 2003).

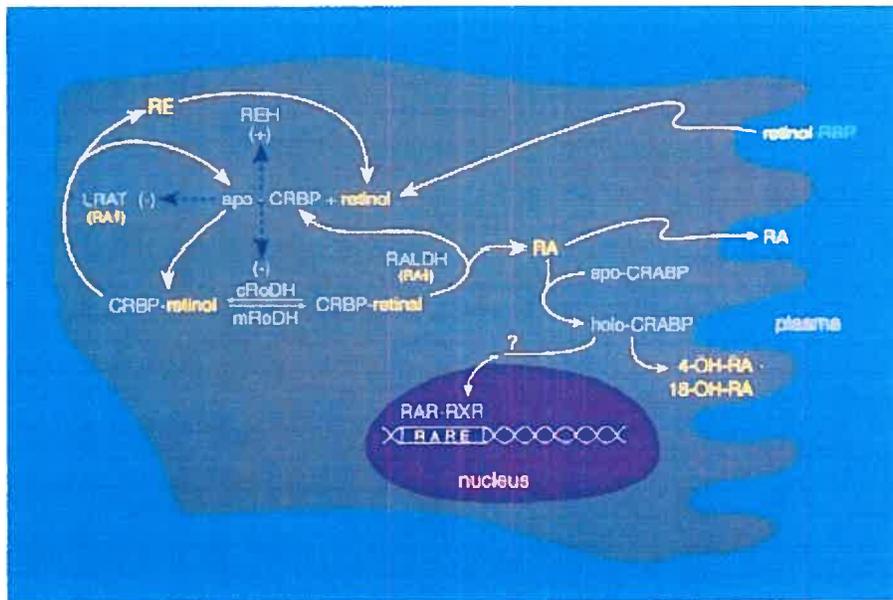
2. Les récepteurs aux rétinoïdes :

Les récepteurs à l'acide rétinoïque (RARs) et les récepteurs aux rétinoïdes X (RXRs) appartiennent aux familles I et II respectivement de la superfamille des récepteurs nucléaires (Ahuja et al., 2003). Les RARs se lient à l'acide rétinoïque *all-trans* (atRA) aussi bien qu'à l'acide rétinoïque *9-cis* (9-cisRA), alors que les RXRs ne peuvent être activés que par 9-cisRA (Chambon, 1996). Chaque famille de récepteur possède chacune 3 isotypes (α , β , et γ), tous encodés par des gènes différents présents sur des chromosomes différents. Chacun des isotypes possède 2 isoformes, à l'exception de RAR β qui en possède quatre. Ces isoformes sont formés par l'utilisation de deux promoteurs différents, P1 et P2. P1 est placé en amont à l'intérieur du promoteur. P2 est situé plus en aval et est inductible par l'acide rétinoïque. Les isotypes peuvent aussi être produits par épissage alternatif à la suite de la transcription. (Chambon, 1996)

2.1 Métabolisme de l'acide rétinoïque :

Le rétinol est un dérivé de la vitamine A. Son métabolisme produit l'hormone acide rétinoïque qui elle, possède une activité biologique (voir fig. 1) (Napoli, 1996). L'acide rétinoïque module plusieurs aspects de l'équilibre cellulaire, comme la prolifération et la différenciation (Blomhoff et al., 1991; De Luca, 1991; Lotan et al., 1990; Ross et al., 2000). Elle agit aussi sur le développement des organismes vivants en modulant entre autres, la morphogénèse et la segmentation chez l'embryon (Lin et al., 2000). La régulation de la concentration intracellulaire de l'acide rétinoïque est donc très importante car un déséquilibre peut entraîner des malformations lors du développement ou de graves problèmes de toxicité cellulaire.

Figure 1: Métabolisme du rétinol et de l'acide rétinoïque



Napoli, J.L., *Retinoic acid biosynthesis and metabolism*. *Faseb J*, 1996. 10(9): p. 993-1001.

La concentration d'acide rétinoïque disponible est contrôlée au niveau de sa biosynthèse et au niveau de son métabolisme. Ce contrôle implique aussi sa séquestration par des protéines spécifiques (voir fig. 1). En circulation dans le sang, le rétinol est lié à la protéine RBP (*retinol binding protein*) qui assure son transport du foie aux tissus

extrahépatiques et son entrée dans la cellule (*Blomhoff et al.*, 1991). Le rétinol peut diffuser librement à travers la membrane plasmique, mais il existerait aussi un récepteur transmembranaire (récepteur à RBP) qui assurerait le transport actif du rétinol vers le cytosol dans certains types cellulaires (*Blomhoff et al.*, 1991). À l'intérieur de la cellule, CRBP I et II (*cellular retinol binding protein*) se lient au rétinol pour séquestrer l'ensemble des molécules libres. On observe que la concentration de CRBP intracellulaire est toujours plus élevée que la concentration de rétinol et qu'elle régule l'entrée de ce dernier dans la cellule (ref. C).

Le complexe CRBP-rétinol sert de substrat pour l'estérification du rétinol par l'enzyme LRAT (*lecithin retinol acyl transferase*) ou pour sa conversion NADP-dépendante en rétinal par RoDH (*retinol dehydrogenase*). À la suite de la conversion du rétinol en rétinal, l'enzyme cytosolique RalDH (*retinal dehydrogenase*) transforme le rétinal en acide rétinoïque. Les protéines CRABP I et II (*cellular retinoic acid binding protein*) se lie alors à l'acide rétinoïque pour le transporter au noyau où il activera les facteurs de transcription RARs et RXRs. On ne sait pas encore si CRABP diffuse au noyau avec l'acide rétinoïque ou si il reste cytoplasmique (*Napoli*, 1996). L'acide rétinoïque peut aussi être sécrété par la cellule, et sera lié par l'albumine dans le sang pour assurer son transport aux autres cellules (ref. C).

2.2 La structure des récepteurs aux rétinoïdes :

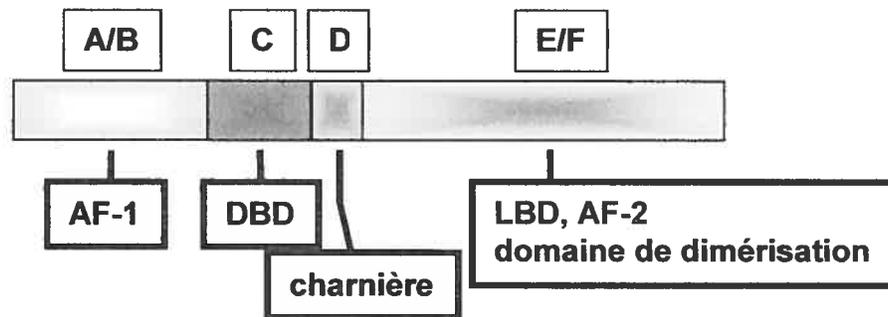
La structure des récepteurs aux rétinoïdes (RAR et RXR) peut se diviser en 6 régions plus ou moins conservées (voir figure 2).

2.2.1 Domaine de liaison à l'ADN (DBD - Région C) :

Parmi les récepteurs nucléaires, le domaine de liaison à l'ADN est le domaine le plus conservé (94-97% chez les RARs, 91-97% chez les RXRs). Long de 66 acides aminés (*Chambon*, 1996), le DBD est formé de deux motifs en doigt de zinc, contenant chacun quatre résidus cystéine qui coordonnent un atome de zinc. Les trois résidus situés dans le doigt de zinc placé en N-terminal (appelé boîte-P) donnent sa spécificité à l'élément de réponse du récepteur. Les quatre résidus localisés dans le doigt de zinc placé en C-

terminal (appelé boîte-D) donnent une spécificité d'interaction protéine-protéine lors de la liaison à l'élément de réponse. Les séquences autour des deux doigts de zinc forment trois hélices- α dont deux sont placées perpendiculairement l'une à l'autre, de façon conservée entre les différents récepteurs nucléaires. Cette géométrie assure la liaison du récepteur à l'élément de réponse dans le sillon majeur de l'ADN. Une hélice- α additionnelle est présente immédiatement en C-terminal du dernier doigt de zinc dans les récepteurs RXRs. Elle serait responsable de l'interaction protéine-protéine lors de l'hétérodimérisation de ce récepteur avec d'autres récepteurs nucléaires (*Kumar et al., 1999*).

Figure 2 : Structure générale des récepteurs nucléaire



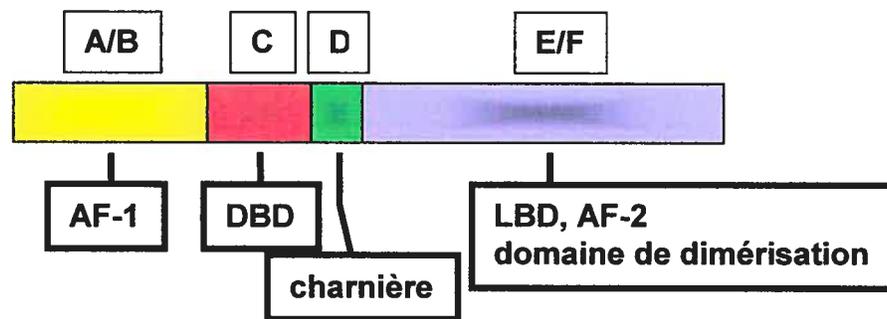
AF-1 et AF-2: domaine d'activation, DBD : domaine de liaison à l'ADN, LBD : domaine de liaison au ligand

(*Pepin, E.*)

Les récepteurs aux rétinoïdes se lient à leurs éléments de réponse composés de deux séquences d'ADN en répétition directe (DR) ayant une séquence hexamérique conservée : PuG(G/T)TCA (*Bastien et al., 2004*). Ces séquences sont espacées soit par 1 (DR1), 2 (DR2) ou 5 (DR5) paires de bases. L'homodimère RXR-RXR se lie à DR1. Quant à l'hétérodimère RAR-RXR, il se lie habituellement à la séquence DR5, mais il peut aussi se lier aux séquences DR1 et DR2. Lorsque lié à un élément de réponse DR2 ou DR5, le RAR occupe la position 3' alors que le RXR occupe la position 5' (voir figure

terminal (appelé boîte-D) donnent une spécificité d'interaction protéine-protéine lors de la liaison à l'élément de réponse. Les séquences autour des deux doigts de zinc forment trois hélices- α dont deux sont placées perpendiculairement l'une à l'autre, de façon conservée entre les différents récepteurs nucléaires. Cette géométrie assure la liaison du récepteur à l'élément de réponse dans le sillon majeur de l'ADN. Une hélice- α additionnelle est présente immédiatement en C-terminal du dernier doigt de zinc dans les récepteurs RXRs. Elle serait responsable de l'interaction protéine-protéine lors de l'hétérodimérisation de ce récepteur avec d'autres récepteurs nucléaires (*Kumar et al.*, 1999).

Figure 2 : Structure générale des récepteurs nucléaire



AF-1 et AF-2: domaine d'activation, DBD : domaine de liaison à l'ADN, LBD : domaine de liaison au ligand

(*Pepin, E.*)

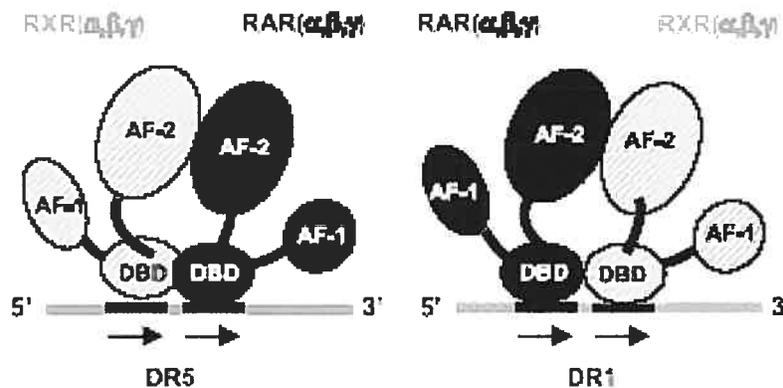
Les récepteurs aux rétinoïdes se lient à leurs éléments de réponse composés de deux séquences d'ADN en répétition directe (DR) ayant une séquence hexamérique conservée : PuG(G/T)TCA (*Bastien et al.*, 2004). Ces séquences sont espacées soit par 1 (DR1), 2 (DR2) ou 5 (DR5) paires de bases. L'homodimère RXR-RXR se lie à DR1. Quant à l'hétérodimère RAR-RXR, il se lie habituellement à la séquence DR5, mais il peut aussi se lier aux séquences DR1 et DR2. Lorsque lié à un élément de réponse DR2 ou DR5, le RAR occupe la position 3' alors que le RXR occupe la position 5' (voir figure

3). L'ordre des partenaires est inversé lorsque lié à un DR1. Conséquemment, lorsque l'hétérodimère est lié à un DR2 ou à un DR5, il agit comme activateur de transcription, alors qu'il est répresseur de transcription lorsqu'il est lié à un DR1.

2.2.2 Le domaine de liaison au ligand (LBD - Faisant partie de la région E) :

Le domaine de liaison au ligand est très conservé parmi les récepteurs nucléaires, même s'il est moins conservé que le DBD. Il est formé principalement d'hélices- α dont le repliement forme une structure qui peut être divisée en deux parties. La partie inférieure consiste en une cavité composée en majeure partie de résidus non-polaires où le ligand vient se lier. La forme de la cavité et un nombre limité d'interactions polaires contribuent à la spécificité des différents récepteurs pour leurs ligands spécifiques. Les récepteurs qui possèdent plus d'un ligand spécifique semblent avoir des cavités plus larges que les récepteurs à ligand unique (Bastien *et al.*, 2004).

Figure 3 : Position des récepteurs RXRs et RARs sur les différents motifs de RARE



J. Bastien, C. Rochette-Egly, *Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes* Gene 2004. 328 : p.1-16

Le changement de conformation entre le récepteur libre et le récepteur lié au ligand provient principalement du changement d'orientation de l'hélice- α 12 (la dernière des 12

hélices- α qui forment la cavité de liaison au ligand) du domaine de liaison au ligand qui oscille entre la conformation ouverte et la conformation fermée du récepteur. L'hélice- α 12 du LBD semble pointer en direction opposée à la cavité en absence de ligand. Lors de la liaison du ligand, l'hélice- α 12 entre en contact direct avec celui-ci et se place comme un couvercle au-dessus de la cavité, dans un mouvement de "trappe à souris" (*Bastien et al.*, 2004; *Nagy et al.*, 2004). Les différentes conformations du récepteur permettent de recruter soit les co-répresseurs en absence de ligand, soit les co-activateurs lors de la liaison du ligand pour la majorité des récepteurs.

2.2.3 Domaines d'activation de la transcription (AF-1-Région A/B et AF-2-Région E):

Les domaines d'activation sont positionnés dans des régions spécifiques de la protéine. Le domaine d'activation AF-1 est retrouvé en position N-terminale. Cette région est la moins conservée de tous les récepteurs nucléaires au sujet de laquelle nous avons le moins d'information structurale. La capacité activatrice de AF-1 semble varier beaucoup d'un récepteur à l'autre. La structure du domaine n'a pu être étudiée de façon précise jusqu'à maintenant mais nous savons que la structure secondaire du domaine AF-1 serait très importante pour sa capacité activatrice. AF-1 semble lier diverses protéines dont la *TATA box-binding protein* (TBP), et ce de façon ligand-indépendante (*Warnmark et al.*, 2003).

Le domaine d'activation AF-2 est placé en position C-terminale de la protéine et fait partie du LBD. Contrairement à AF-1, AF-2 est très structuré. La conformation du LBD ainsi qu'un segment à l'extrémité C-terminal du LBD (formant une hélice amphipathique) sont essentiels à la fonction activatrice de AF-2. Les co-activateurs¹ qui se lient à AF-2 interagissent avec une grande surface du LBD par le biais de séquences consensus (LxxLL pour les co-activateurs, LxxxIxxxI/L pour les co-répresseurs) (*Bastien et al.*, 2004; *Darimont et al.*, 1998; *Warnmark et al.*, 2003; *Webb et al.*, 2000). Cette séquence consensus contribue à leur recrutement ligand-dépendant par le AF-2.

¹ famille des SRC/p160, CARM-1 (activité histone méthyltransférase), complexe de histone acétyl transférase (HAT), Swi/SNF (remodeleur de chromatine ATP-dépendant)

Lors de la liaison du ligand, un changement de conformation du récepteur expose une poche hydrophobe dans le LBD. Ce changement de conformation, couplé au changement de position de l'hélice- α 12 du LBD par un mouvement en "trappe de souris", forme une surface pour l'interaction avec le motif LxxLL, qui forme une hélice- α . Cette interaction est stabilisée par des interactions hydrophobes entre la poche et le ligand favorisant ainsi la liaison des co-activateurs (*Warnmark et al.*, 2003).

2.2.4 Région Charnière (Région D) :

La région charnière sert de lien entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison au ligand. Elle permet au domaine de liaison à l'ADN de pivoter afin d'adopter des conformations différentes et ce sans encombrement stérique (*Bastien et al.*, 2004). La région charnière héberge aussi les signaux de localisation nucléaire nécessaires au transport du récepteur vers le noyau. Enfin, une région appelée T-box assurerait la dimérisation entre la région charnière de RAR α et le DBD de RXR α (*Delmotte et al.*, 1999). Il est à noter que la séquence de la région charnière est bien conservée à l'intérieur d'une même famille (RAR ou RXR) d'une même espèce. Cette conservation est d'autant plus grande lorsqu'on compare un seul isotype entre plusieurs espèces. La conservation inter-espèce laisse croire à une importante fonction, spécifique à chaque isotype. Cependant, très peu de détails fonctionnels sont connus à propos de ce domaine (*Bastien et al.*, 2004; *Chambon*, 1996).

2.2.5 Région F :

La région F, située en position C-terminale des RXRs et des RARs, ne semble posséder aucune séquence conservée parmi les membres d'une même famille, et encore moins entre les familles. Sa fonction demeure inconnue pour le moment (*Chambon*, 1996).

2.3 Activation de la transcription par l'hétérodimère RAR-RXR :

L'hétérodimère RAR-RXR est lié de façon constitutive à l'élément de réponse aux rétinoïdes (RARE), lorsque l'enroulement de la chromatine le permet (conformation relâchée permettant l'accès à l'ADN). En absence de ligand, les récepteurs empêchent la

transcription des gènes par le recrutement de co-répresseurs comme NcoR (*nuclear receptor co-repressor*) et SMRT (*silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*) (Bastien et al., 2004). Ceux-ci font partie ou recrutent des complexes possédant une activité histone déacétylase pour augmenter l'affinité du nucléosome à l'ADN. Les co-répresseurs interagissent avec des séquences conservées du LBD des deux partenaires de l'hétérodimère. Lors de la liaison du ligand au récepteur, le changement conformationnel de ce dernier induit la libération des co-répresseurs et le recrutement des co-activateurs. Les co-activateurs possèdent diverses fonctions dont la capacité de remodeler la chromatine et d'en relâcher l'enroulement, pour ainsi faciliter le positionnement de la machinerie transcriptionnelle (Bastien et al., 2004).

Le changement de conformation dû à la liaison du ligand favorise l'interaction entre les partenaires de l'hétérodimère et augmente leur affinité pour l'ADN. Selon certaines études, RXR serait incapable à lui seul de relâcher les co-répresseurs pour recruter les co-activateurs. Ce rôle serait assuré par RAR dans l'hétérodimère RAR-RXR (Germain et al., 2002; Nagy et al., 2004).

2.4 Phosphorylation des récepteurs aux rétinoïdes :

L'étude de la phosphorylation des récepteurs aux rétinoïdes (RARs et RXRs) fut effectuée majoritairement pour les récepteurs RAR γ 2, RAR α et RXR α . La phosphorylation semble avoir un impact sur leur capacité transactivatrice ainsi que sur leur dégradation par la voie du protéasome 26S.

2.4.1 Phosphorylation des RAR :

2.4.1.1 Phosphorylation de RAR γ :

Les travaux sur la phosphorylation de RAR γ 2 démontrent qu'il est phosphorylé de façon constitutive sur la sérine 68 dans le domaine AF-1. Cette phosphorylation est ligand-indépendante et serait médiée par l'unité cdk7 du facteur de transcription TFIIH (*general Transcription Factor II H*). Elle est nécessaire à l'activation de la transcription des gènes régulés par RAR γ (Bastien et al., 2000).

Nous savons qu'un afflux d'acide rétinoïque dans la cellule cause l'activation de p38MAPK, qui phosphoryle la sérine 66 dans le AF-1 de RAR γ (GianniKopf et al.,

2002). Cette hyper-phosphorylation (la phosphorylation des résidus 66 et 68) de AF-1 agit comme adjuvant dans le recrutement des co-activateurs au promoteur, médié par AF-2. Ce mécanisme a pour but d'amplifier la transcription des gènes lors d'une augmentation de la concentration intracellulaire de atRA.

De plus, l'hyperphosphorylation du domaine AF-1 contribue aussi à la dégradation du récepteur. Il est hypothétisé que la liaison du ligand au récepteur induirait le recrutement des co-activateurs et d'un complexe ubiquitine-ligase. En plus, l'hyperphosphorylation du récepteur sur son domaine AF-1 (causée par p38 MAPK en présence de atRA) augmenterait son ubiquitination et contribuerait à la reconnaissance de cette ubiquitine par SUG-1 (membre de la sous-unité régulatrice 19S du protéasome 26S). SUG-1 serait recruté au AF-2, pour assurer la dégradation du récepteur (GianniBauer et al., 2002). Ainsi, la phosphorylation du domaine AF-1 permet d'activer la transcription, mais assure aussi la dégradation des récepteurs nucléaires. Cette dégradation empêcherait une transcription excessive des gènes cibles. Elle servirait de plus à activer le détachement du complex d'initiation du promoteur, afin de procéder à l'étape d'élongation de la transcription de ces gènes (Bastien et al., 2004; GianniBauer et al., 2002; Kopf et al., 2000).

2.4.1.2 Phosphorylation de RAR α :

Certaines études ont porté sur la phosphorylation du domaine AF-1 de RAR α . Celles-ci démontrent que la phosphorylation faciliterait le relâchement des co-répresseurs et la dissociation de RAR α du complexe de pré-initiation. Ceci favoriserait l'élongation de la transcription (Bastien et al., 2004).

Finalement, une étude par le groupe de Lefebvre démontre que la sérine 157 de la région charnière de RAR α est la cible des kinases PKC α et PKC γ . Ce résidu se situe près des acides aminés impliqués dans la dimérisation avec RXR. Sa phosphorylation cause un encombrement stérique entre les surfaces de dimérisation des deux partenaires et nuirait à cette dimérisation (Delmotte et al., 1999). La phosphorylation de ce résidu entrainerait ainsi une diminution de la signalisation par atRA.

2.4.2 Phosphorylation des RXR :

La phosphorylation de RXR α est étudiée depuis peu. RXR α ne peut transmettre la cascade signalétique des rétinoïdes seul. Pour se faire, il lui faut absolument dimériser avec un partenaire et lier son ligand. Le récepteur est phosphorylé de façon constitutive sur la sérine 22 de son domaine AF-1 dans les cellules F9 (cellules de carcinome embryonnaire de souris). La phosphorylation de ce résidu serait nécessaire à l'activation de la transcription de certains gènes ainsi qu'à la transmission de l'effet antiprolifératif de RA. En effet, le groupe de Rochette-Egly observe que la phosphorylation de la sérine 22 induit une diminution d'expression de p21^{cip} et p27^{kip} qui sont responsables de la progression du cycle cellulaire (Bastien et al., 2002).

RXR α peut aussi être la cible des JNK1 et 2 (*c-Jun NH₂-terminal kinase*) qui le phosphoryle sur les sérines 61, 75 et 87. Cette phosphorylation est normalement causée par un stress cellulaire tel une irradiation UV. Elle permettrait de moduler l'interaction entre les partenaires de l'hétérodimère pour potentialiser l'activité transcriptionnelle au promoteur, en favorisant le recrutement de co-régulateurs (Adam-Stitah et al., 1999).

Finalement, la phosphorylation de la sérine 260 localisée en C-terminal du LBD diminuerait l'activation transcriptionnelle de l'hétérodimère RAR-RXR. Cette phosphorylation causerait un changement de conformation du LBD et ainsi nuirait à l'interaction avec les co-activateurs. Le groupe de Kojima a observé un ralentissement de la dégradation, une diminution de la capacité transactivatrice et ultimement la promotion de la carcinogénèse suite à la phosphorylation de RXR α sur la sérine 260 (Matsushima-Nishiwaki et al., 2001). Ces études furent réalisées dans les cellules d'hépatocarcinome (HCC). Selon leurs plus récents travaux, les hépatocytes normaux non-prolifératifs expriment un RXR α non-phosphorylé, hautement ubiquitiné et sensible à la dégradation par le protéasome. À l'opposé, les hépatocytes prolifératifs démontrent une phosphorylation du RXR α entraînant une sous-ubiquitination du récepteur et une résistance à la dégradation par le protéasome (Adachi et al., 2002). La voie des MAPK serait responsable de la modification post-traductionnelle de la protéine, lui donnant une activité dominante négative. Ceci est renforcé par les travaux du groupe de Kremer, qui ont découvert que la phosphorylation du même résidu par la voie des MAPK entrainerait cette fois, dans un autre modèle, la résistance de kératinocytes transformés à l'effet

antiprolifératif de la vitamine D (*Solomon et al.*, 1999). Ainsi, la phosphorylation du résidu S260 de RXR α pourrait retarder la dégradation du récepteur et contribuer à la carcinogénèse.

3. La résistance à l'acide rétinoïque:

L'acide rétinoïque est utilisé pour le traitement de plusieurs maladies de la peau et certains cancers. La réponse des cellules à l'effet antiprolifératif des rétinoïdes semble diminuer en fonction de la progression de la maladie, ou en fonction de la longueur du traitement à l'acide rétinoïque. Récemment, le développement de dérivés synthétiques des rétinoïdes, plus efficace à plus petites doses, utilisés comme traitement en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques, s'est avéré bénéfique.

3.1 La résistance à l'acide rétinoïque dans différents cancers :

3.1.1 Mécanismes cellulaires impliqués dans la résistance à atRA :

Les cancers du sein peuvent être classés selon leur statut d'expression du récepteur aux estrogènes (ER) : les cancers ER-positifs et les cancers ER-négatifs. Ils sont habituellement ER-positifs au début la maladie, caractérisé par une croissance lente des cellules cancéreuses. Les traitement hormonaux et chimiothérapeutiques utilisés pour traiter la maladie causent souvent une pression de sélection favorable aux cellules ayant diminué l'expression du récepteur aux estrogènes afin de survivre. Le carcinome plus agressif devient alors ER-négatif, ce qui rend inefficace les traitements hormonaux. En parallèle, il a été observé que les lignées cellulaires d'un cancer ER-positif (MCF-7 et T-47D) répondent à l'effet antiprolifératif de l'acide rétinoïque, alors que cette sensibilité est perdue chez les lignées cancéreuses hormono-réfractaires (ER-négatifs) (MDA-MB-231 et BT-20). Le mécanisme entraînant cette absence de réponse à l'acide rétinoïque est encore méconnu (*Chen et al.*, 1997; *Hayden et al.*, 2002).

3.1.1.1 Localisation aberrante de RXR α :

Les études du groupe de deLuca démontrent que le récepteur RXR α est séquestré dans le SFC (*splicing factor compartment*) dans les cancers du sein métastatiques, ER-négatifs, insensibles à l'acide rétinoïque (comme la lignée cellulaire MDA-MB-231) (Tanaka et al., 2004). Les facteurs intervenant dans l'épissage des gènes se localisent dans des domaines du noyau appelés SFC. La localisation des facteurs d'épissage dans les SFCs est dynamique et dépend, entre autres, de l'activité transcriptionnelle et du cycle cellulaire. Dans les cellules MDA-MB-231, RXR α a été retrouvé séquestré au SFC, son export au nucléoplasme étant défectif. Le récepteur est ainsi dans l'impossibilité d'être localisé aux sites actifs de transcription dans ces lignées, alors qu'il colocalise avec les nouveaux transcrits dans les cellules MCF-7 qui sont sensibles à l'acide rétinoïque, ce qui pourrait expliquer l'insensibilité à l'acide rétinoïque dans les cellules MDA-MB-231. Cependant, cette séquestration du récepteur ne fut pas observée dans plusieurs lignées cellulaires, ce qui pourrait expliquer l'insensibilité à l'atRA d'une petite proportion des cancers seulement (Tanaka et al., 2004).

3.1.1.2 Dissociation de l'hétérodimère RXR α - RAR α :

Le groupe de Baxter a aussi démontré que IGF-BP3 peut potentialiser la transactivation des ligands spécifiques aux RXRs par une interaction directe avec le récepteur (Liu et al., 2000). Cependant, cette interaction empêche la formation de l'hétérodimère RAR α -RXR α , et peut même entraîner la dissociation de l'hétérodimère une fois formé, ce qui réduit la transactivation des gènes RARE-dépendante (Schedlich et al., 2004).

3.1.1.3 Surexpression de HER2/neu :

Le traitement à HerceptinTM est utilisé contre les cancers du sein Her2/neu (*human epidermal growth factor receptor 2*) positifs. Il agit comme un anticorps dirigé contre le récepteur, ce qui bloque son activation. Dans ce sens, des expériences démontrent qu'un traitement avec HerceptinTM redonne la sensibilité à atRA à certaines lignées cellulaires

insensibles. Ce regain de sensibilité semble corrélér avec l'expression de RAR α : lorsque les cellules retrouvaient leur sensibilité à atRA par HerceptinTM, l'expression de RAR α était accrue. Dans la même ligne de pensée, le groupe du D^r Lopez-Berestein a observé que la surexpression du récepteur HER2/neu dans les cellules MCF-7 (sensibles à atRA) rendaient les cellules insensibles à atRA (Tari et al., 2002). La surexpression de Her2/neu semble stabiliser p27^{kip} et cyclin D1, deux protéines importantes pour la progression dans le cycle cellulaire (Lenferink et al., 2001; Yang et al., 2000). Le traitement d'une cellule à atRA induit habituellement une dégradation de ces deux protéines, donc la surexpression de Her2/neu empêcherait la propagation de l'effet antiprolifératif de atRA. L'implication des protéines effectrices de Her2/neu, Grb2 et Akt, n'est pas encore connue. Akt ne semble pas moduler l'expression de RAR α de façon directe, mais les études sont encore en cours à ce sujet (Tari et al., 2002).

3.1.2 Résistance à l'acide rétinoïque dans la leucémie promyéloïde aigüe :

La leucémie promyéloïde aigüe (APL) est caractérisée par un arrêt de maturation des cellules myéloïdes au stade promyélocyte. La maladie est causée par une translocation du chromosomes 15 portant le gène PML, et 17, portant le gène RAR α , ce qui entraîne la création d'une protéine de fusion PML-RAR α . Cette protéine de fusion possède la plupart des domaines fonctionnels du récepteur RAR α (Fanelli et al., 1999). Le mutant ainsi créé possède une activité dominante-négative et induit la délocalisation des protéines PML et RAR α sauvages. Ceci résulte en l'inhibition de l'activité transcriptionnelle normale de PML et RAR α (Dyck et al., 1994; Koken et al., 1994; Napoli, 1996).

La différenciation terminale des cellules APL chez les patients peut être induite par un traitement à l'acide rétinoïque (doses pharmacologiques), diminuant l'effet dominant négatif de la protéine de fusion et augmentant sa capacité transactivatrice. Ces cellules peuvent par la suite être éliminées. La thérapie est très efficace et une grosse majorité des patients entrent en rémission. Cependant, chez les cas de rechutes, les cellules développent souvent une insensibilité à atRA, ce qui rend le traitement difficile (Sato et al., 2004).

3.1.2.1 Mutation dans PML-RAR α :

La résistance à l'acide rétinoïque des cellules APL peut, entre autres, être causée par une mutation dans la portion RAR α du gène mutant PML-RAR α . L'analyse de l'ADN d'échantillons provenant de plusieurs patients relève trois regroupements de mutations faux-sens dans les domaines LBD, AF-2 et le domaine de dimérisation de la protéine. Ces mutations ont chacune un effet différent sur la capacité transactivatrice de PML-RAR α (Cote *et al.*, 2002).

Kizaki *et al* (1996) a établi une lignée cellulaire primaire, UF-1, d'un patient atteint de APL qui est devenu résistant à l'atRA à la suite d'une rechute (Kizaki *et al.*, 1996). Cette lignée possède une mutation ponctuelle, changeant le résidu Arg611 de la protéine de fusion (correspondant au résidu Arg 276 du LBD de RAR α sauvage) en résidu Trp (Takayama *et al.*, 2001). Cette mutation empêche la liaison de atRA à RAR α (Kizaki *et al.*, 1996). Elle empêche aussi la libération du co-répresseur SMRT et rend le récepteur incapable de recruter le co-activateur ACTR après une stimulation de $\geq 1\mu\text{M}$ atRA.

3.1.2.2 Protéine tronquée PML-RAR α :

Une autre mutation dans PML-RAR α fut caractérisée dans les cellules HL-60 (cellules de leucémie promyéloïde). Cette mutation ponctuelle transforme le codon 411 (situé en C-terminal de la protéine, dans le LBD) en codon stop, produisant une protéine tronquée de 52 acides aminés en comparaison avec la protéine sauvage. Ce mutant pourrait agir comme dominant négatif en interférant avec la liaison des RARs sauvages ou induire une diminution d'affinité avec atRA (Robertson *et al.*, 1992).

3.1.2.3 Promotion de la différenciation par des thérapies combinées :

Dans le but de renverser le phénotype cancéreux des cellules tumorales, les efforts se sont concentrés vers des moyens pour promouvoir la différenciation de certaines lignées cellulaires cancéreuses. Les recherches récentes portant sur la lignée cellulaire UF-1, dérivée d'un patient atteint de APL et résistant à l'atRA (section 3.1.2.1), utilisent le G-CSF (*granulocyte colony-stimulation factor*). Celui-ci stimule la prolifération des

cellules myeloïdes progénitrices normales. Selon l'étude, un traitement des UF-1 avec G-CSF en combinaison avec atRA, induirait leur différenciation. La liaison de G-CSF à son récepteur induirait l'activation de la voie signalétique JAK-Stat. La protéine Stat-3 est connue comme médiatrice de la différenciation granulocitaire induite par G-CSF, et son expression serait augmentée par atRA dans certaines lignées cellulaires d'APL. Ainsi, G-CSF et atRA agiraient en synergie au niveau de Stat-3 pour activer la différenciation des cellules UF-1 (*Higuchi et al., 2004*).

Finalelement, l'équipe du Dr. W.H. Miller démontre que dans des lignées cellulaires APL résistantes à atRA (à l'exception de UF-1), un traitement au TNF α en combinaison avec atRA induirait la différenciation des cellules promyéloïdes APL en monocytes et non pas en granulocytes. Cette différenciation serait entre autres due à la surexpression de PU-1 médiée par TNF α et atRA. PU-1 est un facteur de transcription qui stimule la voie monocyttaire de différenciation des cellules immatures du sang (*Witcher et al., 2004*).

3.1.3 Résistance à l'acide rétinoïque dans le cancer du poumon:

3.1.3.1 L'implication du gène RAR β :

Le traitement aux rétinoïdes s'est avéré efficace pour différents cancers. Des lésions précancéreuses du poumon et de l'appareil aérodigestif supérieur se sont complètement résorbées après un traitement aux rétinoïdes. Cependant, des études cliniques ont démontré que cette approche est très fréquemment inefficace contre les cancers plus avancés, peut-être dû à une modification de la réponse cellulaire à l'acide rétinoïque.

Le gène candidat le plus étudié pour expliquer cette insensibilité aux rétinoïdes est RAR β , parce qu'il est un récepteur à l'acide rétinoïque d'une part, mais surtout parce qu'il contient un élément de réponse à l'acide rétinoïque (RARE) dans son promoteur (*de The et al., 1990; Hoffmann et al., 1990; Sucov et al., 1990*). Ainsi, dans plusieurs cancers et lignées cancéreuses du poumon, il a été observé que (1) l'expression de RAR β était régulée à la baisse ou (2) même si exprimé à un niveau basal, l'expression du gène ne pouvait être induite par un traitement à l'acide rétinoïque (*Suh et al., 2002; Zhang et al., 1996*). Le même groupe a tenté de surexprimer RAR β dans la lignée du cancer du sein

MDA-MB-231, qui n'exprime pas RAR β et qui est insensible à l'acide rétinoïque. Cette expression forcée a resensibilisé cette lignée cellulaire à l'acide rétinoïque et a causé une diminution de sa prolifération (Zhang *et al.*, 1996). Cependant, forcer l'expression du récepteur nucléaire ne peut pas fonctionner dans tous les cas de cancer. Par ailleurs, bien qu'une mutation dans le promoteur du gène (Zhang *et al.*, 1996) peut être responsable d'une fraction des cas de résistance à l'acide rétinoïque, une défektivité dans la liaison des récepteurs (RXRs et RARs) au promoteur (dû à une mutation de la protéine) (Pratt *et al.*, 1990), aussi bien qu'une difficulté à recruter les co-activateurs, peuvent rendre la surexpression de RAR β impossible.

Les travaux récents de Suh *et al.* (2002) démontrent que l'expression de RAR β serait dépendante de la méthylation de l'ADN dans certains cancers du poumon, mais pas de façon générale. Tout d'abord, ils démontrent que seulement 36% des cancers insensibles à l'acide rétinoïque présentent une méthylation du promoteur de RAR β (Suh *et al.*, 2002). De plus, le traitement à l'acide rétinoïque de cellules réfractaires induit une acétylation aberrante des histones au promoteur de RAR β , et ce indépendamment du statut de méthylation du promoteur. En temps normal, les cellules enroulent l'ADN autour des histones regroupées en nucléosomes (formés des 2 molécules de chaque type d'histone : H2A, H2B, H3 et H4) pour prévenir l'expression des gènes. L'acide rétinoïque induit dans les cellules normales l'acétylation des histones H3 et H4 afin de relâcher l'enroulement de l'ADN et permettre l'accès aux promoteurs des gènes cibles. Cependant, dans certaines lignées de cancer de poumon réfractaires, l'acide rétinoïque n'induit plus l'acétylation des histones au promoteur de RAR β (Suh *et al.*, 2002). Cet enroulement excessif de l'ADN au promoteur de RAR β pourrait expliquer l'insensibilité de certaines lignées cellulaires cancéreuses du poumon à l'acide rétinoïque.

3.1.3.2 L'implication de la protéine COUP-TF :

Comme mentionné précédemment, il est connu que le gène RAR β possède un élément de réponse (β RARE) dans son promoteur qui assure la réponse à l'acide rétinoïque. Le groupe du Dr X-K Zhang a démontré que l'expression de l'hétérodimère RAR-RXR n'est pas suffisant pour assurer l'expression RA-dépendante de RAR β . Ils

ont en fait démontré que la protéine COUP-TF² est requise pour l'induction RA-dépendante de l'expression de RAR β . De plus, cette induction serait aussi RAR α dépendante en hétérodimère avec RXR. Le groupe observe aussi que le promoteur de RAR β possède en amont du β RARE un élément de réponse à COUP-TF, constitué de deux éléments en répétitions directes espacés de 8 nucléotides (DR8). Cet élément de réponse serait requis pour l'activation RA- et RAR α -dépendante de RAR β (*Lin et al., 2000*).

4. La voie des MAP kinases :

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la phosphorylation de RXR α , dont la voie des MAP kinases (*Adachi et al., 2002; Delmotte et al., 1999; Gianni et al., 2003; Matsushima-Nishiwaki et al., 2001*). La voie des MAPKs permet à la cellule de percevoir les changements extracellulaires et d'échaffauder une réponse appropriée. Cette voie signalétique est complexe et permet à la cellule de bien intégrer les différents messages auxquels elle est constamment soumise. Elle permet de moduler plusieurs programmes cellulaires tels la différenciation, la motilité, la division et la mort cellulaire (*Fang et al., 2005*). Cette voie permet d'intégrer différents signaux, et chacun de ces signaux activera une cascade bien précise d'effecteurs kinases. La cascade qui nous intéresse davantage est la voie passant par Ras et ERK1/2 (voir figure 4). Cependant, la description générale de cette voie s'applique pour tous les autres signaux transmis par les MAPKs.

La cascade commence à la surface cellulaire par la liaison d'un facteur de croissance ou d'une hormone à son récepteur transmembranaire. Cette liaison entraîne habituellement (mais pas dans tous les cas) une homodimérisation des récepteurs (*Zhu et al., 2001*). La dimérisation permet l'autophosphorylation (ou phosphorylation réciproque) de résidus tyrosine spécifiques dans les domaines catalytiques cytoplasmiques des récepteurs, ce qui mène à l'activation des récepteurs. S'ensuit une phosphorylation d'autres tyrosines cytoplasmiques responsables du recrutement de protéines de signalisation telles que la molécule adaptatrice Grb2, qui se lie aux résidus

² Un facteur de transcription qui active ou réprime la transcription de différents gènes, en fonction du contexte du promoteur (éléments de réponses, présence d'autres facteurs de transcription).

phosphorylés par son domaine SH2. Ensuite, les deux domaines SH3 de la protéine Grb2 permettent le recrutement de SOS (*Son Of Sevenless*), une protéine médiant l'échange de nucléotides guanines (GEF : *guanine-nucleotide exchange factor*). Lorsque libre dans le cytosol, le domaine régulateur C-terminal de SOS bloque l'activité GEF de la protéine. La liaison à Grb2 permet de lever l'inhibition potentiellement par un changement de conformation (*Seger et al.*, 1995; *Smalley*, 2003).

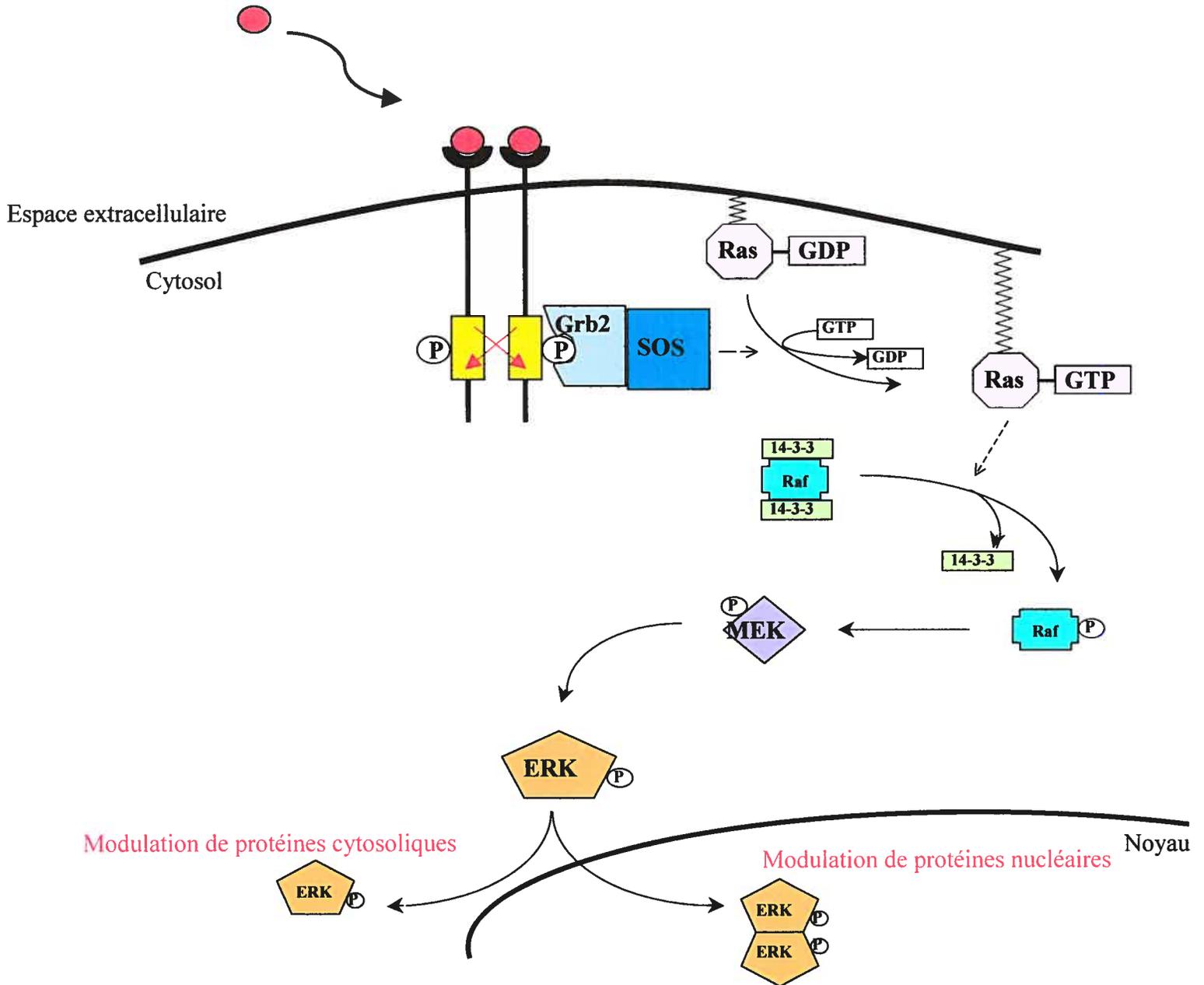
Par la suite, SOS se lie à la protéine Ras. Ras est maintenu à la membrane plasmique par une myristoylation et se trouve dans sa forme inactive, lié à GDP. La liaison de SOS à Ras entraîne un changement de conformation des deux domaines Switch 1 et 2 de Ras, ce qui permet l'ouverture du site de liaison de GDP. GDP est ainsi relâché et, étant donné que la concentration de GTP dans la cellule est 10x plus élevée que la concentration de GDP, GTP se lie à Ras, ce qui active la protéine. S'ensuit la liaison à Raf (*Smalley*, 2003).

Raf-1, une sérine/thréonine kinase, est maintenue dans le cytosol dans sa forme inactive, lié à un dimère de protéines 14-3-3. Chaque monomère se lie à une sérine phosphorylée (sérine 259 et 621), ce qui bloque le domaine catalytique de Raf-1. Lorsque Ras est activé, Ras-GTP se lie à Raf-1 par le domaine N-terminal de celui-ci et cause un changement de conformation qui permet la libération du dimère 14-3-3. Raf-1 est ensuite déphosphorylé sur la sérine 259 par PP2A (*Protein Phosphatase 2A*), ce qui active la protéine et permet son activité kinase (*Abraham et al.*, 2000).

Raf-1 ainsi activé se lie à et phosphoryle MEK (*MAPK/ERK kinase* - une protéine tyrosine et thréonine kinases) sur deux résidus sérines dans sa boucle d'activation, causant ainsi l'activation de la protéine (*Kolch*, 2000). MEK peut ainsi transmettre le signal en se liant à Erk1/2. Cette liaison expose deux tyrosines importantes dans la boucle de phosphorylation de Erk 1/2, qui sont aussitôt phosphorylées par MEK. La phosphorylation induit un changement de conformation qui permet la liaison d'une molécule d'ATP au site catalytique de Erk 1/2, ce qui crée par le même fait un site de liaison spécifique pour ses substrats. Cette nouvelle conformation permet aussi la dimérisation de Erk 1/2, ce qui entraîne sa translocation au noyau pour aller moduler, entre autres, l'activité des récepteurs nucléaires. Les monomères de ERK sont

séquestrés dans le cytosol où ils iront phosphoryler d'autres protéines et ainsi moduler d'autres voies signalétiques (Smalley, 2003).

Figure 4 : Cascade des MAPKs



La multiplicité d'intermédiaires dans la cascade signalétique permet l'amplification du signal. Elle permet aussi une régulation à plusieurs niveaux de la progression de cette cascade. Cependant, dans les maladies comme le cancer, une mutation entraîne souvent l'expression d'une protéine dominante active qui cause l'activation constitutive de la voie de signalisation. Il en est ainsi pour la protéine RAS qui se trouve mutée et activée de façon constitutive dans 30% des cancers humains. Ras donne ainsi le signal à la cellule de proliférer anormalement, ce qui entraîne la formation de tumeurs. De plus, l'oncogène Ras semble inhiber la fonction de la protéine p53 qui est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et la réparation des dommages à l'ADN (*Crespo et al., 2000*).

5. Hypothèses de travail et but du projet:

Le lien entre l'acide rétinoïque ainsi que son précurseur métabolique, le β -carotène, et la suppression du cancer a été établi grâce à une vingtaine d'études épidémiologiques dans les années 1960 et 1970 (*Khuri et al., 2004*). Presque toutes ces études ont démontré que parmi les sujets à haut risque (comme les fumeurs), ceux qui absorbaient le plus de rétinoïdes par le biais de l'alimentation avaient un taux de cancer bien inférieur à ceux qui n'avaient pas une diète haute en rétinoïdes. Cette connaissance a mené notre laboratoire à explorer le rôle potentiel des récepteurs à l'acide rétinoïque dans la suppression du cancer du poumon. En effet, les travaux du laboratoire ont permis de démontrer que la région chromosomique environnante de RAR β avait subi une grande délétion dans presque tous les cancers du poumon (*Leduc et al., 1989*). De plus, ce gène est inactivé dans un grand nombre de cancer du poumon (*Houle et al., 1991*).

Le rôle de RAR β comme gène suppresseur de tumeur fut démontré directement par des études de transfections. En effet, forcer l'expression de RAR β dans des cellules cancéreuses qui ne l'expriment pas, ralentit leur prolifération et rend les cellules moins tumorigéniques lorsque injectées dans des souris nues (*Houle et al., 1993*). Des expériences de macropuces à ADN ont été réalisées sur des clones cellulaires dérivés de la lignée cellulaire de carcinome épidermoïde du poumon Calu-1 (qui n'exprime pas RAR β). Le gène RAR β a été introduit dans les cellules et des clones ont été isolés. Il a été observé que les gènes modulés par RAR β après traitement à l'acide rétinoïque *all-*

trans étaient en grande partie impliqués dans la promotion de l'apoptose et dans le déclenchement de la réponse immunitaire contre le cancer (Toulouse *et al.*, 2000). Ainsi, RAR β aurait un rôle à jouer dans la suppression de la tumorigénèse en réponse à l'acide rétinoïque.

De plus, il fut démontré que l'isoforme β 2 de RAR aurait une fonction de suppression tumorale, alors que l'isoforme β 4 assurerait la promotion de la carcinogénèse (Berard *et al.*, 1994). En effet, des expériences de souris transgéniques exprimant un antisens dirigé contre l'isoforme β 2 démontrent un développement de tumeurs prématuré (11-14 mois), alors que des souris surexprimant l'isoforme β 4 présentent une hyperplasie des cellules pulmonaires accrue par rapport aux contrôles, ainsi que des tumeurs dans plusieurs organes.

Malgré les études épidémiologiques et les études de plusieurs laboratoires sur la fonction supresseur de tumeur de RAR β , des doutes demeurent quant à sa fonction cellulaire. Tout d'abord, même le rôle des rétinoïdes dans la prévention du cancer a été remis en question par plusieurs études de chimioprévention lancées pendant les années 1980 et basées sur les connaissances épidémiologiques. Le ATBC (Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention) Study Group (1994) et le CARET (*Carotenoids and Retinoids Evaluation Trial*) (Omenn *et al.*, 1996) ont testé l'hypothèse selon laquelle le β -carotène et les rétinoïdes réduiraient l'incidence du cancer du poumon dans les populations à risques, en particulier chez les sujets fumeurs. Cependant, les résultats furent très décevants. Les sujets qui recevaient des traitements à la β -carotène développaient plus de cancers du poumons que les placebo. Notamment, les autorités scientifiques ont décidé en 1996 de mettre fin à l'étude CARET à cause de l'effet néfaste des rétinoïdes sur les fumeurs.

De plus, deux études ont porté sur des cohortes d'anciens fumeurs. Ces études ont démontré qu'un traitement aux rétinoïdes entraînait la diminution de la récurrence d'un cancer du poumon (Shalinsky *et al.*, 1996), et qu'un traitement à l'acide rétinoïque 9-*cis* pouvait entraîner une augmentation de l'expression de RAR β (Kurie *et al.*, 2003). Ainsi, tout dépendamment du statut des sujets des cohortes (fumeurs ou non), l'expression

génétique des différents isoformes de RAR β et le contexte cellulaire varient, causant une réponse différente aux traitements aux rétinoïdes.

Quant au rôle moléculaire de RAR β , il existe aussi des résultats contradictoires. En effet, bien que toutes ces études démontrent que RAR β agirait dans un but de prévention du cancer, dans certains contextes cellulaires, il semblerait promouvoir la carcinogénèse. Les gènes supresseurs de tumeurs sont très souvent inactivés durant la tumorigénèse par une mutation ponctuelle. Or, aucune mutation n'a été répertoriée pour le gène RAR β . De plus, les souris "knock-out" pour RAR β ne développent pas de tumeurs, comme il aurait été attendu dans le cas d'un gène supresseur de tumeur. Pour expliquer ces contradictions, notre laboratoire a émis l'hypothèse selon laquelle RAR β fonctionnerait, dans certains contextes cellulaires, comme un oncogène. Afin de tester cette hypothèse, des expériences réalisées à l'aide d'oligonucléotides antisens pour inhiber l'expression de RAR β ont été effectuées dans la lignée d'adénocarcinome du poumon A-549. Les résultats obtenus suggèrent la nature oncogénique de RAR β . En effet, l'inhibition de l'expression de RAR β par des oligonucléotides antisens induit une diminution de la prolifération et une augmentation de la mort cellulaire, et ce en fonction de la dose utilisée. De plus, le spectre de gènes modulés par le traitement aux oligonucléotides antisens suggère que RAR β , dans cette lignée cellulaire cancéreuse, jouerait un rôle de promotion de la tumorigénèse (*J. J. Pappas, résultats non publiés*).

Certaines lignées cancéreuses résistantes à l'acide rétinoïque présentent une absence d'expression de RAR β due à une méthylation du promoteur. À l'opposé, certaines lignées insensibles à l'acide rétinoïque expriment toujours le récepteur. Les travaux effectués par le laboratoire du D^r Kremer de l'Hôpital Royal Victoria de Montréal, Qc (*Solomon et al., 1999*) démontrent que la phosphorylation du partenaire de RAR β , RXR α , serait responsable de la résistance de certaines lignées cancéreuses à l'effet antiprolifératif de la vitamine D. De plus, les travaux de Patrick Allaire dans notre laboratoire ont porté sur l'implication de la voie des MAPK/ERK dans la résistance des lignées cellulaires cancéreuses à l'acide rétinoïque. À la lumière des travaux du groupe du D^r Kremer et de notre groupe de recherche, nous proposons que la phosphorylation de la sérine 260 du récepteur RXR α pourrait jouer un rôle dans la promotion du cancer par

RAR β , dans un contexte cellulaire où RAR β agit comme oncogène. Nous pensons en effet que cette phosphorylation pourrait causer la résistance de certaines lignées cellulaires cancéreuses à l'acide rétinoïque *all-trans*, et ce malgré leur expression du gène RAR β . De plus, faisant suite aux travaux du Dr A. Toulouse et de J.J Pappas dans notre laboratoire, nous proposons que cette phosphorylation modifierait l'expression des gènes cibles de l'hétérodimère RAR β -RXR α , de manière à accroître la prolifération cellulaire, diminuer la différenciation et la visibilité de la cellule par le système immunitaire, donc d'encourager le développement tumoral.

À la lumière de ces observations, nous avons tenté de caractériser plus spécifiquement la phosphorylation du récepteur nucléaire RXR α , partenaire de RAR β dans les lignées de cancer du poumon et de sein RAR β positives et résistantes à l'atRA. En particulier, nous avons vérifié l'impact de la phosphorylation sur la résistance de certaines lignées cancéreuses du poumon et du sein à l'acide rétinoïque. De plus, nous avons tenté d'identifier la voie de signalisation responsable de cette phosphorylation. Enfin, nous avons essayé de comprendre comment la phosphorylation du récepteur RXR α sur la sérine 260 pouvait changer la signalisation par l'acide rétinoïque *all-trans*, par la modulation de l'expression des gènes cibles de l'hétérodimère RAR β -RXR α .

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

Culture cellulaire

Les lignées cellulaires de cancer du poumon, A-549 (carcinome pulmonaire humain), LC-T (adénocarcinome du poumon humain), et de cancer du sein, Hs-578T (carcinome épithélial mammaire humain), MDA-MB-231 (adénocarcinome mammaire humain) ont été maintenues dans le milieu RPMI supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal et 1% d'antibiotiques pénicilline/streptomycine, à 37°C dans une atmosphère humide à 5% CO₂. Lors des essais de prolifération, 10 200 cellules étaient ensemencées par puits dans des plaques de 12 puits. Pour l'extraction protéique, les cellules étaient ensemencées à 1x10⁶ par pétri de 100mm.

Vecteurs

Les constructions utilisées ont été fournies par le D^r Kremer de l'hôpital Royal Victoria de Montréal ou réalisées par Patrick Allaire dans le laboratoire. Brièvement, les constructions utilisées pour les clones stables étaient pSVL-RXR α ^{S260A}, pcDNA3-RAR β ^{S150A} et pcDNA3-RAR β ^{S150D}. Le gène RXR α ^{S260A} a été mis sous le contrôle du promoteur SV40 late alors que les constructions de RAR β ont été mis sous le contrôle du promoteur CMV. Le vecteur pMC1 a été utilisé pour son gène de résistance à la néomycine. Pour les expériences de transfections transitoires, les constructions de HA-RXR α ^{wt} et HA-RXR α ^{S260A} étaient contenues dans le vecteur pcDNA3.0, sous le contrôle du promoteur CMV incluant un gène de résistance à la néomycine. Le gène de la GFP a été transfecté grâce au vecteur pEGFP, gracieusement donné par le D^{re} Royal (CR-CHUM Notre-Dame, Montréal, Qc.)

Génération de clones stables

Les constructions pcDNA3-RAR β ^{S150A} et pcDNA3-RAR β ^{S150D} ont été transfectées dans les cellules A-549, Hs-578T et LCT à l'aide du véhicule Fugene (Roche Diagnostics). La construction pSVL-RXR α ^{S260A} a quant à elle été co-transfectée avec le vecteur pMC1 (pour son gène de résistance à la néomycine) dans les mêmes cellules et avec le même véhicule. Après 48h d'incubation, les cellules ont été soumises à

l'antibiotique généticine (G-418) à une concentration de 400 μM . Après une période de croissance d'environ 14 jours, l'ADN et l'ARNm des clones sélectionnés ont été isolés. La présence du transgène a été vérifiée par PCR et l'expression de ce même transgène vérifiée par RT-PCR. 1 μg d'ADN a été utilisé pour l'amplification par PCR. Les oligonucléotides utilisés furent sens 5'-gacgagttcctcagagctgg-3' et antisens 5'-gggtaggatccggaacgcatt-3' pour les transgènes de RAR β , ainsi que sens 5'-gcagcagcgaggacatcaag-3' et antisens 5'-gtgggagaaggaggcgatgag-3' pour les transgènes de RXR α . L'ADN complémentaire a été synthétisée à l'aide de la méthode de transcription inverse (voir ci-dessous). L'amplification de l'ADNc a été faite grâce aux oligonucléotides sens 5'-gggtaggatccggaacgcatt-3' et antisens 5'-tggctggcaactagaaggcaca-3'.

Essais de prolifération

Les cellules ont été ensemencées en triplicata à densité égale (10200 cellules / puits) dans des plaques de 12 puits au jour -1. Elles ont été traitées au jour 0 avec du milieu complet supplémenté avec 1 μM atRA, 12,5 μM PD98059, 25 μM PD98059 ou 50 μM PD98059, 2 μM ou 6 μM Iressa selon les conditions expérimentales. Aux jours 2, 4 et 6, les cellules ont été lavées une fois au 1x PBS puis trypsinisées. Elles ont été comptées à l'aide d'un hémacymètre.

Synthèse de l'ADN complémentaire

L'extraction de l'ARN est faite à l'aide de Trizol (Invitrogen). L'ARN est ensuite dosé et 2 μg sont utilisés pour synthétiser l'ADN complémentaire. L'ADNc est synthétisé en utilisant 2 μg d'hexamères aléatoires ("random hexamers", pd(N)₆), dans du tampon de transcriptase inverse (80 mM MgCl₂, 0.5 M Tris pH 8.3), comprenant un inhibiteur de RNase, le RNAGuard (Amersham Biosciences) et l'enzyme M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) (Invitrogen). L'enzyme est finalement désactivé à la chaleur.

Expériences de RT-PCR semi-quantitatif

Les cellules sont ensemencées au jour 0 en triplicata à raison de 1×10^6 cellules par pétri de 100 mm. Au jour 1, elles ont été transfectées à l'aide du véhicule de transfection Fugene (Roche diagnostics) avec pEGFP seul, pEGFP et pcDNA3.0-HA-RXR α^{wt} , ou pEGFP et pcDNA3.0-HA-RXR α^{S260A} . Au jour 3, les cellules ont été traitées pour 24 heures avec 1 μM atRA. Puis, elles ont été trypsinisées, filtrées, resuspendues dans du PBS 1x et gardées sur glace. Les cellules exprimant la GFP ont ensuite été triées par FACS Aria (Becton Dickinson, Hôpital St-Luc du CHUM, Montréal, Qc). L'ARNm des cellules récoltées a ensuite été isolée à l'aide de TrizolTM (Invitrogen). L'ADN complémentaire a été synthétisé par la méthode de transcription inverse. Enfin, l'expression des gènes a été mesurée de façon semi-quantitative par PCR. Les amorces utilisées pour les gènes cibles étaient les suivantes : GAPDH : sens : 5'-tcacatctctgtccccctct-3', antisens : 5'-tccgacgcctgctcaccac-3'; RAR β : sens 5'-gacgagttcctcagagctgg-3', antisens 5'-gggtaggatccggaacgcatt-3; Survivin : sens : 5'-ggaaacggggtgaacttcagg-3', antisens : 5'-ggagggcgaatcaaaccatc-3'; Endothelin-1 : sens : 5'-agcgcggtgggtgagaac-3', antisens : 5'-ttgccttcagctgggatcat-3'; Cox-2 : sens : 5'-cccatgtcaaaaccgaggtgtat-3', antisens : 5'-aacgtagatgctcagggactt-3'; ID3 : sens : 5'-gcacctctggactcactc-3', antisens : 5'-tggaggtgtcaggacacg-3'; ICAM-1 : sens : 5'-gtcctagaggtggacacg-3', antisens : 5'-tactgcacacgtcagccg-3'; IL-1 β : sens : 5'-gcggcatccagctacgaatc-3', antisens : 5'-ttcaacacgcaggacaggtacag-3'. Chaque amplification était accompagnée d'un contrôle positif (ADNc de A-549 ou Hs-578T non traitées) et négatif (H₂O). Les amplifications ont été visualisées sur un gel 1% agarose, coloré au bromure d'éthidium à l'aide du logiciel Alpha Imager 3.2 afin de doser la quantité de chaque bande.

Extraction des protéines

Les cellules ont été cultivées dans des pétris 100 mm jusqu'à confluence, traitées et récupérées à l'aide d'un policeman de caoutchouc. Les cellules ont été centrifugées et le surnageant de PBS retiré. Elles ont ensuite été resuspendues dans du tampon de lyse (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, et

0.1% SDS) supplémenté avec des inhibiteurs de protéases (1 µg/mL leupeptine, 1.5 µg/mL aprotinine, 1 mM PMSF) et de phosphatases (1 mM NaV, 1 mM NaF). Les lysats ont été incubés sur glace 30 minutes, puis centrifugés pour récupérer les protéines solubles et se débarrasser des débris cellulaires.

Immunobuvardage de type Western

Les extraits protéiques (60 µg) ont été préparés avec du tampon de chargement Laemmli 1x et 0.1 M DTT. Les protéines ont par la suite été chargées sur un gel d'acrylamide 8% de type SDS-PAGE avec un marqueur de poids moléculaire (Roche), puis séparées par électrophorèse. Une fois la séparation terminée, les protéines du gel ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond, Amersham Biosciences). La membrane de transfert a été bloquée dans une solution de 5% de lait écrémé dilué dans le TBST 1x (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 0.1% Tween 20), puis incubée avec l'anticorps primaire de lapin anti-RXR α (Santa Cruz Biotechnologies) dilué 1/200 dans le TBST 1x. Après une série de lavages, les membranes ont été incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin conjugué à la peroxydase du raifort (*Cell Signalling*) dilué 1/2000 dans le TBST 1x. Les membranes ont été révélées par chimioluminescence après plusieurs lavages, à l'aide d'une trousse de détection ECL (Amersham Biosciences).

Chapitre 3 : Résultats

1. L'inhibition de la voie des MAPKs sensibilise les lignées Hs-578T et A-549 à atRA

Il est établi depuis longtemps que l'acide rétinoïque cause la différenciation et diminue la prolifération des cellules normales. Nous cherchons à démontrer que la phosphorylation de RXR α , le partenaire de RAR β , nuierait la signalisation normale par ce dernier. Notre modèle est constitué de lignées cellulaires qui possèdent une résistance à l'acide rétinoïque, sans toutefois perdre l'expression du récepteur RAR β . Nous avons tout d'abord identifié les lignées cellulaires résistantes à l'acide rétinoïque mais qui expriment le récepteur à l'acide rétinoïque, RAR β .

1.1 Les lignées Hs-578T et A-549 sont insensibles à l'atRA

Afin de sélectionner les cellules propres à notre modèle, nous avons fait des essais de prolifération sur les lignées Hs-578T (carcinome épithélial du sein humain), A-549 (carcinome du poumon humain), LC-T (adénocarcinome du poumon humain), et MDA-MB-231 (adénocarcinome mammaire). Les cellules ont été traitées avec 1 μ M d'acide rétinoïque et leur prolifération suivie sur une période de 6 jours. La lignée A-549 ne présente pas de diminution significative de prolifération en présence de atRA (figure 1a, -□- et -■-), en comparaison avec la lignée LC-T (figure 1c, -□- et -■-) dont la prolifération est diminuée d'environ 1/3 en présence de atRA après 6 jours de traitement. En se basant sur ces résultats, appuyés par ceux obtenus par Suh *et al* (2002), nous avons conservé la lignée A-549 pour les études à venir et délaissé la lignée LCT. Ensuite, l'étude de la lignée Hs-578T (figure 1b, -□- et -■-) démontre que, tout comme les cellules A-549, l'acide rétinoïque n'induit pas une diminution significative de prolifération par rapport aux cellules contrôle non-traitées. Ces deux lignées exprimant toutes deux RAR β , elles ont été retenues pour notre étude. Il est à noter que les essais de prolifération sur MDA-MB-231 démontraient une insensibilité à l'acide rétinoïque (résultats non-présentés). Cependant, cette lignée n'exprimait pas RAR β et elle fut rejetée.

1.2 La voie des MAPKs serait en partie responsable de l'insensibilité de A-549 et Hs-578T à l'atRA

La phosphorylation par la voie des MAPK-ERK1/2 est connue comme étant responsable de l'insensibilité de certaines lignées cellulaires à la vitamine D (*Solomon et al.*, 1999). Afin de vérifier l'effet de cette voie de signalisation sur la résistance des cellules à l'acide rétinoïque, nous avons utilisé l'inhibiteur PD98059, qui bloque de façon spécifique l'activation de MEK1/2 et par le fait même la signalisation par ERK1/2. Nos résultats démontrent que la prolifération des lignées A-549 et Hs-578T est diminuée par l'inhibition de la voie des MAPKs de façon dose-dépendante (figure 1a et b, barres PD 12.5 μ M, PD 25 μ M et PD 50 μ M).

Ensuite, nous avons vérifié la prolifération cellulaire traitées avec l'inhibiteur et atRA. Ce traitement induit une diminution un peu plus accrue de la prolifération cellulaire qu'avec l'inhibiteur seul, (figure 1a et b, barres PD 12,5 μ M + RA 1 μ M, PD 25 μ M + RA 1 μ M et PD 50 μ M + RA 1 μ M). Cette diminution de prolifération n'est toutefois pas observée dans la lignée cellulaire LCT, où le traitement conjoint des cellules avec PD98059 et RA n'affecte pas différemment la prolifération que le traitement à PD98059 seul (figure 1c, barres PD 12.5 μ M, PD 25 μ M, PD 50 μ M, PD 12.5 μ M + RA 1 μ M, PD 25 μ M + RA 1 μ M et PD 50 μ M + RA 1 μ M). Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation des MAPKs aurait un rôle à jouer dans l'insensibilité de certaines lignées cellulaires à l'atRA.

1.3 La voie des EGFR ne serait pas impliquée dans la sensibilité des cellules A-549 et Hs-578T à atRA

L'Iressa est un inhibiteur des récepteurs EGFR qui est utilisée cliniquement pour traiter le cancer du poumon NSCLC. Il fonctionne en se liant au domaine tyrosine kinase du récepteur afin de bloquer la transmission du signal intracellulaire. Ce traitement ayant des effets prometteurs dans la lutte contre le cancer du poumon, et afin d'investiguer le mécanisme extracellulaire responsable de l'activation des MAPKs dans notre système, nous avons tenté de bloquer la voie EGFR (voie en amont de la voie de ERK 1/2) à l'aide de l'inhibiteur Gefitinib (Iressa [ZD1839] d'AstraZeneca). La figure 2 nous démontre

que le traitement à l'atRA 1 μM induit une augmentation de la prolifération chez Hs-578T, mais ne semble pas affecter de façon significative A-549 (figure 2, barres blanches). Tout d'abord, dans la lignée Hs-578T, l'inhibition de EGFR semble induire une augmentation de la prolifération à 2 μM (figure 2, barre bleue foncée), comparable à l'effet de atRA. Curieusement, l'inhibition de la par EGFR à l'aide d'une dose supérieure de Iressa (6 μM) ne semble pas affecter la prolifération (figure 2, barre orange). Par contre, la présence de Iressa semble légèrement sensibiliser la lignée cellulaire à l'effet antiprolifératif de l'atRA et ce de façon dose dépendante (figure 2, barres bleue pâle et jaune). En ce qui a trait à la lignée A-549, l'Iressa ne semble pas affecter de façon significative la prolifération à faible dose et ce, même en présence de atRA (figure 2, barres bleues). Cependant, le traitement à forte dose (6 μM) induit une diminution de la prolifération cellulaire. Enfin, le traitement conjoint (6 μM Iressa et atRA 1 μM) stimule la prolifération de la lignée A-549 (figure 2, barres orange et jaune).

L'Iressa n'aurait donc pas d'effet important sur la sensibilité des cellules Hs-578T et A-549 à atRA.

2. Établissement de lignées exprimant des mutants de phosphorylation de RXR α et RAR β

Nous avons ensuite cherché à savoir si l'inhibition de la phosphorylation de RXR α sur la sérine S260 pouvait changer la signalisation des rétinoïdes. Il est connu que la phosphorylation de ce résidu est responsable de la résistance des kératinocytes à la vitamine D (*Solomon et al.*, 1999). RXR α étant en partie responsable de la transactivation des gènes cibles de RAR β par son hétérodimérisation avec celui-ci, nous avons tenté de faire des clones stables exprimant des mutants de phosphorylation. Ces mutants ont été produits au laboratoire du Dr R. Kremer de l'Hôpital Royal Victoria de Montréal, Qc, Canada (RXR α ^{S260A}) et dans notre laboratoire par Patrick Allaire (RAR β ^{S150A} et RAR β ^{S150D}). Les clones furent sélectionnés à la généticine (G-418) et l'intégration du plasmide à l'ADN fut vérifiée, de même que son expression.

Les clones A-549-14, Hs-578T-1, 4, 6 et 8 ont intégré la construction $RAR\beta^{S150A}$. Nous avons obtenu deux clones pour la construction $RAR\beta^{S150D}$, soient A-549-9 et Hs-578T-10. Enfin, un seul clone fut obtenu pour la construction $RXR\alpha^{S260A}$, soit le A-549-16 (figure 3a). Par contre, malgré cette intégration du plasmide au génome, les amplifications par RT-PCR de l'ARNm démontrent qu'aucun clone n'a exprimé le gène exogène (figure 3b et résultats non présentés pour $RXR\alpha^{S260A}$). Ceci laisse croire à une toxicité induite par le plasmide reçu ou à une sélection de la cellule contre l'expression des mutants de phosphorylation.

Étant dans l'impossibilité d'obtenir des clones stables par voie de transfection normale, nous avons tenté de cloner les ADN complémentaires (ADNc) des récepteurs $RXR\alpha$ sauvage et mutant (S260A) dans le vecteur p-Retro. Ce vecteur permet de mettre la transcription du gène exogène sous le contrôle d'un système inductible à la tétracycline. En absence de tétracycline dans le milieu de culture, l'expression des gènes est inhibée, alors que l'ajout de l'antibiotique enclenche la transcription du gène. De cette façon, nous aurions pu établir nos clones, induire l'expression des mutants de phosphorylation et en vérifier l'effet. Cependant, plus d'une mutation dans le plasmide reçu de source extérieure a rendu le clonage impossible. Nous avons donc décidé d'adopter une nouvelle approche.

3. Abolir la phosphorylation par les MAPK ne semble pas sensibiliser les cellules à atRA

Nous avons à notre disposition deux constructions, l'une encodant le $RXR\alpha$ sauvage et l'autre encodant un $RXR\alpha$ dont la sérine 260 avait été mutée pour une alanine. Afin de comprendre l'implication de la phosphorylation de la sérine 260 de $RXR\alpha$ sur la signalisation des rétinoïdes, nous avons tenté une approche par transfection transitoire (figure 4a). Nous avons tout d'abord co-transfecté les lignées cellulaires A-549 et Hs-578T avec les plasmides codant pour le gène de la GFP et une des deux constructions des $RXR\alpha$ ($RXR\alpha^{wt}$ ou $RXR\alpha^{S260A}$). Nous avons sélectionné les cellules GFP positives par cytométrie en flux, extrait l'ARN de ces cellules et procédé à des amplifications par RT-PCR semi-quantitatifs (figure 5b : exemple d'une série d'amplification).

La figure 4b présente l'immunobuvardage de type Western qui démontre l'expression du gène RXR α dans les cellules A-549 et Hs-578T. Il est possible d'observer pour les cellules non transfectées (no T) le niveau basal d'expression de RXR α dans les deux lignées cellulaires. L'augmentation de l'expression de RXR α dans les extraits cellulaires transfectés est due à l'expression des gènes exogènes (RXR α^{wt} ou RXR α^{S260A}). Ainsi, nous pouvons visualiser que, en ce qui a trait à Hs-578T, la surexpression du gène exogène RXR α^{S260A} est très marquée (figure 4b). Par ailleurs, la construction sauvage est très faiblement exprimée dans la lignée Hs-578T (figure 4b), étant donné le niveau d'expression de RXR α presque similaire au contrôle. En ce qui a trait à la lignée A-549, l'expression des gènes exogènes est visible mais est bien moindre que pour la lignée Hs-578T transfectée avec le mutant (figure 4b).

Les gènes cibles amplifiés par RT-PCR ont été choisis à la suite d'expériences de micropuce à ADN effectuées par Jane Pappas, une étudiante au doctorat dans le laboratoire. Il a été établi à la suite de ces analyses que la transcription de ces gènes est modulée par l'acide rétinoïque. De plus, des expériences d'oligonucléotides antisens démontrent que ces mêmes gènes se retrouvent sous l'influence du récepteur RAR β (Pappas, J.J., résultats non publiés). Ainsi, nous avons sélectionné Endothelin-1, Survivin, ICAM-1, IL-1 β , ID-3 et RAR β comme gènes candidats dans cette étude.

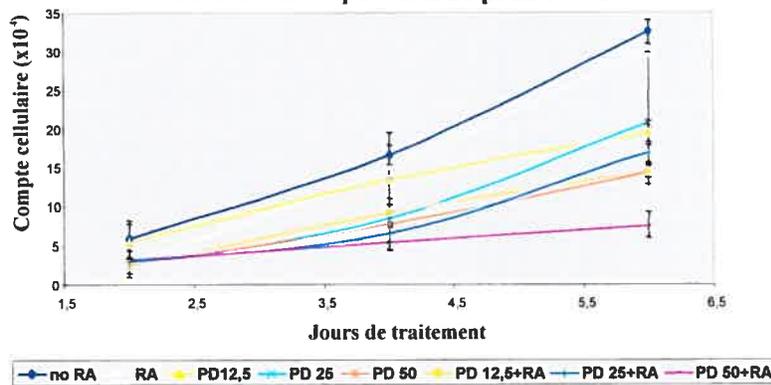
La figure 5a présente les gels d'amplification pour chaque gène. Le succès de l'amplification a été testé pour chacun d'entre eux grâce à un contrôle positif (ADNc de la lignée A-549 ou Hs-578T non-traitée). La contamination a été vérifiée par un contrôle négatif (H₂O - résultats non-illustrés). L'intensité de chaque bande a été mesurée par densitométrie à l'aide du logiciel Alpha Imager 3.2. L'amplification de chaque bande a été normalisée en fonction de l'amplification du gène domestique GAPDH. La figure 5b montre la densitométrie des amplifications normalisées, pour l'un des quatre essais et ce, pour les 2 lignées cellulaires.

À la figure 5c, la compilation des résultats pour les quatre expériences est illustrée. On note que la mutation RXR α^{S260A} semble augmenter la transactivation du gène RAR β en présence d'acide rétinoïque dans la lignée A-549, alors que l'effet est à peine perceptible dans la lignée Hs-578T. Le même effet est observé pour les gènes

Endothelin-1 et Cox-2, mais avec une amplitude moindre. À l'opposé, la mutation semble induire une diminution de l'expression de IL-1 β en présence de atRA chez Hs-578T, mais aucun changement n'est visible pour la lignée A-549. En comparaison, l'expression du gène ICAM-1 semble être diminuée par atRA lorsque le mutant de phosphorylation est surexprimé dans la lignée cellulaire A-549, alors que le même traitement n'induit pas de changement d'expression de ce gène chez Hs-578T. Aucun changement digne de mention n'est à relever pour les gènes Survivin et ID-3. Ainsi, modifier la phosphorylation du récepteur aux rétinoïdes RXR α pourrait avoir un rôle, quoi que restreint, sur la signalisation de atRA. Cette phosphorylation modulerait la capacité transactivatrice de l'hétérodimère RAR β -RXR α et affecterait certains gènes tels RAR β , Endothelin-1, IL-1 β , ICAM-1 et Cox-2. Cependant, étant donné la variabilité des résultats, il est à noter que tous ces changements représentent des tendances vers un effet plutôt qu'un effet réel et ce, en dépit des répétitions de l'expérience.

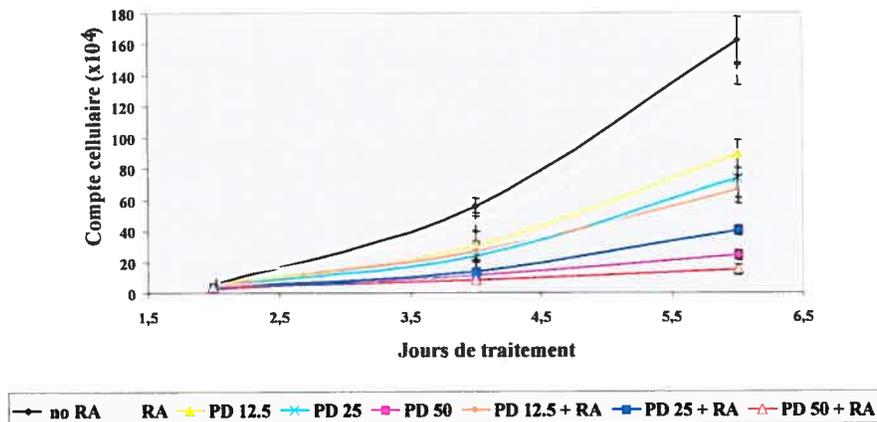
(A)

Effet de l'inhibition de la voie des MAPK sur la sensibilité des cellules A-549 à l'atRA par essai de prolifération



(B)

Effet de l'inhibition de la voie des MAPK sur la sensibilité des cellules Hs-578T à l'atRA par essai de prolifération



(C)

Effet de l'inhibition de la voie des MAPK sur la sensibilité des cellules LCT à l'atRA par essai de prolifération

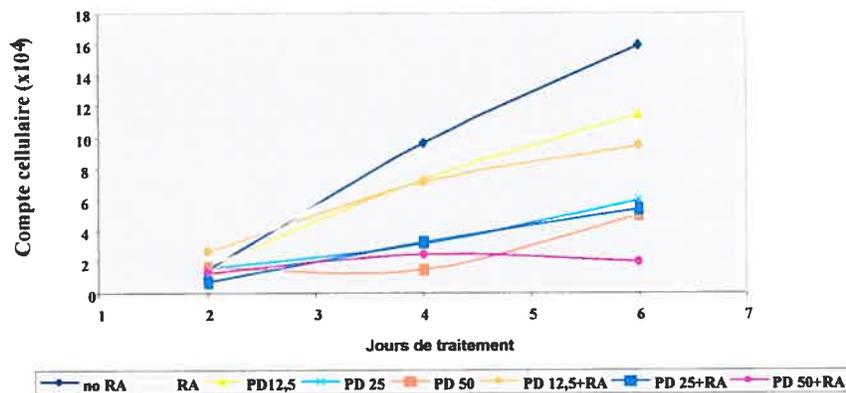


Figure 1: L'inhibition de la voie des MAPK sensibilise les lignées Hs-578T, A-549 et LC-T à l'atRA Essais de prolifération sur les cellules A-549 (A), Hs-578T (B) et LC-T (C). Les cellules sont traitées avec l'inhibiteur de MEK1/2, PD98059, à des concentrations de 12.5 μ M (PD12.5), 25 μ M (PD25) et 50 μ M (PD50), seul ou en co-traitement avec l'acide rétinoïque all-trans (atRA) à 1 μ M, en triplicata. Les cellules sont comptées à l'hémacymètre aux jours 2, 4 et 6. Le milieu culture est changé à chaque jour de compte. Les expériences ont été répétées n=3 en triplicatas, les résultats représentant la moyenne +/- SD.

Le récepteur aux EGF et la sensibilité à atRA

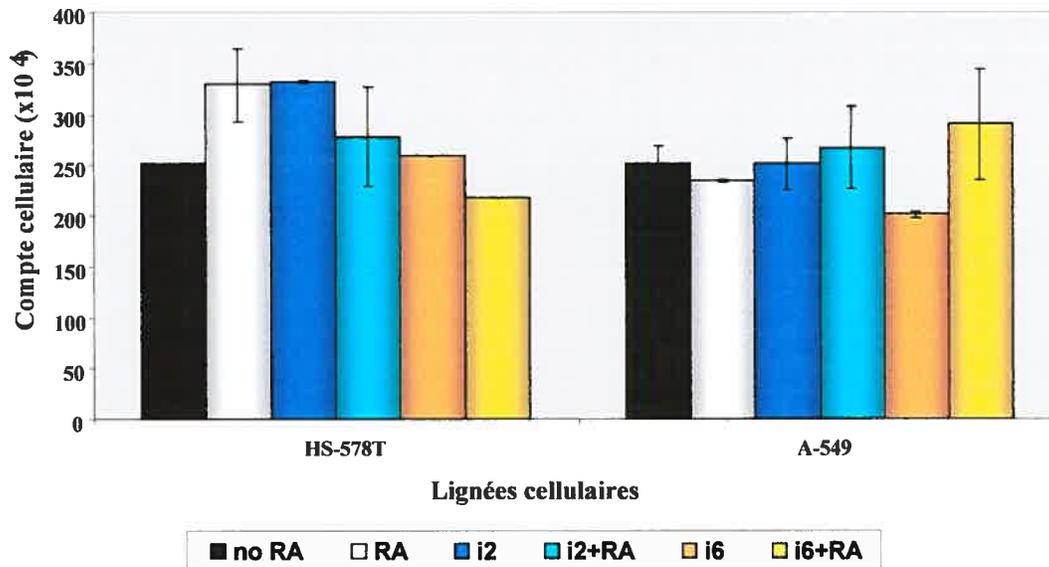
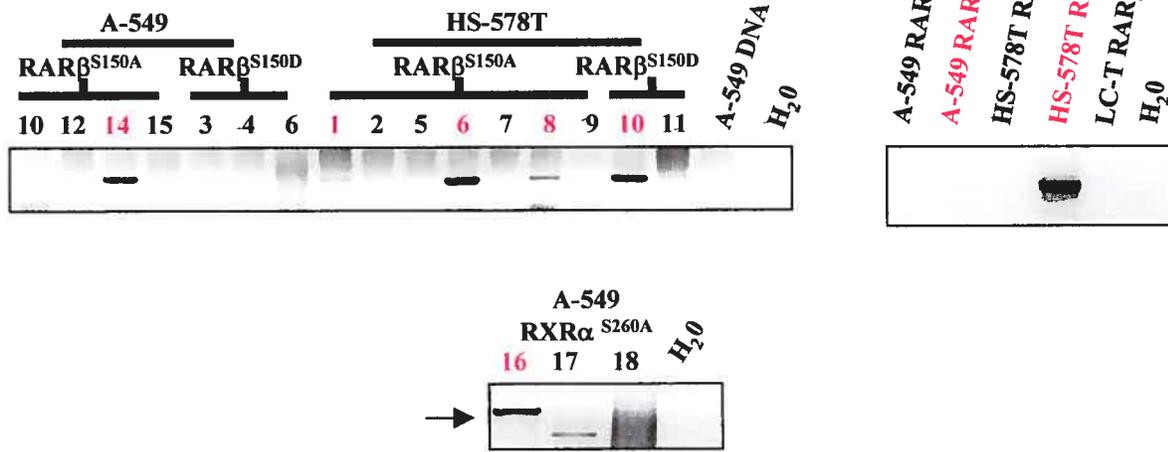


Figure 2: La voie des EGFR pourrait être impliquée dans la sensibilité des cellules à atRA Essais de prolifération sur les cellules Hs-578T et A-549. Les cellules sont traitées avec l'inhibiteur de EGFR, Gefitinib (Iressa), à des concentrations de 2 μ M (i2) et 6 μ M (i6), seul ou en co-traitement avec l'acide rétinoïque all-trans à 1 μ M, en triplicata. Les cellules sont comptées à l'aide d'un l'hémacymètre après 6 jours de traitement. Le milieu de culture est changé à chaque jour de compte. Les barres représentent la moyenne de 3 expériences en triplicatas, +/- SD.

(A) PCR sur ADN Génomique



(B) RT-PCR

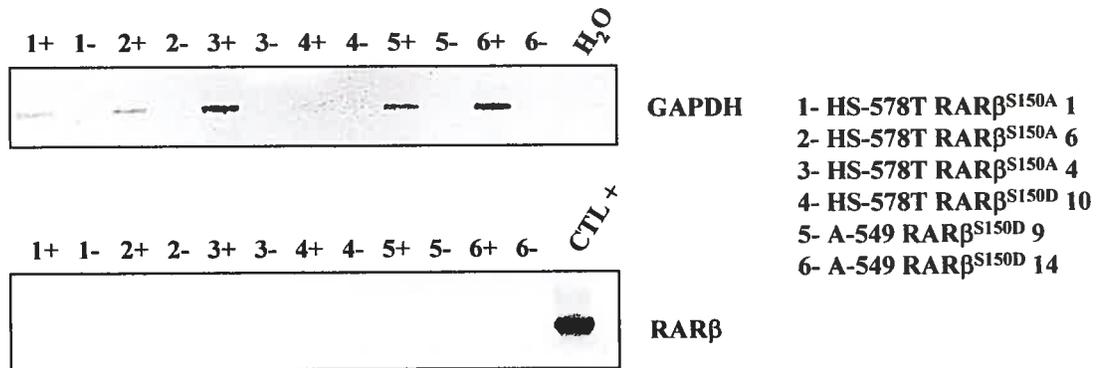
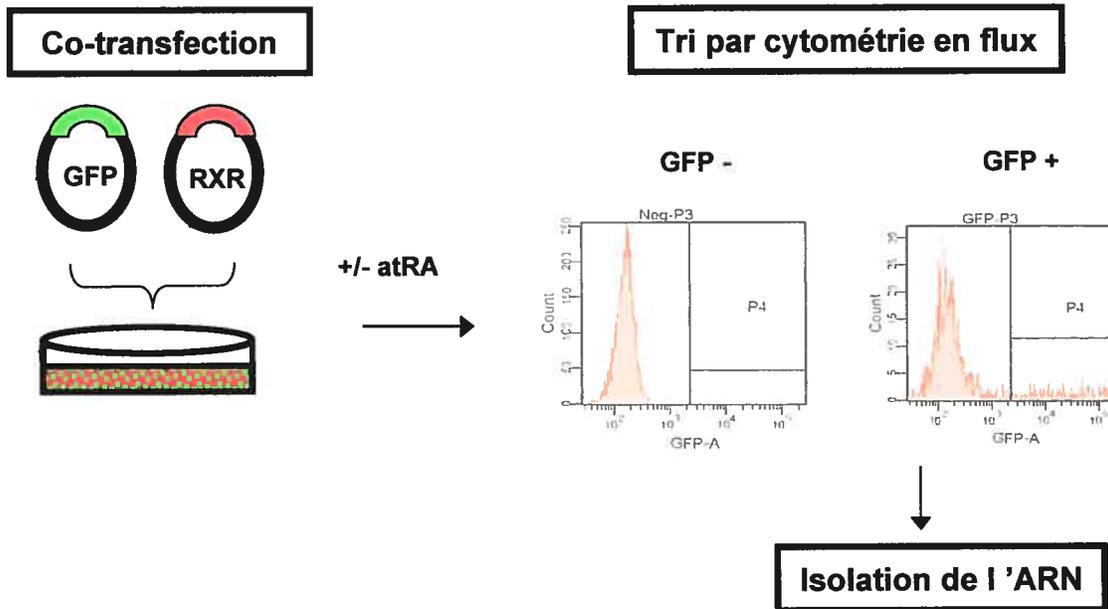


Figure 3: Analyse de l'ADN et de l'ARNm des clones provenant des cellules Hs-578T et A-549. Les cellules ont été transfectées avec les mutants de phosphorylation RARβ^{S150A}, RARβ^{S150D} et RXRα^{S260A} par sélection à la Généticin. (A) Amplification par PCR de l'ADN des clones pour les gènes RARβ et RXRα exogènes. (B) Amplification par RT-PCR de l'ARNm des clones pour le gène RARβ. Le contrôle positif est le vecteur pcDNA3-RARβ^{S150A}. Les signes + et - indiquent la présence ou l'absence de l'enzyme réverse transcriptase dans la réaction de RT.

(A)



(B)

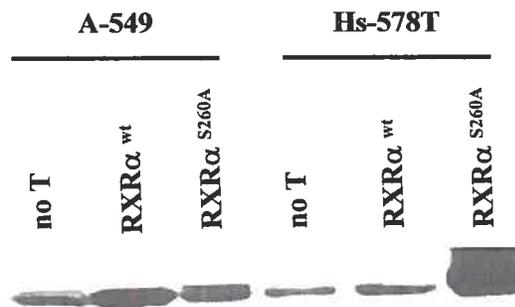
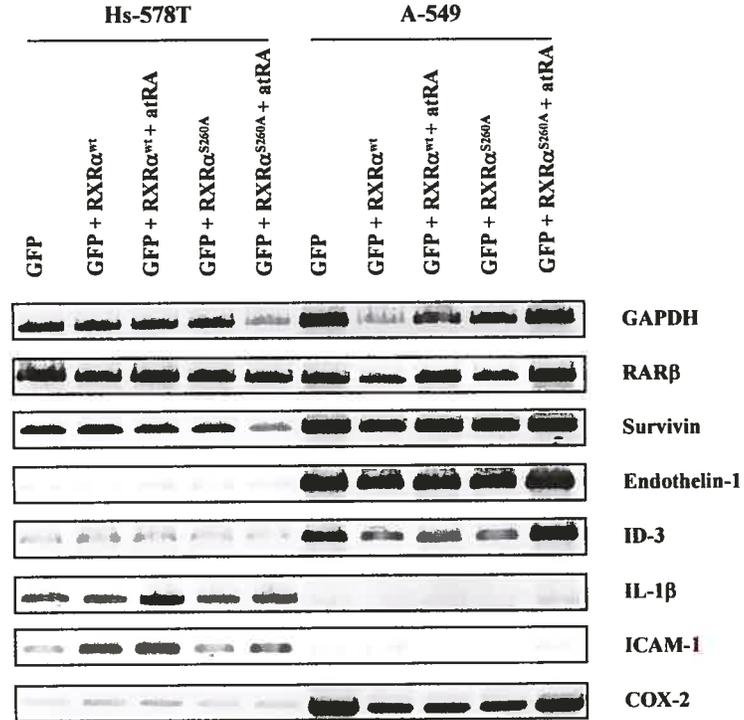
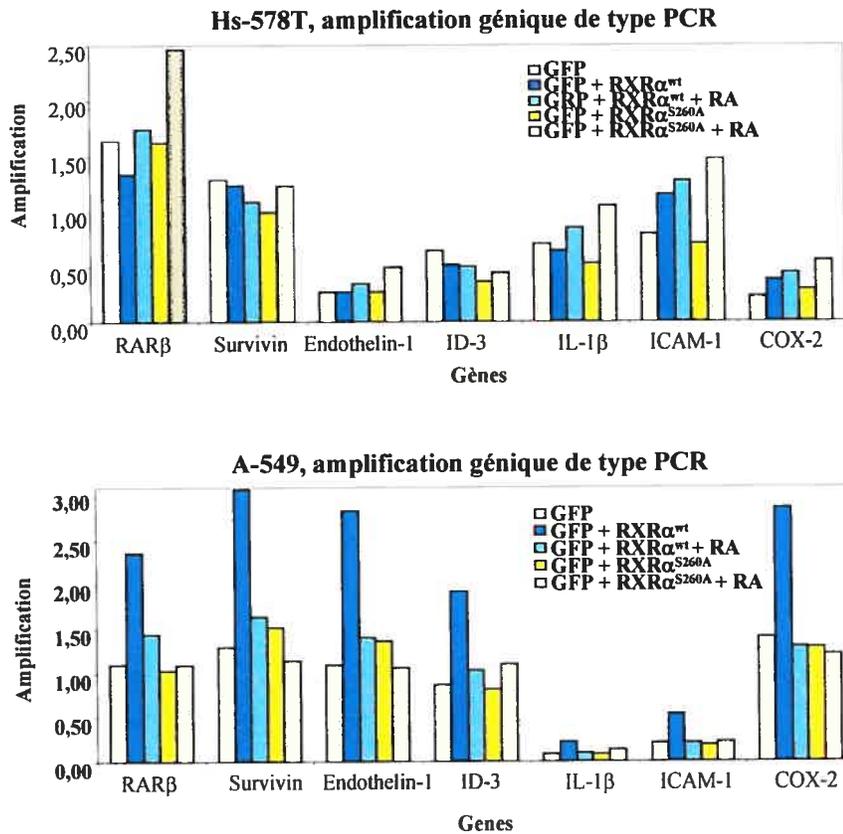


Figure 4: Transfection transitoire et vérification d'expression des gènes exogènes (A) Les cellules Hs-578T et A-549 ont été co-transfectées de façon transitoire avec pEGFP et la forme sauvage (RXR α^{wt}) ou la forme mutante (RXR α^{S260A}) de RXR α . Les cellules ont ensuite été triées par cytométrie de flux pour sélectionner les cellules GFP positives. Les cellules triées étaient ensuite lysées et leur ARN extraite par la méthode de Trizol (*Invitrogen*). (B) Immunobuvardage de type Western vérifiant l'expression des constructions RXR α^{wt} et RXR α^{S260A} dans les cellules A-549 et Hs-578T. 60 μ g d'extraits protéiques totaux ont été mis sur gel de polyacrylamide 8% de type SDS-PAGE. Le chargement uniforme du gel a été confirmé par teinture de rouge ponceau (résultats non présentés). L'immunoblot fut incubé avec un anticorps souris anti-RXR α (*Santa Cruz Biotechnologies*). Le niveau d'expression de RXR α fut révélé par la méthode de chimioluminescence ECL (*Amersham Biosciences*).

(A)



(B)



(C)

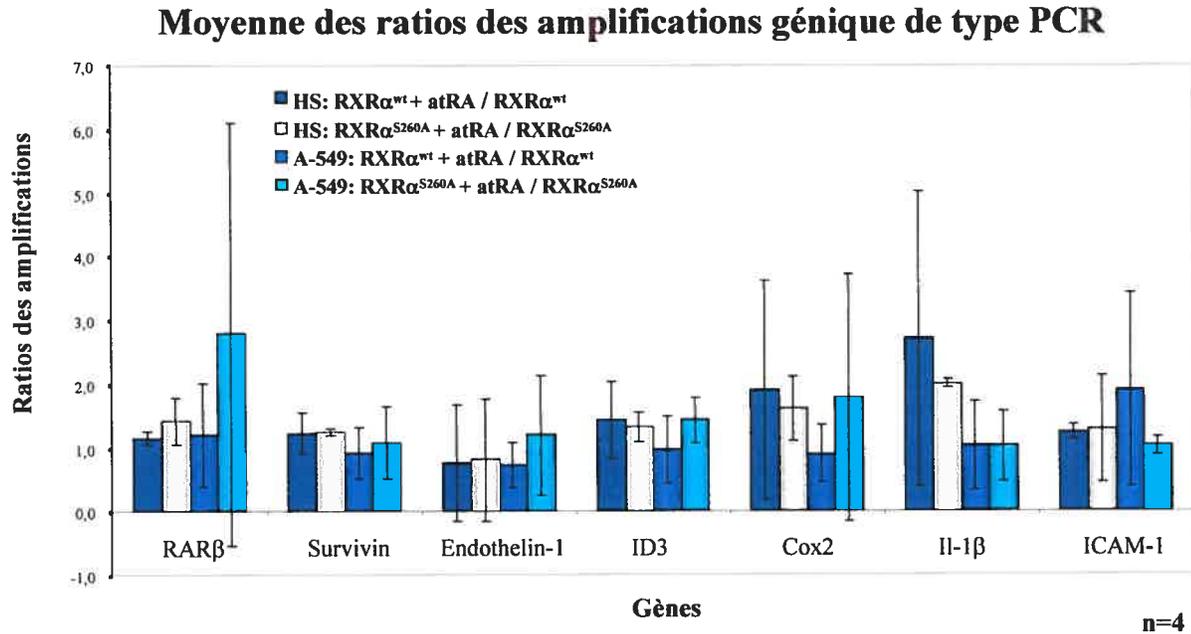


Figure 5: Le mutant de phosphorylation de RXR α ne semble pas modifier la signalisation de l'acide rétinoïque par RAR β (A) Analyse de l'ARNm des cellules transfectées avec les différentes constructions par RT-PCR. Bandes séparées sur gel d'agarose 1%. (B) Densitométrie des amplifications pour chaque gène normalisées par rapport à l'amplification de GAPDH. Les résultats montrés en (A) et (B) ont été obtenus lors de la quatrième répétition et sont représentatifs de l'expérience. (C) Pour chaque lignée cellulaire, la moyenne des ratios obtenus de RXR α^{wt} +RA par rapport à RXR α^{wt} , ainsi que de RXR α^{S260A} +RA par rapport à RXR α^{S260A} , pour les quatre expériences a été exposée sous forme graphique incluant la déviation standard.

Chapitre 4 :Discussion

Le choix des lignées cellulaires utilisées dans notre étude s'est fait en tenant compte de leur résistance à l'atRA et de leur expression du gène RAR β (ce qui a limité notre choix). Une majorité des cancers du poumon devenant résistants à atRA par diminution de l'expression du gène RAR β (*Zhang et al.*, 1996), notre choix de lignées pour cette maladie était restreint. Nous avons par la suite démontré que les lignées choisies étaient belles et bien résistantes à l'acide rétinoïque. Les travaux de Suh *et al* (2002) démontrent qu'une grande proportion des lignées de cancer du poumon n'expriment pas RAR β , ou l'expriment très faiblement (dont la lignée A-549), et que cette absence d'expression de RAR β serait la cause de leur insensibilité à l'acide rétinoïque. Ceci concorde avec nos résultats, puisque nous avons démontré que le traitement des cellules A-549 et Hs-578t à l'acide rétinoïque ne provoque pas de changement dans la croissance cellulaire. Il aurait été intéressant d'avoir plus que deux lignées cellulaires pour nos expériences, ce qui aurait donné un plus large éventail à notre analyse.

1. Implication de la voie MAPK/ERK dans la résistance à l'acide rétinoïque

Nous avons tout d'abord tenté de démontrer que le blocage de la signalisation par la voie MAPK-ERK1/2 permettait de sensibiliser légèrement les cellules à l'acide rétinoïque. La voie des MAPK- ERK1/2 ayant une influence connue sur la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire, il serait tout à fait normal d'observer une diminution de prolifération cellulaire dose-dépendante lors de l'inhibition de la voie des MAPKs. Cependant, nos résultats ne démontrent pas un effet marqué de l'inhibition des MAPKs sur la prolifération. Nous n'observons qu'une légère resensibilisation des cellules A-549 et HS-578T après le traitement avec PD98059.

Il est intéressant de constater les conséquences de l'inhibition de la voie des MAPKs sur la signalisation par les rétinoïdes. En effet, Solomon *et al* (1999) ont observé que l'inhibition de la voie de MAPKs par l'inhibiteur PD98059 re-sensibilise les kératinocytes transformés au métabolite actif de la vitamine D. Nous observons un effet semblable mais moindre sur nos lignées cancéreuses du sein et du poumon, avec le métabolite atRA de la vitamine A cette fois. Ce résultat est très intéressant mais pas tout

à fait surprenant étant donné que les récepteurs à la vitamine D fonctionnent mécaniquement de façon similaire aux récepteurs aux rétinoïdes. La voie des MAPKs aurait donc un certain effet, direct ou indirect, sur la signalisation de atRA. Plusieurs influences potentielles ont été soulevées dans la littérature (phosphorylation des récepteurs, phosphorylation de co-activateurs ou co-répresseurs, effet sur la condensation de la chromatine à certains loci) (*Adachi et al., 2002; Bastien et al., 2002; Bastien et al., 2000; Delmotte et al., 1999; GianniBauer et al., 2002; Kopf et al., 2000; Matsushima-Nishiwaki et al., 2001*).

Le récepteur transmembranaire aux EGF (EGFR : *epidermal growth factor receptor*) module entre autres la prolifération, la différenciation et l'angiogénèse par une cascade signalétique intracellulaire (*Woodburn, 1999; Yarden et al., 2001*). Sa surexpression et son hétérodimérisation avec Her2/neu sont deux mécanismes responsables de la signalisation aberrante dans les cellules cancéreuses (*Ciardello et al., 2003*). Il fut démontré que l'amplification de Her2/neu induit la résistance des cellules du cancer du sein à certains agents chimiothérapeutiques (*Slamon et al., 1987*), mais est aussi la cause de la résistance des cellules MDA-MB-453 à l'acide rétinoïque (*Tari et al., 2002*). Cependant, les résultats sont contradictoires entre les divers groupes de recherche à savoir si EGFR serait aussi responsable en partie de cette résistance. Ainsi, nous avons utilisé l'inhibiteur de EGFR, gefitinib (Iressa) afin de vérifier si le blocage de cette voie de signalisation ne pourrait pas resensibiliser les cellules à atRA. La capacité de Iressa à inhiber la voie des EGFR ne semble pas dépendre de l'expression de la protéine par les lignées cellulaires, les résultats d'études étant opposés à ce sujet (*Ciardello et al., 2003*).

La lignée cellulaire A-549 est considérée comme exprimant EGFR de façon modérée (*Raben et al., 2002*), alors que la lignée Hs-578T possède une forte expression (*Lim et al., 2002*). Nous n'avons cependant pas vérifié le niveau d'activation de EGFR dans nos lignées cellulaires, ce qui aurait pu aider à l'analyse des résultats. Ainsi, nous observons que dans la lignée Hs-578T, l'Iressa a un faible effet à forte dose seulement sur la sensibilité à l'atRA, alors que dans la lignée A-549, aucun effet n'est observable. De plus, à forte dose, Iressa en combinaison avec atRA semble stimuler la prolifération cellulaire, résultat très surprenant en comparaison aux études et aux connaissances acquises jusqu'à maintenant. Cependant, vu l'incertitude allouée à nos résultats, il est

aussi probable que l'effet ne soit pas aussi prononcé que la figure 2 semble l'indiquer. À la lumière de nos résultats, il est quand même surprenant de ne pas voir une diminution de la prolifération plus accrue en inhibant la voie des EGFR. Cette voie ayant des implications importantes dans la croissance cellulaire, nous nous serions attendus à un ralentissement de la prolifération à la suite du traitement à l'Iressa.

2. Génération de clones stables

La génération de clones stables surexprimant une protéine donnée est une approche très exploitée en biologie moléculaire. Elle permet de générer un système mimant la situation *in vivo* où une maladie est causée par la surexpression de la dite protéine. Cependant, surexprimer une protéine change aussi l'équilibre de la cellule, et ne reflète pas exactement la situation réelle, ce qui doit être tenu en compte lors de l'analyse. Sous cette optique, nous avons tenté de générer des clones stables surexprimant nos récepteurs mutants d'intérêt, soit $\text{RAR}\beta^{\text{S150A}}$ et $\text{RXR}\alpha^{\text{S260A}}$, deux mutants des récepteurs nucléaires ne pouvant être phosphorylé sur le résidu en question. Nous avons aussi tenté de surexprimer le mutant $\text{RAR}\beta^{\text{S150D}}$, un mutant dont le remplacement du résidu sérine par acide aspartique mime la phosphorylation constitutive du résidu 150.

Établir ces lignées nous permettrait de vérifier l'impact du mutant sur la signalisation intracellulaire des rétinoïdes. En plus, elles auraient permis l'exploration de l'aspect mécanistique du mutant, c'est-à-dire sa capacité à recruter les co-activateurs ou co-répresseurs, son niveau d'expression, sa localisation intracellulaire. Ceci nous aurait fait comprendre l'implication de la non-phosphorylation ou de la phosphorylation constitutive des récepteurs mutants sur leur fonction.

Les récepteurs aux rétinoïdes ont une fonction intracellulaire très importante, et ce tout au long du développement et de la vie d'un organisme, et perturber leurs niveaux d'expression est d'imposer un stress relativement considérable à la cellule. Ainsi, le résultat obtenu pour la création de clones stables n'est pas totalement innattendu, ni incompréhensible. Premièrement, la surexpression d'un récepteur nucléaire peut altérer l'expression des gènes cibles de façon à perturber considérablement l'équilibre cellulaire,

mais en plus, la surexpression d'une forme mutante de ces récepteurs peut induire des changements encore plus intolérables pour la cellule. Ainsi, à cause d'un changement à ce point dramatique, les cellules qui survivront seront celles qui auront inhibé l'expression du transgène ou peut-être tout simplement cellules qui l'expriment moins, ce qui expliquerait l'absence de détection des transgènes à l'intérieur de tous nos clones stables obtenus. Il est à noter que les groupes de *Le et al* (2000) et *Crowe et al* (1998) ont produit des lignées stables qui surexprimaient un mutant dominant négatif de RAR β dans des lignées de carcinomes de cellules squameuses. La surexpression de ces récepteurs ne serait donc pas impossible. Cependant, le succès de l'expérience dépend peut-être de la fonction du mutant dans la cellule, ainsi que le type cellulaire transfecté. Nous savons à la base que la lignée A-549, tout particulièrement, est très difficile à transfecter. Peut-être que cette réticence à accepter un transgène est en partie responsable de l'échec de notre tentative d'établir des clones stables. Il eut été à notre avantage d'utiliser une lignée cellulaire qui était plus facile à transfecter et qui correspondait à notre modèle cependant, les lignées cellulaires cancéreuses insensibles à l'acide rétinoïque malgré leur expression du gène RAR β ne sont pas nombreuses.

3. Effect du mutant de phosphorylation de RXR α sur la signalisation par les rétinoïdes

Des expériences de micropuces à ADN effectuées dans le laboratoire (*Pappas, J.* résultats non publiés) ont fait état des gènes qui étaient sous le contrôle direct (RARE présent dans le promoteur) ou indirect de RAR β . L'expression des gènes a été évaluée en présence de atRA ou en réduisant l'expression du récepteur par oligonucléotides antisens. Les gènes modulés de façon importantes et dont la fonction est en rapport à la carcinogenèse ont été relevés et la modulation a été vérifiée par RT-PCR semi-quantitatif (*Émilie Pepin*, résultats non-illustrés). Nous avons vérifié par transfection transitoire l'effet du mutant de phosphorylation RXR α ^{S260A} sur l'expression de certains de ces gènes.

Le mutant, lorsque stimulé par un traitement à l'acide rétinoïque, semble augmenter l'expression de RAR β dans la lignée A-549, mais aucune différence notable

n'existe pour Hs-578T. On observe le même phénomène pour Endothelin-1 et Cox-2, mais avec une amplitude moindre. Le gène Endothelin-1 code pour une protéine sécrétée par la cellule, qui est impliquée dans la progression tumorale et qui participe au développement de l'organisme. Le gène de la cyclooxygénase-2 (Cox-2) est un facteur pro-angiogénique qui catalyse la biosynthèse des prostaglandines. La surexpression de COX-2 semble être un élément clé pour la promotion tumorale (Rao *et al.*, 2001; Tsujii *et al.*, 1998). Dans la cellule A-549, le traitement à l'acide rétinoïque n'induit pas de variation d'expression de Endothelin-1, alors que le mutant induit une augmentation de son expression en présence de atRA. À la lumière de nos résultats, le mutant de phosphorylation et l'acide rétinoïque agiraient de concert pour promouvoir la progression tumorale, ce qui va à l'encontre de notre hypothèse.

Par ailleurs, RXR α ^{S260A} semble induire une diminution de l'expression de IL-1 β en présence de atRA dans la lignée Hs-578T, alors qu'aucun changement n'est visible pour les cellules A-549. IL-1 β est une cytokine pro-inflammatoire dont la fonction est d'inhiber la prolifération induite par IGF-1 en bloquant l'entrée en phase S (Jeschke *et al.*, 2004). En induisant une diminution de l'expression d'IL-1 β en présence d'atRA, le mutant contribue à la capacité de la cellule tumorale à proliférer de façon anormale. Ainsi, ces résultats confirment la ligne de pensée avancée par le patron d'expression de Edn-1 et Cox-2.

En comparaison, l'expression du gène ICAM-1 semble être diminuée par atRA lorsque le mutant de phosphorylation est surexprimé dans la lignée cellulaire A-549. Cependant, le même traitement n'induit pas de changement d'expression de ce gène chez Hs-578T. ICAM-1 fait partie de la superfamille des molécules d'adhésion apparentées aux immunoglobulines. Une cellule tumorale ayant une expression accrue de ICAM-1 a un potentiel faible de croissance, alors que la diminution de l'expression permet au cancer de croître et d'éventuellement causer des métastases (Mills *et al.*, 2004). Ainsi, comme nous l'avons avancé précédemment, l'effet que semble avoir l'inhibition de la phosphorylation de RXR α en présence d'atRA est davantage pro-carcinogène qu'anti-prolifératif.

Finalement, aucun changement digne de mention n'est à relever pour les gènes Survivin et ID-3. Le gène Survivin fait partie de la famille des IAP-4, protéines qui se

lient et inactivent les caspases, et qui ont un effet sur la division et le cycle cellulaire. Il est connu que sa surexpression est un indice de mauvais pronostic dans la carcinogénèse (Schimmer, 2004). Quant à ID3, cette protéine se lie aux facteurs de transcription possédant le motif bHLH, agissant comme dominant négatif et empêchant leur liaison à l'ADN (Maeda et al., 2004). ID3 est impliqué dans l'angiogénèse, tant au niveau du développement que pour la carcinogénèse. Des souris "knock-out" pour ID3 présentent une diminution accrue de la croissance tumorale due à une impossibilité à produire de nouveaux vaisseaux sanguins pour l'irriguer (Lyden et al., 1999). Nous nous serions attendu à une modulation du gène Survivin, qui a une implication importante dans l'équilibre cellulaire, mais le mutant ne semble pas induire une expression différente de ce gène.

Les données de l'expérience de RT-PCR à la suite d'une transfection transitoire laissent l'observateur perplexe. À la suite des essais de proliférations avec l'inhibiteur des MAPKs, nous nous serions attendus à voir le spectre d'expression des gènes cibles de RAR β tendre vers une diminution de la prolifération et une réduction des phénomènes alliés à la carcinogénèse tels l'angiogénèse, la survie cellulaire et la motilité. Cependant, ce que la figure 4C démontre est que les lignées cellulaires transfectées avec le mutant de phosphorylation de RXR α , lorsque traitées à atRA, induise l'expression de gènes dont la fonction est pro-cancérogène et diminue l'expression de gènes anticancer. Ainsi, on pourrait hypothétiser que la re-sensibilisation des cellules à l'effet antiprolifératif de atRA par l'inhibition de la voie des MAPK n'est pas dû à une inhibition de la phosphorylation de RXR α , mais agirait sur un autre récepteur, aux rétinoïdes potentiellement. En contrepartie, l'expression des mutants n'est peut-être pas suffisante pour induire des changements notables, ou alors la sérine 260 n'est peut-être pas phosphorylée dans ce système.

Il est cependant important de prendre en compte l'incertitude attribuée à la figure 4. En effet, le design de l'expérience est propice à la variabilité, et ce à plusieurs niveaux. Premièrement, les cellules utilisées possèdent une efficacité de transfection très faible, souvent inférieure à 10%. C'est d'ailleurs pourquoi nous avons décidé de trier les cellules en cytométrie de flux à la suite de la transfection. Cependant, il faut considérer la possibilité que la cytométrie de flux sélectionne des cellules "faussement positives",

c'est-à-dire des cellules qui auraient intégré le plasmide GFP seul, et ce malgré les ratios de transfections qui favorisent l'intégration du vecteur pcDNA₃-RXR α ^{S260A}. La méthode utilisée, le Fugene (Roche applied sciences), est la méthode de transfection qui nous a donné les meilleurs rendements. Cependant, d'autres méthodes, plus coûteuses comme le Nucleofactor™ de Amaxa, distribué par ESBE, ou à plus longue haleine, comme l'infection par adénovirus, seraient des possibilités à envisager. Le Nucleofactor™ est une nouvelle technologie développée par la compagnie Amaxa, qui fonctionne comme une électroporation cellulaire dans le noyau, mais qui garantie des résultats stupéfiants et qui semble faire ses preuves. Quant à l'infection par adénovirus, la synthèse de cet adénovirus est un long procédé qui semble donner de bons résultats, mais le temps de synthèse était trop long pour le travail à faire et le temps disponible dans le cadre de la maîtrise.

Il eut été aussi un choix judicieux de chercher d'autres lignées cellulaires, insensibles à l'acide rétinoïque, mais exprimant le gène RAR β , afin d'augmenter notre échantillon et de voir les variabilités entre les lignées cellulaires. Ceci nous aurait aussi permis de trouver une lignée plus facile à transfecter, ce qui aurait diminué notre marge d'erreur.

Par ailleurs, l'incertitude face à la co-transfection aurait pu être évitée en créant une protéine de fusion RXR α ^{S260A}-GFP. Lors de la co-transfection, il reste toujours un doute à savoir si chacune des cellules qui a intégré le plasmide de la GFP a aussi bien intégré le plasmide codant pour la protéine mutante. En faisant une protéine de fusion, nous sommes assuré de voir la protéine exprimée. Cependant, faire une protéine de fusion implique la possibilité que cette étiquette interfère dans la fonction normale de la protéine. Aussi, le choix de la position de cette étiquette doit être fait de façon réfléchie. En plaçant le GFP en N-terminal de la protéine, une protéine tronquée pourrait être exprimée et nous la verrions tout de même au microscope. En revanche, si la GFP est placée en C-terminal, nous nous assurons que seules les cellules ayant produit des protéines pleines longueurs seront visibles et sélectionnées par cytométrie de flux. De façon alternative, nous pourrions utiliser un plasmide codant pour la GFP, mais séparé de l'origine de transcription du gènes d'intérêt par un IRES. Ce genre de plasmide permet l'expression de la GFP simultanément à l'expression du gènes d'intérêt, sans toutefois

interférer avec la transcription du gène d'intérêt, et surtout sans que celui-ci ait une étiquette nuisant à sa fonction normale.

Par ailleurs, la méthode d'amplification par RT-PCR n'est que semi-quantitative. Tout d'abord, l'échantillon que nous obtenions après le triage par cytométrie de flux comptait très peu de cellules. Ceci rendait les étapes d'extraction d'ARN et de synthèse de cDNA très délicates. N'obtenant que très peu d'ARN, les échantillons ne pouvaient être dosés (par économie de substrat). Ainsi, les résultats étaient normalisés en fonction de l'amplification de GAPDH, que l'on prenait comme indicateur du nombre de cellules obtenues par cytométrie de flux. Cependant, la méthode du RT-PCR semi-quantitatif repose sur la détection par gel d'agarose, qui est non précise et qui ne peut discerner les variations d'expression inférieures à 5x. L'utilisation de la technique de PCR en temps réel aurait augmenté la sensibilité de notre essai et aurait contribué à la diminution de la variabilité. En effet, cette technique repose sur le principe de la lecture immédiate au cours de l'amplification, par l'utilisation d'un agent chimique qui émet une longueur d'onde lorsqu'il est lié à l'ADN double-brin. Cette technique permet de mesurer des différences d'expression de 2x seulement. De plus, elle mesure l'amplification dans la partie exponentielle de la courbe, partie où il y a été démontré qu'il y a le moins de variation entre les échantillons (ref. D). Ainsi, utiliser la méthode de PCR en temps réel aurait augmenté la sensibilité de notre essai.

Finalement, certaines lacunes se sont glissées dans le déroulement expérimental de cette étude. Premièrement, dû à une absence d'anticorps commerciaux dirigés contre S260 de RXR α , nous avons été dans l'impossibilité de vérifier le statut de phosphorylation du récepteur, et ce tout au long de l'étude de même que dans notre lignée cellulaire originale. Ensuite, il aurait été pertinent de détecter par western blot le niveau d'expression de EGFR dans nos lignées. Il aurait été approprié de faire l'analyse protéique de EGFR en parallèle avec l'essai de prolifération, afin de mesurer l'effet de l'inhibiteur Iressa sur l'activation du récepteur. Enfin, nous n'avons pas prouvé l'effet de l'inhibiteur PD98059 sur la phosphorylation des membres de la voie des MAKs. Prouver l'inhibition de l'activation de ERK1/2 par immunobuvardage de type western aurait été préférable et aurait rendu plus robuste notre analyse.

4. Conclusions et perspectives :

Nous avons démontré qu'en parallèle avec les expériences de Solomon *et al* (1999) sur la résistance à la vitamine D, la phosphorylation par la voie des MAPKs pourrait potentiellement jouer un rôle dans la résistance de certaines lignées cancéreuses à l'acide rétinoïque *all-trans*. Nous avons hypothétisé que cette voie signalétique ciblait le résidu S260 du récepteur RXR α . Nous avons été dans l'impossibilité de prouver que ce résidu avait un rôle défini dans cette résistance. En effet, notre modèle expérimental suggère en fait que l'absence de phosphorylation favoriserait la progression cancéreuse, ce qui est caractéristique d'une résistance à l'acide rétinoïque. Cependant, notre modèle expérimental étant peu précis, une investigation plus minutieuse serait recommandée afin de confirmer le refutage de notre hypothèse.

Le groupe de Solomon *et al* (1999) démontre un réel effet de la phosphorylation par la voie des MAPKs sur le résidu 260 de RXR α dans la résistance à la vitamine D. L'investigation du rôle de la phosphorylation de ce résidu dans la transactivation des gènes reste une voie de recherche intéressante. Des études utilisant des mutants structurels ou des mutants ponctuels du récepteur dans un système de gène rapporteur pourrait nous renseigner sur la fonction du résidu d'intérêt et sa phosphorylation dans l'activation de la transcription des gènes cibles. Il pourrait même être intéressant de pousser cette technique en utilisant des mutants pour le gène RAR β , dont la sérine S150 semble être un résidu candidat dans la régulation de la fonction du récepteur par phosphorylation (Delmotte *et al.*, 1999).

Bibliographie

- The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group*, N Engl J Med, 1994, 330(15), 1029-35.
- Abraham, D., Podar, K., Pacher, M., Kubicek, M., Welzel, N., Hemmings, B. A., Dilworth, S. M., Mischak, H., Kolch, W. and Baccarini, M. *Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation*, J Biol Chem, 2000, 275(29), 22300-4.
- Adachi, S., Okuno, M., Matsushima-Nishiwaki, R., Takano, Y., Kojima, S., Friedman, S. L., Moriwaki, H. and Okano, Y. *Phosphorylation of retinoid X receptor suppresses its ubiquitination in human hepatocellular carcinoma*, Hepatology, 2002, 35(2), 332-40.
- Adam-Stitah, S., Penna, L., Chambon, P. and Rochette-Egly, C. *Hyperphosphorylation of the retinoid X receptor alpha by activated c-Jun NH2-terminal kinases*, J Biol Chem, 1999, 274(27), 18932-41.
- Ahuja, H. S., Szanto, A., Nagy, L. and Davies, P. J. *The retinoid X receptor and its ligands: versatile regulators of metabolic function, cell differentiation and cell death*, J Biol Regul Homeost Agents, 2003, 17(1), 29-45.
- Bastien, J., Adam-Stitah, S., Plassat, J. L., Chambon, P. and Rochette-Egly, C. *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, 2002, 277(32), 28683-9.
- Bastien, J., Adam-Stitah, S., Riedl, T., Egly, J. M., Chambon, P. and Rochette-Egly, C. *TFIIH interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7*, J Biol Chem, 2000, 275(29), 21896-904.
- Bastien, J. and Rochette-Egly, C. *Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes*, Gene, 2004, 328(1-16).
- Berard, J., Gaboury, L., Landers, M., De Repentigny, Y., Houle, B., Kothary, R. and Bradley, W. E. *Hyperplasia and tumours in lung, breast and other tissues in mice carrying a RAR beta 4-like transgene*, Embo J, 1994, 13(23), 5570-80.
- Blomhoff, R., Green, M. H., Green, J. B., Berg, T. and Norum, K. R. *Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage*, Physiol Rev, 1991, 71(4), 951-90.
- Chambon, P. *A decade of molecular biology of retinoic acid receptors*, Faseb J, 1996, 10(9), 940-54.
- Chen, A. C., Guo, X., Derguini, F. and Gudas, L. J. *Human breast cancer cells and normal mammary epithelial cells: retinol metabolism and growth inhibition by the retinol metabolite 4-oxoretinol*, Cancer Res, 1997, 57(20), 4642-51.
- Ciardello, F. and Tortora, G. *Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a target in cancer therapy: understanding the role of receptor expression and other molecular determinants that could influence the response to anti-EGFR drugs*, Eur J Cancer, 2003, 39(10), 1348-54.
- Cote, S., Rosenauer, A., Bianchini, A., Seiter, K., Vandewiele, J., Nervi, C. and Miller, W. H., Jr. *Response to histone deacetylase inhibition of novel PML/RARalpha mutants detected in retinoic acid-resistant APL cells*, Blood, 2002, 100(7), 2586-96.

- Crespo, P. and Leon, J. *Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation*, Cell Mol Life Sci, 2000, 57(11), 1613-36.
- 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. *Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions*, Genes Dev, 1998, 12(21), 3343-56.
- De Luca, L. M. *Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia*, Faseb J, 1991, 5(14), 2924-33.
- de The, H., Vivanco-Ruiz, M. M., Tiollais, P., Stunnenberg, H. and Dejean, A. *Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene*, Nature, 1990, 343(6254), 177-80.
- Delmotte, M. H., Tahayato, A., Formstecher, P. and Lefebvre, P. *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, 1999, 274(53), 38225-31.
- Dyck, J. A., Maul, G. G., Miller, W. H., Jr., Chen, J. D., Kakizuka, A. and Evans, R. M. *A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein*, Cell, 1994, 76(2), 333-43.
- Fanelli, M., Minucci, S., Gelmetti, V., Nervi, C., Gambacorti-Passerini, C. and Pelicci, P. G. *Constitutive degradation of PML/RARalpha through the proteasome pathway mediates retinoic acid resistance*, Blood, 1999, 93(5), 1477-81.
- Fang, J. Y. and Richardson, B. C. *The MAPK signalling pathways and colorectal cancer*, Lancet Oncol, 2005, 6(5), 322-7.
- Germain, P., Iyer, J., Zechel, C. and Gronemeyer, H. *Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy*, Nature, 2002, 415(6868), 187-92.
- Gianni, M., Bauer, A., Garattini, E., Chambon, P. and Rochette-Egly, C. *Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR gamma degradation and transactivation*, Embo J, 2002, 21(14), 3760-9.
- Gianni, M., Kopf, E., Bastien, J., Oulad-Abdelghani, M., Garattini, E., Chambon, P. and Rochette-Egly, C. *Down-regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway is involved in retinoic acid-induced phosphorylation, degradation, and transcriptional activity of retinoic acid receptor γ 2*, Journal of biological chemistry, 2002, 277(28), 24859-24862.
- Gianni, M., Tarrade, A., Nigro, E. A., Garattini, E. and Rochette-Egly, C. *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, 2003, 278(36), 34458-66.
- Graham, S. *Epidemiology of retinoids and cancer*, J Natl Cancer Inst, 1984, 73(6), 1423-8.
- Hayden, L. J. and Satre, M. A. *Alterations in cellular retinol metabolism contribute to differential retinoid responsiveness in normal human mammary epithelial cells versus breast cancer cells*, Breast Cancer Res Treat, 2002, 72(2), 95-105.
- Higuchi, T., Kizaki, M. and Omine, M. *Induction of differentiation of retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia cells by the combination of all-trans retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor*, Leuk Res, 2004, 28(5), 525-32.

- Hoffmann, B., Lehmann, J. M., Zhang, X. K., Hermann, T., Husmann, M., Graupner, G. and Pfahl, M. *A retinoic acid receptor-specific element controls the retinoic acid receptor-beta promoter*, Mol Endocrinol, 1990, 4(11), 1727-36.
- Houle, B., Leduc, F. and Bradley, W. E. *Implication of RARB in epidermoid (Squamous) lung cancer*, Genes Chromosomes Cancer, 1991, 3(5), 358-66.
- Houle, B., Rochette-Egly, C. and Bradley, W. E. *Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor beta in human epidermoid lung cancer cells*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(3), 985-9.
- Jeschke, M. G. and Herndon, D. N. *Effect of growth factors as therapeutic drugs on hepatic metabolism during the systemic inflammatory response syndrome*, Curr Drug Metab, 2004, 5(5), 399-413.
- Khuri, F. R. and Lotan, R. *Retinoids in lung cancer: friend, foe, or fellow traveler?*, J Clin Oncol, 2004, 22(17), 3435-7.
- Kizaki, M., Matsushita, H., Takayama, N., Muto, A., Ueno, H., Awaya, N., Kawai, Y., Asou, H., Kamada, N. and Ikeda, Y. *Establishment and characterization of a novel acute promyelocytic leukemia cell line (UF-1) with retinoic acid-resistant features*, Blood, 1996, 88(5), 1824-33.
- Koken, M. H., Puvion-Dutilleul, F., Guillemin, M. C., Viron, A., Linares-Cruz, G., Stuurman, N., de Jong, L., Szosteki, C., Calvo, F., Chomienne, C. and et al. *The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion*, Embo J, 1994, 13(5), 1073-83.
- Kolch, W. *Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions*, Biochem J, 2000, 351 Pt 2(289-305).
- Kopf, E., Plassat, J. L., Vivat, V., de The, H., Chambon, P. and Rochette-Egly, C. *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, 2000, 275(43), 33280-8.
- Kumar, R. and Thompson, E. B. *The structure of the nuclear hormone receptors*, Steroids, 1999, 64(5), 310-9.
- Kurie, J. M., Lotan, R., Lee, J. J., Lee, J. S., Morice, R. C., Liu, D. D., Xu, X. C., Khuri, F. R., Ro, J. Y., Hittelman, W. N., Walsh, G. L., Roth, J. A., Minna, J. D. and Hong, W. K. *Treatment of former smokers with 9-cis-retinoic acid reverses loss of retinoic acid receptor-beta expression in the bronchial epithelium: results from a randomized placebo-controlled trial*, J Natl Cancer Inst, 2003, 95(3), 206-14.
- Leduc, F., Brauch, H., Hajj, C., Dobrovic, A., Kaye, F., Gazdar, A., Harbour, J. W., Pettengill, O. S., Sorenson, G. D., van den Berg, A. and et al. *Loss of heterozygosity in a gene coding for a thyroid hormone receptor in lung cancers*, Am J Hum Genet, 1989, 44(2), 282-7.
- Lenferink, A. E., Busse, D., Flanagan, W. M., Yakes, F. M. and Arteaga, C. L. *ErbB2/neu kinase modulates cellular p27(Kip1) and cyclin D1 through multiple signaling pathways*, Cancer Res, 2001, 61(17), 6583-91.
- Lim, S. J., Gutierrez-Puente, Y. and Tari, A. M. *N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide selectively increases All-TRANS retinoic acid inhibitory effects in HER2/NEU-overexpressing breast cancer cells*, Tumour Biol, 2002, 23(5), 279-86.
- Lin, B., Chen, G. Q., Xiao, D., Kolluri, S. K., Cao, X., Su, H. and Zhang, X. K. *Orphan receptor COUP-TF is required for induction of retinoic acid receptor beta*,

- growth inhibition, and apoptosis by retinoic acid in cancer cells*, Mol Cell Biol, 2000, 20(3), 957-70.
- Liu, B., Lee, H. Y., Weinzimer, S. A., Powell, D. R., Clifford, J. L., Kurie, J. M. and Cohen, P. *Direct functional interactions between insulin-like growth factor-binding protein-3 and retinoid X receptor-alpha regulate transcriptional signaling and apoptosis*, J Biol Chem, 2000, 275(43), 33607-13.
- Lotan, R. *Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells*, Biochim Biophys Acta, 1980, 605(1), 33-91.
- Lotan, R., Lotan, D. and Sacks, P. G. *Inhibition of tumor cell growth by retinoids*, Methods Enzymol, 1990, 190(100-10).
- Lyden, D., Young, A. Z., Zagzag, D., Yan, W., Gerald, W., O'Reilly, R., Bader, B. L., Hynes, R. O., Zhuang, Y., Manova, K. and Benezra, R. *Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts*, Nature, 1999, 401(6754), 670-7.
- Maeda, Y., Tsuji, K., Nifuji, A. and Noda, M. *Inhibitory helix-loop-helix transcription factors Id1/Id3 promote bone formation in vivo*, J Cell Biochem, 2004, 93(2), 337-44.
- Matsushima-Nishiwaki, R., Okuno, M., Adachi, S., Sano, T., Akita, K., Moriwaki, H., Friedman, S. L. and Kojima, S. *Phosphorylation of retinoid X receptor alpha at serine 260 impairs its metabolism and function in human hepatocellular carcinoma*, Cancer Res, 2001, 61(20), 7675-82.
- Mills, P. J., Parker, B., Jones, V., Adler, K. A., Perez, C. J., Johnson, S., Cohen-Zion, M., Marler, M., Sadler, G. R., Dimsdale, J. E. and Ancoli-Israel, S. *The effects of standard anthracycline-based chemotherapy on soluble icam-1 and vascular endothelial growth factor levels in breast cancer*, Clin Cancer Res, 2004, 10(15), 4998-5003.
- Nagy, L. and Schwabe, J. W. *Mechanism of the nuclear receptor molecular switch*, Trends Biochem Sci, 2004, 29(6), 317-24.
- Napoli, J. L. *Retinoic acid biosynthesis and metabolism*, Faseb J, 1996, 10(9), 993-1001.
- Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., Keogh, J. P., Meyskens, F. L., Valanis, B., Williams, J. H., Barnhart, S. and Hammar, S. *Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease*, N Engl J Med, 1996, 334(18), 1150-5.
- Pratt, M. A., Kralova, J. and McBurney, M. W. *A dominant negative mutation of the alpha retinoic acid receptor gene in a retinoic acid-nonresponsive embryonal carcinoma cell*, Mol Cell Biol, 1990, 10(12), 6445-53.
- Raben, D., Helfrich, B. A., Chan, D., Johnson, G. and Bunn, P. A., Jr. *ZD1839, a selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, alone and in combination with radiation and chemotherapy as a new therapeutic strategy in non-small cell lung cancer*, Semin Oncol, 2002, 29(1 Suppl 4), 37-46.
- Rao, C. V., Hirose, Y., Indranie, C. and Reddy, B. S. *Modulation of experimental colon tumorigenesis by types and amounts of dietary fatty acids*, Cancer Res, 2001, 61(5), 1927-33.
- Rearick, J. I. and Jetten, A. M. *Effect of substratum and retinoids upon the mucosecretory differentiation of airway epithelial cells in vitro*, Environ Health Perspect, 1989, 80(229-37).

- Robertson, K. A., Emami, B. and Collins, S. J. *Retinoic acid-resistant HL-60R cells harbor a point mutation in the retinoic acid receptor ligand-binding domain that confers dominant negative activity*, Blood, 1992, 80(8), 1885-9.
- Ross, S. A., McCaffery, P. J., Drager, U. C. and De Luca, L. M. *Retinoids in embryonal development*, Physiol Rev, 2000, 80(3), 1021-54.
- Sato, A., Imaizumi, M., Hoshi, Y., Rikiishi, T., Fujii, K., Kizaki, M., Kagechika, H., Kakizuka, A., Hayashi, Y. and Inuma, K. *Alteration in the cellular response to retinoic acid of a human acute promyelocytic leukemia cell line, UF-1, carrying a patient-derived mutant PML-RARalpha chimeric gene*, Leuk Res, 2004, 28(9), 959-67.
- Schedlich, L. J., O'Han, M. K., Leong, G. M. and Baxter, R. C. *Insulin-like growth factor binding protein-3 prevents retinoid receptor heterodimerization: implications for retinoic acid-sensitivity in human breast cancer cells*, Biochem Biophys Res Commun, 2004, 314(1), 83-8.
- Schimmer, A. D. *Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice*, Cancer Res, 2004, 64(20), 7183-90.
- Seger, R. and Krebs, E. G. *The MAPK signaling cascade*, FASEB J, 1995, 9(9), 726-35.
- Shalinsky, D. R., Bischoff, E. D., Gregory, M. L., Lamph, W. W., Heyman, R. A., Hayes, J. S., Thomazy, V. and Davies, P. J. *Enhanced antitumor efficacy of cisplatin in combination with ALRT1057 (9-cis retinoic acid) in human oral squamous carcinoma xenografts in nude mice*, Clin Cancer Res, 1996, 2(3), 511-20.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A. and McGuire, W. L. *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*, Science, 1987, 235(4785), 177-82.
- Smalley, K. S. *A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma?*, Int J Cancer, 2003, 104(5), 527-32.
- Solomon, C., White, J. H. and Kremer, R. *Mitogen-activated protein kinase inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D3-dependent signal transduction by phosphorylating human retinoid X receptor alpha*, J Clin Invest, 1999, 103(12), 1729-35.
- Sucov, H. M., Murakami, K. K. and Evans, R. M. *Characterization of an autoregulated response element in the mouse retinoic acid receptor type beta gene*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87(14), 5392-6.
- Suh, Y. A., Lee, H. Y., Virmani, A., Wong, J., Mann, K. K., Miller, W. H., Jr., Gazdar, A. and Kurie, J. M. *Loss of retinoic acid receptor beta gene expression is linked to aberrant histone H3 acetylation in lung cancer cell lines*, Cancer Res, 2002, 62(14), 3945-9.
- Takayama, N., Kizaki, M., Hida, T., Kinjo, K. and Ikeda, Y. *Novel mutation in the PML/RARalpha chimeric gene exhibits dramatically decreased ligand-binding activity and confers acquired resistance to retinoic acid in acute promyelocytic leukemia*, Exp Hematol, 2001, 29(7), 864-72.
- Tanaka, T., Dancheck, B., Trifiletti, L., RE, B., Taylor, B., Garfield, S., Thorgeirsson, U. and De Luca, L. *Altered localization of retinoid x receptor alpha coincides with loss of retinoid responsiveness in human breast cancer MDA-MB-231*, Molecular and cellular biology, 2004, 24(9), 3972-3982.

- Tari, A. M., Lim, S. J., Hung, M. C., Esteva, F. J. and Lopez-Berestein, G. *Her2/neu induces all-trans retinoic acid (ATRA) resistance in breast cancer cells*, *Oncogene*, 2002, 21(34), 5224-32.
- Toulouse, A., Loubeau, M., Morin, J., Pappas, J. J., Wu, J. and Bradley, W. E. *RARbeta involvement in enhancement of lung tumor cell immunogenicity revealed by array analysis*, *Faseb J*, 2000, 14(9), 1224-32.
- Tsuji, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M. and DuBois, R. N. *Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells*, *Cell*, 1998, 93(5), 705-16.
- Warnmark, A., Treuter, E., Wright, A. P. and Gustafsson, J. A. *Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation*, *Mol Endocrinol*, 2003, 17(10), 1901-9.
- Webb, P., Anderson, C. M., Valentine, C., Nguyen, P., Marimuthu, A., West, B. L., Baxter, J. D. and Kushner, P. J. *The nuclear receptor corepressor (N-CoR) contains three isoleucine motifs (I/LXXII) that serve as receptor interaction domains (IDs)*, *Mol Endocrinol*, 2000, 14(12), 1976-85.
- Witcher, M., Shiu, H. Y., Guo, Q. and Miller, W. H., Jr. *Combination of retinoic acid and tumor necrosis factor overcomes the maturation block in a variety of retinoic acid-resistant acute promyelocytic leukemia cells*, *Blood*, 2004, 104(10), 3335-42.
- Woodburn, J. R. *The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy*, *Pharmacol Ther*, 1999, 82(2-3), 241-50.
- Yang, H. Y., Zhou, B. P., Hung, M. C. and Lee, M. H. *Oncogenic signals of HER-2/neu in regulating the stability of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27*, *J Biol Chem*, 2000, 275(32), 24735-9.
- Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. *Untangling the ErbB signalling network*, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(2), 127-37.
- Zhang, X. K., Liu, Y. and Lee, M. O. *Retinoid receptors in human lung cancer and breast cancer*, *Mutat Res*, 1996, 350(1), 267-77.
- Zhu, T., Goh, E. L., Graichen, R., Ling, L. and Lobie, P. E. *Signal transduction via the growth hormone receptor*, *Cell Signal*, 2001, 13(9), 599-616.

A. www.gla.ac.uk/ibls/US/L4/options/optionsc/cmcb.html

B. www.uleth.ca/bio/bio4110/5.pdf

C. www.med.unibs.it/~marchesi/vitamins2.html

D. www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf

