

Université de Montréal

Caractérisation enzymatique de deux aldéhydes déshydrogénases
recombinantes en utilisant les substrats rétinol et propanal

par

Nathaly Chow Lan

Département de Médecine

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences biomédicales

Juin 2000

©Nathaly Chow Lan, 2000



Caractérisation enzymatique de deux souches de bactéries
resistantes en utilisant les substrats tétraol et propional

W
4
158
2000
N. 113

par

Nathalie Chow Jan

Département de Médecine

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences biomédicales



1999-2000

Nathalie Chow Jan, 2000

PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Caractérisation enzymatique de deux aldéhydes déshydrogénases
recombinantes en utilisant les substrats rétinol et propanal

présenté par :
Nathaly Chow Lan

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président du jury:	Dr. Claude Lazure
Membre du jury:	Dr. André Lacroix
Directeur de recherche:	Dr. Pangala V. Bhat
Codirectrice de recherche:	Dr. Sylvie Mader

Mémoire accepté le:

SOMMAIRE

Les aldéhydes déshydrogénases (ALDHs) font partie d'une famille d'enzymes pouvant oxyder une variété d'aldéhydes en leurs acides correspondants. Ces enzymes ont été classées selon la similarité de leurs séquences. Les ALDHs de la classe 1 s'expriment dans la fraction cytosolique des tissus de mammifères. Plusieurs ALDHs de classe I humaines, bovines ou murines, participent à l'oxydation du rétinol en acide rétinoïque. Peu est connu sur la spécificité de leurs substrats. Nous avons récemment identifié et cloné une ALDH provenant du rein de rat, la RALDH. Cette enzyme purifiée, la "Retinal Aldehyde Dehydrogenase" (RALDH), catalyse avec une grande efficacité l'oxydation des isomères *9-cis* et *tout-trans* du rétinol en leurs acides correspondants. Dans cette étude, nous avons examiné si la catalyse du rétinol est une propriété générale des ALDHs de classe I ou s'il s'agit d'une propriété spécifique de certaines de ces enzymes. Dans ce but, nous avons comparé les propriétés enzymatiques de la RALDH recombinante, avec une autre enzyme cytosolique de la même classe provenant du rat. Cette dernière, nommée Pb-ALDH, est exprimée dans le foie de manière inductible par le phénobarbital.

Les deux enzymes étudiées, RALDH et Pb-ALDH, sont identiques à 89% au niveau de leurs séquences primaires d'acides aminés, suggérant que leurs propriétés enzymatiques seraient similaires. Nous avons exprimé ces deux enzymes chez *E. coli* et comparé leurs constantes cinétiques en utilisant, comme substrat, les isomères *9-cis* et *tout-trans* du rétinol. Pour la RALDH, les valeurs de K_m ($3,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ et $12 \pm 1 \mu\text{M}$ respectivement) trouvées sont en accord avec celles obtenues pour l'enzyme purifiée. Par contre, la conversion du rétinol en acide rétinoïque par la Pb-ALDH n'a pu être détectée, même si l'oxydation du propanal par la même enzyme a été observée, avec un K_m ($1,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$) similaire à celui décrit pour l'enzyme purifiée. De même, la RALDH peut catalyser l'oxydation du propanal, mais avec un K_m plus élevé et une efficacité catalytique moindre comparativement à la Pb-ALDH.

Par ailleurs, à la lumière de ces nouvelles connaissances, nous avons examiné l'importance d'un acide aminé hautement conservé, la cystéine 301 (remplacée par une

isoleucine chez Pb-ALDH), dans l'activité catalytique de la RALDH avec le rétinol comme substrat. Une RALDH mutante, dans laquelle la cystéine 301 a été remplacée par une isoleucine par mutagenèse dirigée, a un K_m et une efficacité catalytique inchangés pour les isomères *tout-trans* et *9-cis* du rétinol, par rapport à la RALDH sauvage. Ces observations indiquent donc que la cystéine 301 de la RALDH n'est pas essentielle à l'oxydation du rétinol, et cela suggère l'implication des autres acides aminés qui diffèrent entre RALDH et Pb-ALDH dans la reconnaissance des substrats rétinaux et/ou la catalyse de leur oxydation.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	iii
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles et abréviations	x
Remerciements	xiii
PREMIÈRE PARTIE. REVUE DE LA LITTÉRATURE	1
CHAPITRE 1. VITAMINE A ET RÉTINOÏDES	2
1.1 Découverte de la vitamine A	3
1.2 Vitamine A et cancer	6
1.3 Apport nutritionnel et stockage des rétinoïdes	8
1.3.1 Absorption des rétinoïdes	8
1.3.2 Estérification du rétinol dans l'intestin	9
1.3.3 Stockage des rétinoïdes au niveau du foie	11
CHAPITRE 2. PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LE TRANSPORT ET L'UTILISATION DES RÉTINOÏDES	12
2.1 Protéines plasmatiques impliquées dans le transport du rétinol	13
2.2 Protéines cellulaires pour l'acheminement des rétinoïdes	14
2.2.1 Leur caractérisation	14
2.2.2 Leur expression	15
2.2.3 Leurs fonctions.....	16

2.3 Récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque	18
2.3.1 Leur structure	18
2.3.2 Leur localisation tissulaire	20
2.3.3 Structure de l'ADN et interaction avec les récepteurs	21
2.3.4 Récepteurs nucléaires et effets physiologiques de l'acide rétinoïque	22

CHAPITRE 3. ENZYMES IMPLIQUÉES

DANS LE MÉTABOLISME DE LA VITAMINE A : RÔLE DE LA RALDH	25
--	-----------

3.1 Rôle général des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide rétinoïque	26
3.2 Oxydation du rétinol en rétinol	26
3.2.1 Les alcools déshydrogénases	26
3.2.2 Les déshydrogénases/réductases à courtes chaînes	29
3.3 Conversion du rétinol en acide rétinoïque	29
3.3.1 Les cytochromes P450	29
3.3.2 Les aldéhydes déshydrogénases	31
3.4 RALDH	33
3.4.1 Caractérisation enzymatique et clonage de la RALDH	33
3.4.2 Expression de la RALDH durant le développement et chez l'adulte	35
3.5 Comparaison de l'activité de différentes ALDHs pour le rétinol : limites inhérentes à l'étude du problème	36

DEUXIÈME PARTIE. PRÉSENTATION DU MANUSCRIT	38
INTRODUCTION MÉTHODOLOGIQUE	39
CHAPITRE 4. DIFFERENTIAL ACTIVITIES OF RAT KIDNEY AND PHENOBARBITAL-INDUCED ALDEHYDE DEHYDROGENASES FOR RETINAL AND PROPANAL SUBSTRATES	41
4.1 Abstract	43
4.2 Introduction	44
4.3 Experimental procedures	46
4.4 Results	49
4.5 Discussion	61
4.6 References	63
CHAPITRE 5. DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES	65
BIBLIOGRAPHIE	72
ANNEXE	xv

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I	Specificity of RALDH for retinal isomers	59
TABLEAU II	Kinetic constants of RALDH and pb-ALDH for propanal substrate	60

LISTE DES FIGURES

PREMIÈRE PARTIE : Revue de la littérature

Figure 1.1	Quelques formes actives de la vitamine A	52
Figure 1.2	Métabolisme de la vitamine A	10
Figure 2.1	Schéma illustrant la structure d'un RAR	19
Figure 3.1	Enzymes impliquées dans la synthèse de l'acide rétinoïque	27
Figure 3.2	Trois isomères du rétinol	34

DEUXIÈME PARTIE : Présentation du manuscrit

Figure 1	RALDH and pb-ALDH are expressed to similar levels	52
Figure 2A/B	RALDH, but not pb-ALDH, catalyzes retinal conversion	53
Figure 3	Specificity of recombinant RALDH for retinal isomers	55
Figure 4A/B	Recombinant pb-ALDH catalyzes propanal conversion with higher efficiency than RALDH	56
Figure 5A/B	Mutation of Cys 301 to Ile does not alter RALDH enzymatic properties	58

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADH	Alcool déshydrogénase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AF	Région de l'ADN ayant une fonction d'activation de la transcription
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
ALDH 1	ALDH provenant de l'humain
ARAT	Acyl-CoA: rétinol acyl transférase
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CRABPI	Protéine cellulaire de type I liant l'acide rétinoïque
CRABPII	Protéine cellulaire de type II liant l'acide rétinoïque
CRALBP	Protéine cellulaire impliquée dans le processus de la vision
CRBPI	Protéine cellulaire de type I liant le rétinol
CRBPII	Protéine cellulaire de type II liant le rétinol
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DR	Répétition directe d'une séquence sur l'ADN
ER	Ester de rétinol
FCM	Fantômes de chylomycron
hALDH-1	Enzyme cytosolique du foie humain
hCRBP-I	CRBP (Protéine cellulaire liant le rétinol) humain de type I
HDAC-1	Histone désacétylase, co-répresseur de la transcription
Holo-RBP	Protéine RBP liée au rétinol
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HRE	Élément de réponse aux hormones
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LBD	Domaine de liaison du ligand
LRAT	Lécithine: rétinol acyl transférase
mADH-2	Enzyme cytosolique de souris
mRALDH	RALDH mutante

NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NcoR	Récepteur nucléaire, co-répresseur de la transcription
P	Développement postnatal
P450 1A1/1A2	Enzymes du foie faisant partie de la famille P450
P450CYP2J4	Enzyme intestinale faisant partie de la famille P450
P450 Cyp 26 et RAI	Enzyme de la famille P450 jouant un rôle clé dans la régulation des rétinoïdes
pb-ALDH	Aldéhyde déshydrogénase induite par le phénobarbital dans le foie de rat
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PML	Leucémie aigüe à promyélocytes
PPAR	Récepteur nucléaire dont l'activation induit la prolifération des peroxyosomes
PUG(G/T)TCA	Motif consensus reconnu par les RARs et les RXRs
RA	Acide rétinoïque
RALDH	Rétinal déshydrogénase du rein de rat
RAR	Récepteur nucléaire de l'acide rétinoïque
RARE	Élément de réponse de promoteurs répondant à l'acide rétinoïque
RBP	Protéine plasmatique liant le rétinol
RODH	Rétinol déshydrogénase
RXR	Récepteur nucléaire X des rétinoïdes, son ligand spécifique est l'acide rétinoïque <i>9-cis</i>
SDR	Déshydrogénases/réductases à courtes chaînes
SMRT	Co-répresseur de la transcription, au niveau des récepteurs aux rétinoïdes et aux hormones thyroïdiennes
TTR	Transthyrétine
VDR	Récepteur nucléaire de la vitamine D
Vmax	Vitesse maximale théorique d'une réaction enzymatique à saturation de substrat
wRALDH	RALDH sauvage

Acides aminés

A	Ala	Alanine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

Acides nucléiques

A	Adénine
T	Thymine
G	Guanine
C	Cytosine

REMERCIEMENTS

Les travaux de recherche ayant mené à l'écriture de ce mémoire ont été réalisés dans le laboratoire de Nutrition et Cancer, de l'Hôtel-Dieu du CHUM. Les responsables de ce projet étaient les Docteurs Pangala V. Bhat et Sylvie Mader.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude au Docteur Pangala V. Bhat pour son humanité et la confiance qu'il a su me témoigner.

Mes remerciements vont ensuite au Docteur Sylvie Mader pour son expertise en biologie moléculaire et son aide précieuse à maintes reprises. De plus, je tiens à souligner le dévouement dont elle fait preuve.

Pour les radieux moments, merci à ceux qui ont partagé mon laboratoire, je pense à Sylvie Oble, Nina N'diaye, Mélanie Dieudé, Julie Guimond et Dominic Devost.

Un merci tout particulier à Dominic Devost, pour la richesse de ses conseils lors des moments difficiles.

Finalement, je tiens à souligner l'expertise du soutien technique assuré par le Docteur Régis Tremblay.

À maman et papa...

PREMIÈRE PARTIE. REVUE DE LA LITTERATURE

CHAPITRE 1. VITAMINE A ET RÉTINOÏDES

1.1 Découverte de la vitamine A

Les anciens égyptiens utilisaient de l'huile de foie de morue pour traiter les personnes atteintes de troubles de vision nocturne (Wolf 1996). Ils connaissaient l'importance d'un élément contenu dans le foie, qui allait plus tard être connu sous le nom de vitamine A. En 1909, une substance liposoluble a été isolée et reconnue comme essentielle à la vie. Cette substance, initialement nommée "élément liposoluble", a plus tard porté le nom de vitamine A (Drummond 1920). En 1930, il a été démontré que le pigment jaune extrait des plantes, du gras de beurre et du jaune d'œuf, était en fait le carotène, c'est-à-dire la pro-vitamine ou le précurseur de la vitamine A (rétinol) (Wolf 1996). Un peu plus tard, l'isolation et la détermination de la structure chimique du rétinol ont été réalisées, à partir du β -carotène dans le mucus intestinal des animaux et des humains (Beverly 1982). En 1968, certaines des fonctions et des mécanismes moléculaires de la vitamine A dans le processus de la vision ont été élucidés (Wolf 1996).

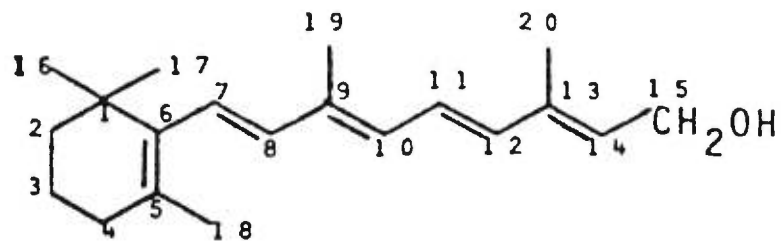
Le premier article traitant de l'importance de la vitamine A pendant la croissance fut publié en 1913 (Sommer 1989). Plus tard, il a été observé qu'une déficience en vitamine A conduit à des changements métaplasiques au sein des tissus épithéliaux de divers organes, dont les voies respiratoires et les glandes salivaires. Une corrélation directe avait été établie entre les rétinoïdes et le cancer lorsqu'en 1926, l'apparition de carcinomes a été observée dans l'estomac de rats déficients en vitamine A (Pawson 1982). Quelques années plus tard, on montrait également que l'insuffisance en vitamine A chez la mère, durant la grossesse, résultait en la mort du fœtus ou en des malformations congénitales (Mason 1935).

Le rôle de la vitamine A en tant que puissant agent de différenciation a été élucidé suite à des études faites sur des rats qui en étaient déficients. L'importance de cette vitamine fut reconnue grâce, entre autres, à ses effets sur la croissance et la différenciation des cellules épithéliales, la vision et la reproduction (Wolf 1996).

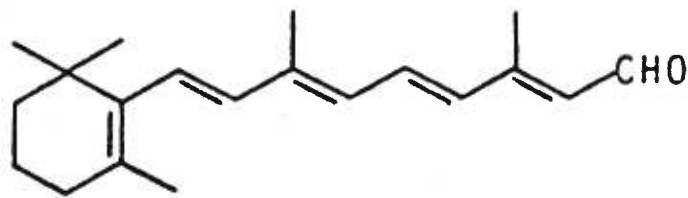
Dans le cadre d'études faites sur le métabolisme de la vitamine A, l'importance des protéines de transport dans le plasma a été montrée, sans oublier celle des protéines de liaison intracellulaires (Wolf 1996). Toutefois, c'est la découverte, en 1987, des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (RARs et RXRs pour "retinoic acid receptors" et "retinoic X receptors") (Wolf 1996), qui a permis de caractériser les mécanismes moléculaires d'action des rétinoïdes (Semba 1998).

Le terme de vitamine A comprend tous les composés naturels ou synthétiques possédant certaines des activités biologiques du rétinol ou de l'acide rétinoïque. Les formes actives de la vitamine A, appelées aussi rétinoïdes, sont le rétinol, les esters de rétinol (ER), le rétinol et l'acide rétinoïque (figure 1.1, p.5). Les caroténoïdes sont synthétisés à partir de plantes et de microorganismes. Parmi les 600 caroténoïdes présents dans la nature, seulement 10% sont convertis en vitamine A. Le β -carotène est le caroténoïde ayant la plus grande activité de provitamine A (Parker 1989). Par ailleurs, chez les animaux supérieurs, les rétinoïdes proviennent de l'alimentation et ne peuvent être synthétisés *de novo* (Collins 1999). Les rétinoïdes proviennent de deux sources, la première est d'origine végétale et comprend les caroténoïdes ou la provitamine A, la deuxième est d'origine animale et inclut le rétinol et les ER (la moitié de l'apport en vitamine A chez l'homme dérive du rétinol et des ER, alors que le reste est fourni par les caroténoïdes). Il existe plusieurs isomères des rétinoïdes (*tout-trans*, *9-cis*, *11-cis*, *13-cis*, *9,13-di-cis*, *11,13-di-cis*, *4-didehydro*, *4-oxo*), chacun ayant des rôles différents.

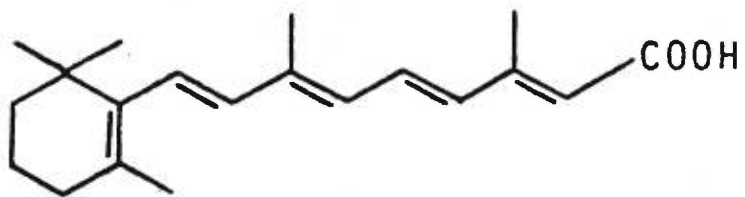
De façon globale, les rétinoïdes sont impliqués dans la vision, la différenciation et la prolifération cellulaires, la croissance, la reproduction et l'intégrité du système immunitaire. Toutefois, un rétinoïde seul peut avoir une ou plusieurs activités biologiques du rétinol. Le rétinol a un effet sur la vision et la reproduction. Par contre, l'acide rétinoïque influence la croissance et la différenciation cellulaires, mais n'a aucun effet sur le processus de la vision. En



Rétinol



Rétinal



Acide rétinoïque

Figure 1.1 Quelques formes actives de la vitamine A (Pawson 1982)

effet, le processus de la vision fait intervenir un chromophore, le stéréoisomère rétinol *11-cis*. Entre autres, l'acide rétinoïque participe à la régulation de l'activité de gènes spécifiques, et à la prévention de certains cancers chez les animaux (Moon 1984).

La principale voie d'activation de la vitamine A conduit à la formation de l'acide rétinoïque. Celui-ci provient de deux réactions d'oxydation. Dans l'une, on assiste à l'oxydation du rétinol en rétinol, laquelle est une activité réversible. Elle fait intervenir une rétinol déshydrogénase cytosolique (RODH) du type alcool déshydrogénase (ADH). Dans l'autre, on assiste à l'oxydation du rétinol en acide rétinoïque, laquelle est une réaction irréversible. L'une des enzymes responsables de cette transformation est une ALDH. Comme la dernière étape est irréversible, cela explique pourquoi l'acide rétinoïque n'intervient pas dans le processus de la vision. Plusieurs isomères de l'acide rétinoïque, les formes *tout-trans*, *9-cis*, *4-didehydro* et *4-oxo* (Blumberg 1996) vont lier et activer les RARs et RXRs au niveau des tissus cibles. L'action des rétinoïdes au noyau et, entre autres, leurs effets sur la différenciation cellulaire, allait attirer l'attention des chercheurs sur l'utilisation thérapeutique des rétinoïdes dans le traitement de certaines maladies comme le cancer.

1.2 Vitamine A et cancer

Les rétinoïdes peuvent agir comme agents anticancéreux en induisant la différenciation cellulaire, l'arrêt du cycle cellulaire ou encore l'induction de l'apoptose. Dans plusieurs lignées cellulaires, il a été démontré que la croissance des cellules peut être inhibée par l'acide rétinoïque et dans certains cas, cela est accompagné d'une induction de la différenciation cellulaire (Van der Saag 1996). Dans les lignées cellulaires provenant de carcinomes rénaux et pulmonaires, une réduction de l'expression de RAR β a été observée (Van der Saag 1996). L'expression de ce récepteur RAR β est aussi associée à l'inhibition de la kératinisation, au niveau de carcinomes retrouvés chez les patients atteints de

cancer de la tête et du cou (Zou 1999). Dans le cas d'un carcinome hépatocellulaire, il y a expression d'un RAR β tronqué qui a un potentiel oncogénique (de Thé 1996). L'altération de l'expression de certains RARs ou RXRs pourrait jouer un rôle dans la carcinogenèse des poumons (Lotan 1999, Picard 1999). De même, l'expression de RAR β est requise pour l'inhibition de la croissance des cellules provenant de carcinomes du colon chez l'humain (Nicke 1999). Le niveau d'expression de RAR β joue un rôle important dans différents types de carcinomes humains.

L'exemple le plus frappant d'implication d'un récepteur des rétinoïdes dans un cancer, est celui de la leucémie aiguë promyélocytaire (PML). Une rémission peut être obtenue par un traitement à l'acide rétinoïque *tout-trans* qui induit la différenciation cellulaire (Castaigne 1990). Cette pathologie est associée à des translocations chromosomiques impliquant le gène RAR α (de Thé 1996). Une translocation des gènes PML et RAR α conduit à l'obtention de transcrits provenant de la fusion des deux gènes. Les deux transcrits sont PML/RAR α et RAR α /PML (de Thé 1996). Les produits qui en découlent pourraient avoir un potentiel transformant, par leurs propriétés de transactivation sur les éléments de réponse aux RARs, par des effets indirects sur la transcription ou par l'altération de la localisation du gène PML. Ainsi, un blocage de la maturation myéloïde (Jeanteur 1998) s'explique par le fait qu'en absence d'acide rétinoïque, il y a recrutement de co-répresseurs à activité histone désacétylase. En présence d'acide rétinoïque, les co-activateurs et les histones acétyltransférases déplacent les co-répresseurs. On assiste alors à une induction des gènes de différenciation (Jeanteur 1998). Par ailleurs, l'interaction avec les RXRs résulte en un complexe PML/RAR α /RXR, lequel risque d'occuper l'ADN cible de façon à inhiber ou à activer constitutivement les gènes cibles. Dans ce cas, les RXRs ne sont plus disponibles pour hétérodimériser avec les autres récepteurs, ce qui risque de bloquer la fonction de ces derniers. Ce blocage est réversible, par l'administration d'acide rétinoïque, qui semble libérer le RXR du complexe (de Thé 1996).

De façon plus large, la vitamine A et les rétinoïdes ont des effets sur une panoplie de phénomènes physiologiques. L'acide rétinoïque exerce un effet sur les tissus adipeux bruns, où il active la transcription d'un gène responsable de la thermogénèse des lipides (Villaroya 1999). La vitamine A et les rétinoïdes jouent un rôle important dans la régulation de la fonction immunitaire. Des études, entre autres chez l'adulte, montrent qu'une carence en vitamine A induit des changements au niveau de la kératine de l'épiderme et affecte la fonction des neutrophiles, celle des monocytes, des macrophages, des lymphocytes T et B et celle de bien d'autres systèmes de défense de l'organisme (Semba 1998). Plusieurs gènes de la schizophrénie sont régulés par l'acide rétinoïque (Goodman 1998). Les propriétés des rétinoïdes peuvent aussi être modulées par d'autres voies de signalisation. Par exemple, les interférons pourraient moduler la voie des rétinoïdes en augmentant l'expression des récepteurs nucléaires. Les interférons sont des cytokines possédant des activités antivirales, antiprolifératives et pouvant promouvoir la différenciation cellulaire (Evans 1999). Tout cela montre à quel point la vitamine A et ses métabolites sont à la croisée des chemins d'un réseau complexe de voies de signalisation. Le portrait global de ce phénomène ne constitue qu'une ébauche de ce qu'il reste à découvrir. Avant tout, il est nécessaire de comprendre comment le corps métabolise la vitamine A, et c'est ce que nous allons voir dans les prochaines lignes.

1.3 Apport nutritionnel et stockage des rétinoïdes

1.3.1 Absorption des rétinoïdes

Tous les rétinoïdes présents dans le corps proviennent de la diète. Ils sont ensuite acheminés sous forme d'ER vers le foie, où ils sont mis en réserve. Il reste maintenant à savoir comment ces métabolites sont absorbés.

Les rétinoïdes d'origine végétale (β carotène) sont absorbés directement par le duodénum. Ils doivent ensuite être transformés en rétinol, puis rétinol. Les rétinoïdes d'origine animale (ER) doivent tout d'abord être hydrolysés en rétinol

par une lipase pancréatique avant d'être absorbés (Collins 1999). Le rétinol (synthétisé à partir du β -carotène ou nouvellement absorbé) est donc estérifié par l'ajout de longues chaînes d'acyl-CoA, dans les entérocytes. Ces ER sont ensuite transportés par les chylomicrons, à travers le système lymphatique, avant d'atteindre la circulation générale. Alors que les chylomicrons voyagent dans le réseau capillaire, ils subissent un série d'hydrolyses par l'action d'une lipoprotéine lipase se trouvant au niveau des cellules endothéliales. Ces réactions conduisent à la formation de fantômes de chylomicrons (FCM), qui seront retirés de la circulation lors de l'absorption des ER par le foie. Les FCMs se trouvent dans les vaisseaux capillaires, et ont pour rôle de transporter les ER vers le foie (figure 1.2, p.10). À cet endroit, les ER sont ensuite rapidement métabolisés en rétinol (Green 1987). Nous verrons en détail le rôle de l'intestin et du foie dans le métabolisme des rétinoïdes.

1.3.2 Estérification du rétinol dans l'intestin

Notons que l'apport des ER au foie a lieu suite à une estérification du rétinol dans les entérocytes. La formation des ER est catalysée par l'enzyme lécithine-rétinol acyl transférase (LRAT) (Hendriks 1996). Elle utilise la phosphatidyl choline comme source de groupes Acyl (Macdonald 1988). La protéine cellulaire "cellular retinol binding protein" (CRBP-II) intervient dans la formation des ER à partir du rétinol provenant du β -carotène, mais aussi à partir du rétinol provenant directement des entérocytes. L'activité de la LRAT est modulée par une compétition avec la CRBP libre et aussi par des changements enzymatiques ayant lieu lors d'une carence en vitamine A (Ross 1993). L'estérification du rétinol peut aussi être catalysée par l'enzyme acyl-CoA-rétinol acyltransférase (ARAT) (Helgerud 1982, 1983). Néanmoins, seule la LRAT peut estérifier le rétinol lié aux CRBPI/II. La CRBP agit sur l'accumulation et l'estérification du rétinol intracellulaire. La CRBP se trouve en excès dans la cellule. Elle assure un maximum de liaison des rétinoïdes.

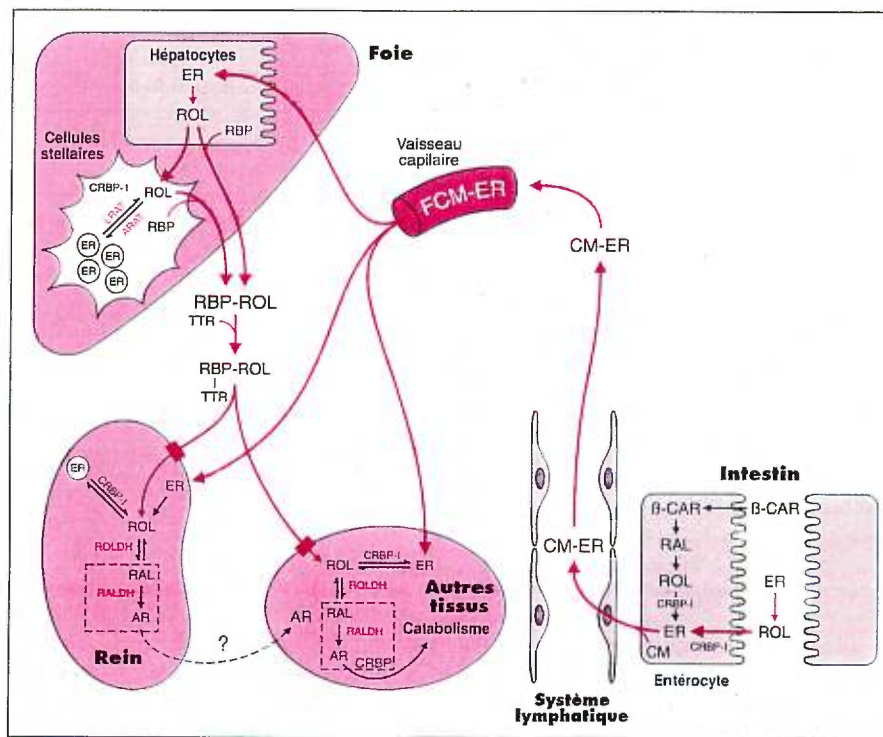


Figure 1.2 Métabolisme de la vitamine A (Labrecque 1997)

1.3.3 Stockage des rétinoïdes au niveau du foie

Le foie a toujours été l'organe principal de mise en réserve et de mobilisation des rétinoïdes. Environ 80% du rétinol et des ER sont stockés dans le foie des vertébrés (Collins 1999). Les hépatocytes servent à capter les rétinoïdes amenés par les FCM. Le rétinol est transféré aux cellules stellaires et est métabolisé ou réestérifié pour sa mise en réserve sous forme de gouttelettes lipidiques. Comme dans les entérocytes, l'estérification du rétinol se fait par l'enzyme LRAT ou ARAT, toutes deux présentes dans les cellules stellaires. Hormis l'estérification du rétinol, celui-ci peut aussi se lier à la protéine "retinol binding protein" (RBP) avant son transport dans la circulation vers les différents tissus, dont les reins (figure 1.2).

Les ER sont hydrolysés par une enzyme, la rétinol-ester hydrolase, située dans les microsomes (Hendriks 1996). Celle-ci stimule la formation du CRBP-rétinol. La CRBP libre se lie au rétinol et a pour rôle de mobiliser les ER pour augmenter l'apport du rétinol aux tissus. En grande quantité, la CRBP libre est un indice de carence en vitamine A (rétinol). Par ailleurs, après le passage des rétinoïdes au niveau du foie, leur acheminement vers les tissus fait intervenir plusieurs protéines impliquées dans le transport et l'utilisation des rétinoïdes.

**CHAPITRE 2. PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LE
TRANSPORT ET L'UTILISATION DES RÉTINOÏDES**

2.1 Protéines plasmatiques de transport du rétinol

Le rétinol se lie à des protéines dans les fluides extracellulaires et à l'intérieur des cellules, comme nous le verrons plus tard. La liaison du rétinol à la protéine RBP est nécessaire pour plusieurs raisons. Premièrement, le rétinol est hydrophobe et il ne peut donc voyager seul. Deuxièmement, les rétinoïdes sont toxiques pour l'organisme. En effet, le rétinol libre a des propriétés de lyse membranaire. Troisièmement, sa liaison à la RBP prévient les dégradations chimique et enzymatique (Collins 1999).

La RBP a un poids moléculaire de 21 kDa et sa structure se résume en une longue chaîne polypeptidique contenant un site de liaison pour le rétinol (Collins 1999). Notons que la RBP se lie spécifiquement au rétinol *tout-trans* (Naylor 1999). C'est essentiellement cette forme complexée (holo-RBP) qui est présente dans le plasma. La RBP est synthétisée principalement par le foie. Les autres sites connus de synthèse sont les reins, les cellules interstitielles des testicules et l'épithélium pigmentaire de la rétine. La RBP a pour rôle de transporter le rétinol vers les sites extra-hépatiques où l'action de la vitamine A est nécessaire. Le complexe holo-RBP se lie à la transthyréline (TTR), totalisant un poids moléculaire de 80 kDa. La formation du complexe RBP-TTR prévient la filtration glomérulaire et le catabolisme de RBP par les reins. De plus, des expériences faites sur des rats déficients en TTR montrent que cette molécule pourrait être impliquée dans la sécrétion de la RBP (Wei 1995). Des expériences montrent qu'il existe des récepteurs spécifiques aux RBPs à la surface des cellules, permettant la libération du rétinol par le complexe holo-RBP au niveau de ces cellules (Goodman 1982).

Des études *in vivo* et *in vitro* (Green 1987) montrent que la majorité du rétinol plasmatique est recyclée de 7 à 13 fois. Ainsi, le rétinol est absorbé, réestérifié et sécrété de nouveau, plusieurs fois, avant son utilisation finale. La synthèse constante de RBP et sa sécrétion sous forme de RBP-rétinol maintient un niveau constant de rétinol sanguin (1.5-3.0 $\mu\text{mol/L}$ chez l'humain adulte). Cela est possible tant que la réserve d'ER demeure disponible (Wolf 1999).

Une étude récente chez l'humain montre que des mutations au niveau du gène de RBP n'affecte que la vision nocturne, sans perturber tout autre phénomène physiologique (Wolf 1999). Des conclusions similaires ont été tirées à partir d'études faites chez le rat dont le même gène avait été muté (Quadro 1999). Plus précisément, dans des conditions d'insuffisance en vitamine A, la RBP est nécessaire au maintien de la vision normale chez les jeunes animaux, et à la mobilisation du rétinol. Toutefois, dans des conditions nutritionnelles normales, la RBP n'est pas nécessaire à l'acheminement du rétinol vers les tissus (Quadro 1999). Ainsi donc, le rôle physiologique de RBP serait d'assurer, lors de l'insuffisance en vitamine A, une disponibilité du rétinol pour le maintien des fonctions cellulaires normales. Ces études dévoilent donc de nouveaux horizons sur le rôle de la RBP dans la physiologie des rétinoïdes.

Hormis les RBPs, plusieurs autres protéines sont responsables de protéger les métabolites, de les rendre solubles dans les fluides corporels, de les rendre non-toxiques et finalement, d'assurer leur transport d'un organe à l'autre ou au sein même de la cellule, vers le site d'action (Wolf 1990). C'est ainsi que dans le processus de formation de l'acide rétinoïque et de son utilisation, interviennent deux classes de protéines cellulaires se liant aux rétinoïdes. La première comprend les CRBPI/II et la deuxième, les "Cellular Retinoic Acid Binding Protein" (CRABPI/II).

2.2 Protéines cellulaires pour l'acheminement des rétinoïdes

2.2.1 Leur caractérisation

Les CRBPs et CRABPs se lient respectivement au rétinol ou rétinol *tout-trans* et à l'acide rétinoïque *tout-trans* et ce, avec une grande affinité. Elles peuvent aussi se lier à d'autres isomères mais avec une affinité moindre. Ces protéines sont hautement conservées chez tous les vertébrés, de l'embryon à l'adulte, et jouent un rôle dans la protection des rétinoïdes et leur métabolisme, ainsi que dans l'interaction de l'acide rétinoïque avec ses récepteurs spécifiques.

Au niveau de leur séquence primaire d'acides aminés, les CRBP I et II partagent 56% d'identité, alors que les deux protéines CRABP I et II partagent 72% d'identité (Li 1999). Les deux protéines, CRBP I et II se lient avec plus d'affinité au rétinol qu'au rétinol. L'acide rétinoïque peut être produit à partir du rétinol libre ou lié à CRBP. Le rapport rétinol-CRBP/rétinol libre détermine le taux de formation de l'acide rétinoïque (Hendriks 1996).

Il est connu que les protéines CRABPs (I et II) peuvent lier l'acide rétinoïque et donc probablement jouer un rôle dans ses effets physiologiques. Ces protéines contrôlent l'accès de l'acide rétinoïque à ses récepteurs nucléaires. Les protéines CRABPs I et II, tout comme les CRBPs, sont d'un petit poids moléculaire (15 kDa) et font partie de la famille des "β-clam". Leurs feuillets β-antiparallèles leur confèrent une structure comparable à une cassette, isolant le ligand hydrophobe dans le site actif, et le protégeant de son environnement cellulaire (Naploli 1995). Les protéines CRABPI et II sont très semblables chez l'humain. Cependant, CRABPI a une plus grande affinité pour l'acide rétinoïque que ne l'a CRABPII. Cela pourrait expliquer les différences de fonctions cellulaires des deux protéines. Des études de transfection montrent que les promoteurs des protéines CRBPI, CRBPII et CRABPII contiennent des éléments de réponse à l'acide rétinoïque (Delva 1999).

2.2.2 Leur expression

Les études d'expression des protéines cellulaires ont surtout été faites chez le rat et la souris. La CRBPI est exprimée dans la plupart des tissus chez l'embryon et chez l'adulte notamment au niveau du foie, des reins et des testicules. La CRBPII est exprimée dans la plupart des tissus adultes et embryonnaires, sauf le foie, le jéjunum, l'iléon, le tube neural et les bourgeons membranaires de l'embryon.

Chez l'animal adulte, la CRABPI s'exprime de façon ubiquitaire, alors que CRABPII s'exprime seulement au niveau de la peau, de l'utérus, des ovaires et du plexus choroïdien (Dong 1999). De plus, lors du développement embryonnaire, ces deux protéines sont fortement exprimées, mais leur expression spatio-temporelle est très différente. Il existe des rôles physiologiques pour chacune de ces protéines (Dong 1999). Par exemple, lors de l'embryogenèse chez la souris, CRABPI s'exprime seulement dans les cellules qui ne peuvent tolérer des niveaux élevés d'acide rétinoïque et ce, dans des conditions de développement normal. Dans ce cas, CRABPI contribue à diminuer la concentration d'acide rétinoïque libre, là où le développement normal en requiert peu. Quant à CRBPII, elle s'exprime là où les structures ne sont pas affectées par un excès d'acide rétinoïque. Chez la même espèce et aussi durant l'embryogenèse, il a été démontré que CRABP II et CRBP I sont parfois co-exprimées. Toutefois, la co-expression de CRABP I avec CRBP I est rarement observée (Ruberte 1992); cela suggère que l'expression protéique entre CRABP I et II est mutuellement exclusive (Guftafson 1993, Giguère 1994). Ces études montrent une fois de plus la différence entre CRABP I et CRABP II. Des études récentes *in vitro* et *in vivo*, montrent que CRABP II régule la transcription dans le métabolisme de l'acide rétinoïque (Delva 1999). De façon dépendante du ligand, CRABP II augmente la transactivation des récepteurs à l'acide rétinoïque.

Par ailleurs, il existe une autre protéine de liaison des rétinoïdes, la protéine au niveau de la rétine servant à lier le rétinol et le rétinol *11-cis* (CRALBP) impliquée uniquement dans le processus de la vision (Ross 1993).

2.2.3 Leurs fonctions

La plupart des ALDHs peuvent reconnaître et oxyder les rétinoïdes sous leur forme libre. Les CRBPs permettent de diminuer le taux de rétinol/rétinal libre. L'oxydation du substrat lié aux CRBPs n'est donc réservée qu'aux déshydrogénases spécifiques (cytosoliques, microsomales...) pouvant reconnaître la CRBP (Napoli

1999). La CRBP, sous sa forme libre, stimule la mobilisation du rétinol à partir des réserves d'ER. Sous sa forme complexée (CRBP-rétinol), elle présente le rétinol par transfert direct aux déshydrogénases qui leur sont spécifiques (Napoli 1991). De plus, il a été démontré que le complexe CRBP-rétinal est spécifiquement reconnu par des enzymes cytosoliques catalysant la synthèse de l'acide rétinoïque (Ottonello 1993).

La CRABPI joue un rôle au niveau de la spermatogénèse. On pense que les CRABP I et II servent à transporter et à diriger l'acide rétinoïque aux récepteurs nucléaires appropriés (Napoli 1999). Cependant, la capacité de ces protéines à pénétrer dans le noyau n'a pas encore été démontrée. Ces deux types de protéines assurent une protection de la cellule contre une concentration excessive d'acide rétinoïque (Dong 1999).

Les fonctions physiologiques des CRBPs ne sont pas encore tout à fait connues. Une étude récente montre que des souris transgéniques surexprimant le CRBP humain (hCRBPI) sont tout à fait normales. La fonction et le métabolisme du rétinol ne sont pas affectés. Toutefois, il est possible qu'un système compensatoire dans le métabolisme des rétinoïdes ait pu cacher l'effet engendré par la surexpression de CRBPI (Troen 1999). Aussi, des études ont démontré que la délétion de CRABP I et II, par recombinaison génétique, ne provoquait aucun changement métabolique important chez les rats. Cela indique que ces protéines ne sont pas essentielles au métabolisme normal des rétinoïdes. En revanche, il a été proposé que ces protéines aient comme fonction de séquestrer l'acide rétinoïque lors d'une déficience en vitamine A, afin de maintenir la signalisation induite par les rétinoïdes (Duester 1996). À ce sujet, plusieurs questions demeurent encore sans réponse. Par ailleurs, la compréhension de l'action de la vitamine A, au niveau du développement, a été grandement facilitée suite à la découverte des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque.

2.3 Récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque

2.3.1 Leur structure

Durant plusieurs années, les chercheurs supposaient que les rétinoïdes agissaient au niveau du noyau afin de contrôler la différenciation cellulaire. Cette idée demeura obscure jusqu'en 1987, l'année à laquelle les laboratoires de Chambon et d'Evans découvrirent l'existence des RARs. Les RARs sont très homologues à la famille des récepteurs des hormones stéroïdiennes/thyroïdiennes/cholécalciférol, récepteurs de la vitamine D (VDR) et récepteurs induisant la prolifération des peroxisomes (PPAR) (Ross 1993). La diversité des effets produits par les rétinoïdes s'exerce grâce à six récepteurs, divisés en deux sous-familles : les RARs α , β et γ et les RXRs α , β et γ (Chambon 1995).

Ces récepteurs sont activés lorsque liés à leur ligand. Sous forme de dimères, ils vont agir en tant que facteurs de transcription afin de contrôler l'expression de gènes cibles en se liant à des éléments de réponse. Même si ces deux familles de récepteurs, RARs et RXRs répondent spécifiquement à l'acide rétinoïque, il n'en demeure pas moins qu'elles diffèrent substantiellement l'une de l'autre, au niveau de leur spécificité de ligand (Rowe 1997). Les RARs se lient aux ligands et sont activés par les deux isomères *tout-trans* et *9-cis* de l'acide rétinoïque alors que les RXRs ne se lient qu'à l'isomère *9-cis* de la même molécule (Giguère 1994, Heyman 1992). Les RARs sont actifs sous forme d'hétérodimères RAR : RXR alors que les RXR peuvent lier l'ADN sous forme d'homodimères. La spécificité de liaison à l'ADN de ces deux complexes est différente au niveau des répétitions directes (DR1 à DR5) de motifs PUG(G/T)TCA sur l'ADN (Kurokawa 1995).

La famille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes/thyroïdiennes est caractérisée par des structures modulaires communes correspondant à plusieurs régions d'homologie (A-F) (figure 2.1, p. 19). Située en N-terminal, la région A/B est importante pour l'activation transcriptionnelle. Elle contient le domaine

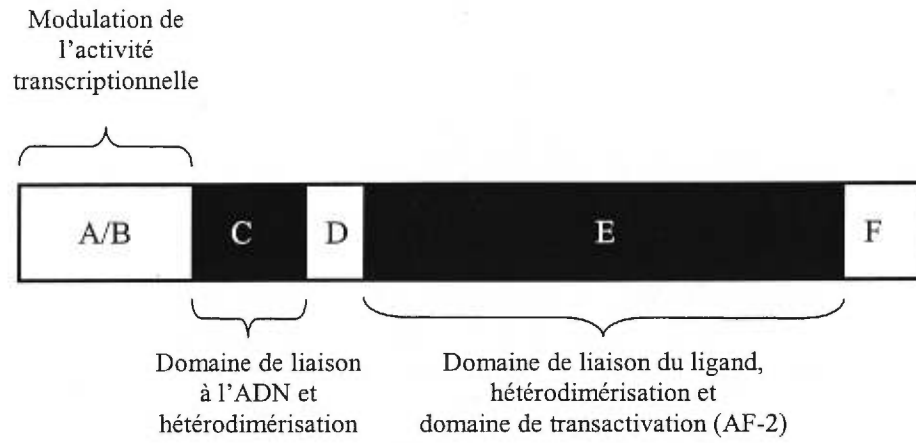


Figure 2.1 Schéma illustrant la structure d'un RAR (inspiré de Rowe 1997).

“Activation Function 1” (AF-1). Celui-ci sert à la transactivation et il est indépendant de la liaison au ligand (Van der Saag 1996). Cette région A/B diffère entre les isoformes multiples des récepteurs qui sont obtenus par l'utilisation de promoteurs différents et par épissage alternatif des premiers exons des RARs et des RXRs. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) ou région C est composé de 66 acides aminés. Il est constitué de deux doigts de zinc, impliqués dans la reconnaissance d'éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RAREs) situés dans la région promotrice de gènes spécifiques. La région C est aussi impliquée dans la formation de dimères. La région D située entre les domaines DBD et le domaine de liaison du ligand (LBD) contient un signal de translocation au noyau. La région E, constituée de 220 acides aminés (Chambon 1996), contient deux fonctions : une activité transcriptionnelle dépendante de la liaison du ligand (AF-2) et une surface de dimérisation. Cette région permet la liaison à l'hormone et affecte aussi la transactivation ou la répression transcriptionnelle. Il existe aussi une région F, dont la fonction est encore inconnue. Les récepteurs nucléaires sont des phosphoprotéines. Leur niveau de phosphorylation peut influencer leur capacité à interagir avec le ligand, avec d'autres protéines ou l'ADN (Carlberg 1996).

2.3.2 Leur localisation tissulaire

Les différents membres de chacune des familles de récepteurs sont exprimés de façon spécifique aux tissus. L'expression tissulaire des RAR α est ubiquiste chez l'adulte et l'embryon. L'expression des RAR β est beaucoup plus restreinte chez l'adulte. Ce récepteur est fortement exprimé dans les reins, les glandes surrénales, la colonne vertébrale, les muscles, la prostate, et il est plus faiblement exprimé dans plusieurs autres tissus. Les RAR γ ont une distribution tissulaire très spécifique chez l'adulte (peau et poumons). Les RAR γ joueraient un rôle lors de la morphogenèse et de la chondrogenèse. Les RXR α ont une expression restreinte chez l'adulte et l'embryon (foie, peau, reins, poumons) et les RXR β , tout comme les RAR α s'expriment de façon ubiquitaire chez l'adulte et l'embryon. La distribution tissulaire des RXR γ est très semblable à celle des

RAR β (Napoli 1996). Il est important de souligner l'importance relative de chacun de ces récepteurs, notamment dans le développement comme nous le verrons plus tard.

2.3.3 Structure de l'ADN et interaction avec les récepteurs

La liaison du complexe formé du ligand et du récepteur dimérisé à la région promotrice des gènes spécifiques peut activer leur transcription d'un facteur de 20 à 40 fois (Wolf 1990). Les RARs et RXRs sont des facteurs de transcription qui sont dépendants des ligands. La séquence de l'ADN à laquelle se lie le complexe s'appelle « élément de réponse aux hormones » (HREs) (Van der Saag 1996). Elle est située dans la région promotrice des gènes cibles. Les HREs des gènes cibles sont polymorphiques. Ils consistent en la répétition directe (DR) de la séquence PUG(G/T)TCA avec des espacements de 1 à 5 paires de base, DR1 à DR5 (Chambon 1995). Les éléments de réponse les plus retrouvés dans la nature sont DR1, DR2 et DR5. La distance entre ces motifs est très importante, afin d'assurer la spécificité de l'interaction récepteur-ADN (Carlberg 1996). Les RAREs se situent au sein des régions régulatrices de la transcription des gènes cibles (Xiao 1995). Il en résulte donc une régulation du taux de transcription des gènes.

Les récepteurs des rétinoïdes modulent l'expression de plusieurs gènes en interagissant sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères avec les éléments de réponse spécifiques. Les RARs et les RXRs se lient à l'ADN avec plus d'affinité sous forme d'hétérodimères que sous forme d'homodimères (Evans 1999). Les hétérodimères RXR/RAR se lient alors de façon plus efficace et de manière plus sélective à leurs RAREs. Cette différence est déterminée, entre autres, par l'orientation relative, l'espacement et la séquence des motifs hexamériques, lesquels sont situés au sein des RAREs (Chambon 1996). Les RXRs peuvent aussi s'associer avec les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, les VDRs, les récepteurs des PPARs et aussi plusieurs récepteurs orphelins. De plus, en présence de l'acide rétinoïque *9-cis*, il y a formation de dimères RXR-RXR. La diversité

des effets associés aux rétinoïdes dépend, entre autres, de la variété des complexes dimériques formés. En réponse à leur ligand, l'acide rétinoïque *9-cis*, les RXRs se présentent sous forme d'homodimères et transactivent le signal. Par contre, en absence de ligand, les RXRs régulent la transcription en formant des hétérodimères avec différents types d'isoformes (Holmbeck 1998).

Les propriétés transcriptionnelles des rétinoïdes sont modulées, entre autres, par la capacité des récepteurs aux rétinoïdes à s'associer à des co-activateurs ou à des co-répresseurs (Evans 1999). Par exemple, les récepteurs peuvent être régulés par le recrutement sélectif de co-activateurs et de co-répresseurs, en réponse à l'acide rétinoïque. L'hétérodimère RAR-RXR lié à l'ADN recrute des co-répresseurs transcriptionnels comme le "Nuclear receptor corepressor" (NcoR), le "Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid receptors" (SMRT) ou la "Histone Désacétylase" (HDAC-1). La liaison du ligand induit un changement de conformation du récepteur entraînant la dissociation des co-répresseurs et la liaison de co-activateurs qui déstabilisent localement la structure chromatinienne par des activités histone acétyl transférase et augmentent l'activité de la transcription (Collins 1999). Des conformations différentes du domaine de liaison du ligand sont induites par la liaison de ce dernier. L'expression de certains gènes est donc modulée positivement ou négativement, grâce à leur interaction avec les récepteurs aux rétinoïdes (Evans 1999).

2.3.4 Récepteurs nucléaires et effets physiologiques de l'acide rétinoïque

Plusieurs études faites sur le développement de la souris appuyées par des études récentes de délétion génétique montrent l'importance de chacune des isoformes de chacune des familles de récepteurs dans le développement (Van der Saag 1996). Des délétions au niveau des récepteurs RAR α , β et γ ne semblent pas affecter l'embryogenèse chez la souris. Cela suggère une redondance quant aux différentes fonctions exercées par les membres de la famille des RARs. Par

contre, une mutation du gène $RXR\alpha$ cause la mort chez ces embryons (Sucov 1995).

En général, l'activité des rétinoïdes au cours du développement est possible grâce à la formation d'hétérodimères RAR–RXR. (Collins 1999). Il a été clairement démontré que les multiples isoformes des RARs détiennent des fonctions qui se chevauchent. Ainsi, l'interaction des RARs et des RXRs avec divers médiateurs et/ou co-répresseurs, occasionne de hauts niveaux de complexité quant à la régulation des réponses, générées par l'acide rétinoïque. Des expériences de délétion génétique simple chez la souris montrent qu'il y a une redondance fonctionnelle à travers ce métabolisme (Semba 1998). Cependant, les mutants nuls de $RAR\alpha\beta2$ sont à l'origine de malformations au niveau des poumons, de l'œsophage et de la trachée, qui ne sont pas observées pour les mutants $RAR\alpha\gamma$. C'est donc dire que les $RAR\beta2$ jouent un rôle spécifique lors du développement de ces tissus (Lohnes 1995). Par ailleurs, les récepteurs $RAR\alpha$ et $RAR\beta2$ jouent un rôle déterminant dans la morphogenèse rénale (Mendelsohn 1999). Les mécanismes initiés par les RARs sont l'un des facteurs requis pour la maturation complète des chondrocytes et pour l'ossification endochondrale, lors du développement des membres (Koyama 1999). Les RARs sont impliqués aussi dans le développement oculaire, et celui des voies reproductrices et urogénitales (Collins 1999).

De plus, l'hétérodimérisation entre RXR/RAR est importante lors du développement de la souris et pour la transduction du signal des rétinoïdes. Des malformations congénitales ont été observées chez des fœtus dont les allèles étaient nuls pour l'une des isoformes de chacune des familles (Kastner 1997).

Les divers processus de développement sont initiés par les métabolites actifs de la vitamine A. La diversité de combinaison des récepteurs, ainsi que les différents ligands contribuent à assurer, dans un cadre spatio-temporel, l'activation adéquate de gènes spécifiques. Mais encore, faut-il qu'il y ait une régulation fine

du métabolisme des rétinoïdes, lesquels sont essentiels au développement de l'embryon. Pour ce faire, plusieurs enzymes interviennent dans le métabolisme, afin de générer l'acide rétinoïque nécessaire à l'activation des récepteurs spécifiques.

**CHAPITRE 3. ENZYMES IMPLIQUÉES DANS LE
MÉTABOLISME DE LA VITAMINE A : RÔLE DE LA RALDH**

3.1 Rôle général des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide rétinoïque

Une grande part des effets de la vitamine A (rétinol) est induite par l'acide rétinoïque. Cette molécule signalisatrice, en interagissant avec ses récepteurs, module plusieurs phénomènes physiologiques. Toutefois, la littérature ne rassemble que très peu de données quant à la transformation du rétinol en son acide correspondant. Il est connu que chez les vertébrés, l'acide rétinoïque s'y trouve distribué de façon spécifique dans le temps et l'espace au cours du développement. Sa présence à un moment inopportun et dans un locus inapproprié peut être tératogénique (Duester 1996). Il existe un mécanisme de régulation des niveaux d'acide rétinoïque. Les enzymes qui oxydent le rétinol et le rétinol sont responsables de ce phénomène. On compte quatre familles d'enzymes (figure 3.1, p.27), pouvant oxyder le rétinol et le rétinol : 1) les ADHs 2) les déshydrogénases/réductases à courtes chaînes (SDRs) 3) les cytochromes P450 4) les ALDHs. Les deux premières sont responsables de l'interconversion du rétinol en rétinol et les deux autres, de l'oxydation du rétinol en acide rétinoïque.

3.2 Oxydation du rétinol en rétinol

3.2.1 Les alcools déshydrogénases

L'oxydation du rétinol en rétinol, un intermédiaire inactif, est catalysée par les ADHs, des enzymes cytosoliques. Ces enzymes catalysent l'oxydation réversible des alcools en aldéhydes. En particulier, il a été montré que les enzymes des classes I, II et IV peuvent catalyser l'oxydation du rétinol. Seules les classes I et IV sont conservées chez tous les mammifères. Les ADHs sont actifs en présence des isomères *tout-trans*, *9-cis* et *13-cis* du rétinol (Duester 1996).

Chez les vertébrés, cinq classes d'enzymes ont été identifiées chez l'humain et trois chez la souris. Chez la souris, ces enzymes s'expriment dans les tissus qui nécessitent l'acide rétinoïque pour se différencier. Par exemple, l'expression des ADHs de la classe IV est détectée lors du développement embryonnaire de la souris

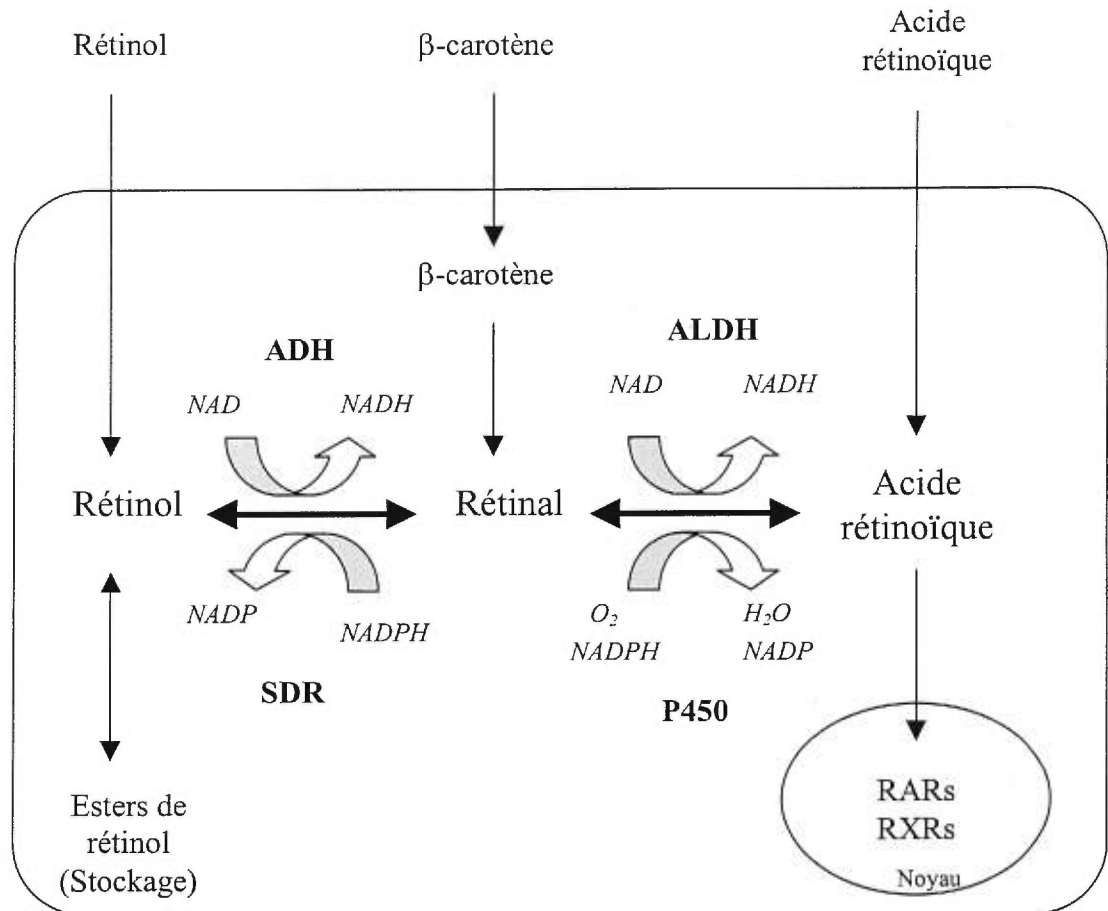


Figure 3.1. Enzymes impliquées dans la synthèse de l'acide rétinoïque (inspiré de Duester 1996a).

au niveau des sites de détection de l'acide rétinoïque. Des recherches faites au niveau de l'épiderme, des testicules et de l'appareil génito-urinaire aboutissent aux mêmes conclusions (Duester 1999). Par ailleurs, l'acide rétinoïque peut aussi agir en tant qu'hormone, puisque son apport aux tissus peut se faire via la circulation sanguine.

Au début de l'embryogenèse chez la souris, seuls les ADHs de la classe IV sont impliqués. Ceux de la première classe sont exprimés très tardivement, quoique les deux classes soient nécessaires à la synthèse de l'acide rétinoïque. Cela est primordial pour l'établissement et le maintien de l'épithélium spécialisé, en phase tardive du développement embryonnaire et à l'âge adulte. Récemment, il a été démontré que les ADHs des classes I et IV sont exprimés lors du développement des glandes surrénales. Cela corrèle avec les données montrant un taux élevé d'acide rétinoïque dans les mêmes organes embryonnaires. Toujours chez la souris, les ADHs de ces mêmes classes jouent un rôle dans la spermatogenèse. Ces enzymes sont retrouvées dans les testicules et l'épididyme et participent à la synthèse locale de l'acide rétinoïque (Deltour 1997). Donc, les rôles des enzymes de classe I et IV se chevauchent et se complètent au cours du développement et chez l'adulte.

Le rétinol étant fourni aux tissus périphériques par la circulation sanguine, l'expression des ADHs dans un tissu donné, avec celle des ALDHs (voir ci-dessous) permet une synthèse locale d'acide rétinoïque lors du développement embryonnaire, de manière contrôlée dans le temps et l'espace (Haselbeck 1998). Les tissus au sein desquels il y a production d'acide rétinoïque à partir du rétinol sont les testicules, les poumons, le foie, les reins, les surrénales et la peau (Napoli 1995). On peut noter que les ADHs sont actifs en présence des isomères *trans*, *9-cis* et *13-cis* du rétinol, permettant la synthèse des isomères correspondants du rétinol.

3.2.2 Les déshydrogénases/réductases à courtes chaînes

Une autre famille d'enzymes, tout comme les ADHs, peut oxyder le rétinol en rétinol ou réduire le rétinol en rétinol. Elle regroupe les SDRs. Ces enzymes sont microsomales, contrairement aux ADHs qui sont cytosoliques (Duester 1996).

La famille des SDRs regroupe environ 57 protéines dont l'identité de séquence entre les différents membres n'est que de l'ordre de 15 à 30%. Cela montre une grande divergence entre les différentes enzymes. Il a été démontré que les trois isoenzymes RODH 1, 2 et 3, provenant du foie de rat, peuvent catalyser la conversion du rétinol *tout-trans* en son rétinol correspondant (Chai 1995a, b, 1996). Par contre, d'autres enzymes de cette famille catalysent l'oxydation du rétinol *9-cis*. En effet, chez l'humain, le RODH *9-cis* catalyse, de façon stéréospécifique, l'oxydation du rétinol *9-cis* en rétinol *9-cis*. L'ARNm correspondant est très abondant dans les reins et les testicules. En outre, il s'exprime faiblement dans le foie, les glandes surrénales, les poumons, le pancréas et les muscles squelettiques (Mertz 1997). Il a été démontré que chez l'embryon de souris, au niveau du système nerveux central, des enzymes peuvent oxyder le même substrat (Romert 1998). De plus, chez le rat, une source de rétinol *9-cis* au niveau du rein a déjà été observée (Labrecque 1993). Les ADHs et SDRs oxydent le rétinol *in vitro*. Cependant, leur rôle *in vivo* dans l'oxydation du rétinol n'a pas encore été démontré.

3.3 Conversion du rétinol en acide rétinoïque

3.3.1 Les cytochromes P 450

Les enzymes faisant partie de la famille P450 oxydent le rétinol en acide rétinoïque. Les enzymes du foie P450 1A1 et 1A2 sont microsomales et peuvent oxyder le rétinol en acide rétinoïque (Duester 1996). P450 1A1 est la forme la plus active des deux pour la conversion des formes *tout-trans*, *9-cis* et *13-cis* du rétinol en leurs acides correspondants (Raner 1996). L'expression du gène de P450 1A1 a été observée chez l'embryon de souris dès le septième jour de gestation (Kimura

1987). Ce gène pourrait jouer un rôle lors du début de la synthèse de l'acide rétinoïque durant l'embryogenèse. Il a été démontré que l'oxydation du rétinol en acide rétinoïque dans le petit intestin de rat est induite en partie par P450 CYP 2J4 qui oxyde les formes *9-cis* et *tout-trans* du rétinol. Des études cinétiques sur la formation de l'acide rétinoïque au sein de microsomes intestinaux de rat, ainsi que l'inhibition de la synthèse de l'acide rétinoïque par l'anticorps anti-CYP 2J4, révèlent que CYP 2J4 pourrait être impliquée dans le maintien de l'homéostasie des rétinoïdes *in vivo* (Zhang 1998).

Par ailleurs, une nouvelle famille d'enzymes a été identifiée. Il s'agit d'une nouvelle classe de cytochromes P450, faisant partie de la famille CYP26 (Abu-Abed 1998). L'enzyme P450RAI identifiée chez le poisson et chez l'humain serait responsable de la formation des formes hydroxylées d'acide rétinoïque. Or, ces formes hydroxylées contribueraient à initier un processus de dégradation de l'acide rétinoïque vers son élimination éventuelle (White 1996, 1997). Cette enzyme jouerait donc un rôle clé dans la régulation des rétinoïdes. De plus, chez la souris, l'expression de cette enzyme n'est pas uniforme. Son patron d'expression dépend de la région et du stade de développement de l'animal (Fujii 1997). Des expériences utilisant des cellules F9 montrent que l'expression du gène P450RAI est induite par certains récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (Abu-Abed 1998).

Hormis les P450s, il existe d'autres familles d'enzymes telles les aldéhydes oxydases qui peuvent convertir le rétinol. L'importance relative de ces enzymes pour la synthèse de l'acide rétinoïque n'a pas été mesurée. Ainsi, au moins deux familles d'enzymes, les P450s et les ALDHs, sont impliquées dans l'oxydation irréversible des isomères du rétinol en acide rétinoïque.

3.3.2 Les aldéhydes déshydrogénases

Les ALDHs représentent un groupe d'enzymes dépendantes du NAD(P)⁺. Leurs structures sont similaires et elles peuvent oxyder une grande variété d'aldéhydes. Ces enzymes se divisent en trois classes I, II et III. Celles faisant partie des deux premières sont des tétramères, tandis que celles faisant partie de la classe III sont des dimères (Perozich 1999). Les aldéhydes de la classe I oxydent plusieurs substrats dont le rétinol, qui est converti en acide rétinoïque dans une réaction irréversible. Elles peuvent catalyser l'oxydation des deux formes (*9-cis* et *tout-trans*) du rétinol en leurs acides correspondants (Labrecque 1997). La classe III ne partage que très peu de similitude de séquence d'acides aminés avec les deux premières, soit environ de 25%, comparativement à 60-70% entre les deux premières. Les aldéhydes de la classe I se retrouvent surtout dans le foie des vertébrés supérieurs, incluant le cheval, le bœuf, le mouton et l'humain. Les enzymes de la classe III sont exprimées dans plusieurs tissus de mammifères, plus précisément ceux de la cornée, l'estomac, les poumons et les conduits urinaires (Moore 1999). Les ALDHs de la classe I sont cytosoliques, constitutives ou inductibles, comme par exemple par le phénobarbital (pb-ALDH). Celles de la classe II sont mitochondriales et constitutives, alors que celles de la classe III sont cytosoliques ou microsomales et constitutives (Kathmann 1997).

De ces classes, nous nous intéressons plus particulièrement à la classe I, car les enzymes y faisant partie ont une grande activité oxydative en présence du rétinol, comparativement aux deux autres, qui n'en ont pratiquement pas. La masse moléculaire de ces enzymes est de 55 kDa, laquelle est similaire chez la plupart des aldéhydes déshydrogénases. Chez la souris, il existe 13 isoenzymes qui diffèrent entre elles par leur distribution subcellulaire, leur préférence pour certains substrats et leur sensibilité à des inhibiteurs spécifiques.

Les enzymes de la classe I sont constitutives ou inductibles. Elles comprennent entre autres l'enzyme cytosolique de souris, mADH-2 (Rongnoporut 1991). Celle-ci est présente dans plusieurs tissus dont le foie, les poumons et les

testicules mais est absente du rein, de l'estomac, des ovaires, du cœur et du cerveau (Rout 1985). L'enzyme cytosolique provenant du foie humain, hALDH-1, est probablement l'analogue de mADH-2. L'identité de leurs séquences est de l'ordre de 87% (Rongnoparut 1991). La hALDH-1 se situe aussi au niveau du cerveau et des globules rouges (Yoshida 1998). En tout, 12 ALDHs ont été identifiées chez l'humain et elles sont exprimées de façon ubiquiste. Contrairement aux études faites sur mADH-2 et hALDH-1, les données rapportées sur une enzyme cytosolique et constitutive du foie de rat sont controversées (Posch 1992, Lindahl 1984, Bhat 1995). En effet, certaines études montrent qu'il existe jusqu'à cinq isoformes d'ALDHs exprimées dans la fraction cytosolique du foie de rat, alors que d'autres prouvent l'absence de ces enzymes. Quoiqu'il en soit, une ALDH cytosolique induite par le phénobarbital, pb-ALDH, a été clonée du foie de rat (Dunn 1989). Aucune ALDH inductible par le phénobarbital n'a été caractérisée chez l'humain et la souris.

Le laboratoire du Dr. Bhat a récemment cloné une enzyme du rein de rat, la RALDH (Bhat 1995) qui catalyse l'oxydation des isomères *tout-trans* et *9-cis* du rétinol en acide rétinoïque. Il est connu que l'expression de RALDH varie au cours du développement du rein de rat et cela coïncide avec le besoin d'acide rétinoïque, lors du développement embryonnaire (Bhat 1998b). La RALDH partage respectivement 89, 96 et 87% d'homologie de séquence avec les ALDHs provenant du rat (pb-ALDH), de la souris (mADH-2) et de l'humain (hALDH-1). Des études récentes montrent qu'une ALDH cytosolique est exprimée fortement dans le rein de rat et faiblement dans le foie (Kathmann 1997, Penzes 1997b). Cette enzyme ne diffère de RALDH que d'un seul acide aminé. Une incertitude demeure à ce jour en ce qui concerne l'identité possible entre ces deux enzymes. La différence d'acides aminés pourrait résulter d'artéfacts de clonage générés par la reverse transcriptase. Une autre enzyme, RALDH-2 (Zhao 1996, Wang 1996, Niederreither 1997), exprimée dans l'embryon de souris, peut aussi générer l'acide rétinoïque.

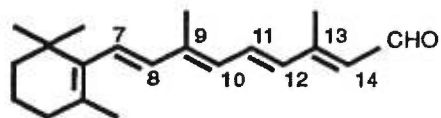
3.4 RALDH

3.4.1 Caractérisation enzymatique et clonage de la RALDH

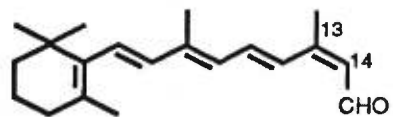
Il y a plusieurs années, une ALDH provenant du rein de rat a été purifiée et caractérisée (Labrecque 1993). La RALDH peut oxyder les isomères *tout-trans* et *9-cis* du rétinol, mais pas sa forme *13-cis* (figure 3.2, p.34). De plus, l'enzyme est beaucoup plus active en présence du rétinol *9-cis* qu'en présence de son isomère *tout-trans*. Le précurseur de la biosynthèse du rétinol *9-cis*, le rétinol *9-cis* est présent dans le rein de rat. Des déshydrogénases catalysant la conversion du rétinol *9-cis* en rétinol *9-cis* y sont aussi présentes. Ces observations appuient l'hypothèse selon laquelle une isomérisation des rétinoïdes *9-cis* en la forme *tout-trans*, a lieu au niveau du rétinol (Labrecque 1995). L'ADN du gène de la RALDH a été cloné (Bhat 1995). La séquence d'acides aminés de cette enzyme a été comparée à celles d'autres ALDHs cytosoliques et s'avère très similaire.

L'enzyme cytosolique présente dans le foie chez l'humain (hALDH-1) peut catalyser l'oxydation des différents isomères du rétinol avec la même efficacité. Toutefois, son affinité pour le rétinol *tout-trans* équivaut à deux fois celle calculée pour les formes *9-cis* et *13-cis* du même substrat. Ainsi, malgré leur grande similitude de séquence, RALDH et hALDH-1 ont des propriétés cinétiques très distinctes. Il en ressort que les fonctions respectives de ces deux enzymes, *in vivo*, sont peut-être différentes. L'enzyme hALDH-1 jouerait donc un rôle différent de celui de RALDH dans le métabolisme du rétinol au niveau du foie. Comme cet organe est le site majeur pour le stockage et le métabolisme du rétinol, il est probable que cette enzyme participe au catabolisme de l'excès de rétinol, présent dans le foie, par l'intermédiaire de l'acide rétinoïque (Bhat 1999).

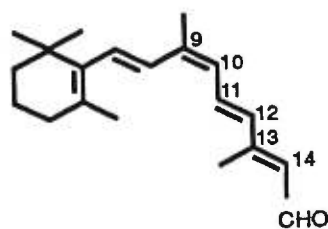
L'identité des différentes isoformes à travers les espèces est mal connue (peu des gènes ont été cartographiés à ce jour). Il est possible que le même gène ait des patrons d'expression différents d'une espèce à l'autre. Il sera intéressant dans le futur de caractériser les enzymes exprimées dans le rein d'autres espèces, tels les homologues de la RALDH.



All-trans-retinal



13-cis-retinal



9-cis-retinal

Figure 3.2 Trois isomères du rétinol (DeLuca 1978)

3.4.2 Expression de la RALDH durant le développement et chez l'adulte

Des études de "Northern blot" ont révélé que la RALDH s'exprime principalement dans le rein et faiblement dans le foie (Bhat 1995). Des expériences d'hybridation *in situ* ont montré que l'ARNm de RALDH s'exprime surtout dans le rein des rats âgés de deux jours. La RALDH a aussi été détectée dans les poumons et dans l'épithélium de plusieurs tissus (testicules, intestin, estomac, trachée) mais faiblement dans le foie (Bhat 1995). Dans les tissus rénaux, le patron de distribution de la RALDH est modifié lors du développement postnatal (P). De P0 à P6, l'hybridation se concentre dans une zone du cortex. Puis, entre P12 et P16, l'expression progresse vers les parties plus profondes du cortex et se trouve très intense dans la médulla à P42. Des études de localisation immunocytochimique de la RALDH ont été effectuées dans le rein néonatal. L'expression est détectée surtout dans la zone corticale des tubules convolutés. Chez le rat adulte, l'expression correspond aux parties proximale et distale des tubules. Ces données montrent que la RALDH joue un rôle important dans la production d'acide rétinoïque, au niveau de certaines cellules rénales du rein en développement, et chez le rat adulte (Bhat 1998b). Cette affirmation est en accord avec les résultats d'expériences faites chez des rats déficients en vitamine A. Chez ces animaux en carence vitaminique, les concentrations tissulaires d'acide rétinoïque ont été mesurées à la suite de l'administration d'une seule dose de rétinol radioactif. Il appert que parmi les différents organes étudiés, le rein avait le plus haut taux d'acide rétinoïque. Cela corrèle avec la forte expression de la RALDH dans cet organe (Bhat 1997).

Chez le rat, les transcrits de la RALDH sont aussi présents dans l'estomac et le petit intestin, lesquels tissus dépendent de l'acide rétinoïque pour la différenciation cellulaire épithéliale. L'expression de la RALDH a été détectée par « Western et Northern blots » dans ces organes durant le développement postnatal et lors d'une carence en vitamine A. Chez le rat, deux jours avant la naissance, l'expression de la RALDH était très élevée dans le petit intestin, et nulle dans l'estomac. Cependant, après la naissance, l'expression de la RALDH dans

l'estomac augmentait graduellement, jusqu'à atteindre de hauts niveaux au jour 42. Dans l'intestin, le schéma inverse était observé : l'expression de la RALDH diminuait progressivement après la naissance. Une déficience en vitamine A dans ces tissus induit une régulation à la hausse de l'expression de la RALDH, dans l'estomac et le petit intestin, durant le développement postnatal. Ainsi, la vitamine A régule l'expression du gène de la RALDH dans ces tissus (Bhat 1998a).

L'acide rétinoïque est essentiel au maintien de la différenciation mucociliaire de l'épithélium trachéal. Le manque d'acide rétinoïque conduit à la métaplasie squameuse et à la perte de la fonction mucociliaire *in vivo* et *in vitro*. Des expériences montrent que l'expression du gène de la RALDH dans la trachée est très faible, lors de la différenciation squameuse et en condition de carence en vitamine A. Par contre, en condition nutritionnelle normale et lors de la différenciation mucociliaire, l'expression de la RALDH était élevée. Après seulement quelques jours d'administration d'acide rétinoïque, on pouvait observer l'expression de la RALDH. Celle-ci corrèle avec l'expression du gène de la mucin-1 dans les cellules mucociliaires en culture. L'expression de la RALDH dépendait donc de l'état de différenciation des cellules de l'épithélium des conduits aériens (Bhat 1998c). La RALDH s'exprime dans les tissus qui dépendent de la vitamine A pour leur différenciation.

3.5 Comparaison de l'activité de différentes ALDHs pour le rétinol : limites inhérentes à l'étude du problème

Il n'y a pas de comparaisons directes réalisées entre les différentes ALDHs pour leur capacité à oxyder le rétinol et pour leur préférence pour les différentes isoformes du rétinol. Souvent, les techniques différentes utilisées pour mesurer la production d'acide rétinoïque (spectrophotométrie/HPLC) et les différents tampons ne permettent pas de comparer les résultats publiés. Il est difficile de comparer les propriétés de deux enzymes puisqu'il existe un problème d'identité entre les espèces, et au sein des différents tissus d'une même espèce. Chez le rat, une

ALDH cytosolique pouvant être induite par le phénobarbital (pb-ALDH) a été décrite dans le foie (Dunn 1989). Nous avons observé que les séquences primaires d'acides aminés de pb-ALDH et de RALDH sont similaires à 89%. Les propriétés cinétiques de pb-ALDH, concernant sa capacité à oxyder le rétinol en acide rétinoïque ne sont pas encore connues.

Ce projet vise à exprimer la RALDH et la pb-ALDH, dans *Escherichia coli*, afin de comparer les propriétés cinétiques de ces enzymes recombinantes, en présence du substrat rétinol et d'un autre aldéhyde.

DEUXIÈME PARTIE. PRÉSENTATION DU MANUSCRIT

INTRODUCTION MÉTHODOLOGIQUE

L'expression bactérienne de RALDH et de Pb-ALDH s'est faite en clonant l'ADNc respectif dans un vecteur d'expression, selon les sites de restriction NdeI et HindIII. Les transformations ont été effectuées dans la bactérie *Escherichia coli* BL21 DE3. Ces bactéries contiennent un plasmide avec le promoteur T7 qui permet la transcription du gène sous l'influence de la T7 polymérase.

Afin de déterminer les niveaux d'expression des différentes enzymes recombinantes, un immunobuvardage de type Western a été effectué, en exposant les protéines à un anticorps dirigé contre l'une des enzymes. L'anticorps pouvait reconnaître les deux enzymes mais avec des efficacités différentes malgré leur haut degré d'homologie. Grâce à l'anticorps, il était possible d'identifier le poids moléculaire mais non de comparer l'intensité des bandes. Ainsi, afin de déterminer le niveau d'expression des enzymes, les résultats obtenus ont été vérifiés par incorporation de S³⁵ méthionine. Notons que le nombre de méthionine dans les deux enzymes est respectivement de 11 pour la RALDH et de 12 pour la Pb-ALDH.

L'activité enzymatique de RALDH et de Pb-ALDH recombinantes a été testée en utilisant comme substrat les isomères *tout-trans*, *9-cis* et *13-cis* du rétinol. La réaction contenait les tampons et les co-facteurs nécessaires. Des contrôles négatifs appropriés étaient présents. L'acide rétinoïque formé a été mesuré par HPLC (High Pressure Liquid Chromatography). L'activité des enzymes recombinantes a été mesurée également en présence d'un substrat autre que le rétinol, nommé propanal. Dans ce cas, le NADH formé était mesuré par spectrophotométrie. Le NADH formé à partir du rétinol n'a pas été mesuré puisque sa détection interfère avec celle de l'acide rétinoïque produit. Lors de l'oxydation du propanal, la mesure de l'acide propanoïque n'a pas été effectuée car sa détection à 280 nm interfère avec une panoplie d'autres protéines. Par ailleurs, sa séparation par HPLC s'avérerait trop complexe, compte tenu des méthodes de séparation et de détections qui ne sont pas connues.

La mutagenèse dirigée a été faite par PCR et plusieurs clones ont été obtenus, séquencés et testés. Le vecteur d'expression et les sites de restriction sont les mêmes que ceux utilisés pour l'enzyme sauvage recombinante. Les conditions d'expression sont les mêmes que celles utilisées pour induire la protéine sauvage. Nous avons vérifié le niveau d'expression de l'enzyme mutée et calculé les paramètres cinétiques.

**CHAPITRE 4. DIFFERENTIAL ACTIVITIES OF RAT KIDNEY
AND PHENOBARBITAL-INDUCED ALDEHYDE
DEHYDROGENASES FOR RETINAL AND PROPANAL
SUBSTRATES**

Differential activities of rat kidney and phenobarbital-induced aldehyde dehydrogenases for retinal and propanal substrates*.

Nathaly Chow Lan^{1,2,3}, Julie Guimond^{1,2,3}, Céline Savineau^{1,2,3}, Pangala V. Bhat^{2,3,4} and Sylvie Mader^{1,4}.

¹Department of Biochemistry and ²Department of Medicine, University of Montreal, and ³Laboratory of Nutrition and Cancer, CHUM Research Centre, Hotel-Dieu Campus, Montreal, Quebec, Canada,

*Correspondence should be addressed to either of the last two authors:

S. Mader, Biochemistry Department, Faculty of Medicine, Université de Montréal, CP6128 Succursale Centre Ville, Montréal QC H3R 3N2. Tel: (514) 343-6111 # 5173; Fax: (514) 343-2210; E-mail: sylvie.mader@umontreal.ca

Pangala V. Bhat, Ph.D., CHUM Research Centre, Hotel-Dieu Campus, Marie-de-la-Ferre Pavilion, 3850 Saint Urbain Street, Montreal, Quebec, Canada, H2W 1T8. Tel.: (514) 843-2927, Fax: (514) 843-2715, E-mail: bhatp@ere.umontreal.ca

Foot Note: * Partial data from this work was presented at the Annual meeting of the Federation of American societies for Experimental Biology held at San Francisco, 1998 (Abstract no.4870). This work was supported by a grant from Medical Research Council of Canada (MOP 36485).

ABSTRACT

Several class I aldehyde dehydrogenases can catalyze oxidation of retinal into retinoic acid. However, substrate specificity within this family of enzymes is still poorly understood. We have previously shown that purified cytosolic aldehyde dehydrogenase from rat kidney converts 9-cis and all-trans retinal to the respective retinoic acids, and have recently cloned from a rat kidney expression library the cDNA for a class I aldehyde dehydrogenase (RALDH). Here, we have expressed in *E. coli* both RALDH and the phenobarbital-induced aldehyde dehydrogenase (pb-ALDH), two class I aldehyde dehydrogenases that share 89% amino acid sequence identity, and compared their kinetic properties using retinal and propanal substrates. RALDH efficiently catalyzed oxidation of 9-cis and all-trans, but not 13-cis retinal. K_m values for 9-cis and all-trans retinal (3.8 μM and 12 μM , respectively) were in good agreement with those obtained with the purified enzyme, demonstrating that the purified activity is encoded by the RALDH cDNA. Conversion of retinal to retinoic acid by pb-ALDH could not be detected, whereas oxidation of propanal was observed with a K_m (1.2 mM) similar to the one reported for the purified enzyme. On the other hand, oxidation of propanal by RALDH was less efficient than with pb-ALDH. Thus, these two class I aldehyde dehydrogenases differ markedly in their activity with retinal and propanal substrates in spite of their high degree of homology. Further, substituting in RALDH the highly conserved Cys 301, adjacent to the active site nucleophile Cys 302, with the corresponding amino acid in pb-ALDH (Ile) did not change either the K_m or the catalytic efficiency of the enzyme, indicating that this amino acid is not responsible for the differential activity of RALDH and pb-ALDH with retinal substrates.

Vitamin A (retinol) plays an important role in normal embryonic development and epithelial cell differentiation (1,2). It exerts its effects by conversion to the biologically active all-trans and 9-cis retinoic acids (RA), which function as specific ligands for nuclear receptors (RARs and RXRs) (3,4). All-trans RA binds and activates RARs, whereas its 9-cis isomer binds with high affinity to both RARs and RXRs (4,5). The metabolic pathway for the synthesis of RA involves oxidation of retinol to retinal, followed by oxidation of retinal to RA (6,7). Numerous enzymes able to catalyze the oxidation of retinol to retinal and of retinal to RA *in vitro* have been identified, including the members of the alcohol and aldehyde dehydrogenase families (7,8).

Aldehyde dehydrogenases (ALDH, also called aldehyde: NAD (P) oxidoreductase E.C.1.2.1.3) are a superfamily of NAD (P)-dependent enzymes which oxidize a variety of aldehydes to their corresponding acids. They are classified into 3 classes based on sequence similarity (9). The class I ALDHs are expressed in the cytosolic fraction of mammalian tissues. Several human, bovine and mouse class-I ALDHs have been shown to participate in the oxidation of all-trans retinal to retinoic acid (10-12). However, the degree and the molecular mechanisms of specificity for all-trans retinal and its isomers within the class I enzymes are not well characterized. We have purified and cloned a class I ALDH from rat kidney (designated as RALDH, 13, 14) which catalyzes the oxidation of all-trans and 9-cis retinal, but not 13-cis retinal, to the corresponding acids with high efficiency (15). Further, we have also shown that RALDH is highly expressed and developmentally regulated in the kidney (16) and in other tissues such as trachea, intestine and stomach epithelia (17,18), where its expression is regulated by vitamin A status. Here, we have expressed the cloned RALDH in bacteria and characterized its enzymatic properties with retinal substrates. The enzymatic characteristics of cloned RALDH matched those observed with the purified enzyme preparation, demonstrating that the observed profile of activity with retinal substrates corresponds to a single enzyme. In addition, we demonstrate that the enzymatic properties of recombinant RALDH differ markedly from those of another rat cytosolic class I ALDH whose expression is induced in liver

by phenobarbital (pb-ALDH) (19), since the latter enzyme did not catalyze either all-trans or 9-cis retinal conversion in spite of a high degree of sequence identity with RALDH. Finally, we observed that amino acid Cys 301 in RALDH could be replaced by Ile, the corresponding amino acid in pb-ALDH, without affecting RALDH enzymatic properties.

Experimental procedures

Materials. Restriction enzymes were purchased from New England Bio-Labs and Promega. Retinoids were obtained from Sigma. The polyclonal antibody raised against pb-ALDH and the pb-ALDH cDNA were generous gifts from Dr. Ronald Lindahl.

Bacterial expression vectors and mutagenesis of RALDH. cDNAs coding for the open reading frame of RALDH and pb-ALDH were cloned into the NdeI and HindIII sites of the bacterial expression plasmid pT7-7 by PCR amplification. Primers corresponding to the N-terminus and the C-terminus of RALDH (N-RALDH & C-RALDH) were designed according to the published cDNA sequences (14) and are listed below.

N- RALDH: CAGAATTCCCATATGTCTTCCCCTGCACAGCCT

C-RALDH: CAGAATTCAAGCTTTTAGGAGTTCTTCTGAGATAT

The N-terminal primer contains a NdeI site (underlined), an initiation ATG codon and nucleotides 1 to 21 of RALDH open reading frame. The C-terminal primer contains a HindIII site (underlined) and the reverse complement of nucleotides 1479-1506 of RALDH including the termination codon TAA. Since the nucleotide sequences of RALDH N-terminus and C-terminus are identical to those of pb-ALDH (20), the same primers were used for PCR amplification of pb-ALDH cDNA. Correct insertion of the RALDH and pb-ALDH cDNAs in pT7.7 was verified by DNA sequencing.

Cys 301 in RALDH was replaced by Ile by two rounds of PCR amplification. First, primers C-RALDH (see above) and Cys301Ile (see below) were used to amplify the C-terminal fragment (nucleotides 892-1506) of RALDH containing the Cys301Ile mutation. The PCR product was gel-purified and used as a primer together with N-RALDH (see above) to amplify full-length mutated RALDH (mRALDH).

Cys301IleTOP: CATCAAGGCCAAATCTGCGTCGCGG

Primer Cys301Ile represents nucleotides 892-916 of the RALDH cDNA, where the codon for Cys 301 (nt 904-906,TGC) was replaced by an Ile codon (ATC, underlined).

The mRALDH cDNA was digested with NdeI and HindIII and cloned into the corresponding sites of pT7-7. Presence of the mutation was confirmed by sequencing.

Bacterial expression of RALDH and pb-ALDH. Parental and recombinant plasmids were transformed into *E. coli* BL21DE3 cells, which express the T7 polymerase under control of a lac promoter. Expression was induced with 0.5 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) in exponentially growing bacteria and continued for 3h. Bacterial pellets were sonicated in 2 mM Tris-HCl pH7.2 containing 1 mM EDTA, 100 mM NaCl and 0.5% Tween-20, and protein extracts were collected after elimination of debris by centrifugation. Expression of RALDH and pb-ALDH was monitored by Western blot using 10 μ g of crude bacterial extract and a rabbit polyclonal antibody raised against pb-ALDH that cross-reacts with RALDH as described earlier (17,18).

Metabolic labeling of recombinant ALDHs: BL21DE3 bacteria containing the parental pT7-7 vector, the recombinant pT7-7-RALDH or pT7-7-pb-ALDH vector were grown to an OD₅₉₅ of 0.5, centrifuged (3000g, 30 sec) and resuspended in 1 ml of M9 salts containing 0.01% (w/v) of each amino acid except methionine and cysteine. Expression was induced by adding 0.5 mM IPTG, together with rifampicine (200 μ g/ml final) to inhibit bacterial polymerase. After 30 min, cells were incubated with 10 μ Ci of [³⁵S]-methionine for 5 min at 37°C, collected by centrifugation and boiled in 40 μ L of Laemmli buffer. Labelled proteins were resolved by SDS-PAGE (8% acrylamide gel) and visualized by autoradiography.

Enzyme assays: At least two clones originating from independent PCR reactions and coding for RALDH, mRALDH and pb-ALDH were expressed in bacteria and

characterized in enzyme assays. Similar results were obtained in all cases using duplicate constructs, indicating that activity of the recombinant enzymes was not affected by potential mutations introduced during PCR amplification. Enzymatic activity was assayed in a final volume of 250 μ l containing 0.02% Tween-80, 1.61 mM dithiothreitol, 603 μ M NAD and 75 μ g of crude protein extract containing RALDH, mRALDH or pb-ALDH. Varying concentrations of substrate (all-trans, 9-cis or 13-cis retinal or propanal) were added in 2.5 μ l dimethylsulfoxide. After incubation with retinoids at 37°C for 60 min, the reaction was terminated by cooling at 4°C in ice cold water. Retinoic acid was quantified by high performance liquid chromatography (HPLC) (21). When propanal was the substrate, enzyme activity was quantified by measuring the NADH formed 10 min after initiating the reaction by absorption at 340 nm (Beckman DU-40 spectrophotometer). Kinetic data for all substrates were obtained by fitting the data from the saturation curves to Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk plots with the computer program Enzfitter (22). Controls performed without protein extract or without substrate indicated that retinoic acid production and NADH formation required both enzyme and substrate. Retinoic acid production was undetectable using proteins extracts from bacteria carrying the parental pT7-7 plasmid. Low levels of NADH production were observed with extracts from bacteria carrying the parental pT7-7 plasmid, and were subtracted from the values obtained with extracts expressing RALDH or pb-ALDH.

RESULTS

RALDH and pb-ALDH are expressed to similar levels in bacteria.

Immunoblots were performed with crude extracts from BL21DE3 bacteria either untransformed (Fig. 1A lane 4) or transformed with expression vectors for RALDH (Fig. 1A lane 1), pb-ALDH (Fig. 1A lane 2), or with the parental pT7-7 expression vector (Fig. 1A lane 3), using an antibody raised against pb-ALDH. As expected, no bands were detected in extracts from bacteria that do not express RALDH or pb-ALDH (lanes 3-4) while a single band with a molecular weight of 55 kDa could be detected in both RALDH and pb-ALDH-expressing extracts (lanes 1-2). The molecular weight of the expressed enzymes is the one reported for each purified enzyme (13,19) as well as all other class I ALDHs. The intensities of the bands detected in western analysis are similar, suggesting comparable expression levels. To exclude the possibility that the antibody may recognize pb-ALDH and RALDH with different affinities, we also compared expression levels by incorporation of [³⁵S] methionine into bacterially-expressed RALDH and pb-ALDH, which contain 11 and 12 methionine residues, respectively. Expression of bacterial proteins was inhibited by rifampicin, allowing detection of the expressed enzymes as the major protein product. The similar intensity of the observed bands confirmed that levels of expression were similar for both proteins (Fig. 1B).

Recombinant RALDH retains the enzymatic characteristics of the purified enzyme:

Increasing concentrations of bacterial extracts containing recombinant RALDH were assayed with all-trans retinal at 37°C. All-trans retinoic acid production increased with RALDH concentration (Fig. 2A). To test whether the kinetic properties of the recombinant RALDH for retinal substrates are similar to those of the purified enzyme from rat kidney, we performed saturation kinetics of RALDH with all-trans, 9-cis,

and 13-cis retinal (Fig. 3 and Table 1). The K_m values obtained (3.8 μM and 12 μM for 9-cis and all-trans retinal) are in good agreement with the K_m values observed with the purified enzyme (5.7 μM and 9.8 μM for 9-cis and all-trans retinal, see also 15). In addition, similar to observations made with the purified enzyme, a higher catalytic efficiency was obtained with 9-cis versus all-trans retinal (about a 2.5 fold ratio) while 13-cis conversion could not be observed. Note that no retinoic acid producing activity was detected using extracts from cells that do not express RALDH and that similar K_m and V_{max} values were obtained after purification of the RALDH-containing bacterial extract over an Affigel blue affinity column (not shown). These results support the conclusion that the aldehyde dehydrogenase activity purified from rat kidney corresponds to a single enzyme encoded by the RALDH cDNA.

RALDH and pb-ALDH have differential activities with propanal and retinal substrates:

Pb-ALDH is not known to catalyze retinal conversion but can oxidize propanal (19). NADH production increased with increasing concentrations of pb-ALDH using propanal as a substrate (Fig. 2B). The K_m of pb-ALDH for propanal (1.2 mM, Fig. 4B and Table 2) compared well with the reported K_m (1.4 mM) of the purified enzyme from rat liver (19). Thus, the bacterially-expressed pb-ALDH enzyme is fully active.

To compare the enzymatic properties of pb-ALDH and RALDH, we measured conversion of all-trans retinal (Fig. 2A) or 9-cis retinal (data not shown) by pb-ALDH. No production of retinoic acid could be observed using the same conditions as with RALDH. On the other hand, RALDH catalyzed the oxydation of propanal less efficiently than pb-ALDH (V_{max}/K_m 0.003 vs 0.05, Fig. 4 and Table 2). These results demonstrate a differential activity of the two enzymes for propanal and retinal, in spite of their high degree of homology, and suggest that amino acids that differ

between the two enzymes are responsible for this difference in activity with retinal substrates.

Mutation of Cys301 in RALDH does not alter enzymatic activity with retinal.

Cys 301 is located next to Cys 302, which plays an important role in the catalytic site of aldehyde dehydrogenases, and is well conserved in class I aldehyde dehydrogenases. However, this amino acid is replaced by Ile in pb-ALDH. We replaced Cys 301 by Ile in RALDH and expressed the mutant protein in *E. coli*. Expression levels of wild-type (RALDH) and mutant RALDH (mRALDH) were similar as judged by western analysis (Fig. 5A). We compared the activity of RALDH and mRALDH using all-trans retinal as a substrate (Fig. 5B). Retinal dehydrogenase activity increased with protein concentrations of extracts from bacteria expressing either recombinant enzymes. Activities of wt and mt RALDH were nearly identical up to 300 μg of protein extract, although RA production was slightly lower with mRALDH compared to RALDH when higher protein concentrations were used, possibly due to increased aggregation of the mutant protein. No significant differences were observed in the kinetic constants of mRALDH (K_m 3.4 \pm 0.2 for 9-cis retinal, and 12.4 \pm 0.3 for all-trans retinal) and of RALDH (K_m 3.8 \pm 0.3 for 9-cis retinal, and 12.0 \pm 1 for all-trans retinal, Table 1) using 75 μg of protein extract. Catalytic efficiencies were also similar for mRALDH (0.6 for 9-cis retinal, 0.3 vs 0.2 for all-trans retinal) and RALDH (0.5 for 9-cis retinal, 0.2 for all-trans retinal, Table 1). These results demonstrate that Cys 301 can be replaced by Ile in RALDH without affecting its enzymatic properties with retinal substrates.

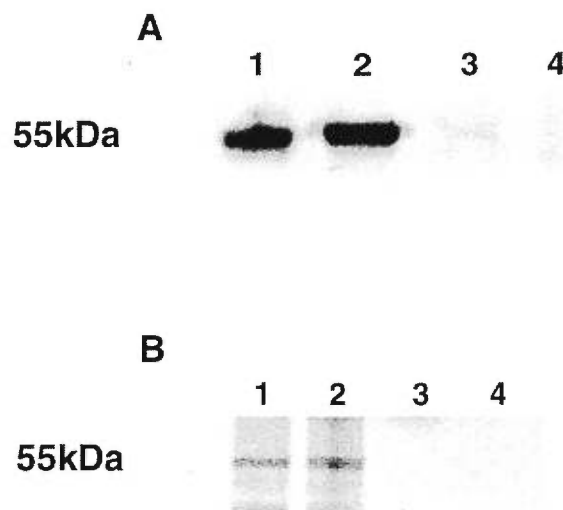


Figure 1. RALDH and pb-ALDH are expressed to similar levels. **A:** Western analysis of bacterially expressed RALDH and pb-ALDH and **B:** (^{35}S) methionine incorporation into RALDH and pb-ALDH recombinant enzymes. Extracts were prepared from BL21DE3 bacteria transformed with pT7-7-RALDH (lane 1), pT7-7-pb-ALDH (lane 2), or pT7-7 (lane 3), or parental BL21DE3 cells (lane 4). Crude protein extracts were separated by SDS-PAGE (8 % polyacrylamide gel) and subjected to immunoblot (A) and to autoradiography (B) as described in the experimental procedures section.

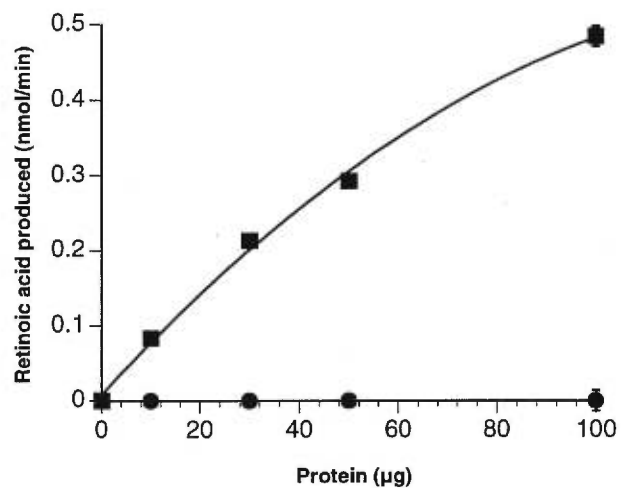
A

Figure 2. RALDH, but not pb-ALDH catalyzes retinal conversion. Reactions were performed as described in the experimental procedures section with 10 μM all-trans retinal (panel A) and 100 μM propanal (panel B, next page), respectively, using bacterial expressing RALDH (squares) or pb-ALDH (circles).

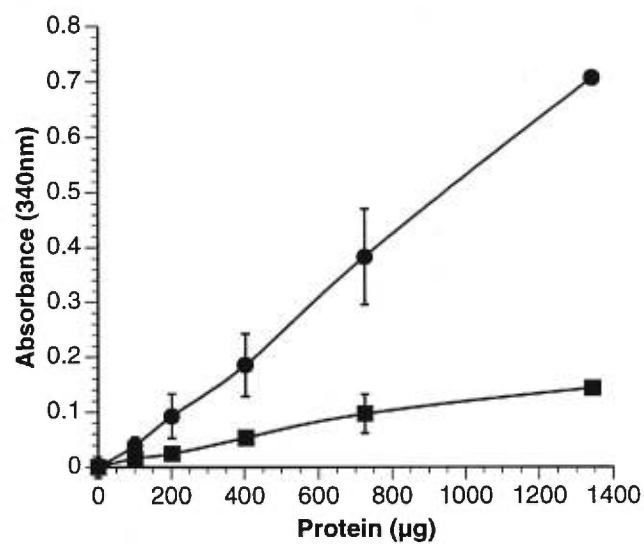
B

Figure 2. RALDH, but not pb-ALDH catalyzes retinal conversion. Reactions were performed as described in the experimental procedures section with 10 μM all-trans retinal (panel A, previous page) and 100 μM propanal (panel B), respectively, using bacterial expressing RALDH (squares) or pb-ALDH (circles).

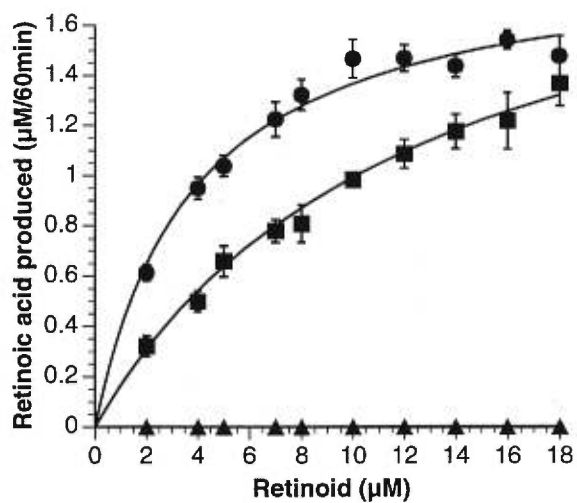


Figure 3. Specificity of recombinant RALDH for retinal isomers. Saturation curves of RALDH for 9-cis (circles), all-trans (squares), or 13-cis (triangles) using 75 µg of bacterial extract expressing RALDH.

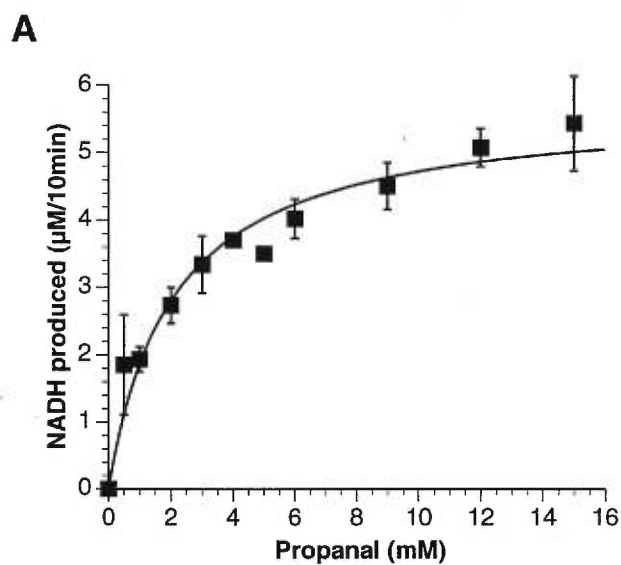


Figure 4. Recombinant pb-ALDH catalyzes propanal conversion with higher efficiency than RALDH. Activity of recombinant RALDH (panel A) or pb-ALDH (panel B, next page) was assayed using 75 µg of bacterial extracts containing pb-ALDH or RALDH by measuring NADH production 10 min after initiation of the reaction.

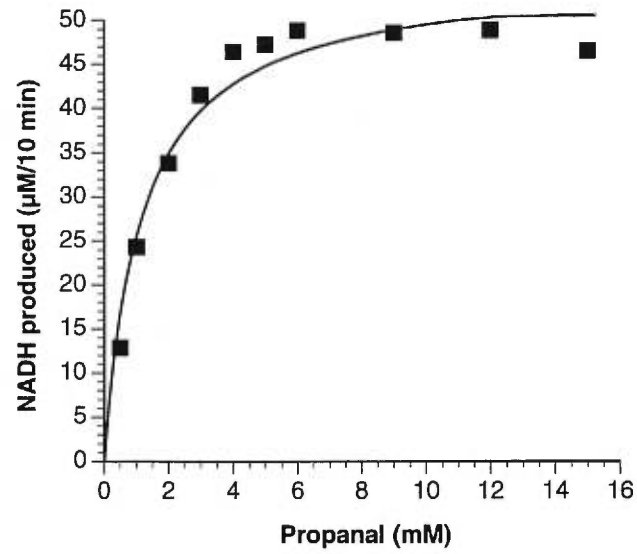
B

Figure 4. Recombinant pb-ALDH catalyzes propanal conversion with higher efficiency than RALDH. Activity of recombinant RALDH (panel A, previous page) or pb-ALDH (panel B) was assayed using 75 µg of bacterial extracts containing pb-ALDH or RALDH by measuring NADH production 10 min after initiation of the reaction.

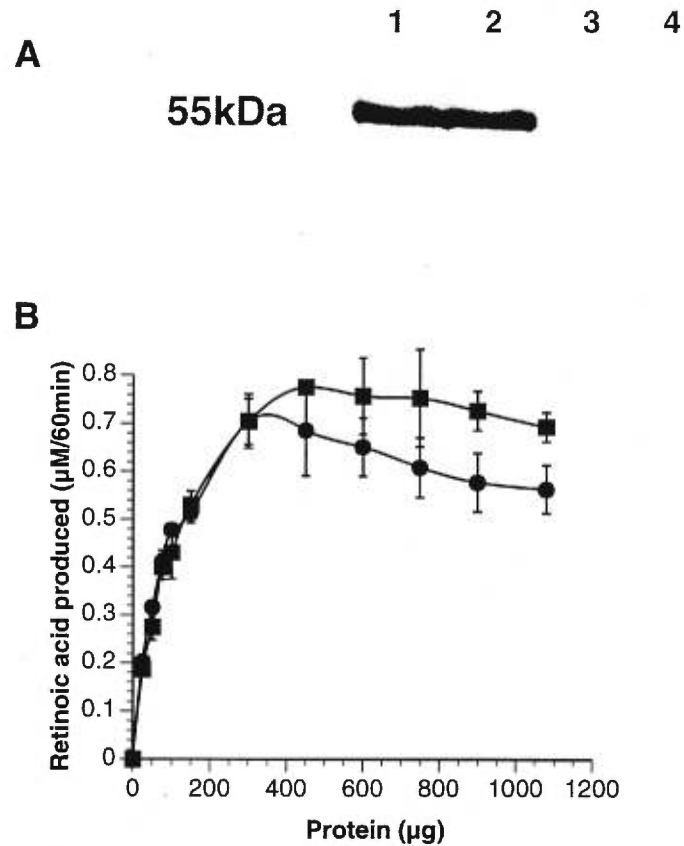


Figure 5. Mutation of Cys 301 to Ile does not alter RALDH enzymatic properties. **A.** Western analysis of bacterial extracts from BL21DE3 cells expressing wild type RALDH (lane 1) or mutant mRALDH (lane 2), of extracts from BL21DE3 cells transformed with the empty pT7-7 vector (lane 3), or of extracts from the parental BL21DE3 cells (lane 4). **B.** Activity of RALDH (squares) or mRALDH (circles) for all-trans retinal oxidation. Incubation conditions are as described in Fig. 2.

Table 1**Specificity of RALDH for retinal isomers**

Retinal isomer	K _m (μM)	V _{max} (μM)	V _{max} /K _m
9-cis	3,8 ±0,3	1,9 ±0,1	0,5
All-trans	12 ±1	2,2 ±0,5	0,2

Kinetic constants were obtained by fitting the data from the saturation curves to Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk kinetic plots with the computer program Enzfitter. Values are the averages of three independent determinations, where each point in the curve in each determination represents the average of triplicate.

Table 2**Kinetic constants of RALDH and Pb-ALDH
for propionaldehyde substrate**

	Km ($\times 10^3 \mu\text{M}$)	Vmax (μM)	Vmax/Km
RALDH	2,1 \pm 0,5	5,7 \pm 0,2	0,003
Pb-ALDH	1,2 \pm 0,2	55,3 \pm 0,7	0,05

Kinetic constants were obtained as described in table 1. Values are the averages of two determinations, where each point in the curve in each determination represents the average of duplicate.

DISCUSSION

In this study, we expressed RALDH and pb-ALDH in *E. coli* from their respective cDNAs. We have previously demonstrated the existence of a class I aldehyde dehydrogenase that oxidizes retinal in rat kidney and purified this activity to homogeneity (13). Results described here demonstrate that the characteristics observed with the enzyme purified from rat kidney are retained by the recombinant enzyme. The good correlation in K_m values as well as the absence of activity with 13-cis retinal and the higher efficiency of 9-cis versus all-trans retinal conversion provide strong evidence that RALDH encodes the purified kidney enzyme (15). Our results also demonstrate that post-translational modifications specific to eukaryotes are not needed for RALDH enzymatic activity, a result consistent with previous observations made with bacterially expressed ALDHs (23, 24).

As well as pb-ALDH (19), RALDH catalyzed the dehydrogenation of the simple aliphatic aldehyde propanal. However, the K_m of RALDH for propanal was much higher (2.1 mM) compared to those for 9-cis retinal (3.8 μ M) or all-trans retinal (12 μ M), and the catalytic efficiency for propanal was much lower compared to retinal substrates (0.003 for propanal for a 10 min reaction vs 0.5 and 0.2 for 9-cis and all-trans retinal, respectively, over a 60 min reaction). Thus, RALDH demonstrates specificity in the oxidation of aldehyde substrates. Further, the difference in activity observed with the retinal isomers may also be characteristic of RALDH versus other retinal-oxidizing ALDHs. Indeed, we recently observed that purified human ALDH1 catalyzes conversion of all three isomers with comparable efficiencies (0.27, 0.20 and 0.22 for 9-cis, all-trans and 13-cis retinal, respectively; see also (25)). It will be of interest in the future to compare more systematically the enzymatic activities of different cloned ALDHs for retinal isomers.

Contrary to what was observed with RALDH, pb-ALDH was inactive for retinal oxidation, although its activity for propanal was in good agreement with previously published data (19). This is in keeping with the recent observation that the mouse homolog of rat pb-ALDH does not function in RA synthesis *in vivo* in a *Xenopus*

embryo assay (26). However, activity of pb-ALDH in this assay was not demonstrated. Therefore, our results provide the first direct demonstration that two class 1 rat aldehyde dehydrogenases have differential activities with retinal and propanal substrates in spite of a high (89%) amino acid sequence identity.

The differences in the activity of pb-ALDH and RALDH for retinal oxidation could result from differences in the substrate binding pockets and/or in the catalytic sites of these enzymes. Studies have shown that the highly-conserved cysteine 302 in ALDHs is involved in the catalysis of aldehydes (27,28). While this cysteine is conserved both in RALDH and pb-ALDH, the adjacent amino acid (301) in pb-ALDH is isoleucine instead of cysteine in RALDH and in all other ALDHs, which could account for the lack of activity of pb-ALDH for retinal oxidation. Therefore, we substituted cysteine 301 in RALDH by isoleucine and tested the ability of mRALDH to catalyze the retinal oxidation. We could not observe any difference in the kinetic constants of these 2 enzymes, suggesting that cysteine 301 is not essential for the catalysis of retinal. The lower activity of mRALDH at high protein concentration could be due to a higher rate of aggregation of mRALDH in solution due to the substitution of the polar hydrophilic cysteine 301 by the hydrophobic amino acid isoleucine.

The recently reported 3-dimensional crystal structure of sheep liver ALDH1 which catalyzes retinal oxidation may partly explain the reasons for the lack of activity of pb-ALDH for retinal oxidation (29). Examination of the amino acid residues in RALDH and pb-ALDH in the substrate entrance tunnel shows multiple amino acid substitutions between these 2 enzymes (amino acid identity varies between 20-45% in these regions). Future studies will be required to determine which of these changes are important for the recognition and the catalysis of retinal substrates.

REFERENCES

1. Smith, S.M., Pang, K., Sundin, O, Wedden, S.E., Thaller, C. and Eichele, G. (1989), *Development* (Cambridge) 107, 121-131.
2. Roberts, A.B., and Sporn, M.B. (1984) *The retinoids* (Sporn, A.B., & Roberts, M.B., eds) pp. 209-286, Academic Press, Orlando, Fla.
3. DeLuca, L.M. (1991) *FASEB J* 5, 2924-2933.
4. Chambon, P. (1996). *FASEB J* 10, 940-954.
5. Mangelsdorf, D.J., Umesono, K. and Evans., R.M. (1994) *The retinoids†: biology, chemistry and medicine* (Sporn, A.B., Robert, M.B. & Goodman, D.S., eds) pp. 319-349, Raven Press, New York.
6. Bhat, P.V., Poissant, L., Falardeau, P., and Lacroix A. (1988) *Biochem. Cell Biol.* 66, 735-740.
7. Duester, G. (1996) *Biochemistry* 35, 12221-12227.
8. Blaner, W.S., and Olson, J.A. (1994) *The retinoids†: biology, chemistry and medicine* (Sporn, A.B., Roberts, M.B. and Goodman, D.S., eds) pp.229-256, Raven Press, New York.
9. Lindahl (1992) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 27, 283-335.
10. Bhat, P.V., Poissant, L., and Wang, WL. (1996) *Biochem. Cell Biol.* 74, 695-700.
11. Lee, M.-O., Manthey, C.L., and Sladek, N.E. (1991) *Biochem. Pharmacol.* 42, 1279-1285.
12. Yoshida, A., Hsu, L.C., and Davé V. (1992) *Enzyme* 46, 239-244.
13. Labrecque J., Bhat, P.V., and Lacroix A. (1993) *Biochem. Cell Biol.* 71, 85-89.
14. Bhat, P.V., Labrecque, J., Boutin, J.-M., Lacroix A., and Yoshida A. (1995) *Gene* 166, 303-306.
15. Labrecque, J., Dumas, F., Lacroix, A., and Bhat, P.V. (1995). *Biochem. J.* 305, 681-684.

16. Bhat, P.V., Marcinkiewicz, M., Li, Y., and Mader, S. (1998) *J. Histo. Chem. Cytochem.*46,1-8.
17. Bhat, P.V., Bader T., Nettesheim, P., and Jetten, A.M. (1998) *Biochem. Cell Biol.* 76, 59-62.
18. Bhat, P.V. (1998) *FEBS Letters* 426, 260-262.
19. Lindahl, R., and Evces, S. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 11991-11996.
20. Dunn, T.J., Koleske, A.J., Lindahl, R., and Pitot, H.C. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 13057-13065.
21. Bhat, P.V., Poissant, L., and Lacroix A. (1988) *Biochem. Biophys. Acta* 967, 211-217.
22. Leatherbarrow, R.J. (1987) *Enzfitter†*: Elsevier-Biosoft, Cambridge, U.K.
23. Hsu, L.C., Chang, W-C., Shibuya, A., and Yoshida, A. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 3030-3037.
24. Penzes, P., Wang, X., and Napoli, J.L. (1997) *Biochem. Biophys. Acta* 1342, 175-181.
25. Bhat, P.V. and Samaha, H. (1998) *Biochem. Pharmacol.* 57, 195-197.
26. Hsu, L. C., Chang, W-C., Hoffmann, I., and Duester, G. (1999) *Biochem. J.* 339, 387-395.
27. Pietruzsko, R., Blatter, E., Abriola, D.P., and Prestwich G. (1991) *Adv. Exp. Med. Biol.* 284, 19-30.
28. Perozich, J., Nicholas, H., Wang, B.-C., Lindahl, R. and Hempel, J. (1993) *Protein Science* 2, 1890-1900
29. Moore, S., Baker, H. M., Blythe, T. J., Kitson, K. E., Kitson, T. M., and Baker, E. N.(1998) *Structure*,6 1541-1551.

CHAPITRE 5. DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

DISCUSSION

Buts

Le but de ce projet est de comparer les propriétés enzymatiques de deux ALDHs de classe I de rat vis-à-vis du rétinol et de ses isomères. Toutes les ALDHs ont un poids moléculaire de 55 kDa et une grande similarité de séquence pouvant malheureusement résulter en une co-purification de ces isoenzymes. Ainsi, nous avons choisi d'exprimer les protéines à l'aide de bactéries. Mais avant tout, un de nos buts était de vérifier que l'ADNc cloné code bien pour une ALDH ayant les mêmes propriétés enzymatiques que celles de l'enzyme purifiée. Au départ, comme nous n'avions qu'une seule enzyme, nous nous attendions à ce que les résultats confirment que l'ADNc code bien pour la RALDH. Ensuite, la comparaison des deux enzymes s'est faite à l'intérieur d'une même espèce pour s'assurer qu'il s'agisse bel et bien d'isoformes différentes.

Choix du système d'expression

Nous avons sous-cloné l'ADNc et exprimé la protéine dans un système hétérologue. L'utilisation de cellules procaryotes constituait la première approche pour exprimer la protéine. Toutefois, était-ce un bon système ou valait-il mieux utiliser des cellules eucaryotes ? Tout d'abord, même s'il risquait d'y avoir une activité ALDH chez les procaryotes, il était peu probable qu'une activité RALDH y soit présente. Afin de confirmer ou d'infirmer ces propos, des blancs ont été utilisés dans les expériences. D'une part, les essais enzymatiques effectués, en utilisant le rétinol comme substrat, comportaient les blancs suivants : une série de contrôles ne contenant pas de protéines et l'autre contenant les bactéries transfectées avec le plasmide sans insert. D'autre part, les études cinétiques réalisées en utilisant le substrat propanal comportaient aussi des blancs contenant le vecteur sans insert. Les résultats des contrôles réalisés en utilisant le rétinol sont négatifs, mais pour ceux obtenus en utilisant le propanal, les résultats sont positifs quoique les valeurs obtenues sont très faibles. Ainsi, il est manifeste qu'aucune activité RALDH ne soit

présente au sein du système procaryote seul. Toutefois, une très faible activité ALDH a été observée mais ces données ont été soustraites lors du calcul des paramètres cinétiques. Il est à noter que pour des fins de contrôles de la méthode utilisée, d'autres blancs ont été nécessaires. En effet, les expériences utilisant le propanal comportaient des blancs dont les solutions ne contenaient soit aucun substrat ou aucune enzyme. Dans ces deux cas, les résultats obtenus étaient nuls et cela permettait de vérifier qu'aucune oxydation non-spécifique ou conversion non-enzymatique ne se produisent.

Les avantages du choix d'un système d'expression procaryote comprennent l'absence d'activités ALDHs eucaryotes. Cela permet d'envisager à plus long terme la purification de l'enzyme et la mise sur pied d'études structurales. Quant aux inconvénients, il y a absence de certaines modifications post-traductionnelles qui peuvent être nécessaires à l'activité de l'enzyme. Toutefois, il est peu probable que cela survienne puisque d'autres ALDHs bactériennes ont déjà été étudiées.

À la lumière de ce qui a été énoncé, nous concluons que l'utilisation des cellules procaryotes s'est avérée être un bon système pour l'étude des paramètres cinétiques de ces enzymes. De plus, grâce à tous les contrôles présents et aux résultats similaires obtenus pour la RALDH brute et purifiée du rein de rat (voir ci-dessous), il était possible d'utiliser les extraits bruts pour comparer les deux enzymes.

Résultats:

Authenticité des enzymes recombinantes

Les enzymes RALDH et Pb-ALDH recombinantes ont été caractérisées. Les propriétés cinétiques (figure 3; tableau I), le poids moléculaire et la reconnaissance par l'anticorps (figure 1B) montrent que la RALDH recombinante est identique à l'enzyme native purifiée du rein de rat (Labrecque 1995). L'authenticité de Pb-ALDH recombinante a aussi été confirmée, d'après le séquençage de l'ADNc, son poids moléculaire et la reconnaissance par l'anticorps. En outre, ses propriétés cinétiques ont été mesurées en présence du substrat propanal

(figure 4B, p.57). Les données obtenues sont comparables à celles de la littérature (Lindahl 1984). Nos résultats suggèrent que les modifications posttraductionnelles, observées chez les eucaryotes, ne sont pas nécessaires à l'activité enzymatique de RALDH et de Pb-ALDH. D'autres résultats chez les enzymes recombinantes confirment ces observations (Hsu 1992, Penzes 1997a).

Activité différentielle de RALDH et Pb-ALDH pour le rétinol et le propanal

Par ailleurs, malgré la grande identité de séquence (89%) entre RALDH et Pb-ALDH, leurs propriétés oxydatives en présence de certains substrats ne sont pas les mêmes. La RALDH catalyse efficacement les substrats rétinaux *tout-trans* et *9-cis*, mais pour la première fois, nous avons démontré que l'activité de Pb-ALDH est nulle quant à l'oxydation des mêmes substrats rétinaux dans les mêmes conditions (figure 2A, p.53). Toutefois, l'activité intrinsèque de Pb-ALDH a été détectée avec le propanal comme substrat. Cela montre que la Pb-ALDH est bel et bien active (figure 2B, p.54). La RALDH peut aussi catalyser l'oxydation du propanal (figure 4A, p.56), mais avec une efficacité catalytique plus faible que celle mesurée en utilisant les substrats rétinaux (tableaux I et II, p.59 et 60). Contrairement à la RALDH, Pb-ALDH ne catalyse pas l'oxydation du rétinol. Même si le propanal n'est pas un substrat physiologique, sa conversion par la Pb-ALDH confirme que cette enzyme est belle et bien active. Une isoenzyme retrouvée chez l'humain (hALDH-1) possède une même efficacité pour les trois isomères du rétinol (*tout-trans*, *9-cis* et *13-cis*). Quant à son affinité, elle est deux fois plus grande pour l'isomère *tout-trans* que pour les deux autres (Bhat 1999).

Récemment, il a été suggéré que l'homologue de souris de Pb-ALDH ne participe pas à la synthèse de l'acide rétinoïque. Les expériences ont été réalisées au sein d'embryon de *Xénopus*. Les ARNm de ALDH1 et de Pb-ALDH ont été injectés dans les oocytes de *Xénopus*. Cette étude a permis la détection d'acide rétinoïque seulement dans les oocytes injectés avec ALDH1. Toutefois, précisons que l'activité de Pb-ALDH dans ce système n'a pas été démontrée (Hsu 1999).

Bases moléculaires de la différence et activité de la RALDH et Pb-ALDH pour le rétinale

Ces observations suggèrent l'implication d'acides aminés spécifiques à RALDH pour la reconnaissance et la catalyse de substrats aldéhydes. Les différences d'activité oxydatives entre RALDH et Pb-ALDH, quant à l'oxydation du rétinale, peuvent provenir de différences au niveau des sites de liaison du substrat ou des sites catalytiques de ces deux enzymes. Des études ont montré que la cystéine 302, hautement conservée chez la plupart des ALDHs, est impliquée dans la catalyse des aldéhydes (Farrés 1995, Hurley 1999, Liu 1997). Il a été démontré, par des modifications chimiques et des études de mutagenèse dirigée, que la cystéine 302 se trouve dans le site actif des aldéhydes déshydrogénases et fonctionne en tant que nucléophile. Par ailleurs, l'activation de ce résidu serait assistée par un autre, lequel attaquerait l'aldéhyde afin de former un intermédiaire thiohémiacétal (Hurley 1999).

Chez plusieurs isoenzymes qui catalysent les substrats rétinaux, non seulement la cystéine en question est présente à la position 302, mais elles possèdent aussi une autre cystéine en position adjacente, c'est-à-dire à la position 301. Il en est ainsi pour ces trois isoenzymes : RALDH, mADH-2 et hALDH-1. Cela est généralement conservé dans la classe I, sauf pour Pb-ALDH. (voir annexe).

Contrairement aux enzymes précédentes, l'isoenzyme Pb-ALDH, quoique possédant une cystéine en position 302, ne possède pas l'autre résidu, la cystéine 301. L'isoleucine la remplace. Ce dernier résidu pourrait expliquer l'absence d'activité oxydative de Pb-ALDH sur les substrats rétinaux. C'est pourquoi, nous avons substitué, par mutagenèse dirigée, la cystéine 301 de la RALDH par une isoleucine, afin de déterminer si cette enzyme allait ou non perdre son activité.

Nous avons mesuré les propriétés cinétiques de l'enzyme mutante résultante, nommée mRALDH, en utilisant les différents isomères du rétinale comme substrat. Avant tout, le même niveau d'expression de la RALDH sauvage (wRALDH) et mutée (mRALDH) a été observée (figure 5A). Les études cinétiques n'ont

révélé aucune différence entre les deux enzymes. Pour la première fois dans la littérature, cela suggère que la cystéine 301 n'est pas essentielle à la catalyse du rétinol. La seule différence observée entre les deux enzymes est une plus faible activité du mRALDH aux fortes concentrations d'enzymes (figure 5B). Cela peut être causé par une agrégation de mRALDH en solution, pouvant résulter d'une substitution de la cystéine 301, un résidu hydrophile polaire, par l'isoleucine, un résidu hydrophobique.

Nous proposons une hypothèse, basée sur la découverte récente de la structure cristalline d'une enzyme cytosolique du foie de mouton (ALDH 1) (Moore 1998). Cette étude révèle la structure tridimensionnelle de ALDH 1, comparativement à son homologue ALDH 2. Cette étude explique la différence de spécificité entre les deux enzymes, pour certains substrats. La comparaison entre ALDH 1 et ALDH 2 révèle des différences majeures, entre autres au sein du tunnel formant le site de liaison du substrat. La taille et la forme de ce tunnel font que ALDH 1, et non ALDH 2, a une grande affinité pour le rétinol et bien moins pour l'acétaldéhyde. Nous suggérons donc que des raisons analogues pourraient expliquer la différence de spécificité du substrat entre RALDH et Pb-ALDH.

Les observations précédentes peuvent expliquer en partie les raisons pour lesquelles Pb-ALDH ne peut oxyder le rétinol. La voie d'entrée du substrat est formée par un tunnel, lequel se compose de quatre hélices : α C, α D, α H et α N. Les résidus présents dans ces branchements ont été identifiés. En comparant les séquences d'acides aminés de RALDH et de Pb-ALDH, de multiples substitutions (entre 20 et 45%) ont été observées entre les deux enzymes. Chez ces dernières, toutes les substitutions ont été identifiées et cela pourrait expliquer l'absence d'activité oxydative de Pb-ALDH pour le rétinol.

Conclusions et perspectives

Ainsi, les constantes cinétiques obtenues pour la RALDH recombinante, en utilisant divers isomères du rétinol comme substrats, sont similaires aux données publiées pour l'enzyme native. La Pb-ALDH recombinante n'a pu catalyser l'oxydation des mêmes substrats. L'activité de ces deux enzymes a été observée en présence du propanal. Finalement, les expériences montrent que la cystéine en position 301 n'est pas essentielle à l'activité catalytique de la RALDH en utilisant le rétinol comme substrat. Présentement, nous effectuons une mutagenèse systématique des acides aminés qui diffèrent entre RALDH et Pb-ALDH, afin de déterminer le(s) région(s) peptidique(s), ainsi que le(s) acide(s) aminé(s) essentiel(s) à la reconnaissance et à la catalyse des substrats rétinaux. Pour chacun des mutants générés, le propanal servira toujours de contrôle pour vérifier l'activité de chacune des enzymes. Il serait également intéressant de comparer ces ALDHs à d'autres enzymes de rat ou de classe I.

BIBLIOGRAPHIE

Abu-Abed, S.S., B.R. Beckett, H. Chiba, J.V. Chithalen, G. Jones, D. Metzger, P. Chambon, M. Petkovich, *Mouse P450RAI (CYP26) Expression and retinoic acid-inducible retinoic acid metabolism in F9 cells regulated by retinoic acid receptor γ and retinoic X receptor α* , J. Biol. Chem., (1998), **273**, 2409-2415.

Bhat, P. V., *Retinal dehydrogenase gene expression in stomach and small intestine of rats during postnatal development and in vitamin A deficiency*, FEBS Letters, (1998a), **426**, 260-262.

Bhat, P. V., *Tissue concentrations of retinol, retinyl esters, and retinoic acid in vitamin A deficient rats administered a single dose of radioactive retinol*, Can. J. Physiol., Pharmacol., (1997), **75**, 74-77.

Bhat, P. V., H. Samaha, *Kinetic properties of the human liver cytosolic aldehyde dehydrogenase for retinal isomers*, Biochemical pharmacology, (1999), **57**, 195-197.

Bhat, P. V., J. Labrecque, J-M. Boutin, A. Lacroix, A. yoshida, *Cloning of a cDNA encoding rat aldehyde dehydrogenase with high activity for retinal oxidation*, Gene, (1995), **166**, 303-306.

Bhat, P. V., M. Marcinkiewicz, Y. Li, , S. Mader, *Changing patterns of renal retinal dehydrogenase expression parallel nephron development in the rat*, J. Histochem. Cytochem, (1998b), **46**, 1025-1032.

Bhat, P. V., T. Bader, P. Nettesheim, A. M. Jetten, *Differentiation-dependent regulation of retinal dehydrogenase gene expression in the trachea*, Biochem. Cell. Biol., (1998c), **76**, 1-4.

Blumberg, B., J. Bolado, F. Derguini, A. G. Creig, T. A. Moreno, D. Chakravarti, R. A. Heyman, J. Back, R. M. Evans, *Novel retinoic acid receptor ligands in xenopus embryos*, Proc. Natl. Acad. Sci., (1996), **93**, 4873-4878.

Carlberg, C, J-H, Laurat, *Vitamin D-retinoid association: Molecular basis and clinical applications*, Journal of investigative dermatology symposium proceedings, (1996), **1**, 82-86.

Castaigne, S., C. Chomienne, M. J. Daniel, R. Berger, P. Feneaux, L. Degos, *All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia I*, Blood, (1990), **76**, 1704-1709.

Chai, X., M. H.E. M. Boerman, Y. Zhai, J. L. Napoli, *Cloning of a cDNA for liver microsomal retinol deshydrogenase*, J. Biol. Chem., (1995a), **270**, 3900-3904.

Chai, X., Y. Zhai, G. Popesar, J. L. Napoli, *Cloning of a cDNA for a second retinol dehydrogenase type II*, J. Biol. Chem., (1995b), **270**, 28408-28412.

Chai, X., Y. Zhai, J. L. Napoli, *Cloning of a rat cDNA encoding retinol dehydrogenase isozyme type III*, Gene, (1996), **169**, 219-222.

Chambon, P., *A decade of molecular biology of retinoic acid receptors*, FASEB J, (1996), **10**, 940-954.

Chambon, P., *The molecular and genetic dissection of the retinoid signalling pathway*, Recent Progress in Hormone research, (1995), **50**, 317-333.

Collins, M., *Teratology of retinoids*, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., (1999), **39**, 399 - 430.

Deltour, L., *Localization of class I and class IV alcohol dehydrogenases in mouse testis and epididymis : potential retinol dehydrogenases for endogenous retinoic acid synthesis*, *Biology of reproduction*, (1997), **56**, 102-109.

DeLuca, L.M., *Vitamin A*, Chapter 1 from handbook of lipid research, vol. 2, edited by Hector F DeLuca, Plenum publishing corporation, 1978, pp. 1-65.

Delva, L., J-N. Baste, C. Rochette-Egly, Radhia Kraïba, N. Bulitrana, G. Despouy, P. Chambon, C. Chomienne, *Physical and fonctional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex*, *Molecular and cellular biology*, (1999), **19**, 7158–7167.

De Thé, H., *Altered retinoic acid receptors*, *FASEB J.*, (1996), **10**, 955-960.

Dong, D., S. E. Ruuska, D. J. Levinthal, N. Noy, *Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid*, *J. Biol. Chem.*, (1999), **274**, 23695-23698.

Drummond, J. C., *The nomenclature of the so-called accessory food factors(vitamins)*, *Biochem. J.*, (1920), **14**, 660-667.

Duester, G., *Function of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase gene families in retinoid signalling*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, (1999), **463**, 311-319.

Duester, G., *Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P-450 in the control of retinoid signalling by activation of retinoic acid synthesis*, *Biochemistry*, (1996), **35**, 1221-1227.

Duester, G., L. Deltour, H.L. Ang, *Evidence that class IV alcohol dehydrogenase may function in embryonic retinoic acid synthesis*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, (1996a), **372**, 357-364.

Dunn, T. J., A. J., Koleske, R. Lindahl, H. C. Pitot, *Phenobarbital-inducible aldehyde dehydrogenase in the rat*, J. Biol. Chem, (1989), **264**, 13057-13065.

Evans, T. R. J., S. B. Kaye, *Retinoids : Present role and future potential*, British journal of cancer, (1999), **80**, 1-8.

Farrés, J., T. T. Y. Wang, S. J. Cunningham, H. Weiner, *Investigation of the active site cysteine residue of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by site-directed mutagenesis*, Biochemistry, (1995), **34**, 2592-2598.

Fujii, H., T. Sato, S. Kaneko, O. Gotoh, Y. Fujii-Kuriyama, K. Osawa, S. Kato, H. Hamada, *Metabolic inactivation of retinoic acid by a novel P450 differentially expressed in developing mouse embryos*, EMBO J., (1997), **14**, 4163-4173.

Giguère, V., *Retinoic acid receptor and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling*, Endocrinol. Rev., (1994), **15**, 61-79.

Goodman, A. B., *Three independent lines of evidence suggest retinoids as causal to schizophrenia*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., (1998), **95**, 7240-7244.

Goodman, D.S., *Retinoid-binding proteins*, J. Am. Acad. Dermatol., (1982), **6**, 583 – 588.

Green, M.H., J.B. Green, *Multicompartmental analysis of whole body retinol dynamics in vitamin A-sufficient rats*, Fed. Proc., (1987), **46**, 1011-1020

Guftafson, A.L., L. Dincker, M. Erikson, *Non-overlapping expression of CRBP I and CRABP during pattern formation of the limbs and cranofacial structures in the early mouse embryo*, Development, (1993), **117**, 451 – 460.

Haselbeck, R., G. Duester, *ADH 1 and ADH 4 alcohol/retinol dehydrogenases in the developing adrenal blastema provide evidence for embryonic retinoid endocrine function*, *Developmental Dynamics*, (1998), **213**, 114-120.

Helgerud, P., L.B. Petersen, K.R. Norum, *Acyl CoA-retinyl acyltransferase in rat small intestine : its activity and some properties of the enzymatic reaction*, *J. Lipid Res.*, (1982), **23**, 609-618.

Helgerud, P., L.B. Petersen, K.R. Norum, *Retinol esterification by microsomes from the mucosa of human small intestine*, *J. Clin. Invest.*, (1983), **71**, 747-753.

Hendriks H.F.J., *Retinoid (Vitamin A) metabolism*. *European Journal of clinical Nutrition*, (1996), **50**, S2-S6.

Heyman, R., P.J. Mangelsdorf, J.A. Dick, R.B Stein, G. Eichele, R.M. Evans, C. Thaller, *9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor*, *Cell*, (1992), **68**, 397-406.

Holmbeck, S. M. A., H. J. Dyson, P. E. Wright, *DNA induced conformational changes are the basis for cooperative dimerization by the DNA binding domain of the retinoid X receptor*, *J. Mol. Biol.*, (1998), **284**, 533-539.

Hsu, L.C., W. C. Chang, A. Shibuya, A. Yoshida, *Human stomach aldehyde dehydrogenase cDNA and genomic cloning, primary structure, and expression in Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, (1992), **267**, 3030-3037.

Hsu, L.C., W. C. Chang, I. Hoffmann, G. Duester, *Molecular analysis of two closely related mouse aldehyde dehydrogenase genes : identification of a role for Aldh1, but not Aldh-ph, in the biosynthesis of retinoic acid*, *Biochem. J.*, (1999), **339**, 387-395.

Hurley, T.D., H. Weiner, *Evaluation of the roles of the conserved residues of aldehyde dehydrogenases*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, (1999), **463**, 45-52.

Jeanteur, P., *Leucémies aiguës à promyélocytes, histone désacétylase et réponse aux rétinoïdes*, *Bull. Cancer*, (1998), **85**, 301-303.

Kastner, P., M. Mark, N. Ghyselinck, W. Krezel, V. Dupé, J. M. Grondona, P. Chambon, *Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development*, *Development*, (1997), **124**, 313-326.

Kathmann E. C., J.J. Lipsky, *Cloning of a cDNA encoding a constitutively expressed rat liver cytosolic aldehyde dehydrogenase*, *Biochemical and biophysical research communications*, (1997), **236**, 527-531.

Kimura, S., J. C. Donovan, D. W. Nebert, *Expression of the mouse P450 gene during differentiation without foreign chemical stimulation*, *J. of experimental pathology*, (1987), **3**, 61-63.

Koyama, E., E. B. Golden, T. Kirsch, S.L. Adams, R.A.S. Chandraratna, J-J Michaille, M. Pacifici, *Retinoid signaling is required for chondrocyte maturation and endochondral bone formation during limb skeletogenesis*, *Developmental biology*, (1999), **208**, 375-391.

Kurokawa, R., M. Söderström, A. Hörlein, S. Halachmi, M. Brown, M. G. Rosenfeld, C. K. Glass, *Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor*, *Nature*, (1995), **377**, 451 – 454.

Labrecque, J., F. Dumas, A. Lacroix, P. V. Bhat, *A novel isoenzyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-cis and all-trans retinoic acid*, *Biochem. J.*, (1995), **305**, 681-684.

Labrecque, J., P. V. Bhat, A. Lacroix, *Purification and partial characterization of a rat kidney aldehyde dehydrogenase that oxidizes retinal to retinoic acid,* *Biochem. Cell. Biol.*, (1993), **71**, 85-89.

Labrecque, J., P. V. Bhat, A. Lacroix, *Régulation de la synthèse des acides rétinoïques tout-trans et 9-cis : rôle d'une nouvelle rétinal déshydrogénase,* *Médecine/sciences*, (1997), **13**, 345-52.

Li, E., *Structure and function of cytoplasmic retinoid binding proteins,* *Molecular and cellular biochemistry*, (1999), **192**, 105-108.

Lindahl, R., S. Evces, *Rat liver aldehyde dehydrogenase. II. Isolation and characterization of four inducible isozymes,* *J. Biol. Chem.*, (1984), **259**, 11991-11996.

Liu, Z-J., Y-J. Sun, J. Rose, Y-J. Chung, C-D Hsiao, W-R. Chang, I. Kuo, J. Perozich, R. Lindahl, J. Hempel, B-C. Wang, *The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold,* *Nature structural biology*, (1997), **4**, 317-326.

Lohnes, D., M. Mark, C. Mendelsohn, P. Dollé, D. Decimo, M. Lemeur, A. Dierich, P. Gorry, P. Chambon, *Developmental roles of the retinoic acid receptors,* *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* (1995), **53**, 475-486.

Lotan, R., *Aberrant expression of retinoid receptors and lung carcinogenesis,* *Journal of the national cancer institute*, (1999), **91**, 989-991.

MacDonald, P.N., D.E. Ong, *Evidence for a lecithin-retinol acyl transferase activity in the rat small intestine,* *J. Biol. Chem.*, (1988), **263**, 12478-12482.

Mason, K. E., *Fœtal death, prolonged gestation, and difficult parturition in the rat as a result of vitamin A deficiency,* *Am. J. Anat.*, (1935), **57**, 303 - 349.

Mendelsohn, C., E. Batourina, S. Fung, T. Gilbert, J. Dodd, *Stromal cells mediate retinoid-dependant functions essential for renal development*, *Developmental biology*, (1999), **126**,1139-1148.

Mertz, J. R., E. Shang, R. Piantedosi, S. Wei, D. J. Wolgemuth, W. S. Blaner, *Identification and characterization of a stereospecific human enzyme that catalyzes 9-cis retinol oxidation. A possible role in 9-cis-retinoic acid formation*, *J. Biol. Chem.*, (1997), **272**, 11744-11749.

Moon R.C., L.M., Itri, *Retinoids and cancer*, *The retinoids*, Academic Press, Orlando, (1984), **2**, 327 – 371.

Moore S. A., H. M. Baker, T. J. Blythe, K. E. Kitson, T. M. Kitson, E. N. Baker, *A structural explanation for the retinal specificity of class I ALDH-enzymes*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, (1999), **463**, 27-58.

Moore, S. A., H. M. Baker, T. J. Blythe, K. E. Kitson, T. M. Kitson, E. N. Baker, *Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase : the structure reveals the basis for the retinal specificity of class I aldehyde dehydrogenases*, *Structure*, (1998), **6**, 1541-1551.

Napoli, J. L., *Biochemical Pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction*, *Clinical immunology and immunopathology*, (1996), **80**, S52–S62.

Napoli J.L., *Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism*, (1999), *BBA*, **1440**,139 – 162.

Napoli, J.L., K. P. posch, P. D. Fiorella, M. H. E. M. Boerman, *Physiological occurrence, biosynthesis and metabolism of retinoic acid: evidence for roles cellular retinol-binding protein (CRBP) and cellular retinoic acid-binding protein*

(CRABP) in the pathway of retinoic acid homeostasis, *Biomed & Pharmacother*, (1991), **45**, 131–143.

Napoli, J. L., M. H. E. M. Boerman, X. Chai, Y. Zhui, P. D. Fiorella, *Enzymes and binding proteins affecting retinoic acid concentrations*, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, (1995), **53**, 497–502.

Naylor, H. M., M. E. Newcomer, *The structure of human retinol-binding protein (RBP) with its carrier protein transthyretin reveals an interaction with the carboxy terminus of RBP*. *Biochemistry*, (1999), **38**, 2647 – 2653.

Nicke, B., E-O. Riedken, S. rosewicz, *Induction of RAR β mediates growth inhibition in retinoid resistant human colon carcinoma cells*, *Gut*, (1999), **45**, 51-57.

Niederreither, K., P. McCaffery, U. C. Drager, P. Chambon, P. Dolle, *Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type II (RALDH II) gene during mouse development*, *Mech. Dev.*, (1997), **62**, 67-78.

Ottonello, S., G. Suta, G. Mantovani, D. Cavazzini, G. L. Rossi, *Retinol bound to cellular Retinol-binding protein is a substrate for cytosolic retinoic acid synthesis*, *J. Biol. Chem.*, (1993), **268**, 27133-42.

Parker, S. Robert, *Carotenoids in human blood and tissues*, *Journal of nutrition*, (1989), **119**, 101-104.

Pawson, B. A., *History of retinoids*, *J. Am. Acad. Dermatol*, (1982), **6**, 577-582

Penzes, P., X. Wang, J. L. Napoli, *Enzymatic characteristics of retinal dehydrogenase type I expressed in Escherichia coli.*, *B.B.A.*, (1997), **1342**, 175-181.

Penzes, P., X. Wang, Z. Sperkova, J. L. Napoli, *Cloning of a rat cDNA encoding retinal dehydrogenase isozyme type I and its expression in E. Coli*, (1997b), *Gene*, **191**, 167-172.

Perozich, J., H. Nicholas, R. Lindahl, J. Hempel, *The big book of aldehyde dehydrogenase sequences*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, (1999), **463**, 1-7.

Perozich, J., H. Nicholas, B-C. Wang, R. Lindahl, *Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family*, *Protein Science*, (1999), **8**, 137-146.

Picard, E., C. Séguin, N. Menhoven, C. Rochette-Égly, J. Siat, J. Borelly, Y. Martinot, N. Martinot, J-M. Vignaud, *Expression of retinoid receptor genes and proteins in non-small-cell lung cancer*, *Journal of the national cancer institute*, (1999), **91**, 1059-1066.

Posch, K. C., R. D. Burns, J. Napoli, *Biosynthesis of all-trans-retinoic acid from retinal*, *J. Biol. Chem.*, (1992), **267**, 19676-19682.

Quadro, L., W.S. Blaner, D. J. Salchow, S. Vogel, R. Piantedosi, P. Gouras, S. Freeman, M. P. Cosma, V. Colantuori, M.E. Gottesman, *Impaired retinal fonction and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein*, *The Embo Journal* (1999), **18**, 4633-4644.

Raner, G. M., A. D. N. Vaz, M.J. Coon, *Metabolism of all-trans, 9-cis, and 13-cis isomers of retinal by purified isozymes of microsomal cytochrome P450 and mechanism-based inhibition of retinoid oxidation by citral*, *Molecular pharmacology*, (1996), **49**, 515-522.

Romert, A., P. Tuvendal, A. Simon, L. Dencker, U. Eriksson, *The identification of a 9-cis retinol dehydrogenase in the mouse embryo reveals a pathway for synthesis for 9-cis retinoic acid*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, (1998), **95**, 4404-4409.

Rongnoparut, P. , S. Weaver, *Isolation and characterization of a cytosolic aldehyde dehydrogenase-encoding cDNA from mouse liver*, *Gene*, (1991), **101**, 261-265.

Ross C., *Cellular metabolism and activation of retinoids: roles of cellular retinoid – binding proteins*, *Faseb J.*, (1993), **7**, 317 – 327.

Rout, U. K. , R. S. Holmes, *Isoelectric focusing studies of aldehyde dehydrogenases from mouse tissues :variant phenotypes of liver, stomach and testis isozymes*, *Comp. Biochem. Physiol.*, (1985), **81** , 647-651.

Rowe, A., *Retinoid X Receptors*, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, (1997), **29**, 275-278.

Ruberte, E., V. Friederich, G. Morris-Kay, P. Chambon, *Differential distribution patterns of CRABP I and CRABP II transcripts during mouse embryogenesis*, *Development*, (1992), **115**, 973–987.

Saari, J. C. L. Bredberg, G. G. Garwin, *Identification of the endogenous retinoids associated with three cellular retinoid-binding proteins from bovine retina and retinal pigment epithelium*, *J. Biol. Chem.*, (1982), **257**, 13329-33.

Semba, R.D., *The role of vitamin A and related retinoids in immune function*, *Nutrition Reviews*, (1998), **56**, 538 – 548.

Sommer, A., *New imperatives for an old vitamin A*, *J. Nutr.*, (1989), **119**, 96-100.

Sucov, H. M., R. M. Evans, *Retinoic acid and retinoic acid receptors in development*, *Molecular neurobiology*, (1995), **10**, 169-189.

Troen, G. W. Eskild, S. H. Fromm, L. M. DeLuca, D. E. Ong, S. A. Wardlaw, S. Reppe, R. Blomhoff, *Vitamin A-sensitive tissues in transgenic mice expressing*

high levels of human cellular retinol-binding protein type I are not altered phenotypically, J. Nutr., (1999), **129**, 1621-1627.

Van der Saag, P., *Nuclear retinoid receptors: mediators of retinoid effects*, European Journal of Clinical Nutrition, (1996), **50 (suppl.3)**, S24–S28.

Villarroya, F., M. Giralt, R. Iglesias, *Retinoids and adipose tissues : metabolism, cell differentiation and gene expression*, (1999), Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord., **23**, 1-6.

Wang, X., P. Penzes, J. L. Napoli, *Cloning of a cDNA encoding an aldehyde dehydrogenase and its expression in Escherichia coli*, J. Biol. Chem., (1996), **271**, 16288-16293.

Wei, S., V. Episkopou, R. Piantedosi, S. Maeda, K. shimada, M. E. Gottesman, W.S. Blaner, *Studies on the metabolism of retinol and retinal – binding protein in transthyretin-deficient mice produced by homologous recombination*, J. Biol. Chem., (1995), **270**, 866 – 870.

White, J.A., B. Beckett-Jones, Y.D. Guo, F.J. Dilworth, J. Bonasoro, G. Jones, M. Petkovich, *cDNA Cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450 (CYP26)*, J. Biol. Chem., (1997), **272**, 18538-18541.

White, J.A., Y.D. Guo, K. Baetz, B. Beckett-Jones, J. Bonasoro, K.E. Hsu, F.J. Dilworth, G. Jones, M. Petkovich, *Identification of the retinoic Acid-inducible All-trans-retinoic Acid 4-Hydroxylase*, J. Biol. Chem., (1996), **271**, 29922-29927.

Wolf, G., *A History of vitamin A and retinoids*, The FASEB J., (1996), **10** : 1102-1107.

Wolf, G., *A case of human vitamin A deficiency caused by an inherited defect in retinol-binding protein without clinical symptoms except night blindness*, Nutrition reviews, (1999), **57**, 258-60.

Wolf, G., *The intracellular vitamin A-binding proteins: An overview of their fonctions*, Nutrition Reviews, (1990), **49**, 1-12.

Xiao, J-H., B. Durand, P. Chambon, J. J. Boorhees, *Endogenous retinoic acid receptor(RAR)-retinoid X receptor(RXR) heterodimers are the major fonctional forms regulating retinoid responsive elements in adult human keratinocytes. Binding of ligands to RAR only is sufficient for RAR-RXR heterodimers to confer ligand-dependent activation of hRAR beta 2 /RARE(DR5)*, J. Biol. Chem., (1995), **270**, 3001-3011.

Yoshida, A., A. Rzhetsky, L. C. Hsu, C. Chang, *Human aldehyde dehydrogenase gene family*, Eur. J. Biochem., (1998), **251**, 549-557.

Zhang, Q-Y., G. Raner, X. Ding, D. Dunbor, M.J. Coon, L. S. Kaminsky, *Characterization of the cytochrome P450 CYP2J4: Expression in rat small intestine and role in retinoic acid biotransformation from retinal*, Archives of biochemistry and biophysics, (1998), **353**, 257-264.

Zhao, D., P. McCaffery, K. J. Ivins, R. L. Neve, P. Hogan, W. W. Chin, U. C. Droger, *Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase*, Eur. J. Biochem, (1996), **240**, 15-22.

Zou, C-P., W. K. Hong, R. Lotan, *Expression of RAR β is associated with inhibition of keratinization in human head and neck squamous carcinoma cells*, Differentiation, (1999), **64**, 123-132.

ANNEXE

COMPARAISON DES SÉQUENCES D'ACIDES AMINÉS DE :
(Labrecque 1995, Perozich 1999)

a : RALDH b : pb-ALDH c : mADH-2 d : hALDH-1

a : DADLDIAVEFAHHGVFYHQGQCCVAASRIFVEESVYDEFV
b : DADLDSAVEFAHQGVFFHQGQICVAASRLFVEESIYDEFV
c : DADLDIAVEFAHHGVFYHQGQCCVAASRIFVEESVYDEFV
d : DADLDNAVEFAHHGVFYHQGQCCIAASRIFVEESIYDEFV

↑
Acide aminé 301