

Université de Montréal

**Analyse cinétique des rétinaldéhydes déshydrogénases
recombinantes de type 3 et 4 de souris**

par
Aurélia Sima

Département de Nutrition
Faculté de Médecine

Mémoire présentée à la Faculté des Études Supérieures en vue d'obtention du grade de
Maître ès Sciences (M.Sc.) en Nutrition

Août, 2009

©Aurélia Sima, 2009

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :
Analyse cinétique des rétinaldéhydes déshydrogénases
recombinantes de type 3 et 4 de souris

Présenté par :
Aurélia Sima

a été évalué par un jury composé par les personnes suivantes :

Dr. Muhammad Zafarullah
Président-rapporteur

Dr. Pangala V. Bhat
Directeur de recherche

Dr. Sylvie Mader
Co-directeur de recherche

Dr. Jolanta Gutkowska
Membre du jury

Mémoire accepté: décembre 2009

SOMMAIRE

Les Rétinal déshydrogénases (RALDHs) catalysent irréversiblement la déshydrogénation du Rétinal en Acide Rétinoïque (AR) qui est impliqué dans l'embryogenèse et la différenciation tissulaire. Pour comprendre le rôle dans la biosynthèse de l'AR des RALDHs type 3 et 4 de souris, nous avons déterminé leurs propriétés cinétiques ainsi que leur comportement en présence de différents inhibiteurs.

Les tests enzymatiques sont effectués avec une préparation d'enzyme recombinante, tagguée avec 6 histidines, purifiée sur colonne Ni-NTA (Qiagen). L'activité enzymatique est évaluée en quantifiant la production d'AR par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inversée. Les constantes cinétiques ont été déterminées pour les isomères du rétinol tout-*trans*, 9-*cis* et 13-*cis*.

La RALDH4 catalyse les isomères 9-*cis* et 13-*cis* de rétinol, elle présente un faible K_M (3 μ M) pour les deux isomères et a une efficacité catalytique élevée pour le 9-*cis* rétinol 3.4 fois supérieure au 13-*cis* rétinol. La RALDH3 est spécifique au tout-*trans* rétinol avec un K_M de 4 μ M et une efficacité élevée.

β -Ionone, inhibiteur possible pour la RALDH4, inhibe l'activité avec le rétinol 9-*cis* et 13-*cis*, mais n'influence pas l'activité de la RALDH3. Le para-hydroxymercuribenzoïque (p-HMB) inhibe l'activité de deux isoenzymes. Le cation $MgCl_2$ augmente par 3 fois l'oxydation du rétinol 13-*cis* par la RALDH4, diminue l'oxydation du 9-*cis* rétinol et influence faiblement la RALDH3.

Ces données enrichissent les connaissances sur les caractéristiques cinétiques des RALDHs recombinantes de souris de types 3 et 4 et fournissent des éclaircissements sur la biogenèse de l'acide rétinolique *in vivo*.

Mots clés : acide rétinolique, aldéhyde déshydrogénase, Ni-NTA, HPLC, isomères de rétinol, rétinol déshydrogénases, β -Ionone

SUMMARY

Retinal dehydrogenases (RALDHs) catalyze the dehydrogenation of retinal into retinoic acids (RA) that are required for embryogenesis and tissue differentiation. This study sought to determine the detailed kinetic properties of 2 mouse RALDHs, namely RALDH3 and 4, for retinal isomer substrates, to better define their specificities in RA isomer synthesis.

RALDH3 and 4 were expressed as His-tagged proteins and affinity-purified. RALDH3 oxidized all-*trans* retinal with high catalytic efficiency but did not show activity for either 9-*cis* or 13-*cis* retinal substrates. RALDH4 was inactive for all-*trans* retinal substrate, exhibited high activity for 9-*cis* retinal oxidation, and oxidized 13-*cis* retinal with lower catalytic efficiency.

β -ionone, a potent inhibitor of RALDH4 activity, suppressed 9-*cis* and 13-*cis* retinal oxidation competitively, but had no effect on RALDH3 activity. The p-HMB inhibited the activity for both RALDH3 and RALDH4. The divalent cation $MgCl_2$ activated 13-*cis* retinal oxidation by RALDH4 by 3-fold, slightly decreased 9-*cis* retinal oxidation, and did not significantly influence RALDH3 activity.

These data extend the kinetic characterization of RALDH3 and 4, providing their specificities for retinal isomer substrates, which should help in determining their functions in the synthesis of RAs in specific tissues.

Keywords: Retinal isomers, retinal dehydrogenase, retinoic acids, HPLC, Ni-NTA, β -ionone.

TABLE DE MATIÈRES :

SOMMAIRE	III
SUMMARY	IV
LISTE DES TABLEAUX :	VIII
TABLE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	X
REMERCIEMENTS.....	XIII

CHAPITRE 1 : Revue de littérature

1. INTRODUCTION.....	2
2. METABOLISME DE LA VITAMINE A :.....	7
2.1. Sources :	7
2.2. Absorption:.....	7
2.3. Métabolisme, stockage et mobilisation du Rétinol dans le foie :.....	10
2.4. Transport des rétinoïdes dans le plasma aux tissus cibles :	11
3. PROTÉINES DE TRANSPORT DE RÉTINOÏDES.....	13
3.1. Fonctions des protéines de liaison de rétinoïdes	13
3.2. RBP4 protéine de transport du ROL	14
3.3. CRBPs : protéines de liaison du ROL cellulaire.....	14
3.4. CRABPs : protéines de liaison de l'acide rétinoïque cellulaire	15
4. ACIDE RÉTINOÏQUE	18
4.1. Fonctions de l'acide rétinoïque	18
4.2. Biosynthèse de l'acide rétinoïque	19

4.3. Enzymes impliquées dans le métabolisme de la vitamine A :	19
4.3.1. <i>Les alcools déshydrogénases à moyennes chaînes (ADHs)</i>	20
4.3.2. <i>Les alcools déshydrogénases à chaîne courte (SDRs)</i> :	24
4.4. Les enzymes impliquées dans l'oxydation du RAL :	25
4.4.1. <i>Les aldéhydes déshydrogénases</i> :	25
4.4.2. <i>RALDH de type 1</i> :	28
4.4.3. <i>RALDH de type 2</i> :	30
4.4.4. <i>RALDH de type 3</i> :	31
4.4.5. <i>RALDH de type 4</i> :	34
4.4.6. <i>Cytochrome P450</i> :	35
4.5. Catabolisme de l'acide rétinoïque :	36
5. ACTION CELLULAIRE DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE	38
5.1. Les récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïque :	39
5.2. Structure et fonctions :	39
5.3. Les RARs :	42
5.4. Les RXRs :	43
5.5. Les éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RARE) :	45
6. ACIDE RÉTINOÏQUE ET CANCER	48
6.1. Carcinomes	49
6.2. Leucémie aiguë promyélocytaire (APL)	51
6.3. Rétinoïdes et cancer. Perspectives :	54
7. HYPOTHÈSE ET OBJECTIF	56
7.1. Hypothèse :	56
7.2. Objectif :	57

CHAPITRE 2: Kinetic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase types 3 and 4 for retinal substrates

ABSTRACT	59
INTRODUCTION	60
MATERIALS AND METHODS	61
RESULTS AND DISCUSSION	63
ACKNOWLEDGEMENT	67
REFERENCES	68
FIGURE LEGENDS	70

CHAPITRE 3 : Discussion et conclusions générales

But.....	79
Discussion	79
Conclusions :	84
Perspectives :	87
BIBLIOGRAPHIE:	88

LISTE DES TABLEAUX :

CHAPITRE 1 : Revue de littérature

Tableau I : Caractéristiques et fonctions de quelques protéines de liaison aux rétinoïdes	17
--	----

CHAPITRE 2: Kinetic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase types 3 and 4 for retinal substrates

Table 1 : Kinetic parameters of RALDH3 and RALDH4 for Retinal isomers	77
--	----

CHAPITRE 3 : Discussion et conclusions générales

Tableau 2 : Effets de différents réactifs sur l'activité des mRALDH3 et 4.....	82
---	----

Tableau 3 : Activité des RALDHs avec différentes isomères de RAL	84
---	----

TABLE DES FIGURES :

CHAPITRE 1 : Revue de littérature

Figure 1.1: Isomères de rétinoïdes	5
Figure 1.2: Fonctions de la vitamine A chez l'homme et la femme	6
Figure 2.2: Mécanismes de digestion et absorption de la vitamine A	9
Figure 2.3: Absorption transport du ROL et RE dans le corps	12
Figure 4.2: Biosynthèse de l'acide rétinoïque.....	23
Figure 4.4.4: Représentation graphique du modèle de RALDH3 de souris	33
Figure 5.2.1: Structure des récepteurs nucléaires (A); Dimérisation des RNs (B) ; Diagramme de la structure de protéines RAR, leurs domaines fonctionnels et des sites de phosphorylation (C)	41
Figure 5.2.2: Répression/activation de récepteurs	42

CHAPITRE 2: Kinetic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase types 3 and 4 for retinal substrates

Figure 1: SDS-PAGE of purified recombinant RALDH3 and RALDH4.....	72
Figure 2: Rates of all- <i>trans</i> RA synthesis from all- <i>trans</i> retinal by RALDH3 (A), and 9- <i>cis</i> and 13- <i>cis</i> RA synthesis from respective retinal substrates by RALDH4 (B), with increasing protein concentrations.....	73
Figure 3: Kinetic saturation curves of RALDH3 (A) and RALDH4 (B) with retinal isomers	74
Figure 4: Competitive inhibition by β -ionone of 9- <i>cis</i> and 13- <i>cis</i> retinal oxidation catalyzed by RALDH4.....	75
Figure 5: Effects of MgCl ₂ on RALDH3 (A) and RALDH4 activities (B)	76

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADH	Alcool déshydrogénase
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AF	Fonction de transactivation
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
APL	Leucémie aiguë à promyélocytes
ApoB	Apolipoprotéine B
Apo-CRABP	CRABP non-lié à l'AR
Apo-CRBP	CRBP non-lié au ROL
AR	Acide Rétinoïque
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARDS	Syndrome de détresse respiratoire adulte
CEL	Ester carboxylique
Ch	Cholestérol
CM	Chylomicron
CMER	Chylomicron chargé d'ester de ROL
COUP-TF	Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor
CRABP	Protéine cellulaire liant l'acide Rétinoïque
CRAD	Cis-rétinol/androgen dehydrogenase
CRBP	Protéine cellulaire liant le rétinol
P450RA (CYP26)	Enzymes de la famille du cytochrome P450
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DR	Répétition directe
DTT	Dithiothreitol
ER (RE)	Ester de ROL
hALDH1	ALDH de l'humain
HDAC	Histone désacétylase
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
holo-CRABP	CRABP lié à l'AR
holo-CRBP	CRBP lié au ROL

HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
iLBP	Protéine de liaison intracellulaire
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranoside
K_M	Constante cinétique d'affinité de Michaelis-Menten
LBD	Domaine de liaison au ligand
LPT	Lipase pancréatique
LRAT	Lécithine : rétinol acide transférase
LRP	Récepteur relatif au LDL
MDR	Déshydrogénase/réductase à moyenne chaîne
MES	2-[N-Morpholino] ethanesulfonic acid
mRALDHs	Rétinal déshydrogénases de souris
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
Ni-NTA résine	Résine nickel- acide nitrilo-triacétique
p-HMB	Para-hydroxymercuribenzoic
PL	Phospholipide
PLB	Lipoprotéine lipase B
PLZF	Facteur de transcription
PML	Protéine nucléaire
PPAR	Récepteur de prolifération de peroxysomes
RAL	Rétinal
RALDH	Rétinaldéhyde déshydrogénase
rRALDH	Rétinaldéhyde déshydrogénase du rat
RAMBA	Agent de blocage de l'acide rétinoïque
RAR	Récepteur à acide rétinoïque
RARE	Élément de réponse à l'acide rétinoïque
RBP	Protéine plasmatique liant le ROL (Retinol binding protein)
REH	Rétinol ester hydrolase
RN	Récepteur nucléaire
ROL	Rétinol

RODH	Rétinol déshydrogénase/réductase
RLDL	Récepteur aux lipoprotéines de faible densité
RXR	Récepteur nucléaire X rétinoïque
SDR	Déshydrogénase/réductase à courte chaîne
SDS-Page	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TG	Triglycéride
TR	Récepteur nucléaire à l'hormone thyroïdienne
TRAIL	Tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand
TRIS	Trishydroxyméthylaminométhane
TTR	Transthyrétine
TZD	Thiazolidine
VDR	Récepteur nucléaire de la vitamine D
V_{max}	Vitesse maximale à saturation de substrat

REMERCIEMENTS

Je remercie Dr Bhat pour m'avoir donné l'occasion de réaliser ce projet de maîtrise. Ses connaissances, sa passion pour les sciences et pour le travail bien fait, ainsi que sa disponibilité et son humanité m'ont été d'une grande aide tout au long de ce parcours.

Je remercie aussi Dr Mader qui m'a permis d'acquérir des connaissances dans le domaine passionnant de la biologie moléculaire. J'ai toujours apprécié ses conseils et sa disponibilité, malgré son horaire chargé.

Un grand merci aux membres du laboratoire Dr Mader à IRIC qui m'ont donné l'envie d'apprendre, de continuer et d'investiguer. Merci à Maxime, Martine, Éric, Khalid et aux autres qui ont fait de cette expérience quelque chose d'extraordinaire.

Merci aussi aux membres du laboratoire 7-124, de l'Hôtel Dieu pour leur soutien, leur bonne humeur et leur collégialité. Merci, particulièrement, à mon collègue de l'équipe du Dr Bhat, Daniel, qui en bon compagnon a facilité l'accès aux appareils, surtout à l'HPLC.

À tous mes proches, à ma fille, Amélia, et à tous ceux qui ont cru en moi, je leur remercie sincèrement.

A mon père

CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

1. INTRODUCTION

La vitamine A et ses métabolites fait l'objet de beaucoup d'études depuis plusieurs décennies. Des études dans plusieurs disciplines : biologie moléculaire et cellulaire, dermatologie, oncologie et santé publique essayent d'élucider les rôles potentiels qu'ont les rétinoïdes. Malgré tout, il y a plusieurs aspects peu connus en ce qui concerne le métabolisme et les mécanismes d'action des rétinoïdes, ainsi que leurs rôles dans la physiologie et dans la pathologie (Blomhoff and Blomhoff 2006).

La vitamine A fait partie des vitamines liposolubles et elle se trouve dans l'alimentation. Plusieurs dérivés naturels et synthétiques de la vitamine A, possédant une activité biologique, sont groupés dans la famille de rétinoïdes (Miano and Berk 2000). La vitamine A de provenance naturelle vient de deux sources : les esters de ROL (ER) de source animale et les caroténoïdes (avec le composant le plus actif : β -carotène) de source végétale. Les formes actives de la vitamine A sont le rétinol (ROL), le rétinal (RAL) et l'acide rétinoïque (AR). La mise en réserve est faite sous forme d'esters de ROL dans le principal organe de stockage, le foie. Plusieurs isoformes de ces composés se trouvent dans l'organisme (**Figure 1.1**, page 5). L'orientation *cis* ou *trans* de la chaîne de carbone latérale, confère aux différents isomères des propriétés spécifiques. Tous les rétinoïdes ont dans leur composition chimique un cycle β -ionone, une queue isoprénoïde et un groupement polaire terminal. Selon l'état d'oxydation de la molécule, ce groupement est : hydroxyle pour le ROL, aldéhyde pour le RAL et carboxyle pour l'AR. Ces molécules sont sensibles à l'oxygène et à la lumière.

Le ROL est la forme de transport de la vitamine A dans l'organisme et est impliqué dans la reproduction. Sous l'influence de différentes enzymes (ADH, SDR) le ROL est oxydé en RAL (étape d'oxydation réversible) qui est oxydé à son tour en AR (étape oxydative irréversible catalysée par des RALDHs), le métabolite actif de la vitamine A. L'isomère 11-*cis* RAL est critique dans la fonction visuelle (Nojd et al. 2009) L'isomère tout-*trans* de l'AR est un des ligands pour les récepteurs nucléaires RARs et le 9-*cis* AR est un ligand pour les RARs et également les RXRs. Leur action biologique

est transmise par l'activation de ces récepteurs nucléaires qui permettent la régulation de l'activité transcriptionnelle et l'expression protéique des gènes cible. Ainsi ils sont impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire et dans l'embryogenèse. L'isomère 13-*cis* (isotrétionine), composé naturel retrouvé chez les Eucaryotes, dans le sang et les tissus humains (Blaner 2001), n'a pas la capacité de réguler l'activité des gènes. Il est utilisé comme agent dermatologique pour soigner le psoriasis et l'acné sévère (Thielitz et al. 2008). Les isomères d'AR n'ont aucun rôle dans la vision ni dans la reproduction (Mangelsdorf 1994). On retrouve aussi des effets de la vitamine A dans le système immunitaire (Kim 2008), la régénération des tissus épithéliaux de divers organes (Maden 2004, Niles 2003, Spinella et al. 2003), le traitement contre certains cancers (Moise et al. 2007) et dans le fonctionnement du cerveau (Luo et al. 2009).

Les rétinoïdes contrôlent les processus de différenciation cellulaire et de l'apoptose par la régulation de plusieurs gènes chez les vertébrés depuis l'embryogenèse jusqu'à la mort (Napoli 1996). Une carence ou un excès en vitamine A peut avoir des conséquences néfastes sur l'organisme. Une régulation de l'homéostasie des rétinoïdes est donc essentielle. Une hypovitaminose A entraîne chez le fœtus des malformations au niveau des systèmes cardiovasculaire, respiratoire, uro-génital, des membres et du cerveau allant jusqu'à la mort de l'embryon si la déficience est extrême. Quand les besoins nutritionnels ne sont pas atteints, la déficience clinique en vitamine A se caractérise par de graves problèmes oculaires (xérophtalmie).

Le déficit en vitamine A constitue un problème majeur de santé mondiale (dans plus de 120 pays), particulièrement chez les enfants d'Asie, Amérique du Sud et d'Afrique où l'alimentation est pauvre en carotène (Custodio et al. 2009, Jiang et al. 2008, Kalua et al. 2008, Pal and Sagar 2008, Vieira et al. 2008, Willard et al. 2009). Il est estimé qu'entre 140 et 250 millions d'enfants d'âge préscolaire ont une déficience subclinique en vitamine A, 3 millions étant cliniquement déficients. Chaque année, plus d'un million de décès pendant l'enfance sont associés à la déficience en vitamine A (WHO, 2003). Chez l'adulte le fonctionnement visuel et les processus biologiques de la reproduction sont affectés.

L'hypervitaminose A chez l'embryon a des effets tératogènes affectant les membres, les structures crânio-faciales, le système nerveux, la circulation, la peau et le cœur (Hathcock et al. 1990, Biesalski 1989). Chez l'enfant et l'adulte, l'excès de la vitamine A affecte la pression du liquide céphalo-rachidien entraînant la fatigue, des maux de tête, de la fièvre.

Selon beaucoup d'études la vitamine A est essentielle dans plusieurs processus biologiques et son implication est critique à plusieurs étapes (**Figure 1.2**, page 6). Elle a un rôle déterminant dans la prolifération cellulaire et la différenciation des tissus fœtaux. Elle est impliquée dans le maintien de l'intégrité des tissus épithéliaux de l'estomac, du petit intestin chez l'adulte (Sporn and Roberts 1984), dans la vision (Palczewski and Saari 1997), dans la modulation de la réponse immunitaire, la reproduction, l'hématopoïèse et le développement de la moelle osseuse (Sporn and Roberts 1994).

La vitamine A et ses métabolites sont utilisés dans le traitement de certaines maladies humaines et dans la prévention de certains cancers (Sporn and Suh 2000) incluant les leucémies (Montrone et al. 2009, Okuno et al. 2004, Warrell 1996), les tumeurs secondaires du cou et de la tête (Benner et al. 1994, Hong et al. 1990, Lee et al. 1993) et les cancers cervicaux (Abu et al. 2005). Depuis les années 80, de nombreuses études montrent que les effets biologiques observés sont dus à l'AR de par son rôle de ligand pour des récepteurs nucléaires (RARs et RXRs) et sa capacité de régulation de l'expression de différents gènes dans l'organisme.

Figure 1.1: Isomères de rétinoïdes (Creech Kraft et al. 1994)

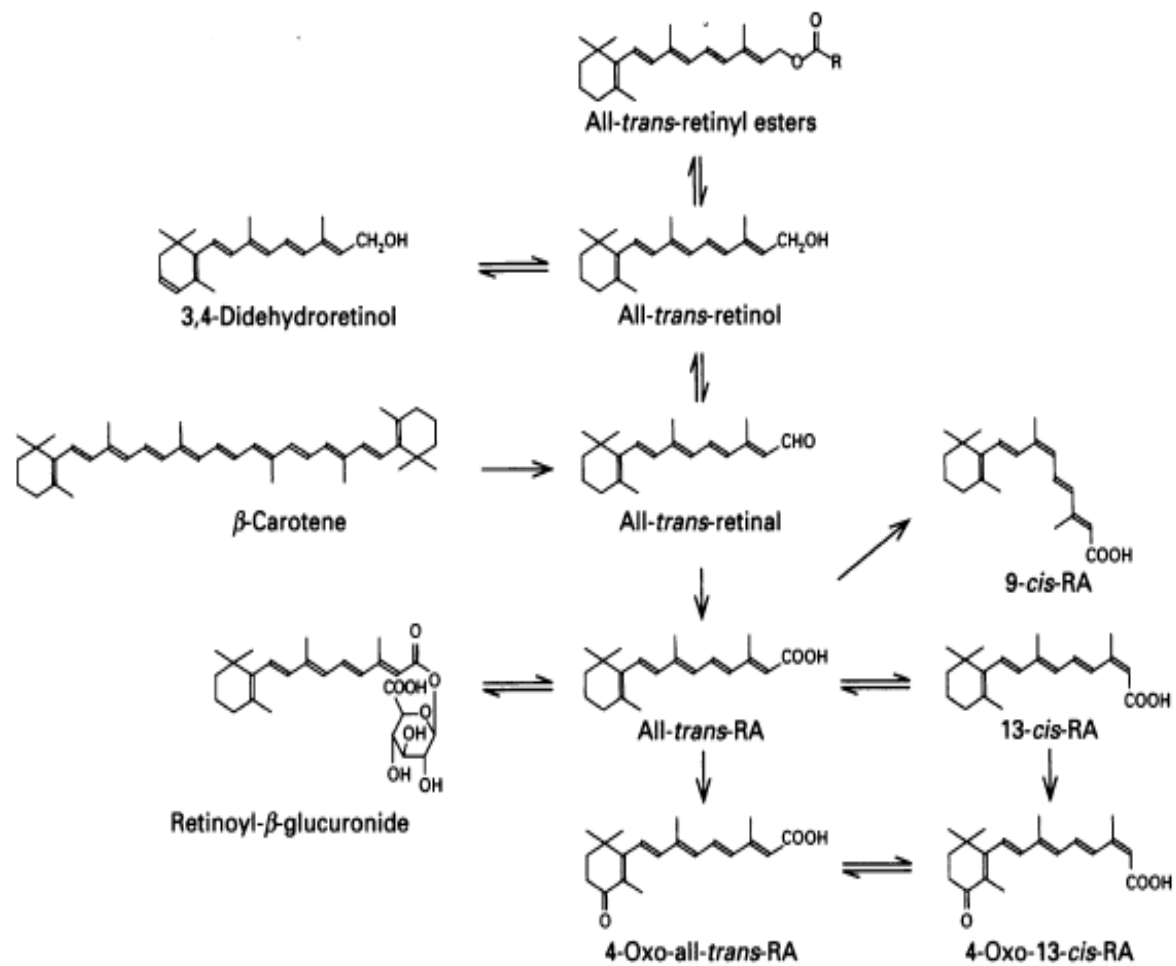
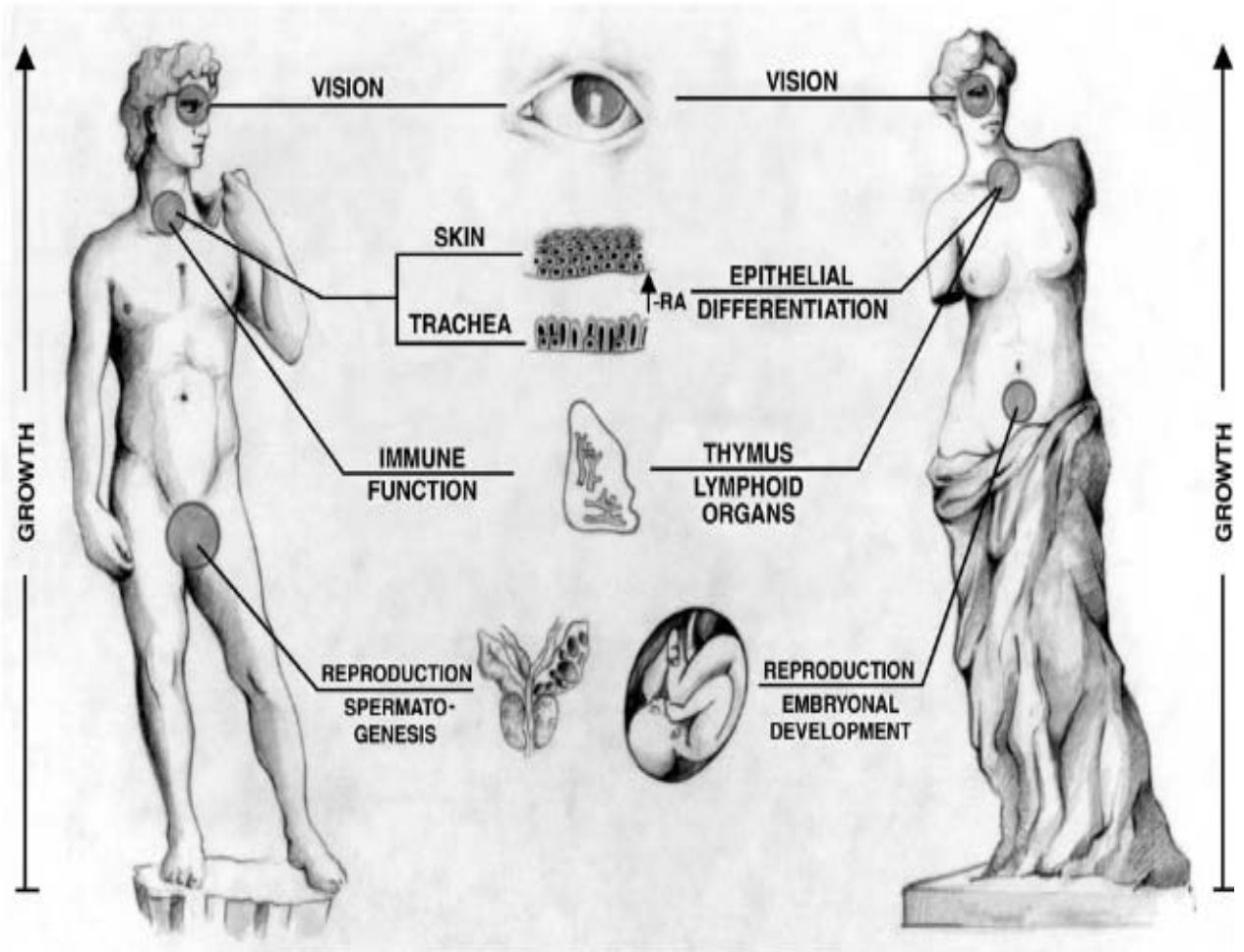


Figure 1.2. Fonctions de la vitamine A chez l'homme et la femme (Ross et al. 2000)



2. METABOLISME DE LA VITAMINE A :

2.1. Sources :

La vitamine A n'est pas synthétisée *de novo* par les animaux ou les humains. Les besoins en vitamine A sont assurés par l'ingestion à partir des sources végétales (caroténoïdes) ou animales (la vitamine A préformée dont les esters de rétinol et dans la moindre mesure Rétinol). L'Apport Nutritionnel de Référence en vitamine A est de 900 µg/jour. L'Apport Maximum Tolérable pour la vitamine A préformée est de 3000 µg/jour. Les caroténoïdes provenant de fruits et légumes verts et colorés et les esters de rétinol d'origine animale (spécialement du foie), les produits laitiers (beurre) et les œufs sont des précurseurs de ROL (Gottesman et al. 2001). Les produits fortifiés en vitamine A : lait, margarine, céréales pour petit déjeuner font également partie de cette catégorie. Les animaux et les plantes possèdent des enzymes pouvant cliver les caroténoïdes leur permettant ainsi d'obtenir des molécules biologiquement actives. (Exp. : les rétinoïdes pour l'animal) (Nagao 2004). De cette façon, les caroténoïdes, comme l' α et le β -carotène, β -cryptoxanthine, chez le poisson, le poulet, la souris et l'humain sont convertis en rétinol et en apocaroténoïdes (qui sont, par la suite, convertis en rétinoïdes), et ainsi les animaux obtiennent des composés actifs de la vitamine A par la diète.

L'être humain et les animaux peuvent se procurer aussi des ERs en mangeant des tissus animaux où il y a stockage des ERs après conversion des caroténoïdes. Dans les pays industrialisés 25-75% de l'apport en vitamine A provient des ERs et du ROL et le reste est assuré par les caroténoïdes (Harrison 2005).

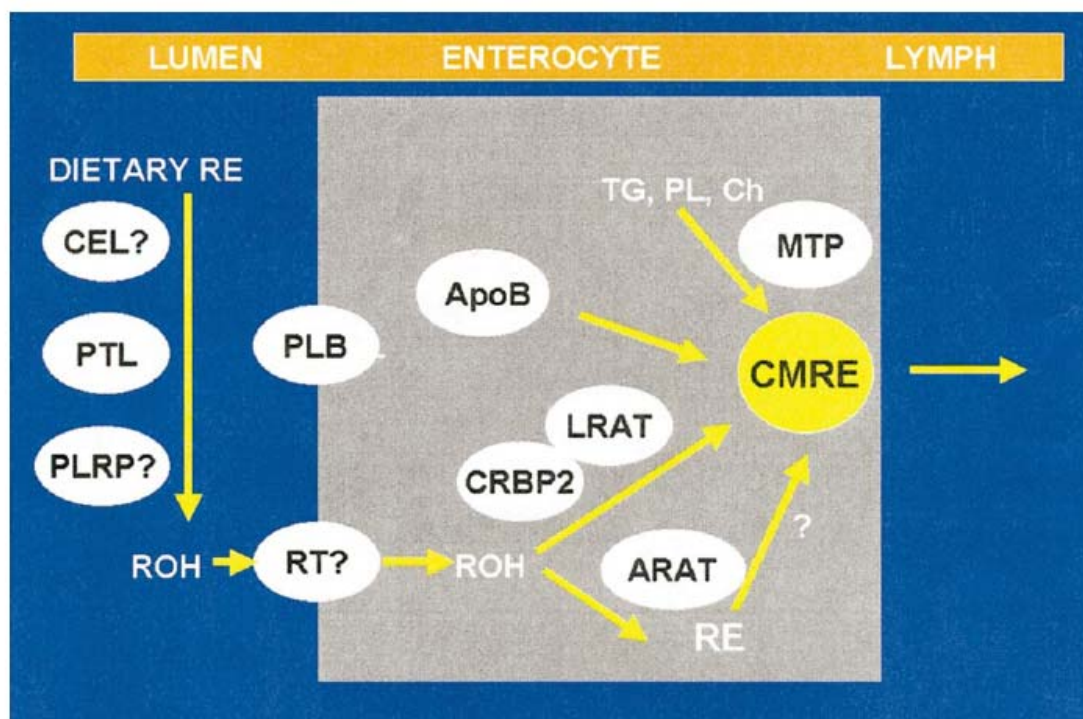
2.2. Absorption:

L'absorption des caroténoïdes se fait dans les entérocytes de l'intestin grêle par diffusion passive. Son efficacité s'accroît avec l'augmentation de l'apport. Des études

(Li and Tso 2003) ont montré un processus saturable *in vitro*. Le mécanisme de clivage de caroténoïdes a été identifié et étudié dès les années 1950 (Glover and Redfearn 1954) et les données plus récentes (Napoli and Race 1988, Yonekura and Nagao 2007) suggèrent un clivage asymétrique. Il en résulte deux molécules de β -apocarotène avec des chaînes de différentes longueurs. En fonction de leur longueur, ces molécules sont transformées en RAL ou AR par l'intervention catalytique des différentes enzymes. La **β , β carotène 9', 10'-dioxygénase**, enzyme responsable du clivage asymétrique du β -carotène et de la lutéine, a été identifiée et clonée récemment (Kiefer et al. 2001).

Les ERs sont hydrolysés dans la lumière intestinale par la triglycéride-lipase pancréatique (PTL) et par la phospholipase B de la bordure en brosse de l'intestin (PLB) (**Figure 2.2**, page 9). Le ROL libre passe dans les entérocytes, passage facilité probablement par un transporteur du ROL, non-identifié encore. Une fois dans la cellule, le ROL forme un complexe avec la protéine cellulaire de liaison au ROL (cellular rétinol-binding protein) de type 2 (CRBP2), complexe qui constitue le substrat pour la réestérification du ROL par l'enzyme : lécithine-rétinol acyltransférase (LRAT). Les ERs sont incorporés dans les chylomicrons (lipoprotéines intestinales) qui contiennent d'autres lipides : triglycérides (TG), phospholipides (PL), cholestérol (Ch) et cholestéryl esters (CEs) et apolipoprotéine B (apoB). L'incorporation d'une partie de ces lipides est dépendante de l'activité de la microsomal triglycéride transférase (MTP). Les chylomicrons (CM) qui contiennent les ERs nouvellement absorbés (CMRE) sont sécrétés dans la lymphe. Le ROL nonestérifié est aussi absorbé dans la circulation portale et son passage est probablement facilité par le même transporteur membranaire du ROL : Retinol transporter protein (RT), non-identifié (Harrison 2005). Dans la lymphe, ces lipoprotéines vont être entraînées dans la circulation générale.

Figure 2.2. Mécanismes de digestion et absorption de la vitamine A (Harrison, 2005)



PTL:	triglycéride-lipase pancréatique
PLB:	phospholipase B
LRAT:	lécithine-rétinol acyltransphérase
CRBP2:	protéine cellulaire de liaison du Rétinol
TG:	triglycérides
PL:	phospholipides
Ch:	cholestérol
CEs:	cholestéryl esters
apoB:	apo-lipoprotéine B
MTP:	protéine microsomale de transfert de triglycérides (microsomal triglycéride transfer protein)
CM:	chylomicrons
CMRE:	chylomicrons qui contiennent les ERs nouvellement absorbés
RT:	transporteur membranaire du ROL (Retinol transporter protein)
ROH:	rétinol

2.3. Métabolisme, stockage et mobilisation du Rétinol dans le foie :

Par le système lymphatique, le CM est acheminé dans le foie. Dans les hépatocytes, les ERs sont hydrolysés par les enzymes rétinyl-ester hydrolases et le ROL ainsi produit s'associe à la protéine de liaison du ROL, la CRBP de type I. Le complexe ROL-CRBP I est réestérifié par la LRAT et emmagasiné dans les cellules stellaires hépatiques sous forme de gouttelettes lipidiques ou relâché dans la circulation sanguine (Harrison 2005). Le ROL subi plusieurs fois, dans les hépatocytes, un processus de recyclage (hydrolyse, sécrétion, estérification, emmagasinage) avant son utilisation finale. Le ROL non-estérifié se lie à la RBP, protéine se trouvant en grande concentration dans les hépatocytes, et le complexe sera sécrété dans le plasma. La RBP est associée à la protéine transthyréline (TTR) (Zanotti and Berni 2004). La TTR sert à prévenir la filtration glomérulaire du complexe ROL-RBP. Le complexe ROL-RBP-TTR est internalisé dans les cellules cibles (Collins and Mao 1999, Zanotti and Berni 2004)

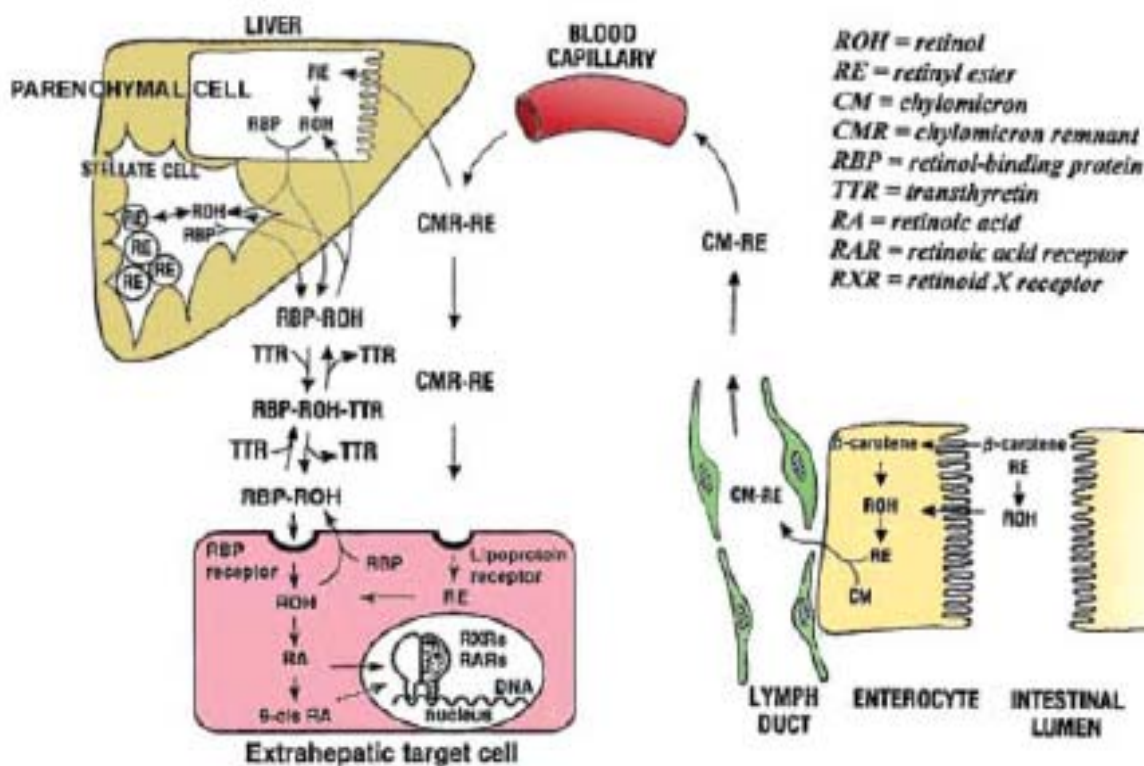
Le foie de mammifères stocke 50-80% du ROL, incluant les ER, les cellules étoilées renferment 90-95% du ROL présent dans le foie (Senoo 2004). La réserve hépatique de vitamine A peut subvenir au besoin de l'organisme entier pendant plusieurs mois (Blomhoff et al. 2006). L'assimilation extra-hépatique des résidus du CM est importante dans l'acheminement des ERs et caroténoïdes vers différents tissus comme la moelle osseuse, les cellules sanguines périphériques, la rate, les tissus adipeux, les muscles squeletales et les reins (Paik et al. 2004). (**Figure 2.3**, page 12)

2.4. Transport des rétinoïdes dans le plasma aux tissus cibles :

Pour être excrété dans la circulation sanguine, il est essentiel que le ROL soit lié à son transporteur plasmatique, la protéine de liaison du ROL, RBP. (Gottesman et al. 2001) Le complexe ROL-RBP, de faible poids moléculaire, s'associe, dans le plasma, à une autre protéine, la transthyréline (TTR) dans un rapport équimolaire 1 :1. Cette association empêchera le complexe ROL-RBP d'être éliminé par les reins par filtration glomérulaire (Wei et al. 1995, Zanotti and Berni 2004)

La CRBP-I (et l'homologue CRBP-II) et la LRAT ont une expression importante dans les cellules étoilées du foie. Ces protéines ont un rôle essentiel dans le stockage des ERs (Batten et al. 2004). Les concentrations plasmatiques du ROL lié au RBP dans le sang sont strictement régulées à 2 $\mu\text{mol/L}$. La grande capacité de stockage du foie et le contrôle de la mobilisation des ERs par les cellules étoilées assurent une concentration physiologique constante du ROL dans le plasma sanguin, malgré les fluctuations de l'ingestion de vitamine A, pendant la journée. (Soref et al. 2001) Le mécanisme responsable de la mobilisation du ROL par les cellules étoilées reste à être élucidé. (**Figure 2.3**, page 12) Dans les situations de déficit sévère en vitamine A ou des maladies liées à son métabolisme, il n'y a plus de régulation du niveau ROL-RBP (de Pee and Dary 2002).

Figure 2.3 : Absorption transport du ROL et RE dans le corps (Blomhoff et Blomhoff 2006)



ROH : Rétinol

RE : Rétinyl-esters

CM : Chylomicron

CMR : Chylomicron rémanent

RBP : Protéine de liaison au Rétinol (Retinol binding protein)

TTR : Transthyrétine

RA : Acide Rétinoïque

RAR : Récepteur à l'Acide Rétinoïque

RXR : Rétinoïde X Récepteur

3. PROTÉINES DE TRANSPORT DE RÉTINOÏDES

Plusieurs protéines sont impliquées dans le transport des rétinoïdes, dans le plasma, au niveau intracellulaire ainsi qu'intercellulaire. Le transport du ROL dans le sang jusqu'aux cellules cibles est assuré par la retinol binding protein (RBP). Dans les cellules, le ROL, le RAL et l'AR se lient à des protéines cellulaires qui les solubilisent, augmentant leur affinité comme substrat. Ces protéines jouent aussi un rôle de protection en liant le ROL libre car ce dernier, en excès, peut déstabiliser la structure membranaire et affecter sa fonction (Blomhoff 2006). Elles sont les «cellular retinol-binding protein» (CRBP), de type I et II, et les «cellular retinoic acid-binding protein» (CRABP), de type I et II (Gottesman et al. 2001). Elles font partie d'une famille de protéines cytosoliques, hautement conservée chez les mammifères, liant de petits ligands hydrophobiques comme les rétinoïdes (Ong 1994).

3.1. Fonctions des protéines de liaison de rétinoïdes

Les protéines de liaison du ROL (CRBPs) et les protéines de liaison à l'acide rétinoïque (CRABPs) protègent les rétinoïdes des interactions non spécifiques et des dégradations. En se liant à ces protéines, le ROL et l'AR seront protégés des oxydations non enzymatiques, des enzymes métaboliques opportunistes et de l'isomérisation. Le rôle de ces protéines est aussi de garder des concentrations intracellulaires de rétinoïdes très basses pour protéger les cellules de propriétés détergentes des rétinoïdes libres, qui peuvent détruire l'intégrité (structure-fonction) de la membrane plasmique en s'intercalant dans la bicouche lipidique (Napoli 1996) Les complexes CRBP-rétinoïdes constituent des substrats spécifiques pour les enzymes de l'oxydation du ROL.

3.2. RBP4 protéine de transport du ROL

Il est connu depuis plusieurs décennies que le ROL est transporté dans le plasma, lié à une protéine spécifique, la RBP. Kanai et collaborateurs a démontré en premier ce fait en 1968. (Kanai et al. 1968) La RBP, petite protéine de 21 kDa, possède une poche hydrophobique destinée à lier et protéger la molécule liposoluble du ROL (Zanotti and Berni 2004). Elle appartient à la famille de protéines lipocalines de même que nombreuses autres protéines de liaison pour molécules liposolubles, comme le cholestérol et les odorants (Newcomer and Ong 2000).

La RBP est principalement synthétisée dans les cellules parenchymateuses du foie et, dans une quantité moindre, dans quelques autres tissus (Soprano et al. 1986). Initialement, il a été considéré que la RBP hépatique et extra-hépatique est responsable du recyclage du ROL dans le plasma, mais ce rôle est mis en question. Des études récentes ont établi que la RBP est essentielle pour la mobilisation du ROL hépatique dans le plasma et pour l'apport cellulaire du ROL dans la rétine, surtout quand il y a une petite disponibilité alimentaire en vitamine A.

3.3. CRBPs : protéines de liaison du ROL cellulaire

CRBP-I et CRBP-II sont deux protéines cytoplasmiques qui lient le ROL. Il y a 56% d'identité d'acides aminés de ces deux protéines chez le rat (Li et al. 1986). CRBP-I ainsi que LRAT sont hautement exprimées dans les cellules étoilées du foie et, ensemble, ont un rôle essentiel dans le stockage des ERs dans ces cellules (Batten et al. 2004). Dans le foie et les autres tissus, CRBP-I contrôle l'estérification-déestérification du ROL, l'oxydation du ROL en RAL jusqu'à la formation de l'AR (Ballardini et al. 2009). Dans la synthèse de l'AR, CRBP-I peut se lier au ROL et au RAL lui permettant de livrer le ROL et le RAL à leurs déshydrogénases respectives d'une manière spécifique par interaction directe protéine-protéine. Elle ne semble pas essentielle à la

synthèse de l'AR pendant le développement, car des études sur des souris «knock-out» pour ce gène ne montrent pas de malformations congénitales associées à une déficience en AR. Cependant, une réduction notable est observée dans les réserves d'ER dans le foie qui serait due au fait que l'estérification du ROL par l'enzyme LRAT n'est pas aussi efficace avec le ROL libre qu'avec celui lié au CRBP (Ghyselinck et al. 1999).

L'expression de CRBP-I est ubiquitaire mais elle est plus abondante dans les tissus connus pour le métabolisme des quantités considérables de vitamine A (Ong 1994). Chez l'humain et le rat, elle est exprimée principalement dans le foie, les reins, les poumons, les testicules et la peau (Franzoni et al. 2002).

CRBP-II est impliquée dans l'absorption du ROL intestinal et dans l'estérification du ROL en ER dans les entérocytes (Matsuura et al. 1997). L'expression de CRBP-II est exclusive aux cellules de la muqueuse du petit intestin où elle se retrouve dans une concentration élevée (1% des protéines solubles totales) (Ong 1994). CRBP-II semble avoir un rôle important dans le processus initial d'absorption du ROL provenant de l'alimentation (Li and Norris 1996). CRBP-II lie *tout-trans* ROL, *tout-trans* RAL, mais ne lie pas le *tout-trans* RA. L'expression de CRBP-I est stimulée par les rétinoïdes, pendant que celle de CRBP-II est inhibée (Blaner et al. 1986).

CRBP-I et CRBP-II sont deux petites protéines (15 kDa) de quatre CRBPs identifiées (Folli et al. 2002). CRBP-III et IV sont exprimées dans les tissus extra-intestinaux et ont un rôle connu moins important. CRBP-III et LRAT sont nécessaires pour l'incorporation des ERs dans le lait (Blomhoff and Blomhoff 2006).

3.4. CRABPs : protéines de liaison de l'acide rétinoïque cellulaire

Les deux formes de CRABP présentent une homologie en acides aminés de 72%. L'expression de la CRABP-I est ubiquitaire et possiblement régulée par l'AR, tandis que celle de la CRABP-II est plus limitée (dans la peau, l'utérus et les ovaires) et stimulée

par l'AR dans plusieurs tissus (Kato et al. 1985). Les deux protéines, d'une très petite taille, vont lier l'AR et ensemble passeront la membrane nucléaire pour livrer l'AR au noyau (Takase et al. 1986, Takase et al. 2000). Les CRABPs solubilisent et protègent leur ligand du milieu aqueux cytosolique. Il est suggéré que ces protéines ont un rôle de tampon en séquestrant l'AR dans le cytoplasme en favorisant son catabolisme et ainsi empêcher qu'un excès de ligand arrive jusqu'au noyau. L'AR lié au CRABP sert de substrat aux systèmes enzymatiques de la famille de P450 qui oxydent l'AR, en régularisant sa concentration intracellulaire. Une possible explication pour l'atténuation du signal induit par l'AR, est la localisation spécifique de CRABP à l'intérieur de la cellule. Elles se trouvent uniquement dans le compartiment cytoplasmique de cellules et, malgré leurs petites tailles, ne peuvent pas se rendre librement dans le noyau. Cette barrière physique empêche l'AR de traverser, en excès, la membrane nucléaire pour atteindre les RARs et initier une réponse transcriptionnelle (Ruff and Ong 2000).

Les deux isoformes, CRABP-I et CRABP-II, ont un modèle d'expression tissulaire différent selon le type de cellules et les différents stades du développement. Elles sont largement exprimées dans l'embryon mais elles ne coexistent jamais dans la même cellule (Maden 1994). Leur rôle physiologique n'est pas très bien connu puisque des souris «Knock out» pour les deux gènes ont un développement embryonnaire et post-natal normal, sont fertiles et ont une espérance de vie normale. Il a été proposé la possibilité de l'existence d'une autre protéine hydrophobique de liaison inconnue qui serait capable à certains degrés de substituer les CRABPs. Mais l'étude de Lampron (Lampron et al. 1995) démontre qu'il n'y a pas de redondance entre CRABP-I et II ou une autre protéine inconnue car le double mutant est normal et aucune activité supplémentaire de l'AR n'a été détectée. Ces protéines ont été trop bien conservées pendant l'évolution et cela suggère un rôle important dans le métabolisme de la vitamine A, pas encore élucidé.

Les caractéristiques et fonctions des protéines de liaison aux rétinoïdes sont résumées dans le **Tableau I**, p.23.

Tableau I : Caractéristiques et fonctions de quelques protéines de liaison aux rétinoïdes d'après Noy (Noy 2000))

Protéine	Famille	Masse moléculaire (kDa)	Ligand	Fonctions physiologiques
RBP	Lipocaline	21.0	ROL	Transporteur du ROL
CRBP-I	iLBP	15.0	ROL	Holo-CRBP substrat pour LRAT Apo-CRBP stimule REH et inhibe LRAT
CRBP-II	iLBP	15.0	ROL RAL	Holo-CRBP substrat pour LRAT et RAL réductase
CRABP-I	iLBP	14.0	AR	Holo-CRABP substrat pour le métabolisme de l'AR Séquestre l'AR
CRABP-II	iLBP	14.0	AR	Même que CRABP-I mais avec une affinité différente pour l'AR

4. ACIDE RÉTINOÏQUE

4.1. Fonctions de l'acide rétinolique

La distribution tissulaire de l'AR, pendant le développement, est contrôlée étroitement et définie en fonction de l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse et le catabolisme de l'AR. L'AR est le métabolite actif de la vitamine A jouant un rôle déterminant dans l'embryogenèse, la différenciation cellulaire, immunité et cancers. C'est un puissant modulateur de la formation des axes embryonnaires et du maintien du phénotype des tissus épithéliaux chez l'adulte (Morriss-Kay and Sokolova 1996). L'AR est une de premières molécules définies comme morphogénétiques, molécules signalétiques produites localement mais qui ont une action à distance sur des tissus cibles, action dépendante de leur concentration (Eichele and Thaller 1987). Des centres morphogènes pour l'AR tout-*trans* sont générés par la synthèse localisée de l'AR à partir du RAL tout-*trans* catalysée par une des enzymes RALDHs et catabolisé par l'action de une de trois CYP26 (Reijntjes et al. 2005). Pour comprendre le rôle de morphogène de l'AR il faudra, semble-t-il, identifier où et quand l'AR est synthétisé et catabolisé en examinant la distribution de ces enzymes et aussi en déterminant à quel point ces enzymes régularisent la concentration en AR (Blomhoff and Blomhoff 2006).

De par son rôle de ligand pour les récepteurs nucléaires spécifiques RARs et RXRs, l'AR régule l'expression de plusieurs gènes. L'homéostasie de l'AR est hautement contrôlée dans les tissus cibles via l'expression des enzymes de la synthèse et du catabolisme de l'AR, car un excès ou une déficience en AR engendre des conséquences biologiques graves, surtout pendant l'embryogenèse (Petkovich PM 2001).

4.2. Biosynthèse de l'acide rétinoïque

L'AR *tout-trans* et *9-cis* est biosynthétisé dans les cellules des tissus cibles, par deux étapes d'oxydation enzymatique, à partir du ROL et en passant par le RAL, qui est le métabolite intermédiaire. La première étape, l'oxydation du ROL en RAL est réversible, et implique des enzymes de deux familles distinctes : les alcool-déshydrogénases (ADH) et les déshydrogénases/réductases à chaîne courte (SDR). L'étape d'oxydation du RAL en AR est irréversible et implique des aldéhydes-déshydrogénases cytosoliques (ALDH) et des enzymes de la famille du cytochrome P450 (aldéhyde-oxydases : AOX). L'AR produit est utilisé ou dégradé en produits inactifs par des enzymes de la famille des cytochromes P450 dont les plus efficaces et spécifiques sont les CYP26A1, B1, C1 (Duester et al. 2003, Napoli 1999) (**Figure 4.2**, page 23). Ces réactions enzymatiques sont facilitées par les protéines de liaison aux rétinoïdes, les CRBPs et les CRABPs.

4.3. Enzymes impliquées dans le métabolisme de la vitamine A :

Plusieurs enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'AR à partir du ROL ont été identifiées, isolées, purifiées et caractérisées (Bhat and Samaha 1999). Ces déshydrogénases appartiennent à quatre familles ayant des origines ancestrales distinctes (Duester 2000) Les déshydrogénases qui catalysent réversiblement l'oxydation/réduction du ROL en RAL et qui font partie de la famille des alcool-déshydrogénases ou déshydrogénases/réductases à moyenne chaîne (ADHs) et de la famille des déshydrogénases/réductases à chaîne courte (SDRs). Les déshydrogénases qui catalysent l'oxydation du RAL en AR font partie de la famille des aldéhydes déshydrogénases (ALDHs) et du cytochrome P450. Dans la même famille du cytochrome P450 il existe aussi des enzymes de dégradation de l'AR en métabolites polaires, les CYP26.

La compilation des données actuelles sur les connaissances des rétinoïdes-déshydrogénases, indique l'existence des 17 formes nonorthologues : 4 ADHs, 8 SDRs

et 4 ALDHs, 8 formes étant conservées entre l'humain et la souris. Des données suggèrent que les ADHs: ADH1, ADH3 et ADH4 et SDRs: RDH1, RDH5, RDH11, CRAD1, CRAD2, CRAD3 et retSDR1 catalysent l'oxydation du ROL en RAL (Duester et al. 2003). Plusieurs SDRs (RoDH1, RoDH4, CRAD1 et CRAD2) ont comme substrat préférentiel les androgènes, ce qui suggère leurs fonctions dans le métabolisme des androgènes mieux que dans celui des rétinoïdes. L'oxydation du RAL en AR est catalysée par les ALDHs: RALDH1-4, qui ont des spécificités par rapport aux isomères de RAL comme substrat (Gagnon et al. 2002, Lin M. et al. 2003, Niederreither et al. 2002b). Les séquences en acides aminés de ces enzymes sont conservées entre les humains et les rongeurs.

4.3.1. Les alcools déshydrogénases à moyennes chaînes (ADHs)

La superfamille des alcools déshydrogénases à moyenne chaîne (MDRs) avec ~ 350 résidus d'acides aminés, comprend les alcools déshydrogénases classiques du foie (ADHs; E1.1.1.1) les quinones réductases, léukotriène B4 déshydrogénase et plusieurs autres formes (présentement, il y a 10888 membres de la superfamille de MDR qui constituent des entrées dans la base de données UniProt). Les ADHs sont des métalloenzymes dimériques, dépendantes du Zn et codées par 25 gènes différents (en excluant les homologues proches) chez l'humain. Elles se trouvent dans la fraction cytosolique de la cellule. Il y a 5 classes différentes chez l'humain qui sont le résultat de la duplication de gènes pendant l'évolution des vertébrés. Le premier gène a été retracé il y a ~500 millions d'années à partir d'une lignée ancestrale de formaldéhyde déshydrogénase (Persson et al. 2008, Szalai et al. 2002).

Les ADHs catalysent l'oxydation réversible des alcools primaires, secondaires et cycliques dans les aldéhydes et cétones respectives. Chez les mammifères, elles sont groupées dans 6 classes distinctes en fonction de la similarité de leur séquence primaire et de leurs propriétés catalytiques. Les membres de différentes classes partagent 70% d'identité de séquence chez une même espèce (Szalai et al. 2002).

Il y a 5 classes des ADHs chez l'humain et les souris et ces gènes sont conservés dans les deux espèces, ce qui suggère que les ADHs ont des fonctions conservées chez les souris et les humains. Des études sur des souris knock-out pour les ADH I, III et IV démontrent l'évidence de ces fonctions dans le métabolisme du ROL *in vivo* (Parés et al. 2008). Les ADHs appartenant aux classes I et II sont responsables, en particulier, du métabolisme de l'éthanol hépatique chez l'humain et montrent une activité élevée avec le ROL. Chez les souris knockout en ADH I la toxicité du ROL augmente. Elles sont spécialement exprimées dans le foie (les trois isoformes humaines d'ADH I : ADH1A, 1B et 1G ont une expression plus importante par rapport à l'ADH II) Les ADHs de la classe III ont une affinité élevée pour les alcools primaires à longue chaîne, mais leur fonction principale est l'élimination du formaldéhyde. Elles agissent comme des déshydrogénases dépendantes du glutathion (Koivusalo et al. 1989, Persson et al. 2008).

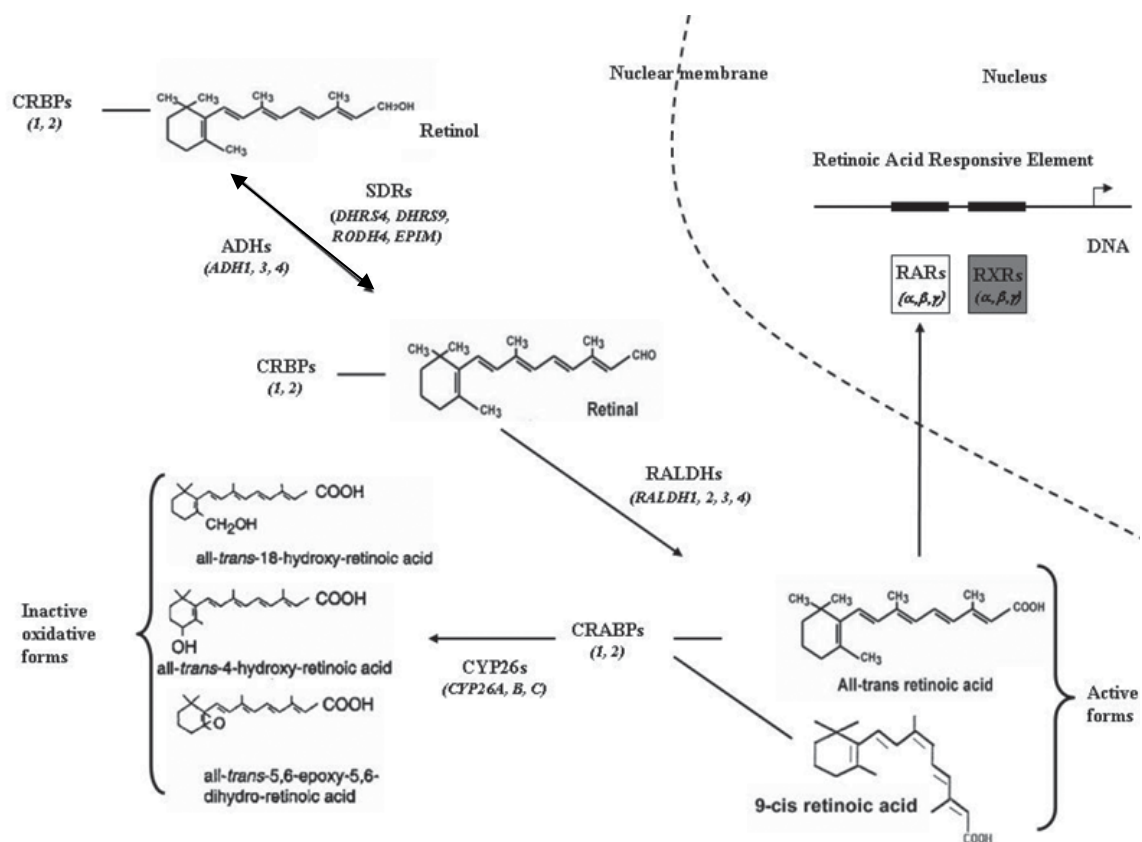
Plusieurs études récentes ont contribué à la caractérisation moléculaire des ADHs de classe IV. Les ADH IV de type humain ont une efficacité catalytique très élevée pour l'oxydation du ROL. Des études cinétiques et génétiques suggèrent que les ADH IV jouent 2 rôles physiologiques importants, comme contributeurs majeurs dans la première étape du métabolisme de l'éthanol dans l'estomac et comme participants dans la synthèse de l'AR. Les ADH IV sont exprimées dans les tissus épithéliaux, tels que la muqueuse du tractus gastro-intestinale, la cornée et l'endothélium des vaisseaux sanguins (Yin et al. 2003). Le meilleur substrat pour cette classe d'enzyme est le ROL 9-*cis* ce qui démontre fortement le rôle de la classe IV dans la synthèse du AR 9-*cis* (Crosas et al. 2000, Martras et al. 2004). Les classes V et VI sont peu définies et seulement identifiées par leur ARNm; elles ont été isolées chez l'humain et les rongeurs. La classe V est exprimé dans le foie du fœtus humain. Du fait de leur faible identité de séquence, elles ont été séparées dans deux autres classes (Höög et al.).

Les ADHs des classes I, III et IV sont les enzymes qui catalysent l'oxydation du ROL en RAL *in vitro*. Toutefois, le modèle d'expression des ADHs de classe IV colocalise avec celui de la biosynthèse de l'AR pendant les stades précoces du développement de la souris. Ces observations suggèrent que les ADHs de classe IV

pourraient être responsables de la production d'AR dans ces tissus (Ang et al. 1996a, Ang et al. 1996b). Cette classe d'enzyme présente une activité élevée comme ROL déshydrogénase ce qui suggère un rôle majeur dans l'oxydation du ROL dans les tissus où elle est exprimée (Parés et al. 2008).

Plusieurs études sur des souris knockout ADH I, III, ou IV, ont démontré que les fonctions d'ADH I ne se recouvre pas avec celles d'ADH IV dans la synthèse du l'AR. ADH I joue un rôle primordial dans la réduction de la toxicité de la vitamine A en facilitant le métabolisme du ROL en AR par le renouvellement des rétinoïdes (excrétion) tandis que l'ADH IV réduit les effets négatifs de la déficience en vitamine A en assurant un niveau suffisant d'AR produit par le métabolisme du ROL. Par contre, les fonctions des ADH I et ADH III vont se recouper quant à la protection contre la toxicité de la vitamine A. Les fonctions des ADH IV se recourent avec celles de l'ADH III pour protéger contre la déficience en vitamine A. Ces données désignent les ADH de classe III comme des ROL déshydrogénases polyvalentes (activité réduite, omniprésente) qui peuvent être suffisantes pour l'oxydation du ROL, en conditions de suffisance en vitamine A, alors que les ADH I et IV sont des ROL déshydrogénases spécialisées (activité élevée, tissus-spécifiques) dont les fonctions sont nécessaires seulement dans des tissus spécifiques dans des conditions extrêmes de vitamine A (Duester et al. 2003)

Figure 4.2. Biosynthèse de l'acide rétinéique (Nezzar et al. 2007)



4.3.2. Les alcools déshydrogénases à chaîne courte (SDRs) :

Les SDRs sont des alcools déshydrogénases-réductases à courte chaîne qui constituent une grande famille d'oxydoréductases NAD(P)(H)-dépendant. Elles ont des mécanismes similaires et partagent les mêmes motifs séquentiels. Ces enzymes ont ~ 250 aminoacides. SDRs ont des rôles critiques dans le métabolisme des lipides, acides aminés, hydrates de carbone, cofacteurs, hormones et xénobiotiques et dans les mécanismes de détecteurs redox (Kavanagh et al. 2008). Elles catalysent les réactions d'oxydation réversibles utilisant NADP⁺ préférentiellement au NAD⁺. Leur activité catalytique ne dépend pas de la présence d'ions métalliques (Jörnvall et al. 1995).

Plusieurs enzymes microsomales de la famille des SDRs servent dans le métabolisme des rétinoïdes, des androgènes et des estrogènes. Ces sous-groupes incluent les ROL déshydrogénases (RoDHs) 1-3, les *cis*-ROL/ androgène déshydrogénases 1, 2 et 3 (CRAD), les retSDRs 1-4, 9/11-*cis*-ROL déshydrogénase et les 17β-hydroxystéroïde déshydrogénases (17β-HSD) type 6 et 9. Quelques-unes de ces SDRs sont spécifiques pour le ROL tout-*trans* (RoDH, retSDR, 17β-HSD 6 et 9) tandis que d'autres préfèrent les isomères 9 et/ou 11-*cis* ROL (CRAD, 9/11-*cis*-ROL déshydrogénases). CRAD2 ne reconnaît pas le ROL 9-*cis* comme substrat (Zhuang et al. 2002).

RDH1, RDH5, CRAD1, CRAD2, CRAD3 et retSDR1 sont capables d'oxyder le ROL en RAL *in vitro*. La RDH1 de souris est efficace avec le ROL tout-*trans* et 9-*cis* et a une expression intense et répandue dans les tissus embryonnaires et adultes chez la souris. Des cellules co-transfectées avec RDH1 et une des 3 isoenzymes RALDHs, synthétisent l'AR tout-*trans* à partir du ROL. Ces caractéristiques sont en concordance avec le fonctionnement de RDH1 dans la voie de la biosynthèse de l'AR, tôt, dans l'embryogénèse (Napoli 2001, Zhang M et al. 2001, Zhuang et al. 2002).

CRAD3 catalyse l'oxydation du ROL 9-*cis* en RAL 9-*cis* et présente une similarité de séquence d'acides aminés avec d'autres SDRs : CRAD1, CRAD2 et RDH4. Par rapport à la CRAD1, CRAD3 fait mieux la discrimination entre 9-*cis* ROL et tout-*trans*

ROL, comme substrat et présente une efficacité réduite comme androgène-déshydrogénase. Les tissus où CRAD3 s'exprime plus intensément sont le foie et les reins, deux tissus qui sont reconnus pour avoir une concentration élevée en rétinoïdes 9-*cis*. CRAD3 est aussi exprimée dans les testicules, les poumons, l'intestin grêle, le cœur et le cerveau. Ces données sont cohérentes avec la participation de la CRAD3 dans la biogénération de l'AR (Zhuang et al. 2002).

L'expression génique est spécifique à chaque isoenzyme au cours du développement. Il y a peu d'investigations génétiques concernant les SDRs, exceptant la RDH5 qui joue, potentiellement, un rôle important dans la voie du RAL 11-*cis*, donc dans le cycle visuel. La RDH5 ne semble avoir aucun rôle dans la synthèse de l'AR *in vivo*. Plusieurs SDRs (RoDH1, RoDH4, CRAD1 et CRAD2) ont comme substrats préférentiels les androgènes suggérant ainsi un rôle dans le métabolisme des androgènes plutôt que dans celui des rétinoïdes (Duester et al. 2003).

4.4. Les enzymes impliquées dans l'oxydation du RAL :

4.4.1. Les aldéhydes déshydrogénases :

Les aldéhydes déshydrogénases (ALDHs) sont une superfamille des enzymes NAD^+ dépendantes qui catalysent l'oxydation d'un large spectre d'aldéhydes exogènes et endogènes en acides carboxyliques. Les ALDHs ont été identifiées dans la quasi-totalité des génomes analysés ce qui indique leur importance dans les fonctions biologiques des espèces vivantes. Dans le génome humain ont été identifiés 19 gènes fonctionnels putatifs ainsi que 3 pseudogènes. Les ALDHs sont des protéines multifonctionnelles, possédant des propriétés catalytiques et non-catalytiques y compris l'hydrolyse des esters, des propriétés antioxydants, bioactivation xénobiotique et l'absorption des UVs (Vasiliou and Nebert 2005). Des mutations dans ces gènes et des erreurs congénitales subséquentes dans le métabolisme des aldéhydes, créent les bases moléculaires pour plusieurs maladies : le syndrome de Sjögren-Larsson, l'hyperprolinémie de type II,

l'acidurie gamma-hydroxybutirique et la crise pyridoxine-dépendante. Les ALDHs ont un rôle important dans l'embryogénèse et le développement, dans la neurotransmission, le stress oxydative et le cancer (Marchitti et al. 2008).

Les ALDHs se distinguent entre elles de par leurs propriétés physico-chimiques et enzymologiques, leur localisation cellulaire et leur distribution tissulaire (Pietruszko 1983, Yoshida et al. 1998). Parmi leurs fonctions il y a la détoxification de l'organisme par élimination des aldéhydes de source endogène et exogène (Jakoby and Ziegler 1990). Les aldéhydes endogènes résultent du métabolisme des acides aminés, des hydrates de carbone, des stéroïdes, lipides et vitamines. Celles exogènes proviennent des produits pharmacologiques qui génèrent des intermédiaires métaboliques (aldéhydes).

L'arbre phylogénétique révèle que les gènes ALDH humains dérivent de 4 gènes ancestraux existant avant la séparation des Eubactéries des Eucaryotes. L'organisation intron-exon indique que les gènes ALDH ont évolués à partir d'un gène ancestral commun qui aurait subi par la suite, des insertions introniques (Rzhetsky et al. 1997). La famille des ALDH1A humaine comporte 3 gènes : ALDH1A1-3. Il semblerait que l'ALDH1A3 s'est départi en premier de l'arbre commun. Les trois ALDH1A humains sont localisés sur 2 chromosomes, ALDH1A1 sur le chromosome 9 et les ALDH1A2 et ALDH1A3 sur le chromosome 15 où ils sont séparés par 43 Mb (Cañestro et al. 2009).

Les protéines ALDHs (EC 1.2.1.3) se divisent en 3 classes selon leur séquence en acides aminés. Elles comportent essentiellement 500 acides aminés et contiennent une cystéine catalytique dans leur site actif. Les classes I et II possèdent 60-70% d'identité de séquence, participent au métabolisme de l'éthanol et d'autres alcools (Yoshida et al. 1998). La classe III oxyde les aldéhydes aliphatiques et partage 25% d'identité de séquence avec les classes I et II (Perozich et al. 1999a). Les classes I et II forment des homotétramères et la classe III forme des homodimères (Hempel et al. 2003). Les ALDHs de la classe I sont des enzymes cytosoliques omniprésentes dans plusieurs tissus de mammifères. Elles présentent une affinité très grande pour le RAL comme substrat et jouent un rôle vital dans l'oxydation du RAL tout-*trans* ainsi que du RAL 9-*cis*.

Les ALDH de classe II et III ne possèdent pas cette activité catalytique (Montplaisir et al. 2002). Les ALDHs de classe II existent dans la matrice mitochondriale de plusieurs tissus, le niveau d'expression le plus grand se trouvant dans le foie. Leur rôle principal semble être le métabolisme des acétaldéhydes, ayant une grande activité dans l'oxydation de ces composants. L'ALDH mitochondriale de classe II est responsable du 65% du métabolisme des acétaldéhydes, alors que la forme cytosolique (ALDH1) catalyse seulement 20% des acétaldéhydes générées pendant l'oxydation de l'éthanol (Ehrig et al. 1990, Jelski and Szmitkowski 2008).

Les ALDHs de classe III jouent un rôle mineur dans l'oxydation des acétaldéhydes, mais sont considérées comme des enzymes générales dans l'élimination des aldéhydes biogénétiques et xénobiotiques toxiques, telles que celles présentes dans les monoamines, les diamines et les polyamines. Elles participent aussi dans le métabolisme des aldéhydes générées pendant le processus de lipoperoxydation des membranes.

Les rétinal déshydrogénases (RALDHs), membres des ALDHs de classe I, oxydent le RAL en AR. Il y a 4 types de RALDHs cytosoliques trois de la famille 1: la RALDH de type 1 (RALDH1), la RALDH de type 2 (RALDH2), la RALDH de type 3 (RALDH3) et une de la famille 8 : la RALDH de type 4 (RALDH4). Ces 4 isoformes participent à la biosynthèse de l'AR dans différents tissus (Bhat et al. 1996, Lin M and Napoli 2000, McCaffery and Dräger 1997, Romand et al. 2006). Leur expression spatio-temporelle est spécifique à chaque type leur conférant des rôles biologiques distincts (Hsu et al. 2000). L'expression de la RALDH2 survient tôt dans le développement et précède celle de la RALDH1, RALDH3 et RALDH4 qui s'expriment dans les stades plus tardifs, pendant la différenciation des tissus et organes. Dans le foie embryonnaire de souris (jour 14.5), l'ARNm de RALDH4 s'exprime intensément, contrairement à l'ARNm de la RALDH1 peu exprimé. Il n'y a pas d'expression d'ARNm de RALDH2 et 3 dans cet organe (Lin M. et al. 2003, Niederreither et al. 2002b).

L'alignement des séquences d'acides aminés de 4 RALDH de souris montre des régions semblables indiquant des similarités des fonctions. Ces régions des peptides

conservés sont impliquées dans la liaison du coenzyme et du ligand et dans l'activité catalytique. Les 3 RALDH de la famille 1 sont composées de 13 exons et la jonction de leurs introns-exons est identique (Hsu et al. 2000) tandis que la RALDH4 compte seulement 7 exons. L'alignement des séquences primaires des 145 ALDHs a permis l'identification de 23 résidus et les motifs essentiels qui sont conservés dans la superfamille des ALDH. Ces résidus, comme une cystéine dans le site actif, sont indispensables dans le maintien de la structure de la protéine et de l'activité catalytique (Perozich et al. 1999b). Les 4 RALDH présentent les sites actifs hautement conservés, avec les 23 résidus. Elles ont des identités de séquences entre 67 à 71%, pour les RALDH de la famille 1, tandis que la RALDH4 a moins de 50% d'identité de séquence.

4.4.2. RALDH de type 1 :

Les 2.1 kb de l'ADNc du gène de la RALDH de type 1 code pour une protéine de 501 acides aminés (Bhat et al. 1995). Elle est exprimée différemment selon les espèces. Une importante expression dans les tissus comme les reins, les poumons, les testicules, l'intestins, l'estomac, la trachée et aussi dans le foie de rat a été observée par le laboratoire du Dr. Bhat en 1995. Il y a une identité de séquence de 96% avec l'ALDH1 de souris, et 87% avec celle humaine (Bhat et al. 1995). La RALDH1, appelée aussi E1, ALDH1A1, Adh-2 et ALDH1 est fortement exprimée dans la rétine dorsale des embryons et dans plusieurs tissus épithéliaux adultes (Haselbeck et al. 1999, Luo et al. 2006). La RALDH1 recombinante de souris est active avec les isomères tout-*trans* et 9-*cis* du RAL, catalysant l'oxydation en AR tout-*trans* et 9-*cis*, avec une efficacité catalytique similaire (7.37-10.6). Elle ne présente aucune activité avec l'isomère 13-*cis* du RAL (Gagnon et al. 2003, Labrecque et al. 1995).

Plusieurs études ont démontré le rôle important de la RALDH1, dans la synthèse de l'AR. Elle semble être essentielle dans la différenciation des cellules épithéliales de l'estomac et des intestins (Frota-Ruchon et al. 2000). L'expression de la RALDH1 dans la rétine dorsale à été proposée comme étant associée à la synthèse de l'AR dans ce

tissu. Ceci suggère une fonctionnalité dans la production de l'AR nécessaire dans le modèle dorsoventrale de l'œil et dans le circuit axonal des cellules ganglionnaires de la rétine lorsqu'elles étendent leurs axones dans le cerveau (Wagner et al. 2000). La surexpression de la RALDH1 de souris ou de grenouilles dans l'embryon du *Xenopus* mène à une synthèse prématurée de l'AR durant l'embryogenèse ce qui prouve l'évidence que cette enzyme a, en effet, un rôle dans la production de l'AR *in vivo*. (Ang and Duester 1999). Les conclusions sont controversées puisque des études sur des souris knockout RALDH1, ont montré des effets mineurs dans la rétine dorsale et les projections axonales, suggérant ainsi que l'enzyme n'est pas essentielle dans la synthèse de l'AR dans plusieurs tissus (Duester et al. 2003).

L'expression de la RALDH1 se maintient après la naissance et elle est forte dans le rein adulte, suggérant un rôle dans la maturation et les fonctions de celui-ci. Il y a aussi une augmentation postnatale d'expression dans l'estomac et une diminution dans l'intestin du rat. Une déficience en vitamine A augmente la régularisation d'expression de la RALDH1 dans l'estomac et l'intestin (Bhat 1998, Bhat et al. 1998). La RALDH1 est exprimée entre le 9^{ème} et le 10^{ème} jour de la gestation et l'expression protéique se situe dans le mésencéphale, la rétine, le thymus et les vésicules optiques (Haselbeck et al. 1999). Elle est retrouvée pendant le développement des poumons surtout au niveau de l'épithélium bronchique et trachéal et montre une expression à des stades spécifiques dans l'estomac, l'épithélium et les couches mésenchymateuses des intestins et, plus faiblement, dans le foie (Niederreither et al. 2002b).

L'ALDH de type 1, appartenant à la classe I des ALDHs, est une protéine très conservée entre les espèces. Elle présente une identité de séquence en acides aminés de 87% entre l'humain et la souris (Hsu et al. 1999) et de 76% entre la souris et la grenouille (Moore et al. 1998). Des études génétiques démontrant l'implication de la RALDH1 dans la synthèse de l'AR *in vivo* sont nombreuses mais, malgré tout, le rôle de cette enzyme, à ce niveau, reste incertain. Une fonctionnalité possible ayant été proposée, serait l'implication de cette enzyme dans le catabolisme du ROL en excès (Blomhoff and Blomhoff 2006).

4.4.3. *RALDH de type 2 :*

La RALDH2, aussi nommée ALDH1A2, ALDH11 et V2, appartient à la famille 1 des ALDHs de classe I. Elle a été identifiée initialement dans la rétine ventrale de l'embryon de souris (Duester 2000). Elle partage 72% d'identité de séquence avec l'ALDH1 humaine. Sa caractérisation enzymatique démontre son activité avec 3 isomères du RAL : *tout-trans*, *9-cis* et *13-cis* avec une efficacité catalytique préférentielle pour le *tout-trans* (5.5 plus grande que pour le *9-cis* et 3 fois plus que pour le *13-cis*) (Gagnon et al. 2002). Les 3.14 kb de l'ADNc du gène de RALDH2 codent pour une protéine de 518 résidus d'acides aminés. La séquence en acides aminés a été conservée au cours de l'évolution présentant une identité de > 95% avec celles du rat et de la souris (Yoshida et al. 1998) et du poulet (Ono et al. 1998).

La RALDH2 est exprimée dans de nombreux types des cellules aussi bien embryonnaires que dans des tissus adultes. Elle est exprimée initialement pendant les stades précoces de l'embryogenèse chez la souris, à l'étape de la gastrulation au niveau des somites non différenciées. Elle a été mise en évidence au jour embryonnaire E7.5, quand l'AR commence à être détectable. Principalement, l'expression est localisée dans les cellules mésenchymales du mésoderme somitique, dans les membres différenciés, dans le bourgeonnement mésodermale du poumon, le cerveau antérieur (proscéphale) et dans le cœur (Niederreither et al. 1997). L'expression précoce de la RALDH2 dans le mésoderme suggère un rôle pour l'AR dans la formation de l'axe de rotation de l'embryon. La RALDH2 est, de ce fait, une excellente candidate pour examiner les voies de synthèse embryonnaire de l'AR dans plusieurs sites, partout dans l'embryon.

Des études sur des souris knockout RALDH2 révèlent que les embryons meurent le 10^{ème} jour de la vie embryonnaire, sans formation d'axe de rotation ni présence d'AR. Une administration d'AR à la mère, entre le jour 7 et 10, va sauver les embryons qui vont se développer normalement (Mic et al. 2002, Niederreither et al. 2002a). Dans ces études de récupération, il a été découvert que d'autres enzymes additionnelles qui génèrent l'AR (RALDH1 dans la rétine dorsale, RALDH3 dans plusieurs structures de

l'œil, etc.) commencent à s'exprimer à partir du jour 8.75, donc l'administration d'AR pour les souris RALDH2^{-/-} n'est plus nécessaire après le jour 10 (Mic et al. 2002). Il est ainsi démontré clairement le rôle essentiel de la RALDH2 dans la croissance et le développement embryonnaire. Ses fonctions dans la synthèse de l'AR, tôt dans le développement, suggèrent qu'elle est la seule enzyme à fournir de l'AR à ce stade précoce. La RALDH2 oxyde préférentiellement le RAL ($K_m=0.7\mu\text{M}$) comparativement à l'acétaldéhyde ($K_m=645\mu\text{M}$) à un pH de 8.

4.4.4. RALDH de type 3:

La RALDH de type 3, est aussi nommée ALDH1A3, V1 et ALDH6. Dans les embryons de souris et poulet, elle est exprimée dans la rétine ventrale, dans le pigment épithélial de la rétine dorsale et dans les organes olfactifs et optiques. Elle s'exprime dans le bourgeonnement de l'uretère et de l'ectoderme pendant le développement de la partie antérieure du cerveau. La RALDH3 de souris partage 70% d'identité de séquence la RALDH1 de souris et 71% avec la RALDH2 (Mic et al. 2000). RALDH3 est aussi conservée entre les espèces, montrant une identité de séquence de 94% entre celle de souris et celle humaine (initialement nommé ALDH6) (Yamauchi and Tata 2001).

Les 3.4kb de l'ADN complémentaire de la RALDH3, codent pour une protéine de 512 résidus d'acides aminés. Hsu et collaborateurs a identifié et caractérisé le gène de la RALDH3 (ALDH6) en 1994. L'existence de cette unique isoenzyme dans la salive humaine et son polymorphisme avait été démontrée auparavant. Des analyses Northern blot ont montré l'expression du gène d'ALDH6 à petite échelle dans quelques tissus et, à un niveau important, dans les glandes salivaires, l'estomac et les reins (Hsu et al. 1994). L'hybridisation *in situ* des embryons de souris et poulet a démontré l'expression de l'ALDH1A3 dans le développement sensoriel de neuroépithélium des yeux, nez oreilles et, d'une façon plus discrète, dans le système nerveux central (Grün et al. 2000)

Des études génétiques ont été faites sur des souris knockout pour élucider

l'importance de la RALDH3 dans l'embryogenèse, implicitement son rôle dans la synthèse de l'AR. Les souris nées ne sont pas viables et meurent 10 heures après la naissance suite à des défauts dans le développement nasal. Ceci prouve le rôle essentiel de la RALDH3 dans la synthèse de l'AR (Dupé et al. 2003). Cette malformation embryonnaire peut être prévenue avec un traitement d'AR donné à la mère. L'expression de la RALDH3, dans le développement du cerveau antérieur, a lieu tardivement et joue un rôle dans la neurogenèse (l'éminence latérale ganglionnaire-ELG commence le jour E12.5) Des études n'ont pas clarifié si l'AR contrôle l'expression des gènes importants impliqués dans le développement de cet organe (Molotkova et al. 2007). Par contre l'expression tardive de la RALDH3 dans la zone subventriculaire d'ELG est exigée dans l'activité de signalisation de l'AR dans la région ventrale du cerveau antérieur.

Chez les souris RALDH3^{-/-} l'expression du récepteur D2 de la dopamine est éliminée de façon définitive dans les noyaux accumbens en émergence. Les chercheurs ont conclu que le rôle de l'AR dans le développement du cerveau antérieur commence tard, en même temps avec l'expression de la RALDH3 initialisée dans la zone subventriculaire. (Molotkova et al. 2007). Ces observations indiquent que différents organes et cellules utilisent des mécanismes adaptés pour se procurer l'AR nécessaire (une ou l'autre des RALDHs) (Niederreither et al. 2002b). Comme les deux autres RALDHs de la famille ALDH1A, la RALDH3 catalyse irréversiblement l'oxydation du RAL en RA dans une réaction NAD⁺ dépendante. Elle est active uniquement avec le RAL tout-trans.

La RALDH3 semble jouer un rôle important dans le cancer. Plusieurs études ont démontré qu'une déficience d'expression de la RALDH3 peut avoir un impact crucial dans différents cancers. L'expression de la RALDH3 est réduite dans les cellules mammaires cancéreuses, MCF-7 (Rexer et al. 2001). L'ALDH1A3 est un de deux gènes (avec le type p53) qui voit son expression augmentée suite à l'induction dans des cellules cancéreuses dans le cancer humain de colon (Okamura et al. 1999). Des études sur des souches des cellules cancéreuses ainsi que sur des souris ont montré son importance dans la tumorigenèse mammaire, ainsi que dans le cancer gastrique (Han et al. 2005, Koch et al. 2007, Yamashita et al. 2006).

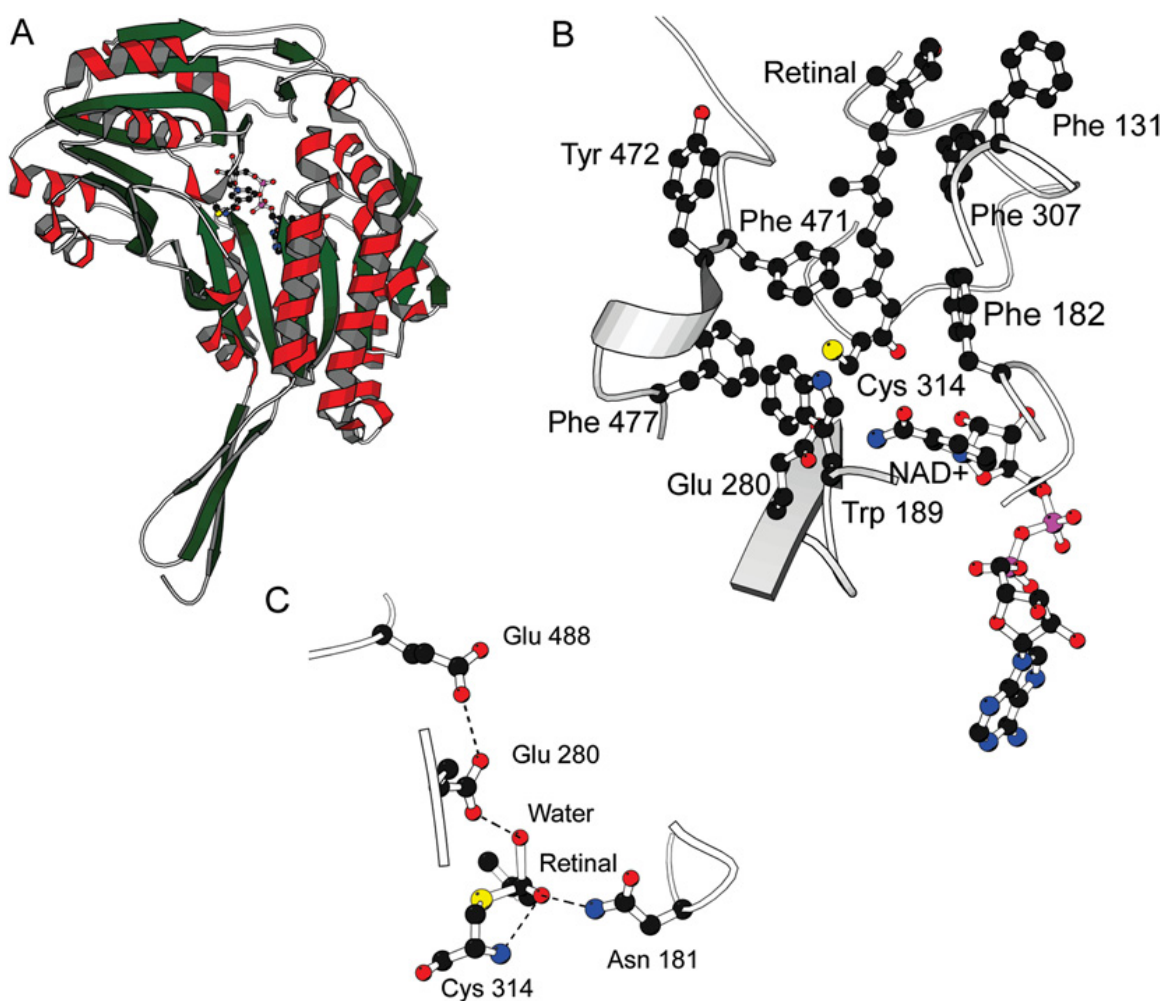
Figure 4.4.4. Représentation graphique du modèle de RALDH3 de souris :

A : structure de la RALDH3 qui montre le tunnel de liaison au substrat, avec la Cys314 (nucléophile) et le NAD⁺ dans le fond du tunnel;

B : Modèle de la liaison du RAL montrant le NAD⁺ et la Cys314. Aussi montrés les acides aminés hydrophobiques. L'anneau de la β -Ionone est situé au dessus du tunnel de liaison et peut interagir peu ou du tout avec l'enzyme;

C : L'état intermédiaire d'un modèle tétrahédral

(d'après Graham et al. 2006)



4.4.5. RALDH de type 4 :

La RALDH de type 4, une ALDH cytosolique, appartient à la classe I des ALDH, la famille ALDH8 membre 1. Elle est aussi nommée ALDH8A1 ou ALDH12 et a été identifiée dans le foie et le rein chez l'humain et les rongeurs. L'ADNc de la RALDH4 de souris, d'une longueur de 2.3 kb, code pour une protéine de 487 résidus d'acides aminés de même que l'ALDH12, l'orthologue humain. Elles présentent le motif invariable de 23 acides aminés, 4 régions conservées, le motif du cofacteur et le résidu de cystéine dans le site actif (Cys(287)), spécifiques aux membres de la superfamille des ALDHs. Le gène humain ALDH12 (ALDH8A1) a été localisé sur le chromosome 6 et présente 3 variantes. Il a été identifié chez d'autres espèces, notamment le rat et la souris avec une conservation d'identité de séquence évidente entre les espèces (>80%).

Il y a peu d'information sur la RALDH4, mais il est connu qu'elle est intensément exprimée dans les reins, le foie et modérément dans le cerveau, les glandes mammaires, la moelle épinière, thymus, les surrénales, les testicules, la prostate et le tract gastro-intestinal (Lin M and Napoli 2000, Marlier and Gilbert 2004). Elle participe à la biosynthèse de l'AR à travers l'oxydation du RAL avec une préférence distincte pour l'isomère 9-*cis* du RAL, ce qui est unique pour les RALDHs. L'ALDH8A1 métabolise aussi des aldéhydes aliphatiques incluant les acétaldéhydes ($K_m = 10.2$ mM), le décanal, l'octanal, l'hexanal, le propanal, l'activité augmentant avec la longueur de la chaîne du substrat. Elle présente de l'activité avec d'autres aldéhydes métaboliques importants comme la SSA et la glutaraldéhyde (Lin M and Napoli 2000).

L'étude de Lin et Napoli, 2003, sur la RALDH4 de souris, a montré l'affinité de cette enzyme pour le RAL 9-*cis* comme substrat. Auparavant la même équipe avait caractérisé l'ALDH8A1 humaine, aussi connue ALDH12, ainsi que la RALDH4 du rat. La RALDH4 de souris est un orthologue de l'ALDH12 humaine puisqu'elles partagent 90% d'identité de résidus d'acides aminés et ont un K_m similaire ($\sim 3 \mu M$) pour le RAL 9-*cis* et ne catalysent pas le RAL tout-*trans*.

La caractérisation du RALDH4 de souris enrichit la vision qu'on a à propos du métabolisme du ROL. Elle génère de l'AR dans des cellules intactes, en coopération avec trois SDRs de souris. Le modèle d'expression de l'ARNm et de la protéine RALDH4, diffère des autres RALDHs. Contrairement aux trois autres RALDHs, la RALDH4 est exprimée au jour E14.5 dans le foie des embryons de souris. Seulement la RALDH1 est faiblement exprimée à ce moment, tandis que les autres ne sont pas exprimées (Niederreither et al. 1997, Niederreither et al. 2002b). Cette intense expression tôt, pendant l'embryogenèse, suggère des fonctions dans le développement du foie fœtal. L'expression dans le foie et dans quelques cellules sanguines, prédit une contribution potentielle dans l'hémopoïèse fœtale. Les embryons de souris qui manquent de RXR α ont une expression en érythropoïétine diminuée et une érythropoïèse réduite entre les jours E10.25 et E14.5 (Makita et al. 2001). Ces observations peuvent faire penser à un mécanisme synergétique entre les effets de la vitamine A et le Fe sur l'érythropoïèse et le soulagement de l'anémie nutritionnelle (Suharno et al. 1993).

Les caractéristiques enzymatiques de la RALDH4, l'expression intense dans le foie fœtal, le modèle unique d'expression dans les reins adultes (deux tissus rapportés avec le plus haut taux des rétinoïdes 9-*cis* endogènes), comparativement aux RALDH1-3 suggèrent l'implication de la RALDH4 dans la voie de biosynthèse d'AR 9-*cis in vivo*.

4.4.6. Cytochrome P450 :

Les enzymes du cytochrome P450 ont en commun un thiolate comme ligand axial du fer au centre de l'hème. On trouve les cytochromes P450 dans la plupart des êtres vivants. Dans les mammifères, et notamment chez l'homme, on trouve les cytochromes P450 dans presque tous les tissus, sauf dans le muscle, les os, et les globules rouges. Les organes particulièrement riches en P450 sont le foie et les glandes surrénales. Le cytochrome P450 est la mono-oxygénase terminale d'une courte chaîne de transfert d'électrons. Il y a deux grandes classes de P450 : les microsomaux et les mitochondriaux (www.biochimie.univ-montp2.fr).

Certaines des enzymes microsomiales P450 peuvent catalyser l'oxydation irréversible du RAL en AR et d'autres dégradent l'AR en métabolites inactifs (Duester 1996). L'isoforme P450 1A1 (CYP26A1), exprimé dans le foie, est le plus actif dans le catabolisme de l'AR tout-*trans*, 9-*cis* et 13-*cis*. Les P450s 2B4 et 2C3 sont les plus actifs dans la 4-hydroxylation du RAL 9-*cis*, avec un taux de renouvellement 7 fois plus grand que le P450 1A1 (Raner et al. 1996). L'isoforme CYP2J4 produit l'AR à partir des isomères tout-*trans*, 9-*cis* RAL. Elle est exprimée dans le petit intestin du rat au niveau de la muqueuse intestinale et serait impliquée dans la métabolisation de la vitamine A provenant directement de l'alimentation (Zhang QY et al. 1998). Les enzymes de la famille CYP450, induites par l'AR, ont des fonctions importantes (dégradation de l'AR en excès) dans le maintien de l'homéostasie des rétinoïdes *in vivo*.

4.5. Catabolisme de l'acide rétinoïque :

L'équilibre entre la synthèse et la dégradation détermine la concentration de l'AR dans les tissus cible (Malpel et al. 2000). Le catabolisme de l'AR est un mécanisme important pour contrôler le niveau d'AR dans les cellules et les tissus. Les enzymes de la famille P450RA/CYP26 sont induites par l'AR, exprimées principalement dans les mêmes tissus que les enzymes impliquées dans la synthèse de l'AR (Wouters et al. 1992). Elles semblent convertir spécifiquement l'AR en produits hydroxylés, qui bloquent la voie de la signalisation de l'AR dans les cellules cibles (Formelli et al. 1996)

L'enzyme CYP26A1, une enzyme appartenant au cytochrome P450, clonée en premier en 1997 par White et collègues, est capable de dégrader l'AR. Les produits de dégradation sont des métabolites polaires, inactifs (AR 4-hydroxy, 4-oxo, 18-hydroxy, 5,6-époxy et 5,8-époxy). Swinden et coll. ont cloné cette enzyme chez l'humain, la souris, le rat et le poulet. CYP26A1 est présente à des niveaux élevés dans le foie, le duodénum, le colon et le placenta ainsi que dans quelques régions du cerveau (Lampen et al. 2001, Ray et al. 1997). Le gène CYP26A1 contient, dans la région en amont du promoteur proximal, un élément de réponse à l'AR fonctionnel qui indique l'induction de la transcription de ce gène par l'AR. Ces données laissent entendre l'existence d'un mécanisme à travers lequel le gène CYP26A1 est sensible à la concentration de l'AR et

régularise, en conséquent, le métabolisme oxydatif de l'AR tout-*trans* (Blomhoff and Blomhoff 2006). L'expression du CYP26A1 augmente davantage en présence de l'AR 9-*cis* que dans celle de l'AR tout-*trans* (Luo et al. 2006).

Une seconde enzyme du cytochrome P450, nommée CYP26B1, a été clonée par la suite. Les deux CYP sont exprimées dans des tissus différents, mais elles ont une activité catalytique similaire (White et al. 2000). La CYP26B1 est exprimée dans les testicules des souris et les gonades des poulets. Ensemble, avec la RALDH1 qui synthétise l'AR, elles régularisent le comportement spécifique au genre dans les cellules somatiques dans le développement des gonades chez la souris (Bowles et al. 2009). La CYP26B1 n'est pas détectable dans la rétine normale de la souris, mais est intensément activée dans les cellules ganglionnaires de la rétine (Luo et al. 2006).

La CYP26C1, clonée récemment s'exprime dans des cellules transfectées et convertit l'AR tout-*trans* en métabolites polaires hydrosolubles (Taimi et al. 2004). La CYP26C1 est semblable aux autres CYP mais catabolise l'AR 9-*cis* plus efficacement. Son expression n'est pas trop répandue dans les tissus adultes, mais elle semble être induite par l'AR. Les trois CYP s'expriment dans des tissus différents suggérant des rôles individuels pour chacune d'entre elles dans le catabolisme de l'AR (Reijntjes et al. 2004). La répression de la transcription du gène CYP26C1 par l'AR tout-*trans* montre un modèle neuronal différentiation-dépendante (Xi and Yang 2008). Dans le développement oculaire, son expression est aussi réprimée par l'AR (Luo et al. 2006).

La distribution spatio-temporelle de l'AR dans l'embryon résulte de la régulation de l'expression des RALDHs impliquées dans la synthèse de l'AR et des enzymes du cytochrome P450, les CYP26, qui métabolisent l'AR. Un excès ou une déficience en AR conduit à un large et complexe spectre d'anormalités embryonnaires. Des embryons des souris knockout en CYP26A1 meurent pendant la deuxième partie de la période de gestation. Les embryons montrent un nombre des défauts morphogénétiques : Spina-bifida, transformation des vertèbres cervicales, anomalies au rhombencéphale et de troncation de la queue et de la région lombo-sacrée (y compris les anomalies des reins, l'appareil urogénital, et l'intestin postérieur). Dans des cas extrêmes il a été observé de cas de «sirénomelia» ("queue de sirène") (Abu-Abed et al. 2001, Abu-Abed et al. 2002).

Le rôle essentiel de la CYP26A1 est celui de dégrader l'AR, dans des régions spécifiques, pour protéger l'embryon en formation d'un excès d'AR qui va initier des signalisations intracellulaires inappropriées.

Des souris double-mutant CYP26A1^{-/-} et RALDH2^{-/-} sont viables et ne présentent pas de malformations. Cette étude prouve l'évidence génétique de l'activité concurrentielle des RALDH2 et CYP26A1 pour maintenir l'homéostasie de l'AR. Les phénotypes résultant d'un effet délétère du gène CYP26A1 sont dus à une perte d'activité catabolique tissu-spécifique qui entraîne une augmentation de la quantité d'AR, plutôt qu'un déficit de signalisation intracellulaire initié par les métabolites hydroxylés (Niederreither et al. 2002c). La CYP26A1 et la RALDH2 établissent un niveau d'AR dans des sites spécifiques de l'embryon afin de permettre la formation normale des organes. Les CYP26 ont des fonctionnalités redondantes, mais leur rôle dans la régularisation du niveau de l'AR dans le développement normal des embryons, semble être bien établi.

5. ACTION CELLULAIRE DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE

L'AR est une hormone lipidique soluble similaire aux stéroïdes, aux hormones thyroïdiennes et à la vitamine D. Il est un ligand pour les récepteurs RARs et RXRs appartenant à la famille des récepteurs nucléaires aux stéroïdes et à l'hormone thyroïdienne (Million et al. 2001). Les RARs sont activés également par l'AR tout-*trans* et 9-*cis* tandis que les RXRs sont activés seulement par l'AR 9-*cis*. Pour être actifs, les RARs et les RXRs doivent former des dimères. Les RARs forment des hétérodimères avec les RXRs. Les RXRs peuvent former et des hétérodimères avec les RARs ou d'autres récepteurs, mais aussi des homodimères : RXRs/RXRs. Les homo et hétéro dimères agissent comme facteurs de transcription dépendant de leur ligand et interagissent avec leur élément de réponse à l'AR le RARE, qui est localisé dans la région promotrice de leurs gènes cibles (de Thé et al. 1990, Mangelsdorf et al. 1993).

5.1. Les récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïque :

Il y a une grande variété de gènes qui ont dans leurs régions promotrice RARE. Le RAR est un régulateur transcriptionnel de ces gènes. Le RXR est un co-régulateur des RARs ainsi que d'autres récepteurs nucléaires à hormones stéroïdiennes : TR, VDR, PPAR (McSorley and Daly 2000). Les RARs et RXRs sont codés par des gènes indépendants situés sur des chromosomes différents (Mangelsdorf 1994).

5.2. Structure et fonctions :

Les récepteurs à l'AR partagent des propriétés structurales et fonctionnelles communes aux récepteurs nucléaires, c'est-à-dire 6 domaines fonctionnels de A à F (**Figure 5.2.1.A** page 41). L'extrémité N-terminale, hautement variable, contient le domaine A/B qui est responsable de l'activation constitutive, de façon indépendante, du ligand, nommé «activation function A» (AF1). Ce domaine peut subir des modifications post-traductionnelles, tel qu'une phosphorylation.

Le domaine central (C), adjacent au domaine A/B, permet l'interaction spécifique avec les éléments de réponse présents sur le promoteur et constitue le domaine de liaison à l'ADN (DBD). Ce domaine est la région où l'homologie de séquence est la plus importante entre les différents récepteurs nucléaires. Il est composé de 66 à 68 acides aminés dont 9 résidus cystéine parfaitement conservés. Ce domaine contient 2 séquences riches en acides aminés cystéine, lysine et arginine, formant une structure en forme de doigt contenant un ion zinc. Le motif en doigt de zinc, retrouvé dans d'autres facteurs de transcription, permet au récepteur de se fixer sur la double hélice d'ADN. Ces structures sont très rigides, différentes selon la nature des ligands du zinc. Les motifs en doigts de Zn ne participent pas directement à la fixation de l'ADN, mais imposent une géométrie particulière à l'ensemble du domaine, permettant essentiellement la présentation d'une hélice se positionnant dans le grand sillon de l'ADN. Cette géométrie permet, probablement, l'interaction de ce domaine avec les domaines similaires de récepteurs nucléaires différents. Ceci explique l'effet coopératif des différentes hormones sur la

régulation de l'expression des gènes. Les deux hélices, provenant chacune de deux récepteurs différents, s'intègrent dans le grand sillon de l'ADN à un tour de distance (Pettersson and Gustafsson 2001).

Les éléments de réponse aux hormones (HRE) ciblent des séquences d'ADN spécifiques et se composent d'un motif de deux hexa-nucléotides AGGTCA ou de ses variantes, séparés par un écart de plusieurs nucléotides. La spécificité de liaison des récepteurs est réalisée par l'espacement (règle 3-4-5) et l'orientation de deux demi-sites (direct-, inversé- ou extroverti-répété) (Sonoda et al. 2008). (**Figure 5.2.1.B**, page 41)

Le domaine E possède une fonction d'activation de la transcription dépendante du ligand (AF2). Il permet la reconnaissance et la fixation spécifique du ligand (LBD) et la dimérisation du récepteur (homodimère ou hétérodimère). Il permet aussi l'interaction avec des co-activateurs et des co-répresseurs. Le domaine LBD comporte 12 hélices, la dernière se trouvant dans AF2. Entre le domaine C et le domaine E se trouve le domaine D, appelé région charnière, qui confère souplesse dans la structure des dimères de récepteurs, permettant au dimère d'interagir avec de multiples séquences de HRE. Dans la région C-terminale se trouve le domaine F, une région courte, très peu conservée, pas toujours présente et avec une fonction peu connue (Chambon 2005). (**Figure 5.2.1. A**, page 41)

Les RNs à l'AR, s'attachent à l'ADN, même en l'absence du ligand. L'arrivée du ligand modifie l'activité régulatrice exercée par le récepteur sur la transcription du gène cible. En absence du ligand (AR) les dimères de récepteurs à l'AR (RAR/RXR ou RXR/RXR) agissent comme répresseurs, mais dès que l'AR fixe les récepteurs, le dimère est activé et commence à stimuler la transcription des gènes sensibles à l'AR. La liaison du ligand dans la poche de liaison du ligand dans le LBD change la conformation du domaine AF2. Ceci se traduit par le détachement du complexe histone-désacétylases (HDAC)-corépresseur et le recrutement des histone-acétyl-transférases (HAT) et coactivateurs (Sonoda et al. 2007) (**Figure 5.2.2**, page 42). Trois sous-types existent pour chaque types des récepteurs RARs et RXRs : α , β , γ et l'existence de plusieurs isoformes pour chaque sous-types résulte de l'épissage alternatif des gènes transcrits (Gudas 1994).

Figure 5.2.1: Structure des récepteurs nucléaires (A); Dimérisation des RNs (B) (Sonoda et al. 2008); Diagramme de la structure de protéines RAR, leurs domaines fonctionnels et des sites de phosphorylation (C)(Rochette-Egly and Germain 2009) :

A : Structure des récepteurs nucléaires; **DBD : domaine de liaison à l'ADN**; **LBD: domaine de liaison au ligand**; **ZF1, ZF2 : doigts de Zn**; **Hinge : région charnière**

B : Formes de dimérisation des récepteurs et types des éléments de réponse aux hormones (**HRE**) ; **GR : glucocorticoïde** ; **XR : récepteur X** ; **RXR : rétinolde X récepteur** ; **ERR : récepteur orphelin**

C : Exemplification de la structure de récepteurs nucléaires avec les RARs

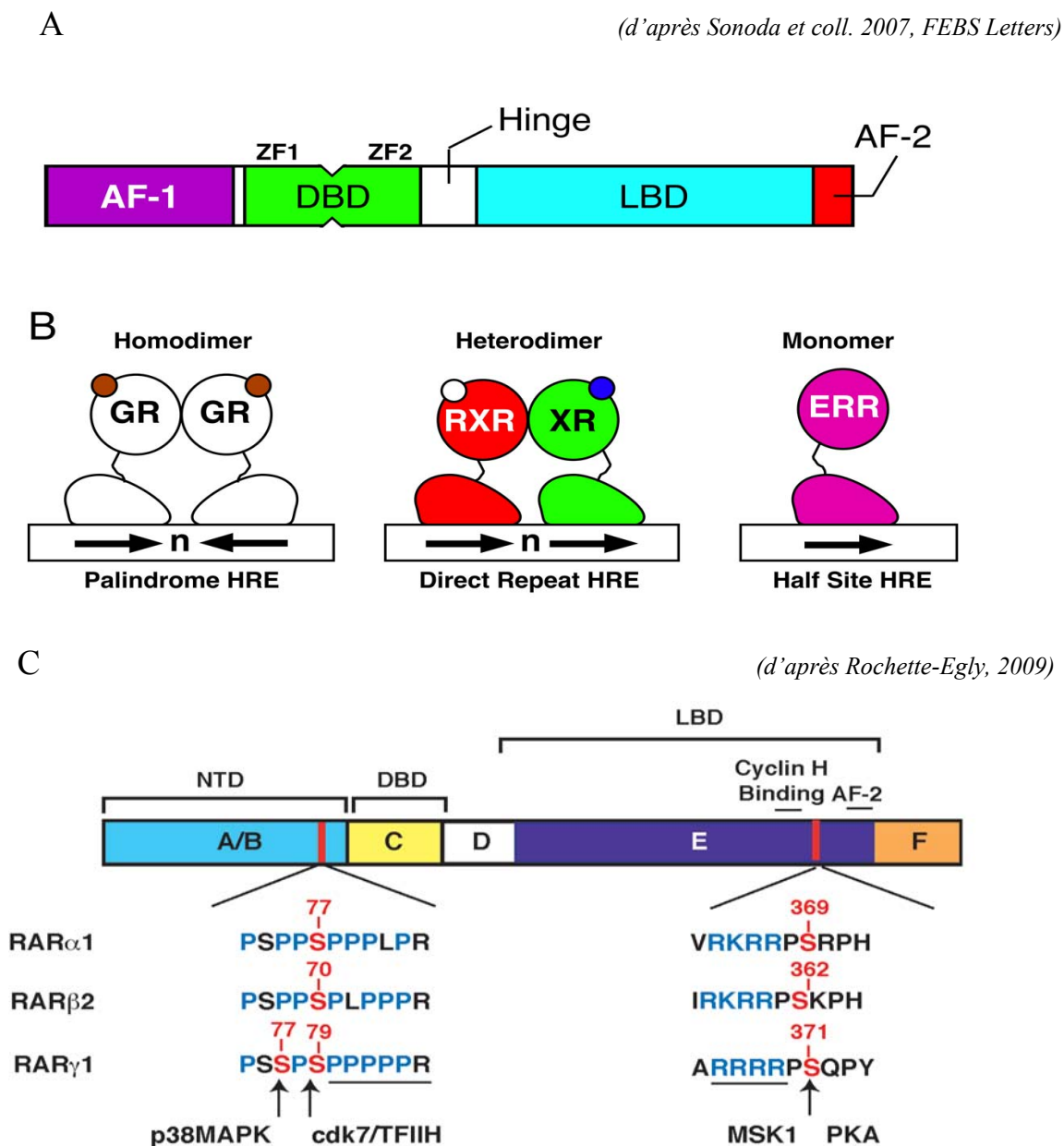
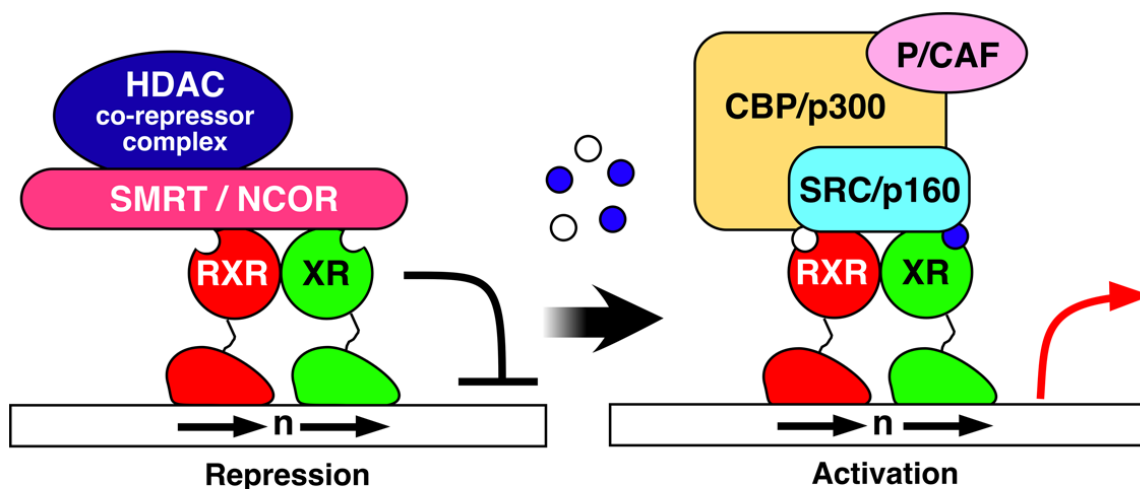


Figure 5.2.2. Répression/activation de récepteurs (d'après Sonoda 2007)



5.3. Les RARs :

Le RAR α , appartenant à la famille des récepteurs des hormones stéroïdiennes/thyroïdiennes, a été cloné en 1987 (Giguere et al.). Deux autres membres de cette famille, les RAR β et les RAR γ , ont été identifiés plus tard (Chambon 2004, Evans 2004). Les RARs sont des régulateurs transcriptionnels ligand-dépendants, qui contrôlent l'expression d'un sous-ensemble spécifique de gènes. Les RAR: α , β et γ , se présentent sous plusieurs isoformes. Les gènes de ces récepteurs ont été identifiés chez les mammifères, les oiseaux et les amphibiens (Mangelsdorf 1994). Les séquences d'acides aminés de 3 récepteurs révèlent une conservation inter-espèces plus grande pour le même sous-type de récepteur, qu'entre les sous-types de la même espèce. Cette observation suggère que les trois sous-types ont leur fonctions bien spécifiques (Petkovich M 1992). *In vitro*, les RARs forment des hétérodimères avec les RXRs et sont activés par l'AR tout-*trans* et 9-*cis* mais non par le 13-*cis* (Soprano et al. 2004).

L'expression de RAR α est ubiquitaire et abondante dans des régions spécifiques du cerveau (de Thé et al. 1990). Les RAR β sont exprimés dans plusieurs tissus et de façon prépondérante, dans les reins, la prostate, l'hypophyse, les glandes surrénales et le système nerveux central. Les RAR γ sont surtout exprimés dans la peau et les poumons (Kastner et al. 1990).

L'habilité des RARs d'intégrer plusieurs voies de signalisation est attribuée aux multiples sites de phosphorylation : la protéine kinase A phosphoryle un résidu sérine conservé dans le LDB, alors que le DBD peut être phosphorylé par la protéine kinase C. Les régions N et C-terminal contiennent des sites de phosphorylation pour les protéines kinases : cycline-dépendantes, mitogène-activées et les Jun N-terminal (JNKs). La phosphorylation en N-terminal du RAR par la cycline H-CDK7, associée au facteur basal de transcription TFIIH, est exigée pour la fonction de transactivation du domaine AF1. (Bastien et al. 2000, Gianni et al. 2002, Rochette-Egly et al. 1997). Ces phosphorylations sont aussi nécessaires dans l'ubiquitylation et la dégradation subséquente des RARs (Kopf et al. 2000).

Des symptômes, semblables aux ceux du syndrome de déficience en vitamine A, ont été observés chez des souris ayant un ou plusieurs types de RARs délétés. Des double-mutants, manquant des deux sous-types de RARs ou des RAR et RXR α , ne survivent pas et les anomalies sont plus prononcées, comparativement aux souris knock-out pour un seul gène qui survivent avec des anomalies limitées. Ces données suggèrent une redondance entre les sous-types de récepteurs et leurs isoformes (Azaïs-Braesco and Pascal 2000). La multitude des effets biologiques des rétinoïdes dans les cellules est due, aussi, à la diversité des récepteurs nucléaires à l'AR, à leur expression variée selon les tissus et à leurs interactions avec d'autres récepteurs nucléaires.

5.4. Les RXRs :

Les «retinoid X receptors», RXRs, sont une seconde classe de récepteurs, homologues aux RARs, découverts pour la première fois, dans les années 1990. Ils font partie de la famille de récepteurs orphelins et présentant une grande affinité pour l'AR 9-*cis*, comme ligand. Il y a 3 sous-types des RXRs : α , β , γ , et chaque sous-type se présente sous plusieurs isoformes (Levin et al. 1992, Mangelsdorf et al. 1990, Rowe et al. 1991). L'homologie des RXRs est plus prononcée avec THR qu'avec les RARs et, du

fait que les deux groupes des récepteurs appartient à deux classes différentes, suggère aussi des fonctions différentes (Escriva et al. 2006).

Il est prouvé, à travers plusieurs études, que les RXRs sont nécessaires à plusieurs autres RNs pour former des hétérodimères. *In vitro*, les RXR forment des homodimères RXR/RXR, ce qui suggère l'existence d'un modèle de signalisation RXR indépendant (Mader et al. 1993, Mangelsdorf et al. 1991). L'existence de l'AR 9-*cis* endogène étant controversée, des questions se posent quant au rôle physiologique des RXRs. Ces questions peuvent trouver réponse au moment de la découverte d'un ligand endogène spécifique pour les RXRs. Malgré tout, beaucoup d'études ont relevé des opportunités thérapeutiques par l'utilisation sélective des ligands pour les RXRs (les rexinoïdes) dans différents cancers et maladies métaboliques (Clarke et al. 2004, Dawson 2004, Dragnev et al. 2005, Gronemeyer et al. 2004).

Des disparités dans les modèles d'expression des RXRs ont été observées. Ainsi l'expression du RXR β est largement distribuée, pouvant être détectée dans presque tous les tissus (Dollé et al. 1994, Hamada et al. 1989). Les RXR α sont exprimés principalement dans le foie, les reins, l'épiderme, les intestins et c'est le RXR majoritaire dans la peau. Il a un rôle crucial dans le développement de la peau dès par sa hétérodimérisation avec le récepteur de la vitamine D (VDR) (Mangelsdorf et al. 1992). Les RXR γ sont exprimés dans les muscles, une partie du cerveau et faiblement dans les adipocytes. Dans les adipocytes l'expression augmentée par les thiazolidinediones (TZD), des molécules insulino-sensitives (Nohara et al. 2009). Cette distribution, ainsi que la capacité de former des hétérodimères avec plusieurs RNs, suggère que les RXRs sont essentiels dans le développement et les processus métaboliques.

Des études sur des souris mutantes, pour un ou plusieurs types de RXRs, ont été faites, pour comprendre l'importance *in vivo* des RXRs (Kastner et al. 1995, Mark et al. 2004, 2006, Szanto et al. 2004). L'inactivation du gène RXR α , a des conséquences plus sévères que l'inactivation des RXR β , ou γ . Des embryons de souris RXR $\alpha^{-/-}$ présentent l'hypoplasie du myocarde qui semble être la cause principale de la mort des embryons, dans le jour E14.5, par déficience cardiaque. Parmi d'autres défauts remarquables, il y a les malformations oculaires (Kastner et al. 1994, Sucov et al. 1994).

Chez les souris $RXR\beta^{-/-}$, 50% d'embryons meurent. Les survivants semblent normaux, mais les mâles sont stériles et présentent des défauts aux testicules. Des anomalies dans le métabolisme des lipides ont été rapportées, démontrant ainsi les interactions fonctionnelles avec d'autres RNs, impliqués dans le métabolisme des lipides (Mascrez et al. 2004). Les souris $RXR\gamma^{-/-}$ semblent normales, mais les niveaux sériques de l'hormone de stimulation de la thyroïde et en thyroxine sont élevés. Ils présentent aussi un métabolisme de base élevé par rapport aux souris sauvages (Brown et al. 2000). Le gène $RXR\gamma$ s'exprime dans les cellules thyroïdiennes de la glande pituitaire antérieure. Les double-mutants $RXR\beta^{-/-}\gamma^{-/-}$ présentent des déficiences dans le système locomoteur, dues à une dysfonction dans la voie de signalisation de la dopamine (Krezel et al. 1998).

Toutes ces études démontrent aussi une redondance dans les fonctions des RXRs. Pour d'autres RNs, les RXRs sont des partenaires essentiels. Le $RXR\alpha$ forme des hétérodimères avec les RARs, $LXR\alpha$, PXR, FXR, $CAR\beta$, $PPAR\alpha$ (Wan et al. 2000). Sans les RXRs, ces RNs ne peuvent pas activer efficacement la voie de signalisation de leurs gènes cibles. Le domaine le plus important pour les fonctions des $RXR\alpha$ dans le développement embryonnaire, semble être le domaine AF2 et non l'AF1 (Mascrez et al. 2001).

5.5. Les éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RARE) :

Les RARs et les RXRs modulent l'expression de plusieurs gènes, en se liant, sous forme des hétérodimères ou homodimères, à l'ADN sur des séquences spécifiques, les éléments de réponse à l'AR, les RAREs ou les RXREs. Ces séquences présentent deux motifs 5' AGGTCA 3', en répétition directe (DR) espacée de 2 ou 5 nucléotides : DR2 et DR5. Les RXREs sont principalement séparés par un nucléotide : DR1 (Balmer and Blomhoff 2005, Soprano et al. 2004). Les RAREs ont été identifiés dans les promoteurs de plusieurs gènes cibles de l'AR. L'espacement entre les séquences répétées détermine la nature du dimère ainsi que sa polarité de fixation sur l'ADN. Le DR5 classique se trouve dans le promoteur du gène du $RAR\alpha 2$ (Leroy et al. 1991), $RAR\beta 2$ (de Thé et al.

1990), RAR γ 2 (Lehmann et al. 1992) et du CYP26A1 (Loudig et al. 2000). Le DR2 a été identifié dans les promoteurs des gènes CRBP-I et CRABP-II. Le seul élément DR1 naturel, a été identifié dans le promoteur du gène CRBP-II (Mangelsdorf et al. 1991).

Les RAR forment des hétérodimères principalement avec les RXRs et ces dimères vont reconnaître les éléments DR1, DR2 et DR5 selon leur polarité de fixation sur l'ADN. Pour les DR2 et DR5, les études *in vitro*, ont illustré que le RXR occupe un motif 5' hexamérique, tandis que son partenaire, le RAR, occupe le motif 3' (5'-RXR-RAR-3'). Dans le DR1, la polarité est inversée, RAR occupant le motif 5' tandis que le RXR occupe le motif 3' (5'-RAR-RXR-3') (Gronemeyer et al. 2004). Des études récentes ont révélé que l'expression de la CRABP-II augmente l'activité de transcription du RAR. En l'absence du ligand, la CRABP-II se trouve dans le cytosole et répond à l'AR par une translocation dans le noyau où elle s'associe directement au RAR. Le complexe CRABP-II-RAR potentialisera l'activité transcriptionnelle du RAR (Budhu AS and Noy 2002, Budhu A et al. 2001, Delva et al. 1999, Dong et al. 1999).

Il est bien établi que 27 gènes sont des cibles directes pour le motif classique RAR-RXR-RARE. Balmer et Blomhoff ont localisé, en 2005, chez les gènes homologues de l'humain, de la souris et du rat, 51 RAREs conservés. Dans les 153 sites analysés, 92% des éléments de réponse présentent une symétrie directe-répétée, et 76% exhibent les espacements «autorisés». De point de vue statistique, les DR1 sont fondamentalement différents comparativement aux DR2 et DR5 (Balmer and Blomhoff 2005). Du fait qu'il y a plus des gènes qui ont leur site de liaison situé plutôt en 3', ceci prédit que plusieurs RAREs vont être découverts dans des régions autres que le promoteur. Actuellement un nombre significatif de transcriptions non-codées sont régulées par l'AR, via RARs-RXR. Le rôle des hétérodimères RAR-RXR peut s'étendre au-delà de la régulation de transcription des gènes (Blomhoff and Blomhoff 2006, Cawley et al. 2004).

Les RXRs forment des hétérodimères avec des RNs autres que les RN à l'AR. Les RXR-hétérodimères qui sont activés par les RXR-ligand sont appelés permissifs, ceux qui ne s'activent pas suite à la liaison RXR-ligand sont considérés non-permissifs. Les récepteurs de la classe des hétérodimères permissifs semblent représenter des voies thérapeutiques prometteuses dans plusieurs troubles métaboliques. Les RXRs sont des

partenaires importants dans la hétérodimérisation pour l'hormone thyroïdienne (THR), l'hormone à la vitamine D (VD), les proliférateurs des peroxyosomes (PPARs), le chicken ovalbumin upstream promoteur-transcription factor (COUP-TF) et d'autres récepteurs orphelins (Dawson 2004). La formation d'hétérodimères, implique les RXRs dans la co-régulation des voies métaboliques des lipides et de signalisations hormonales.

L'hétérodimère PPAR/RXR est impliqué dans le contrôle du métabolisme des lipides et glucides. L'homodimère RXR/RXR active *in vivo* les gènes cibles du récepteur PPAR (Ijpenberg et al. 2004). Le ligand semble être l'AR 9-*cis*. Les isoformes PPAR γ et PPAR α sont des cibles prouvées pour des médicaments pour l'amélioration de la résistance à l'insuline et la dyslipidémie respectivement (Lefebvre et al. 2006, Semple et al. 2006). Le COUP-TF a été identifié chez les mammifères sous forme de deux gènes, COUP-TFI et COUP-TFII. Se sont des facteurs de transcription exprimés dans plusieurs tissus et impliqués dans plusieurs processus biologiques. Les COUP-TFs forment des hétérodimères avec les RXRs et sont considérés comme des répresseurs de la transcription pour d'autres RNs de la classe des hormones : RARs, THR, VDR, PPAR etc. RXR/COUP-TFII, ayant pour ligand l'AR tout-*trans* et 9-*cis*, inhibe la voie de signalisation de l'AR, en bloquant l'action de l'hétérodimère RAR/RXR (Park et al. 2003).

Les hétérodimères RAR/RXR sont responsables de la transduction du signal *in vivo*. En présence du ligand (AR tout-*trans* et/ou 9-*cis*), l'hétérodimère RAR/RXR, se lie au RARE qui se trouve dans le promoteur du gène cible, induisant ainsi l'activation de la transcription. En absence du ligand, l'hétérodimère va lier le corépresseur et l'histone désacétylase (HDAC) avec lesquels il va former un complexe répressif qui a un rôle actif dans la répression de la transcription des gènes cibles. Le recrutement de l'histone désacétylase porte sur la répression transcriptionnelle par la prévention de l'ouverture de la chromatine qui est liée à la désacétylation des nucléosomes (Vigushin and Coombes 2004).

6. ACIDE RÉTINOÏQUE ET CANCER

Les acides rétinoïques naturels ou synthétiques contrôlent, ensemble avec leur récepteurs nucléaires à l'AR, les RARs et les RXR, les programmes génétiques essentiels dans le développement embryonnaire, l'organogénèse, l'homéostasie, la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Kastner et al. 1995). Ces composés semblent être des alternatives à la chimiothérapie anti-leucémique et sont utilisés dans la prévention de la tumorigenèse et dans le traitement des différents cancers et troubles cutanés (McSorley and Daly 2000).

La compréhension croissante de l'étiologie moléculaire du cancer, comme étant causé par des mutations spécifiques des gènes associées aux contrôle des cycles cellulaires, l'apoptose et les enzymes de réparation de l'ADN, met en évidence des stratégies visant la limitation des dommages de l'ADN, d'augmentation de la probabilité de réparation de l'ADN par inhibition de la prolifération anormale, ce qui conduira à une diminution du taux d'incidence des cancers. La prévention reste la meilleure méthode pour diminuer l'incidence des cancers. Nombreuses études épidémiologiques estiment que plus de 70% des cancers sont dus aux habitudes de vie. Ces observations conduisent à des stratégies de préventions et d'interventions (Bertram and Vine 2005):

- Supprimer les sources des cancérigènes chimiques (tabac), physiques (les rayons ultra-violets) ou multifactorielles (diète, obésité).
- L'inhibition des conséquences de l'exposition aux carcinogènes. Les rétinoïdes et caroténoïdes sont utilisés dans cette stratégie.
- L'identification et l'ablation des lésions pré-néoplasiques.

L'AR agit sur les cellules précancéreuses et cancéreuses en induisant la différenciation cellulaire caractérisée par un arrêt de la prolifération cellulaire ou en induisant l'apoptose des cellules cancéreuses. Les RARs sont impliqués dans la propagation de l'action de l'AR et implicitement dans l'effet anti-cancérigène des rétinoïdes.

6.1. Carcinomes

Les communications jonctionnelles intercellulaires (GJC : gap junction communication) sont des communications basiques, fondamentales, permettant l'échange intercellulaire direct, de cytoplasme à cytoplasme. Cette communication est permise par une famille des protéines, les connexines, dont les différents membres possèdent des perméabilités qui varient selon les critères physiques des charges et de conformation. Les connexines ont une expression spatiotemporelle différente, durant le développement et spécifique dans les tissus adultes. Ce comportement suggère qu'elles régulent des homéostasies tissulaires liées aux états de différenciation des cellules. La cancérogenèse est une perturbation de l'état de différenciation et, de ce fait, la perte de la capacité de communication jonctionnelle est associée au phénotype de tumorigenèse. (Bertram and Vine 2005, Mesnil et al. 2005)

Les rétinoïdes et les caroténoïdes augmentent l'expression de la connexine 43 (Cx43), gène putatif suppresseur de tumeurs. Les rétinoïdes et les caroténoïdes ont des interactions séparées avec le promoteur de la Cx43. Ceci suggère la possibilité que des traitements simultanés avec des rétinoïdes et des caroténoïdes, non-précurseurs de la vitamine A (comme l'astaxanthine), conduisent à une super-induction de la Cx43. Si ces mécanismes séparés pouvaient être activés dans un contexte clinique, ce traitement combiné pourrait avoir des résultats effectifs dans la chimioprévention sans la toxicité associée au rétinoïdes (Vine and Bertram 2002, 2005, Vine et al. 2005).

Il est maintenant évident que l'isoforme RAR β 2, inductible par l'AR, agit comme un suppresseur des tumeurs. Dans plusieurs cancers, le RAR β 2 est souvent manquant ou épigénétiquement silencieux, et, de plus, son expression est inversement corrélée avec le degré de la tumeur (Desreumaux et al. 2001). En restaurant l'expression du RAR β 2, la croissance contrôlée par l'AR est réactivée (Haffner et al. 2004). Dans des modèles de systèmes *in vitro*, les effets anti-prolifératifs des rétinoïdes requièrent le RAR β 2 (Altucci et al. 2007b). Le niveau de RAR β 2 augmente dans les tumeurs qui répondent à la thérapie. Cet effet a été constaté dans une étude clinique avec nombre réduit de patients souffrant de cancer rénal et traités avec AR 13-*cis* combiné à l'interféron- α

(IFN α) (Berg et al. 1999). Plusieurs études démontrent le rôle incontestable du RAR β 2 dans la suppression de la carcinogénèse. L'état de méthylation du promoteur du gène RAR β 2 a été utilisé comme bio-marqueur pour la détection précoce de la malignité ou comme marqueur intermédiaire pour monitoriser l'efficacité des agents de chimioprévention dans des essais cliniques (Fujiwara et al. 2005, Lewis et al. 2005).

La déficience en vitamine A chez l'adulte est associée avec une incidence accrue de cancers. Elle augmente la sensibilité aux agents carcinogènes (tabac, polluants chimiques, inflammations chroniques, etc). Les rétinoïdes naturels ou synthétiques inhibent la tumorigénèse induite par ces carcinogènes dans différents tissus (Miller 1998). Une déficience dans l'absorption du ROL, ainsi que dans la biosynthèse de l'AR, s'accompagne avec l'augmentation des cancers (Parisotto et al. 2006).

Une combinaison pan-RAR/RXR-agoniste AR 9-*cis*, et tamoxifen augmente de manière significative l'apoptose des cellules du carcinome hépatique (Di Bisceglie et al. 2005). Une combinaison rétinoïdes-cellules T semble efficace dans les neuroblastomes (Dawson 2000). Divers rétinoïdes sont utilisés en clinique dans des approches de chimioprévention pour des patients avec des lésions pré-malignes (kératinose actinique, leukoplakie ou dysplasie cervicale, métaplasie bronchiale) ou après le traitement des tumeurs primaires (cancer de la peau, des voies orales, du poumon ou du sein) (Freemantle et al. 2003, Petkovich PM 2001).

L'expression de différentes RALDHs dans des tissus spécifiques est diminuée dramatiquement dans divers types de cancers. Ainsi l'expression de la RALDH2 est réduite dans les cancers de la prostate. Le traitement par un inhibiteur de la méthylation de l'ADN permet la restauration de l'expression de ce gène dans des lignées cellulaires (Kim H et al. 2005). La RALDH1 est un marqueur possible pour l'identification des cellules-souche humaines du sein et du colon et pour leur traçabilité durant la progression de ces cancers (Huang et al. 2009, Morimoto et al. 2009). Son expression est réduite dans les tumeurs du poumon (Moreb et al. 2008). La biosynthèse de l'AR dans les cellules mammaires se fait via la RALDH3 (ALDH6). Les cellules de cancer du sein, MCF7, n'expriment pas la RALDH3 comme les cellules épithéliales mammaires normales (Rexer et al. 2001).

Des applications cliniques de l'AR ont été effectuées sur d'autres types des tumeurs telles que le cancer de la vessie, les cancers cutanés, le lymphome T cutané, le cancer de poumon, les cancers de la tête et du cou et du col utérin. Des études ont démontré l'impact positif de l'utilisation de l'AR 9-cis qui a été approuvé comme traitement topique dans les lésions cutanées du sarcome *du Kaposi* (Baumann et al. 2005). Dans plusieurs utilisations, l'AR semble être efficace, mais des doses importantes, ou l'utilisation à long terme, sont toxiques. Actuellement, il y a différentes voies prometteuses des traitements des cancers en utilisant des rétinoïdes naturels ou synthétiques, seuls ou en combinaison avec d'autres molécules (Altucci et al. 2007a).

6.2. Leucémie aiguë promyélocytaire (APL)

La leucémie aiguë représente 10 % des leucémies aiguës non lymphoblastiques (myéloblastiques). Dénommée M3 dans la classification internationale FAB (France, Amérique, Grande-Bretagne), elle présente deux particularités : 1. Des promyélocytes anormales dans la moelle osseuse (cellules malignes qui ressemblent à un promyélocyte: cellule intermédiaire dans la formation d'un globule blanc (granulocyte) à partir d'une cellule souche bloquée à ce stade de maturation). Elles ont une morphologie caractéristique avec des grosses granules et de nombreux bâtonnets appelés «corps d'Auer». 2. Un syndrome hémorragique grave, causé par la fibrinolyse et une coagulation disséminée intravasculaire, accentué en début de la chimiothérapie. La malignité provient d'une seule cellule dont la descendance envahit la moelle osseuse et «asphyxie » les cellules normales.

La leucémie APL est causée par une translocation inter-chromosomes qui implique le $RAR\alpha$. La translocation la plus commune est celle entre les chromosomes 15 et 17, $t(15;17)$ qui fusionne le gène codant pour le $RAR\alpha$ se trouvant sur le chromosome 17 au gène codant pour un facteur de transcription PML (promyelocytic leukemia) du chromosome 15. Cette translocation génère deux protéines de fusion réciproques : les

protéines de fusion PML- RAR α et RAR α -PML qui contient des grandes parts de deux protéines, incluant le domaine LBD du RAR α .

La PML est une protéine localisée dans une structure nucléaire multi-protéique, nommée domaine oncogénique PML (PODs) ou corps nucléaires PML (PML-NBs). Elle semble avoir un rôle crucial dans la formation et la stabilité de ces corps nucléaires. La PML est un coordonateur des PML-NBs dans plusieurs fonctions dans la suppression des tumeurs, incluant l'apoptose, l'arrêt de la croissance et dans la sénescence cellulaire (Salomoni and Pandolfi 2002). En comparaison avec le RAR α , la PML- RAR α augmente l'efficacité de liaison des co-répresseurs de la transcription qui vont recruter le complexe contenant les histones désacétylase (HDACs). La désacétylation locale des histones conduit à la condensation de la chromatine et rend les gènes cibles silencieux. Des doses physiologiques d'AR *tout-trans* n'arrivent pas à renverser le phénomène (Minucci et al. 2001). Ces fusions causent plusieurs autres aberrations de signalisation concernant les PML et/ou RAR α , qui affectent la survie de lymphoblastes et le renouvellement des cellules souches. Des doses importantes d'AR *tout-trans* dissocient le complexe HDAC-corépresseurs-protéine de fusion, et facilitent le recrutement du complexe co-activateur histone-acétylase (HAT). La chromatine se décondense et la machinerie transcriptionnelle est réactivée (Jiménez-Lara et al. 2004).

Plusieurs modèles sur l'action de la PML- RAR α ont été proposés : la protéine fusionnée recrute 2 co-répresseurs; elle bloque le RARE et réprime l'activation de la transcription par l'hétérodimère RAR/RXR (formé avec l'allèle intacte de RAR α); la désintégration des NBs et une localisation aberrante de la PML.

D'autres gènes peuvent fusionner, plus rarement, avec le RAR α et forment des protéines de fusion : PLZF (PML Zn finger), NUMA (nuclear mitotic apparatus protein), NPM (nucleophosim), STAT5b (signal transducer and activator of transcription 5b) (Pitha-Rowe et al. 2003, Zelent et al. 2001). Ces protéines de fusion donnent des formes d'APL insensibles au traitement avec AR. La protéine de fusion PLZF/ RAR α est le résultat de la translocation t(11;17). Le complexe avec les co-répresseurs va se lier à l'apo-RAR α ainsi qu'à la PLZF ce qui donnera un complexe répresseur non-dissociable, même en présence de l'AR. Cependant une grande concentration d'inhibiteurs HDAC,

bloquera l'activité des HDACs et permettra la signalisation de l'AR, même à travers PLZF- RAR α (He et al. 1998). La conséquence de la formation des protéines de fusion PML(PLZF)–RAR α est le blocage de la différenciation à l'étape promyélocytaire.

Les stratégies thérapeutiques actuelles visent l'induction de la maturation et/ou l'apoptose des lymphoblastes leucémiques. L'AR, ensemble avec la chimiothérapie, cause la rémission complète et un taux de survie approchant 80% sur 5 ans (Tallman et al. 2002). L'administration d'AR tout-*trans* permet la différenciation des promyélocytes contenant la fusion PML- RAR α et la rémission. Dans les cas de rechutes et/ou la résistance à l'AR, l'utilisation de trioxyde-arsenic représente une voie thérapeutique complémentaire. Le succès de la thérapie à base d'AR s'explique par la génétique des RNs à l'AR et de l'APL. Une concentration supra-physiologique d'AR dissociera le complexe corépresseur. Les isomères de l'AR : tout-*trans*, 9-*cis* et 13-*cis* induisent efficacement la différenciation des cellules leucémiques (Chomienne et al. 1990).

La thérapie par AR est bien tolérée, mais elle peut provoquer des effets secondaires, dus à l'expression des cytokines induites par l'AR dans les cellules APL. Les symptômes rapportés sont : fièvre, gain de poids, le syndrome de détresse respiratoire chez l'adulte (SDRA), l'hypotension et l'insuffisance rénale. Les cytokines avec un rôle pathologique sont : IL-1 β , IL-6, TNF- α et IL-8. Elles sont impliquées dans l'activation des leucocytes, l'adhérence cellulaire et le développement du SDRA (Dubois et al. 1994).

Autre l'induction de la différenciation, les rétinoïdes ont des multiples activités anti-cancer. Ces activités regroupent l'induction des régulateurs des cycles cellulaires, la répression de l'APL dans des modèles des carcinogénèses chimiques et l'induction du «tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand» : TRAIL. Les agonistes du RAR α peuvent induire une apoptose post-maturation des lymphoblastes via l'induction du TRAIL et de la caspase-8 (Altucci et al. 2001). Cette observation a des implications intéressantes puisque le TRAIL recombiné, développé comme agent anti-cancer, peut être utilisé ensemble avec des petites doses d'AR. Cette situation réduit les effets secondaires du traitement aux rétinoïdes (Altucci and Gronemeyer 2004). En remplaçant d'autres agents chimio-thérapeutiques, usuellement utilisés, par le TRAIL, il est

possible de continuer la thérapie avec l'AR tout-*trans*, même dans les cas résistants. Les rétinoïdes agissent en synergie avec les interférons (IFN) pour induire l'apoptose de cellules cancéreuses dans le cancer du sein, mais aussi avec le TRAIL dans les APL (Clarke et al. 2004).

Plusieurs patients avec APL accomplissent leur rémission clinique en suivant le traitement combiné AR tout-*trans* et chimiothérapie, mais ~30% font des rechutes. Une grande partie de ces patients développent une résistance aux rétinoïdes. Dans les APL, cette résistance est donnée par des mécanismes génétiques et pharmacologiques. L'augmentation du métabolisme des rétinoïdes par les enzymes du cytochrome P450, notamment la CYP26A1, ainsi que l'expression aberrante de la CRABP II qui pourrait séquestrer l'AR tout-*trans*, diminue la disponibilité des rétinoïdes. Le mécanisme génétique inclut, soit une résistance intrinsèque donnée par l'expression de la PLZF-RAR α , soit une résistance acquise due aux mutations dans le domaine LBD du RAR α dans les protéines de fusion PML-RAR α (Marasca et al. 1999).

L'activation de la voie indépendante de signalisation du RAR α , par la communication-croisée entre les rétinoïdes et la protéine A Kinase (PKA) induit la maturation et l'apoptose des cellules APL, AR-tout-*trans*-résistantes et non-résistantes (Benoit et al. 1999). D'autres stratégies thérapeutiques sont utilisées pour contrecarrer l'effet de la résistance. La présence d'inhibiteurs des enzymes du cytochrome P450, (cétocoazole et le liarozole), permettent de rétablir les niveaux d'AR plasmatique. Les rétinoïdes, agonistes des RAR α ou avec une faible affinité pour les CRABP II, sont des candidats potentiels pour prévenir la résistance à l'AR (Fontana and Rishi 2002).

6.3. Rétinoïdes et cancer. Perspectives :

Les isomères de l'AR se sont avérés efficace dans le traitement de plusieurs tumeurs, en association avec l'interféron IFN. L'interféron est une cytokine aux propriétés antivirales qui, en association avec l'AR, amplifie l'inhibition de la croissance et de la différenciation cellulaire (Pelicano and Chelbi-Alix 1998). L'utilisation des précurseurs naturels de l'AR, tels que les ERs, le ROL, le RAL est une alternative à la thérapie à

l'AR (Kang et al. 1995). Les effets secondaires sont moins dommageables, mais leur action curative est moins performante. La recherche sur les rétinoïdes et leur implication dans le traitement des cancers se poursuit et une des voies explorées est celle de gènes cibles des RARs et RXRs qui possèdent dans leur promoteur des RAREs, particulièrement des gènes homéo box, qui peuvent s'avérer des nouveaux agents thérapeutiques.

Actuellement, il y a plusieurs études qui tendent à cerner des stratégies alternatives à la thérapie avec AR *tout-trans* exogène. L'utilisation des agents bloquants du métabolisme de l'AR, RAMBA (retinoic acid metabolism blocking agents) peut augmenter le taux d'AR circulant en inhibant, dans les tumeurs, les enzymes responsables de son inactivation. Les études avec le liarozole fumarate (LIA) ont données des bons résultats *in vivo* dans les cancers avancés du sein et de la prostate (Miller 1998, Petkovich PM 2001), mais cet agent inhibe plusieurs enzymes du cytochrome P450. D'autres RAMBA, récemment développés, présentent une plus grande efficacité et spécificité dans l'inhibition des CYP26 (Armstrong et al. 2005).

7. HYPOTHÈSE ET OBJECTIF

7.1. Hypothèse :

Le rôle des isomères de l'AR dans l'embryogenèse, différenciation cellulaire et dans le traitement des différents cancers est bien établi par plusieurs études. Les mécanismes d'action pour les isomères tout-*trans* et 9-*cis* AR dérivent de leur capacité de ligands pour les RN à l'AR impliqués dans la signalisation de plusieurs gènes. Les RALDHs, enzymes qui oxydent le RAL en AR ont une expression spatio-temporelle différente et sont essentielles dans des tissus spécifiques. Elles interviennent dans les voies métaboliques des isomères de RAL, avec des préférences pour le substrat. Les RALDH1 et 2 ont été bien caractérisées, mais on connaît peu sur les RALDH3 et 4 qui semblent avoir des rôles spécifiques.

Les mRALDH de type 3 et 4 sont des ALDH appartenant aux familles 1 et 8. Elles sont bien conservées entre les espèces, présentant une grande homologie de séquence. Le pourcentage d'identité de séquence entre les deux types analysés est de moins de 50%, mais elles présentent le même motif conservé dans la superfamille des ALDHs, ainsi que pour le site actif. Elles sont NAD⁺ dépendantes. La RALDH3 a une activité catalytique envers le RAL tout-*trans* tandis que la RALDH4 est active avec RAL 9-*cis*. Nous considérons que les mRALDH3 et mRALDH4 sont actives avec des isomères de RAL et présentent des préférences dans l'oxydation de substrat. Nous voulons vérifier si elles catalysent les isomères tout-*trans*, 9-*cis* et 13-*cis* du RAL en AR correspondants, pour mieux définir leur importance biologique *in vivo*. Nous allons utiliser les enzymes recombinantes, purifiées de souris, parce que le modèle souris est très utilisé et du fait que les séquences et l'action de ces enzymes sont très bien conservées entre les espèces.

7.2. Objectif :

L'objectif de cette étude est de produire et de purifier les mRALDH3 et mRALDH4 et de déterminer les constantes cinétiques, le K_m et le V_{max} , de leur activité enzymatique avec les isomères tout-*trans*, 9-*cis* et 13-*cis* du RAL. Nous voulons, également, déterminer l'effet de différents inhibiteurs sur l'activité enzymatique. Ces caractérisations vont augmenter la compréhension du rôle de la mRALDH3 et de la mRALDH4 dans la régulation de la biosynthèse des stéréo-isomères des AR *trans* et 9-*cis*, qui sont des ligands physiologiques des RARs et RXRs, et leur implication dans les cancers.

**CHAPITRE 2: Kinetic characterization of recombinant mouse
retinal dehydrogenase types 3 and 4 for retinal substrates**

Kinetic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase types 3 and 4 for retinal substrates

Aurelia Sima^{*‡}, Maxime Parisotto^{§‡}, Sylvie Mader^{§¶} and Pangala V. Bhat^{*†}

*Laboratory of Nutrition and Cancer, Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) –Hôtel-Dieu, and the Departments of *Medicine and §Biochemistry and §Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

†To whom correspondence should be addressed: CRCHUM–Hotel-Dieu, 3850 Saint Urbain St., Montreal, Quebec H2W 1T7, Canada. Telephone: 514-890-8000, Ext 12927; Fax: 514-412-7152.

¶To whom correspondence should be addressed: Institute for Research in Immunology and Cancer, Faculty of Medicine, Université de Montréal, C.P. 6128 Succursale Centre-ville, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada. Telephone: 514-343-7166; Fax: 514-343-6288.

‡ Contributed equally to this work.

Keywords: Retinal isomers; retinal dehydrogenase; retinoic acids, β -ionone.

Abstract

Background: Retinal dehydrogenases (RALDHs) catalyze the dehydrogenation of retinal into retinoic acids (RAs), which are required for embryogenesis and tissue differentiation. This study sought to determine the detailed kinetic properties of 2 mouse RALDHs, namely RALDH3 and 4, for retinal isomer substrates, to better define their specificities in RA isomer synthesis.

Methods: RALDH3 and 4 were expressed in *Escherichia coli* as His-tagged proteins and affinity-purified. Enzyme kinetics were performed with retinal isomer substrates. The enzymatic products were analyzed by high pressure liquid chromatography.

Results: RALDH3 oxidized all-*trans* retinal with high catalytic efficiency ($V_{\max}/K_m = 77.88$) but did not show activity for either 9-*cis* or 13-*cis* retinal substrates. On the other hand, RALDH4 was inactive for all-*trans* retinal substrate, exhibited high activity for 9-*cis* retinal oxidation ($V_{\max}/K_m = 27.38$), and oxidized 13-*cis* retinal with lower catalytic efficiency ($V_{\max}/K_m = 8.24$). β -ionone, a potent inhibitor of RALDH4 activity, suppressed 9-*cis* and 13-*cis* retinal oxidation competitively with inhibition constants of 0.60 and 0.32, respectively, but had no effect on RALDH3 activity. The divalent cation $MgCl_2$ activated 13-*cis* retinal oxidation by RALDH4 by 3-fold, did not significantly influence 9-*cis* retinal oxidation, and slightly activated RALDH3 activity.

Conclusions: These data extend the kinetic characterization of RALDH3 and 4, providing their specificities for retinal isomer substrates. **General significance:** The kinetic characterization of RALDHs should give useful information in determining amino acid residues that are involved in the specificity for retinal isomers and on the role of these enzymes in the synthesis of RAs in specific tissues.

Introduction

Retinoic acids (RAs), the biologically-active metabolites of retinol (vitamin A), play a fundamental role in embryogenesis and tissue differentiation through the binding and activation of RA receptors and retinoid X receptors (RXRs) [1, 2]. RAs are synthesized from retinol by successive oxidation in which retinal is an intermediate metabolite. The conversion of retinol to RAs is initially catalyzed by retinol dehydrogenases followed by further oxidation by retinal dehydrogenases (RALDHs) [3-7]. RALDHs are cytosolic aldehyde dehydrogenases (ALDHs) that are part of the superfamily of ALDHs that catalyze the NAD^+ -dependent oxidation of all-*trans*, 9-*cis* and 13-*cis* retinal [8-11]. Four isozymes of RALDHs, namely RALDH1-4, differing in specificities for retinal isomer substrates, have been identified and cloned [12-15].

The well-characterized rat, mouse and human RALDH1 and mouse RALDH2 catalyze both all-*trans* and 9-*cis* retinal oxidation. In addition, human RALDH1 and mouse RALDH2 also show activity for 13-*cis* retinal [9-11]. The catalytic activity of RALDH3 for all-*trans* retinal oxidation was first demonstrated by Gruin et al. [14]. However, it remained largely uncharacterized for its role in the synthesis of 9-*cis* or 13-*cis* RA. The cloning and initial characterization of RALDH4 from humans and mice were reported by Lin et al. [15], who demonstrated its high activity for 9-*cis* retinal and relatively low activity for 13-*cis* and all-*trans* retinal in cells transiently transfected with RALDH4 cDNA. However, extensive kinetic characterization of purified recombinant RALDH4 has not yet been performed.

The purpose of this investigation was to undertake detailed kinetic studies of mouse RALDH3 and 4 for retinal isomer substrates and to further characterize the recombinant

enzymes for ALDH inhibitor β -ionone [22]. This will allow to compare the kinetic properties of these enzymes with those of previously-reported mouse RALDH1 and 2.

Materials and Methods

Reagents: Retinoids and β -ionone were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). Purity of the retinoids was verified by high pressure liquid chromatography (HPLC) and was found to be greater than 99%. They were handled under yellow light to prevent photoisomerization. HPLC grade solvents were obtained from Fisher Scientific (Toronto, Ontario).

Expression and purification of RALDHs: Bacterial expression vectors for His-tagged RALDHs were constructed by excision of RALDH3 and RALDH4 cDNA from pT7.7 parental vectors with NdeI/HindIII for RALDH3 and NheI/EcoRI for RALDH4 and cloning into the same sites in pET28a. Sequence analysis verified the correct subcloning of wild type mouse RALDH3- and RALDH4-pET28a. The resulting recombinant plasmids were transformed into E. Coli BL-21DE3 cells and their expression was induced with 0.4 mmol/L isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside for 16 h at 19°C. Bacterial pellets containing RALDH3 and RALDH4 were sonicated in 20 mM Tris-HCl (pH 7) and MES (pH 5.7) buffers containing 500 mM NaCl, 5% glycerol, 20 mM imidazole and a mixture of protease inhibitors respectively. Lysates were cleared by centrifugation (4,000 g at 4°C for 30 min). His-tagged RALDH3 and RALDH4 proteins were purified from the bacterial supernatanta on a Ni-NTA column by eluting the bound proteins with their respective sonication buffers containing 400 mM imidazole. The purity of the recombinant proteins was assessed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels (SDS-PAGE, 10%) stained with Coomassie Brilliant blue.

Enzyme assays: RALDH activities for retinal substrates were assayed by measuring RA formation under HPLC, as described earlier [16]. Recombinant RALDH3 was incubated in 10 mM Tris- HCl buffer (pH 8.5) containing 0.02% Tween-80, 161 mM dithiothreitol (DTT), and 603 μ M NAD in a final volume of 250 μ l. Purified RALDH4 was incubated in 100 mM HEPES buffer (pH 8.5) containing 500 mM NaCl, 161 mM DTT and 603 μ M NAD (final volume 250 μ l). The substrates (*all-trans*, *9-cis*, and *13-cis* retinal) were added at variable concentrations to the incubation mixture in 2.5 μ l dimethylsulfoxide, and the incubations were undertaken at 37°C for 20 min. After incubation, the reaction products were extracted with 400 μ l butanol:acetonitrile (1:1) and separated in a 250 x 4.5 mm Phenomenex 10-ODS analytical column (Phenomenex Inc., Torrance CA). Retinoids were eluted with a mobile phase of acetonitrile:water (60:40) containing 10 mM ammonium acetate, at a flow rate of 1.2 ml/min, and quantitated by a photodiode array detector that collects spectra between 200 and 500 nm. The kinetic constants of RALDHs for various substrates were obtained by plotting saturation curves under conditions in which enzyme activity was linear with respect to protein concentration and reaction time, and fitting data from the saturation curve to Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk plots with the Prism software (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA).

Results and Discussion

Gel electrophoresis of recombinant affinity-purified RALDH3 and RALDH4 revealed an expected molecular mass of approximately 55 kDa (Figure 1). To determine substrate specificities, the catalysis of all-*trans*, 9-*cis*, and 13-*cis* retinal to respective RAs by various amounts of RALDH3 and RALDH4 proteins was examined at 10- μ M substrate concentrations. RALDH3 showed activity for all-*trans* retinal oxidation but not for either 9-*cis* or 13-*cis* retinal substrates (Figure 2 A). On the other hand, RALDH4 was highly active for 9-*cis* retinal oxidation, with low activity for 13-*cis* retinal, and did not catalyze all-*trans* retinal oxidation (Figure 2 B). The rates of RA production by RALDH3 and RALDH4 were linear up to 300 ng of protein (Figure 2). The saturation kinetics of RALDH3 for all-*trans* retinal and RALDH4 for 9-*cis* and 13-*cis* retinal are reported in Figures 3 A and B, respectively. The K_m and catalytic efficiency (V_{max}/K_m) derived from saturation curves for RALDH3 were 3.93 μ M and 77.88, respectively (Table 1). RALDH4 had similar K_m for 9-*cis* and 13-*cis* retinal, but catalyzed 9-*cis* retinal oxidation with 3-fold higher efficiency than 13-*cis* retinal (Table 1).

The β -ionone ring strongly inhibited RALDH4 activity and, at 2 μ M concentration, 9-*cis* and 13-*cis* RA production was reduced by 53% and 63%, respectively. Surprisingly, β -ionone had no effect on RALDH3 activity. Next, we investigated the nature of inhibition by β -ionone on the conversion of 9-*cis* and 13-*cis* retinal to respective RAs by RALDH4. β -ionone competitively suppressed 9-*cis* and 13-*cis* retinal oxidation with inhibition constants (K_i) of 0.61 and 0.32, respectively (Figure 4). We and others have shown that magnesium ions influence RALDH1 and RALDH2 activities [9, 10, 17]. Therefore, we examined the effects of magnesium on RALDH3 and RALDH4 activities for retinal substrates. Magnesium slightly activated RALDH3 activity for all-*trans*

retinal oxidation (Figure 5 A). Interestingly, magnesium ions activated 13-*cis* retinal oxidation by RALDH4 by 300% (Figure 5 B). However, magnesium at lower concentration had no effect on RALDH4 activity for 9-*cis* retinal, and, at 4 mM concentration, inhibited 9-*cis* retinal oxidation by 30% (Figure 5 B).

Human RALDH3 (ALDH6) was first cloned by Hsu et al. [18] and later isolated from chicks and mice by Gruin et al. [14]. RALDH3 sequences share 69% amino acid conservation with RALDH1 and RALDH2, and 48% with RALDH4, and amino acid residues found in the catalytically-active sites of ALDHs are conserved. RALDH3 is strongly expressed in sensory neuroepithelia which include the ventral retina, olfactory epithelium and otic vesicle [14, 19], and its deletion leads to choanal atresia with respiratory death in early postnatal life [20]. Normal human mammary cells express RALDH3, and its expression is lost in MCF7 breast cancer cells, suggesting its role in providing RA needed to maintain the normal mammary gland phenotype [21].

Although RALDH3 is capable of catalyzing the oxidation of all-*trans* retinal to RA [14], its activity for other retinal isomer substrates, such as 9-*cis* and 13-*cis* retinal, is not clearly established. We demonstrated that RALDH3 is specific for all-*trans* retinal, suggesting its involvement in the production of all-*trans* RA required for the functioning of specific tissues. In our assay conditions we obtained a K_m of 3.93 μM for all-*trans* retinal oxidation by RALDH3, which is 20 times higher than that reported by Graham et al [22]. This difference in K_m values could be due to differences in solubility of the recombinant proteins, but can also be explained by difference in the analytical method used to measure enzymatic product. We assayed RALDH3 activity by measuring RA formation by HPLC, where as Warren et al. assayed enzyme activity by measuring NADH formation by spectrophotometry at 340 nm. When retinal is used as substrate,

spectrophotometric measurement of NADH formation may not be accurate, because RA (A350) formed may interfere with UV absorption of NADH (A340).

The catalytic efficiency of RALDH3 for all-*trans* retinal is 10-fold higher than that of mouse RALDH1 and RALDH2, which contrary to RALDH3 also catalyze 9-*cis* retinal oxidation with equal efficiency [9, 10]. Interestingly, β -ionone, the ring structure of all-*trans* retinal, is not a major recognition site of RALDH3, as it did not inhibit its activity. This observation was also reported by Graham et al. [22]. The high specificity of RALDH3 for all-*trans* retinal indicates the requirement of restricted all-*trans* configuration of the carbon side chain in the retinal substrate.

Lin et al. noted high mouse RALDH4 activity for 9-*cis* retinal, lower activity for 13-*cis* retinal, and very low activity for all-*trans* retinal in homogenates of CHO-K1 cells transiently expressing this enzyme [15]. Our results on purified recombinant RALDH4 are consistent with those of Lin et al. with respect to activity towards 9-*cis* and 13-*cis* retinal. However, we did not observe any activity of RALDH4 for all-*trans* retinal. It is likely that the very low activity for all-*trans* retinal that they discerned in their study might have originated from the CHO-K1 cells. It is noteworthy that the amino acid sequence of RALDH4 is the most divergent enzyme within the RALDH1 to 4 group [15]. The catalytic efficiency of RALDH4 for 9-*cis* retinal oxidation is 3- and 25-fold higher than that of mouse RALDH1 and RALDH2, respectively, indicating that RALDH4 converts 9-*cis* retinal to 9-*cis* RA more efficiently than RALDH1 and 2. It is interesting that β -ionone competitively inhibits both 9-*cis* and 13-*cis* retinal oxidation by RALDH4, which suggests that the β -ionone ring of retinal is one of the important recognition sites for the catalysis of retinal substrates. Magnesium has been shown to stimulate catalysis by RALDH2 and to inhibit RALDH1 activity [9,10]. RALDH3

activity was slightly stimulated by magnesium at higher concentrations (Figure 5 A). On the other hand, magnesium dramatically activated 13-*cis* retinal oxidation by RALDH4 without significantly affecting 9-*cis* retinal oxidation. Although the exact mechanisms by which magnesium affects RALDH activities are not known, it is believed to affect NADH release which may influence the activities of RALDHs [23, 24]. The isomeric configuration of retinal substrates may alter the orientation of RALDH proteins which may impact the release of NADH in the presence of magnesium. RALDH4 is expressed in the adult mouse liver and kidney [15]. However, its function *in vivo* is not known. The K_m for 9-*cis* retinal oxidation by RALDH4 is in μM range. The cellular concentration of 9-*cis* retinal is not known and may be difficult to determine due the opposite actions of retinol and retinal dehydrogenases, which are respectively reversible and irreversible. Nevertheless the relative affinity (K_m) of RALDH4 for 9-*cis* retinal is several fold higher compared to other aldehydes such as benzaldehyde and acetaldehyde [25], suggesting selectivity for 9-*cis* retinal oxidation. 9-*cis* RA binds to RXRs with high affinity. However, 9-*cis* RA is an endogenous ligand for these receptors *in vivo* has not yet been fully demonstrated. Since the occurrence of 9-*cis* RA *in vivo* is controversial [26, 27], and the role of RALDH4 in mouse development has not yet been investigated, it is not clear whether RALDH4 is involved in 9-*cis* RA biosynthesis *in vivo*. On the other hand, *in vitro* enzyme assays clearly demonstrated the occurrence of retinoid dehydrogenases capable of converting 9-*cis* retinol to 9-*cis* RA via 9-*cis* retinal [4, 7, 9-11]. In addition, the CYP26C1 enzyme catabolises 9-*cis* RA [28]. These observations provide circumstantial evidence that 9-*cis* RA may be formed *in vivo* from all-*trans* retinol. However, firm demonstration of 9-*cis* RA occurrence *in vivo* and of the role it plays in cell differentiation and embryogenesis via RXRs will require further research.

Acknowledgement

This research was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-81319).

References

- [1] L.M. De Luca, Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia, *FASEB J.* 5 (1991) 2923-2933.
- [2] P. Chambon, A decade of molecular biology of retinoic acid receptors, *FASEB J.* 10 (1995) 940-954.
- [3] G. Duester, Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis, *Biochemistry* 24 (1996) 12221-12227.
- [4] J.L. Napoli, Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 63 (1999) 139-188.
- [5] J. Labrecque, P.V. Bhat, A. Lacroix, Purification and partial characterization of a rat kidney aldehyde dehydrogenase that oxidizes retinal to retinoic acid, *Biochem. Cell Biol.* 71 (1993) 85-89.
- [6] J. Labrecque, F. Dumas, A. Lacroix, P.V. Bhat, A novel isozyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-cis and all-trans retinoic acid, *Biochem. J.* 305 (1995) 681-684.
- [7] J.R. Mertz, 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, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 33125-33131.
- [8] P.V. Bhat, Role of retinal dehydrogenase type 1 (RALDH1) in retinoic acid biosynthesis, *Enzymol. Mol. Biol.* 12 (2005) 66-72.
- [9] I. Gagnon, G. Duester, P.V. Bhat, Kinetic analysis of mouse retinal dehydrogenase 2 (RALDH2) for retinal substrates, *Biochim. Biophys. Acta* 1506 (2002) 156-162.
- [10] I. Gagnon, G. Duester, P.V. Bhat, Enzymatic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase type 1, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 1685-1690.
- [11] P.V. Bhat, H. Samaha, Kinetic properties of human liver cytosolic aldehyde dehydrogenase for retinal isomers, *Biochem. Pharmacol.* 57 (1999) 195-197.
- [12] P.V. Bhat, J. Labrecque, J.-M. Boutin, A. Lacroix, A. Yoshida, Cloning of a cDNA encoding rat aldehyde dehydrogenase with high activity for retinal oxidation, *Gene* 166 (1995) 303-306.
- [13] D. Zhao, P. McCaffery, K.J. Ivins, R.L. Nerve, P. Hogans, W.W. Chin, U.C. Drager, Molecular identification of a major retinoic acid synthesizing a retinaldehyde-specific dehydrogenase, *Eur. J. Biochem.* 240 (1996) 15-22.
- [14] F. Gruin, Y. Hirose, S. Kawauchi, T. Ogura, K. Umesono, Aldehyde dehydrogenase 6, a cytosolic retinaldehyde dehydrogenase prominently expressed in sensory neuroepithelia during development, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 41210-41218.
- [15] M. Lin, M. Zhang, M. Abraham, S.M. Smith, J.L. Napoli, Mouse retinal dehydrogenase 4 (RALDH4), molecular cloning, cellular expression, and activity in 9-cis-retinoic acid biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 9856-9861.
- [16] H. Brodeur, M. Parisotto, S. Chagnon, S. Mader, P.V. Bhat, Isomer-specific retinoic acid biosynthesis in HeLa cells expressing recombinant class I aldehyde dehydrogenases, *Biochim. Biophys. Acta.* 1770 (2007) 1548-1556.
- [17] E.C. Kathmann, S. Naylor, J.J. Lipsky, Rat liver constitutive and phenobarbital-

induced cytosolic aldehyde dehydrogenases are highly homologous proteins that function as distinct isozymes, *Biochemistry* 39 (2000) 11170-11176.

[18] L.C. Hsu, W.C. Chang, L. Hiraoka, C.L. Hsieh, Molecular cloning, genomic organization, and chromosomal localization of an additional human aldehyde dehydrogenase gene, ALDH6, *Genomics* 24 (1994) 333-341.

[19] F.A. Mic, A. Molotkov, F. Fan, A.E. Cuenca, G. Duester, RALDH3, a retinaldehyde dehydrogenase that generates retinoic acid, is expressed in the ventral retina, otic vesicle and olfactory pit during mouse development, *Mech. Dev.* 97 (2000) 227-230.

[20] V. Dupé, N. Matt, J.M. Garnier, P. Chambon, M. Mark, N.B. Ghyselinck, A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 14036-14041.

[21] B.N. Rexer, W.L. Zheng, D.E. Ong, Retinoic acid biosynthesis by normal human breast epithelium is via aldehyde dehydrogenase 6, absent in MCF-7 cells, *Cancer Res.* 61 (2001) 7065-7070.

[22] C.E. Graham, K. Brocklehurst, R.W. Pickersgill, M.J. Warren, Characterization of retinaldehyde dehydrogenase 3, *Biochem. J.* 394 (2006) 67-75.

[23] F.M. Dickinson, G.J. Hart, Effects of Mg^{2+} , Ca^{2+} and Mn^{2+} on sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase, *Biochem. J.* 205 (1982) 443-448.

[24] K.K. Ho, A. Allai-Hassani, T.D. Hurley, H. Weiner, Differential effects of Mg^{2+} ions on the individual kinetic steps of human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases, *Biochemistry* 44 (2005) 8022-8029.

[25] M. Lin, J. L. Napoli, cDNA cloning and expression of a human aldehyde dehydrogenase (ALDH) active with 9-cis-retinal and identification of a rat ortholog, ALDH12, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 40106-40112.

[26] F.A. Mic, A. Molotkov, D.M. Benbrook, G. Duester, Retinoid activation of retinoic acid receptor but not retinoid X receptor is sufficient to rescue lethal defect in retinoic acid synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 7135-7140.

[27] R.A. Heyman, D.J. Mangelsdorf, J.A. Dyck, 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* 68 (1992) 397-406.

[28] M. Taimi, C. Helvig, J. Wisniewski, H. Ramshaw, J. White, M. Amad, B. Korczak, M. Petkovich, A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 77-85.

Figure legends

Figure 1. SDS-PAGE of purified recombinant RALDH3 and RALDH4. **Lanes:** 1. protein standards, 2. and 3. RALDH3 (10 μ g) and RALDH4 (6 μ g) respectively purified in a Ni-NTA column.

Figure 2. Rates of all-*trans* RA (■) synthesis from all-*trans* retinal by RALDH3 (A), and 9-*cis* (●), and 13-*cis* (▲) RA synthesis from respective retinal substrates by RALDH4 (B), with increasing protein concentrations. Each point in the curve represents the average of triplicate values (less than 6% variation between each replicate).

Figure 3. Kinetic saturation curves of RALDH3 (A) and RALDH4 (B) with retinal isomers. Incubations were performed at 37°C for 20 min with protein. All-*trans* (■), 9-*cis* (●), and 13-*cis* retinal (▲). Each point in the curve represents the average of 3 replicates (less than 6% variation between each replicate).

Figure 4. Competitive inhibition by β -ionone of 9-*cis* and 13-*cis* retinal oxidation catalyzed by RALDH4. Retinal concentrations were maintained at 10 μ M. Each point on the curve represents the average of 3 replicates (less than 5% variation between each replicate).

Figure 5. Effects of $MgCl_2$ on RALDH3 (A) and RALDH4 activities (B). Assays were performed with 0.2 mg protein, 10 μ M all-*trans* (■), 13-*cis* (▲), and 9-*cis* (●) retinal under incubation conditions described in methods. Points are the average of duplicate experiments, each carried out in triplicate.

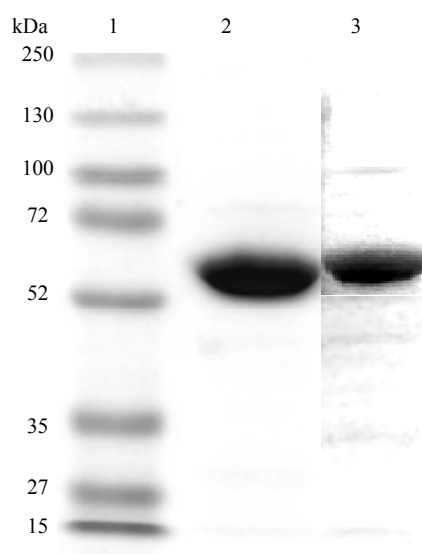
Figure 1

Figure 2

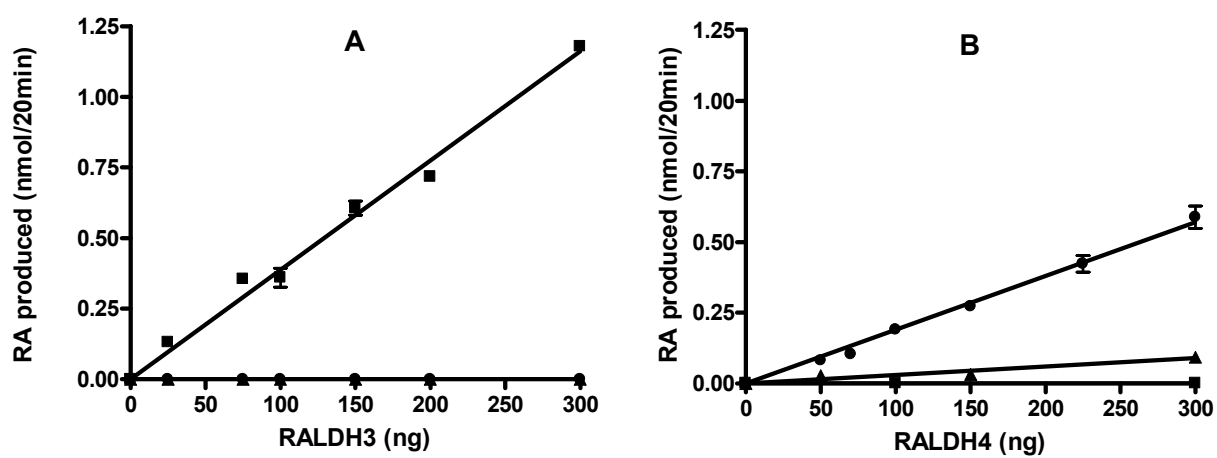


Figure 3

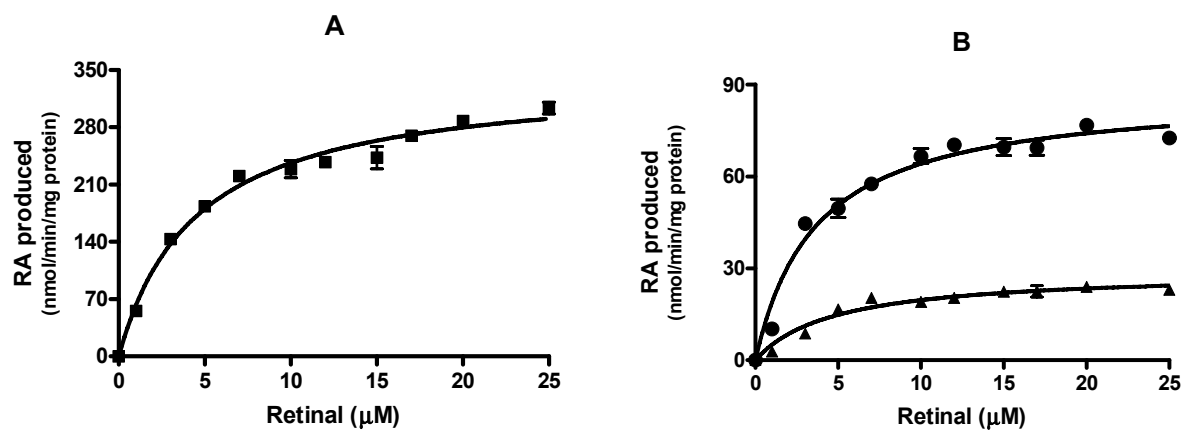


Figure 4

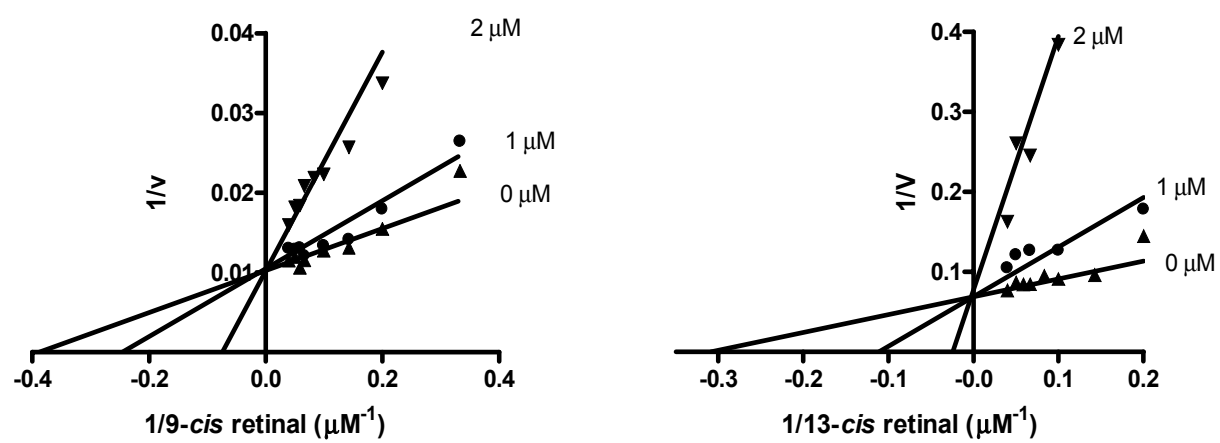


Figure 5

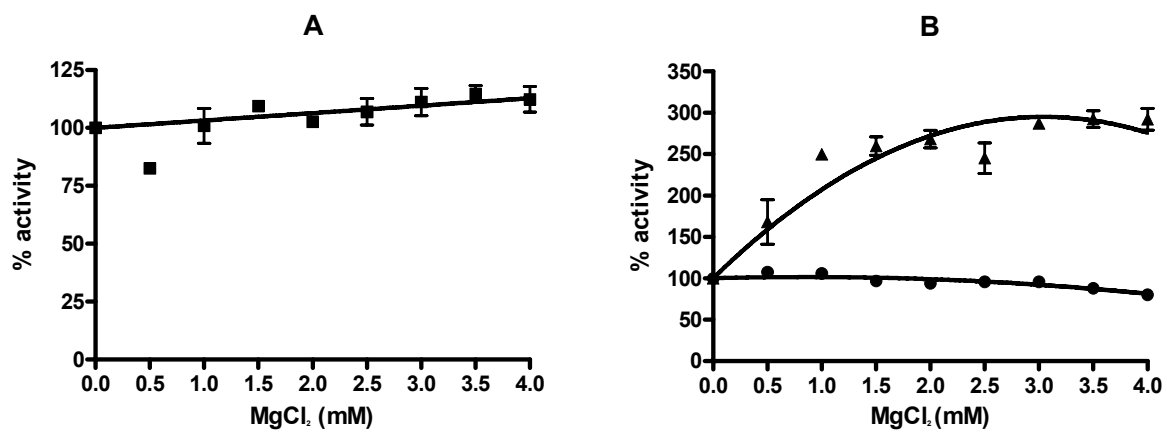


Table 1

KINETIC PARAMETERS OF RALDH3 AND RALDH4 FOR RETINAL ISOMERS

Retinal	RALDH3			RALDH4		
	K_M (μM)	V_{max} (nmol/min/mg)	V_{max}/K_M	K_M (μM)	V_{max} (nmol/min/mg)	V_{max}/K_M
<i>all-trans</i>	3.9±0.7	306.2±38.2	77.9	-	-	-
<i>9-cis</i>	-	-	-	3.0±0.6	80.8±4.8	27.4
<i>13-cis</i>	-	-	-	3.4±0.4	27.7±2.1	8.2

Values (\pm S.E.M.) were obtained from saturation curves performed thrice in triplicate

CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

But

L'acide rétinoïque est un facteur essentiel dans le développement des différents tissus et organes des vertébrés grâce à sa capacité de promoteur de la différenciation, de régulateur de l'apoptose et de par son rôle dans la modélisation des cellules et tissus par une spécialisation du positionnement de l'information. Le rôle des isomères de l'AR comme agents thérapeutiques dans différents cancers et troubles métaboliques est largement étudié. Les isomères *tout-trans* et *9-cis* de l'AR sont des ligands pour les récepteurs nucléaires à l'AR, les RARs et pour les RXRs, qui sont des médiateurs de la transduction des signaux intracellulaires initiés par les rétinoïdes. L'AR est biologiquement disponible suite aux étapes d'oxydation du ROL, notamment l'étape irréversible de la conversion du RAL en AR, oxydation catalysée par les rétinal déshydrogénases. Le but de ce projet est de caractériser les RALDH de type 3 et 4 recombinantes, purifiées de souris, en déterminant leur constantes cinétiques : K_m , V_{max} et l'efficacité catalytique (V_{max}/K_m) et leur comportement par rapport à différents inhibiteurs pour 3 isomères de rétinal : *tout-trans*, *9-cis* et *13-cis*.

Discussion

Les rétinal déshydrogénases (RALDHs), membres des ALDHs de classe I, oxydent le RAL en AR. Il y a 4 types de RALDHs cytosoliques trois de la famille 1: la RALDH de type 1 (RALDH1), la RALDH de type 2 (RALDH2), la RALDH de type 3 (RALDH3) et une de la famille 8 : la RALDH de type 4 (RALDH4). Ces 4 isoformes participent à la biosynthèse de l'AR dans différentes tissus (Bhat et al. 1996, Lin M and Napoli 2000, McCaffery and Dräger 1997, Romand et al. 2006). Les RALDH1 et 2 de souris ainsi que leur homologues humain et rat ont été bien caractérisés, en partie par notre laboratoire (Bhat and Samaha 1999, Brodeur et al. 2003, Brodeur et al. 2006, Gagnon et al. 2002, 2003, Labrecque et al. 1995). Les RALDH3 et RALDH4 ont été partiellement caractérisées et leur rôle dans l'oxydation des isomères *tout-trans*, *9-cis* et

13-*cis* du RAL reste à être consolidé. Nous avons déterminé les propriétés enzymatiques de la mRALDH3 et de mRALDH4.

La mRALDH3 et mRALDH4 possèdent chacune des propriétés cinétiques, un modèle spatio-temporel durant l'embryogenèse et une distribution cellulaire chez l'adulte qui diffèrent, leur conférant un rôle physiologique propre.

Les mRALDH de type 3 et 4 recombinantes purifiées sont visualisées par résolution sur SDS-PAGE (10%) révélé au bleu de Coomassie. Les enzymes purifiées sur colonne résine Ni-NTA, sont très pures et des bandes uniques se voient à 55kDa et 54kDa, comme attendu. Les enzymes sont taguées avec un tag de 6 Histidines pour permettre la purification sur la colonne Ni-NTA, qui a l'affinité pour le His-tag, et aussi pour faciliter leur visualisation par Western-blot. Actuellement, il n'y a pas des anticorps anti-RALDH4 et ceux pour la RALDH3 sont tout récents. Ces préparations de RALDH recombinantes purifiées ont été utilisées pour effectuer les cinétiques enzymatiques, ainsi que les tests enzymatiques sur l'influence des divers réactifs sur la vitesse d'oxydation avec les isomères du RAL.

mRALDH de type 3

La mRALDH3 a un poids moléculaire de 55 kDa, pareil aux autres RALDH de la même famille (**Figure 1**, page 71) Elle est stable à un pH de 7 et catalyse le RAL tout-*trans*. Elle ne présente aucune activité avec les isomères 9-*cis* et 13-*cis* du RAL (**Figure 2A**, page 72). Les incubations pour déterminer les cinétiques enzymatiques, ont été faits 20 min à 37°C, à un pH de 8.5.

La mRALDH3 catalyse uniquement l'isomère tout-*trans* du RAL et présente une courbe de saturation montrant une activité catalytique importante (**Table I**, page 76). Son efficacité catalytique est 10 fois plus élevée avec l'isomère tout-*trans* du RAL, comparativement aux RALDH1 ou RALDH2, qui, elles, sont également actives avec le RAL 9-*cis*. L'efficacité catalytique importante de la RALDH3 de manière spécifique pour le tout-*trans* RAL suggère son implication dans la production de l'AR tout-*trans* requis pour des fonctions dans des tissus spécifiques *in vivo*.

Différents réactifs ont été testés pour vérifier leur effet sur la vitesse d'oxydation du RAL tout-trans (**Table 2**, page 81). L'acide para-hydroxymercuribenzoïque (p-HMB) est un agent bloquant des groupements sulfhydryles. Le Mg^{2+} est un ion essentiel pour l'activité catalytique de certaines enzymes. La β -Ionone présente l'anneau aromatique des rétinoïdes, mais pas la partie linéaire. Elle peut entrer en compétition avec le substrat et inhiber les réactions catalytiques des RALDH.

L'inhibition causée par le p-HMB est dramatique, mais elle diminue en présence de dithiothréitol (DTT) ce qui suggère que les groupements sulfidryles sont importants dans l'activité catalytique de la RALDH3. Il est à noter que l'enzyme pure est conservée dans une solution tampon d'un pH de 7, contenant 15% glycérol et 1% DTT. Le p-HMB inhibe l'activité des autres RALDH, les 1 et 2 (Gagnon, 2003). Il est connu que $MgCl_2$ inhibe l'activité des ALDHs cytosoliques de classe I et augmente celle des ALDHs mitochondriales de classe II (Bennett et al. 1983, Dickinson and Hart 1982, Takahashi and Weiner 1980). Les études précédentes dans notre laboratoire, ont montré que la présence du $MgCl_2$ augmente l'activité de la mRALDH2 avec le RAL tout-trans et inhibe l'activité de la mRALDH1 pour les 2 isomères avec lesquels elle est active, les tout-trans et 9-cis RAL. Dans notre étude, la présence du $MgCl_2$ (même échelle de concentrations utilisée) influence faiblement l'activité de la mRALDH3, en l'augmentant de 10% pour une concentration de 4mM (**Figure 5A**, page 75).

La β -Ionone, l'anneau aromatique de la structure du RAL tout-trans, ne représente pas un site majeur de reconnaissance pour la RALDH3, puisqu'elle n'influence pas l'activité catalytique. Cette observation a déjà été rapportée par Graham et collègues. La grande spécificité que la mRALDH3 a pour le RAL tout-trans indique qu'une configuration tout-trans restrictive de la chaîne de Carbones, du substrat de RAL, est exigée (**Figure 4.4.4**, page 33).

Tableau 2 : Effets de différents réactifs sur l'activité des mRALDH3 et 4
(données non publiées)

Réactif	Concentration mM	RALDH3		RALDH4	
		tout- <i>trans</i> AR produit (% du contrôle)	9- <i>cis</i> AR produit (% du contrôle)	13- <i>cis</i> AR produit (% du contrôle)	
None (control)	0	100	100	100	
p-HMB (+DTT)	1	51.53	52.09	40.33	
	2	32.91	26.02	39.16	
	3	16.15	21.24	46.72	
p-HMB (-DTT)	1	2.22	14.24	21.12	
	2	1.22	9.02	25.13	
	3	0.96	7.69	22.54	
MgCl ₂	1	100.85	110.19	249.72	
	2	102.62	93.91	268.06	
	3	111.16	93.06	287.13	
	4	112.37	80.12	291.98	
	4.5	121.24	68.04	231.91	
β-Ionone	0.001	100	85.55	69.75	
	0.002	100	46.96	36.49	

mRALDH de type 4

La mRALDH de type 4 a un poids moléculaire de 53.4kDa (**Figure 1**, page 71) et fait partie de la famille 8 des ALDHs. Elle est la première rétinol déshydrogénase qui montre une préférence pour l'isomère 9-*cis* du RAL. Sa purification est facilitée à un pH de 5.7 et elle présente une bonne stabilité dans ces conditions. L'enzyme purifiée a été gardée dans une solution tampon, pH 5.7, contenant 15% glycérol et 1% DTT. Des aliquotes ont été conservés à -80°C et utilisés pour les tests, après décongélation sur glace. Des tests avec l'enzyme fraîche et conservée ont montrés une stabilité dans l'activité enzymatique, allant jusqu'à deux mois de conservation (variations ~ 2%). La mRALDH4 catalyse les isomères 9-*cis* et 13-*cis* du RAL et ne présente aucune activité avec l'isomère tout-*trans* (**Figure 2B**, page 72). Les cinétiques enzymatiques ont été réalisées à une température d'incubation de 37°C, 20 min à un pH de 8.5.

La mRALDH4 catalyse les 2 isomères du RAL et les courbes de saturation (**Figure 3B**, page 73) montrent une activité catalytique plus élevée pour le RAL 9-*cis* que pour le 13-*cis*. Le K_m pour les 2 isomères est presque identique, par contre la V_{max} pour le 9-*cis* RAL est beaucoup plus élevée. La mRALDH4 catalyse plus efficacement le 9-*cis* RAL que le 13-*cis* RAL, son efficacité catalytique est 3 fois plus élevée avec ce substrat (**Table 1**, page 76).

La mRALDH4 présente une identité de séquence de plus de 85% avec l'ALDH12 humaine et celle de rat. Lin et collègues ont caractérisé en 2000 l'ALDH12 et ont trouvé qu'elle présente une très faible activité avec le RAL tout-*trans*. D'un autre côté, nos résultats concernant la mRALDH4 sont comparables pour les isomères 9-*cis* et 13-*cis* du RAL à ceux déjà rapportés (Lin M. et al. 2003), mais nous n'avons pas trouvé d'activité avec le RAL tout-*trans*. Elle convertit le RAL 9-*cis* avec une efficacité plus grande de 3 à 25 fois par rapport aux RALDH1 et 2 ce qui indique que la mRALDH4 pourrait convertir la RAL 9-*cis* beaucoup plus efficacement s'il était généré *in vivo*.

L'inhibition causée par le p-HMB est dramatique, mais elle diminue en présence de dithiothréitol (DTT) ce qui suggère que les groupements sulfhydryles sont importants dans l'activité catalytique de la RALDH4 aussi. L'inhibition est plus importante quand le substrat est le RAL 9-*cis* que pour le RAL 13-*cis* (**Tableau 2**, page 81).

Comme réalisé pour la mRALDH3, nous avons testé l'effet de plusieurs concentrations de $MgCl_2$ sur la vitesse d'oxydation de 10 μ M de RAL 9-*cis* et 13-*cis* par la mRALDH4. Les résultats obtenus sont très intéressants puisque le $MgCl_2$ augmente de 300% l'activité en présence de l'isomère 13-*cis* RAL et inhibe de 30% l'activité de la mRALDH4 en présence du 9-*cis* RAL (**Figure 5B**, page 75, **Tableau 2**, page 81)

La β -Ionone inhibe fortement l'activité de la mRALDH4. Pour une concentration de 2 μ M, la quantité d'AR produit est réduite de 53% pour le 9-*cis* et de 63% pour le 13-*cis*. Après avoir recueilli ces données, nous avons investigué la nature de l'inhibition par la β -Ionone de la conversion du RAL 9-*cis* et 13-*cis* dans les ARs respectifs par la mRALDH4. La β -Ionone est un inhibiteur compétitif qui présente des constantes

d'inhibition, K_i de $0.61\mu\text{M}$ et, respectivement $0.32\mu\text{M}$ (**Figure 4A et 4B**, page 74, **Tableau 2**, page 81)

Conclusions :

Ces observations démontrent les différences entre les propriétés cinétiques de la mRALDH3 et la mRALDH4, mais aussi entre ces enzymes et leurs parentes, les mRALDH1 et 2. Les RALDH3 et 4 sont actives avec des isomères différents de RAL, démontrant des caractéristiques uniques dans le groupe des RALDHs : la mRALDH3 est active seulement avec le RAL tout-*trans*, tandis que la mRALDH4 ne présente aucune activité avec le RAL tout-*trans*, ce qui est singulier (**Tableau 3**, page 83). Elles sont toutes NAD^+ dépendantes, pareil aux autres ALDHs cytosoliques de classe I, de laquelle elles font partie.

Tableau 3 : Activité des RALDHs avec différentes isomères de RAL

RALDH	Espèce	ACTIVITÉ AVEC ISOMÈRES DE RAL		
		Tout- <i>trans</i>	9- <i>cis</i>	13- <i>cis</i>
RALDH1	Rat	+	+	-
	Souris	+	+	-
	Humain	+	+	+
	Singe	+	+	+
RALDH2	Rat	+	+	+
	Souris	+	+	+
RALDH3	Humain	+	?	?
	Souris	+	-	-
RALDH4	Humain	-	+	+
	Souris	-	+	+

La β -Ionone n'inhibe pas l'activité de la RALDH3 ce qui confirme les résultats de Graham et collègues en 2006. Le fait que l'anneau aromatique ne représente pas un site majeur d'identification du substrat, ainsi que la préférence exclusive de la RALDH3 pour le RAL tout-*trans*, démontrent l'importance de la chaîne de 8 carbones en structure *trans* dans le substrat. Le modèle structural de la mRALDH3 (**Figure 4.4.4**, page 33) montre un tunnel de liaison au substrat avec le site de liaison au NAD⁺ situé en bas et de la Cys314 active. La RALDH3 présente une activité légèrement plus grande avec le RAL tout-*trans* comparativement à l'octanal, et elle décroît avec l'hexanal (6 C) et le décanal (10 C). Ceci démontre l'importance et la spécificité de la chaîne de 8 atomes de carbones, en conformation *trans* et aussi l'importance de la structure spécifique du RAL tout-*trans*, rigide et plane, par rapport à l'octanal, qui est saturé, et donc structurellement flexible. La chaîne de carbones se lie à l'entrée du tunnel, contrairement à l'anneau β -Ionone qui reste exposé au solvant (Graham et al. 2006).

La mRALDH3 a une efficacité catalytique avec le RAL tout-*trans*, 10 fois plus grande comparativement aux mRALDH1 et mRALDH2 ce qui suggère son rôle dans la synthèse *in vivo* de l'AR dans les tissus et organes où elle est exprimée. Cette activité s'explique possiblement de par sa structure et spécificité. Contrairement aux autres RALDHs, actives avec le RAL tout-*trans*, qui présentent des boucles structurales désordonnées et qui peuvent accommoder aussi le RAL 9-*cis*, la RALDH3 présente un tunnel de liaison étroit qui capte uniquement la chaîne linéaire de 8 Carbones.

La spécificité pour un type de substrat semble avantager les enzymes du groupe des RALDHs. La RALDH4 est active uniquement avec les isomères *cis*. Son efficacité catalytique est 3 fois plus importante par rapport à la RALDH1 et 25 fois plus importante par rapport à la RALDH2 pour le RAL 9-*cis*. Elle présente une forte activité avec l'isomère 13-*cis* du RAL, mais 3.5 fois plus petite par rapport au RAL 9-*cis*.

La β -Ionone inhibe compétitivement l'activité de la RALDH4 pour les 2 isomères du RAL, ce qui suggère que l'anneau β -ionine du RAL est un site majeur d'identification pour la catalyse du substrat de RAL.

Le $MgCl_2$ affecte différemment l'activité de 2 enzymes, et aussi différemment l'activité de la RALDH4 pour les 2 substrats. On a constaté une légère augmentation d'activité (10%) de la RALDH3, une augmentation presque explosive d'activité de la RALDH4 avec le 13-*cis* RAL (300%) et une petite diminution (30%) de l'activité de la RALDH4 avec le RAL 9-*cis* à des concentrations de 4mM de $MgCl_2$. Le mécanisme exact selon lequel le cation Mg^{2+} affecte l'activité des RALDHs n'est pas encore explicité, mais on croit qu'il affecte la libération du NADPH qui peut influencer les activités des RALDHs. La conformation des isomères de RAL peut changer l'orientation des protéines RALDH et de ce fait avoir un impact sur la délivrance du NADH en présence du magnésium (Mg).

La RALDH4 partage moins de 50% d'identité de séquence d'acides aminés avec les autres RALDHs, mais elle présente plusieurs similarités. Elle est exprimée dans le foie et les reins adultes, tant chez l'humain que chez les rongeurs (Lin M and Napoli 2000). Ces fonctions *in vivo* ne sont pas connues. L'AR 9-*cis* est un ligand pour les RXRs, mais ce rôle n'est pas encore démontré *in vivo*. L'existence de l'AR 9-*cis in vivo* est controversée et l'indispensabilité de la RALDH4 dans le développement de la souris n'a pas été investiguée, donc il n'est pas clair si la RALDH4 est impliquée dans la biosynthèse de l'AR 9-*cis in vivo*. Le fait qu'elle s'exprime à un stade précoce dans le foie fœtal de souris, avant les autres RALDHs ainsi que dans certaines cellules du sang, suggère un rôle dans le développement du foie et dans l'hématopoïèse (Lin M. et al. 2003). Ceci est significatif puisque les embryons de souris $RXR\alpha$ manquants, ont l'expression de l'érythropoïétine diminuée et l'érythropoïèse endommagée dans le même intervalle quand il y a expression de la RALDH4 (Makita et al. 2001).

La RALDH4 a une expression différente pendant le développement embryonnaire et dans le rein adulte comparativement aux trois autres RALDHs de souris. La RALDH4 peut fonctionner avec une de CRAD, 1 ou 3 ou la RDH1 qui sont des enzymes reconnues pour leurs activités dans la biosynthèse de l'AR 9-*cis*. La RALDH4 est active *in vitro* avec le RAL 9-*cis* et 13-*cis* et ceci est très bien démontré. La CYP26C1, une enzyme qui catabolise l'AR 9-*cis* et le ROL 9-*cis*, existe *in vivo* (Taimi et al. 2004).

Perspectives :

Pour approfondir notre connaissance sur le comportement enzymatique de ces enzymes, nous avons l'intention d'identifier les acides aminés impliqués dans la catalyse des isomères du RAL. Pour ce faire nous allons procéder par mutagenèse dirigée et par des constructions chimériques. Les données actuelles et nos observations sur ces enzymes, nous indiquent des spécificités dans l'oxydation des isomères du RAL. Notre contribution future nous aidera à mieux comprendre et mieux définir les rôles de ces isoenzymes dans la voie de la biosynthèse de l'AR *in vivo* et par ce fait même, de définir l'implication et les fonctions biologiques des isomères d'AR *in vivo*. Nous voulons, également, obtenir la structure cristalline des RALDH3 et RALDH4, ce qui nous apprendra davantage sur le fonctionnement de ces enzymes.

BIBLIOGRAPHIE:

- Abu J, Batuwangala M, Herbert K, Symonds P. 2005.** Retinoic acid and retinoid receptors: potential chemopreventive and therapeutic role in cervical cancer. *Lancet Oncol* 6: 712-720.
- Abu-Abed S, Dollé P, Metzger D, Beckett B, Chambon P, Petkovich M. 2001.** The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev* 15: 226-240.
- Abu-Abed S, MacLean G, Fraulob V, Chambon P, Petkovich M, Dollé P. 2002.** Differential expression of the retinoic acid-metabolizing enzymes CYP26A1 and CYP26B1 during murine organogenesis. *Mech Dev* 110: 173-177.
- Altucci L, Gronemeyer H. 2004.** Retinoids and TRAIL: two cooperating actors to fight against cancer. *Vitam Horm* 67: 319-345.
- Altucci L, Balducci L, Irminger-Finger I. 2007a.** Cancer therapy: new drugs are emerging based on molecular targeting but still many challenges. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 1278-1279.
- Altucci L, Leibowitz M, Ogilvie K, de Lera A, Gronemeyer H. 2007b.** RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nat Rev Drug Discov* 6: 793-810.
- Altucci L, Rossin A, Raffelsberger W, Reitmair A, Chomienne C, Gronemeyer H. 2001.** Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. *Nat Med* 7: 680-686.
- Ang H, Duester G. 1999.** Stimulation of premature retinoic acid synthesis in *Xenopus* embryos following premature expression of aldehyde dehydrogenase ALDH1. *Eur J Biochem* 260: 227-234.
- Ang H, Deltour L, Hayamizu T, Zgombić-Knight M, Duester G. 1996a.** Retinoic acid synthesis in mouse embryos during gastrulation and craniofacial development linked to class IV alcohol dehydrogenase gene expression. *J Biol Chem* 271: 9526-9534.
- Ang H, Deltour L, Zgombić-Knight M, Wagner M, Duester G. 1996b.** Expression patterns of class I and class IV alcohol dehydrogenase genes in developing epithelia suggest a role for alcohol dehydrogenase in local retinoic acid synthesis. *Alcohol Clin Exp Res* 20: 1050-1064.
- Armstrong J, Ruiz M, Boddy A, Redfern C, Pearson A, Veal G. 2005.** Increasing the intracellular availability of all-trans retinoic acid in neuroblastoma cells. *Br J Cancer* 92: 696-704.

- Azaïs-Braesco V, Pascal G. 2000.** Vitamin A in pregnancy: requirements and safety limits. *Am J Clin Nutr* 71: 1325S-1333S.
- Ballardini N, Johansson C, Lilja G, Lindh M, Linde Y, Scheynius A, Agerberth B. 2009.** Enhanced expression of the antimicrobial peptide LL-37 in lesional skin of adults with atopic eczema. *Br J Dermatol*.
- Balmer J, Blomhoff R. 2005.** A robust characterization of retinoic acid response elements based on a comparison of sites in three species. *J Steroid Biochem Mol Biol* 96: 347-354.
- Bastien J, Adam-Stitah S, Riedl T, Egly J, Chambon P, Rochette-Egly C. 2000.** TFIID interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7. *J Biol Chem* 275: 21896-21904.
- Batten M, Imanishi Y, Maeda T, Tu D, Moise A, Bronson D, Possin D, Van Gelder R, Baehr W, Palczewski K. 2004.** Lecithin-retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver. *J Biol Chem* 279: 10422-10432.
- Baumann L, Vujevich J, Halem M, Martin L, Kerdel F, Lazarus M, Pacheco H, Black L, Bryde J. 2005.** Open-label pilot study of alitretinoin gel 0.1% in the treatment of photoaging. *Cutis* 76: 69-73.
- Benner S, Pajak T, Lippman S, Earley C, Hong W. 1994.** Prevention of second primary tumors with isotretinoin in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: long-term follow-up. *J Natl Cancer Inst* 86: 140-141.
- Bennett A, Buckley P, Blackwell L. 1983.** Inhibition of the dehydrogenase activity of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase by magnesium ions. *Biochemistry* 22: 776-784.
- Benoit G, Altucci L, Flexor M, Ruchaud S, Lillehaug J, Raffelsberger W, Gronemeyer H, Lanotte M. 1999.** RAR-independent RXR signaling induces t(15;17) leukemia cell maturation. *EMBO J* 18: 7011-7018.
- Berg W, Nanus D, Leung A, Brown K, Hutchinson B, Mazumdar M, Xu X, Lotan R, Reuter V, Motzer R. 1999.** Up-regulation of retinoic acid receptor beta expression in renal cancers in vivo correlates with response to 13-cis-retinoic acid and interferon-alpha-2a. *Clin Cancer Res* 5: 1671-1675.
- Bertram J, Vine A. 2005.** Cancer prevention by retinoids and carotenoids: independent action on a common target. *Biochim Biophys Acta* 1740: 170-178.
- Bhat P. 1998.** Retinal dehydrogenase gene expression in stomach and small intestine of rats during postnatal development and in vitamin A deficiency. *FEBS Lett* 426: 260-262.

- Bhat P, Samaha H. 1999.** Kinetic properties of the human liver cytosolic aldehyde dehydrogenase for retinal isomers. *Biochem Pharmacol* 57: 195-197.
- Bhat P, Poissant L, Wang X. 1996.** Purification and partial characterization of bovine kidney aldehyde dehydrogenase able to oxidize retinal to retinoic acid. *Biochem Cell Biol* 74: 695-700.
- Bhat P, Marcinkiewicz M, Li Y, Mader S. 1998.** Changing patterns of renal retinal dehydrogenase expression parallel nephron development in the rat. *J Histochem Cytochem* 46: 1025-1032.
- Bhat P, Labrecque J, Boutin J, Lacroix A, Yoshida A. 1995.** Cloning of a cDNA encoding rat aldehyde dehydrogenase with high activity for retinal oxidation. *Gene* 166: 303-306.
- Blaner W. 2001.** Cellular metabolism and actions of 13-cis-retinoic acid. *J Am Acad Dermatol* 45: S129-135.
- Blaner W, Das K, Mertz J, Das S, Goodman D. 1986.** Effects of dietary retinoic acid on cellular retinol- and retinoic acid-binding protein levels in various rat tissues. *J Lipid Res* 27: 1084-1088.
- Blomhoff R, Blomhoff H. 2006.** Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol* 66: 606-630.
- Bowles J, Feng C, Knight D, Smith C, Roeszler K, Bagheri-Fam S, Harley V, Sinclair A, Koopman P. 2009.** Male-specific expression of *Aldh1a1* in mouse and chicken fetal testes: Implications for retinoid balance in gonad development. *Dev Dyn* 238: 2073-2080.
- Brodeur H, Gagnon I, Mader S, Bhat P. 2003.** Cloning of monkey RALDH1 and characterization of retinoid metabolism in monkey kidney proximal tubule cells. *J Lipid Res* 44: 303-313.
- Brodeur H, Chagnon S, Parisotto M, Mader S, Bhat P. 2006.** Kinetic properties of chimeric class I aldehyde dehydrogenases for retinal isomers. *Biochem Cell Biol* 84: 799-804.
- Brown N, et al. 2000.** Thyroid hormone resistance and increased metabolic rate in the RXR-gamma-deficient mouse. *J Clin Invest* 106: 73-79.
- Budhu A, Noy N. 2002.** Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol Cell Biol* 22: 2632-2641.
- Budhu A, Gillilan R, Noy N. 2001.** Localization of the RAR interaction domain of cellular retinoic acid binding protein-II. *J Mol Biol* 305: 939-949.

Cawley S, et al. 2004. Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell* 116: 499-509.

Cañestro C, Catchen J, Rodríguez-Mari A, Yokoi H, Postlethwait J. 2009. Consequences of lineage-specific gene loss on functional evolution of surviving paralogs: ALDH1A and retinoic acid signaling in vertebrate genomes. *PLoS Genet* 5: e1000496.

Chambon P. 2004. How I became one of the fathers of a superfamily. *Nat Med* 10: 1027-1031.

—. **2005.** The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades. *Mol Endocrinol* 19: 1418-1428.

Chomienne C, Ballerini P, Balitrand N, Daniel M, Fenaux P, Castaigne S, Degos L. 1990. All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemias. II. In vitro studies: structure-function relationship. *Blood* 76: 1710-1717.

Clarke N, Germain P, Altucci L, Gronemeyer H. 2004. Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. *Expert Rev Mol Med* 6: 1-23.

Collins M, Mao G. 1999. Teratology of retinoids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 399-430.

Creech Kraft J, Schuh T, Juchau M, Kimelman D. 1994. Temporal distribution, localization and metabolism of all-trans-retinol, didehydroretinol and all-trans-retinal during *Xenopus* development. *Biochem J* 301 (Pt 1): 111-119.

Crosas B, Allali-Hassani A, Martínez S, Martras S, Persson B, Jörnvall H, Parés X, Farrés J. 2000. Molecular basis for differential substrate specificity in class IV alcohol dehydrogenases: a conserved function in retinoid metabolism but not in ethanol oxidation. *J Biol Chem* 275: 25180-25187.

Custodio V, et al. 2009. Vitamin A deficiency among Brazilian school-aged children in a healthy child service. *Eur J Clin Nutr* 63: 485-490.

Dawson M. 2004. Synthetic retinoids and their nuclear receptors. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 4: 199-230.

de Pee S, Dary O. 2002. Biochemical indicators of vitamin A deficiency: serum retinol and serum retinol binding protein. *J Nutr* 132: 2895S-2901S.

de Thé H, Tiollais P, Dejean A. 1990. The retinoic acid receptors. *Nouv Rev Fr Hematol* 32: 30-32.

- Delva L, Bastie J, Rochette-Egly C, Kraïba R, Balitrand N, Despouy G, Chambon P, Chomienne C. 1999.** Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex. *Mol Cell Biol* 19: 7158-7167.
- Desreumaux P, et al. 2001.** Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 193: 827-838.
- Di Bisceglie A, Osmack P, Brunt E. 2005.** Chemoprevention of hepatocellular carcinoma: use of tamoxifen in an animal model of hepatocarcinogenesis. *J Lab Clin Med* 145: 134-138.
- Dickinson F, Hart G. 1982.** Effects of Mg²⁺, Ca²⁺ and Mn²⁺ on sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. *Biochem J* 205: 443-448.
- Dollé P, Fraulob V, Kastner P, Chambon P. 1994.** Developmental expression of murine retinoid X receptor (RXR) genes. *Mech Dev* 45: 91-104.
- Dong D, Ruuska S, Levinthal D, Noy N. 1999.** Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J Biol Chem* 274: 23695-23698.
- Dragnev K, Petty W, Ma Y, Rigas J, Dmitrovsky E. 2005.** Nonclassical retinoids and lung carcinogenesis. *Clin Lung Cancer* 6: 237-244.
- Dubois C, Schlageter M, de Gentile A, Balitrand N, Toubert M, Krawice I, Fenaux P, Castaigne S, Najean Y, Degos L. 1994.** Modulation of IL-8, IL-1 beta, and G-CSF secretion by all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 8: 1750-1757.
- Duester G. 1996.** Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry* 35: 12221-12227.
- . **2000.** Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem* 267: 4315-4324.
- Duester G, Mic F, Molotkov A. 2003.** Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol Interact* 143-144: 201-210.
- Dupé V, Matt N, Garnier J, Chambon P, Mark M, Ghyselinck N. 2003.** A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14036-14041.

- Ehrig T, Bosron W, Li T. 1990.** Alcohol and aldehyde dehydrogenase. *Alcohol* 25: 105-116.
- Eichele G, Thaller C. 1987.** Characterization of concentration gradients of a morphogenetically active retinoid in the chick limb bud. *J Cell Biol* 105: 1917-1923.
- Escriva H, Bertrand S, Germain P, Robinson-Rechavi M, Umbhauer M, Cartry J, Duffraisse M, Holland L, Gronemeyer H, Laudet V. 2006.** Neofunctionalization in vertebrates: the example of retinoic acid receptors. *PLoS Genet* 2: e102.
- Evans R. 2004.** A transcriptional basis for physiology. *Nat Med* 10: 1022-1026.
- Folli C, Calderone V, Ramazzina I, Zanotti G, Berni R. 2002.** Ligand binding and structural analysis of a human putative cellular retinol-binding protein. *J Biol Chem* 277: 41970-41977.
- Fontana J, Rishi A. 2002.** Classical and novel retinoids: their targets in cancer therapy. *Leukemia* 16: 463-472.
- Formelli F, Barua A, Olson J. 1996.** Bioactivities of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and retinoyl beta-glucuronide. *FASEB J* 10: 1014-1024.
- Franzoni L, Lücke C, Pérez C, Cavazzini D, Rademacher M, Ludwig C, Spisni A, Rossi G, Rüterjans H. 2002.** Structure and backbone dynamics of Apo- and holo-cellular retinol-binding protein in solution. *J Biol Chem* 277: 21983-21997.
- Freemantle S, Spinella M, Dmitrovsky E. 2003.** Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene* 22: 7305-7315.
- Frota-Ruchon A, Marcinkiewicz M, Bhat P. 2000.** Localization of retinal dehydrogenase type 1 in the stomach and intestine. *Cell Tissue Res* 302: 397-400.
- Fujiwara K, et al. 2005.** Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. *Clin Cancer Res* 11: 1219-1225.
- Gagnon I, Duester G, Bhat P. 2002.** Kinetic analysis of mouse retinal dehydrogenase type-2 (RALDH2) for retinal substrates. *Biochim Biophys Acta* 1596: 156-162.
- . 2003. Enzymatic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase type 1. *Biochem Pharmacol* 65: 1685-1690.
- Ghyselinck N, et al. 1999.** Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J* 18: 4903-4914.
- Gianni M, Bauer A, Garattini E, Chambon P, Rochette-Egly C. 2002.** Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR gamma degradation and transactivation. *EMBO J* 21: 3760-3769.

- Giguere V, Ong E, Segui P, Evans R.** Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330: 624-629.
- GLOVER J, REDFEARN E. 1954.** The mechanism of the transformation of beta-carotene into vitamin A in vivo. *Biochem J* 58: xv-xvi.
- Gottesman M, Quadro L, Blaner W. 2001.** Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays* 23: 409-419.
- Graham C, Brocklehurst K, Pickersgill R, Warren M. 2006.** Characterization of retinaldehyde dehydrogenase 3. *Biochem J* 394: 67-75.
- Gronemeyer H, Gustafsson J, Laudet V. 2004.** Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3: 950-964.
- Grün F, Hirose Y, Kawauchi S, Ogura T, Umesono K. 2000.** Aldehyde dehydrogenase 6, a cytosolic retinaldehyde dehydrogenase prominently expressed in sensory neuroepithelia during development. *J Biol Chem* 275: 41210-41218.
- Gudas L. 1994.** Retinoids and vertebrate development. *J Biol Chem* 269: 15399-15402.
- Haffner C, et al. 2004.** Structure-based design of potent retinoid X receptor alpha agonists. *J Med Chem* 47: 2010-2029.
- Hamada K, Gleason S, Levi B, Hirschfeld S, Appella E, Ozato K. 1989.** H-2RIIBP, a member of the nuclear hormone receptor superfamily that binds to both the regulatory element of major histocompatibility class I genes and the estrogen response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 8289-8293.
- Han J, Yang L, Puri R. 2005.** Analysis of target genes induced by IL-13 cytotoxin in human glioblastoma cells. *J Neurooncol* 72: 35-46.
- Harrison E. 2005.** Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annu Rev Nutr* 25: 87-103.
- Haselbeck R, Hoffmann I, Duester G. 1999.** Distinct functions for Aldh1 and Raldh2 in the control of ligand production for embryonic retinoid signaling pathways. *Dev Genet* 25: 353-364.
- He L, Guidez F, Tribioli C, Peruzzi D, Ruthardt M, Zelent A, Pandolfi P. 1998.** Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with co-repressors determine differential responses to RA in APL. *Nat Genet* 18: 126-135.
- Hempel J, Perozich J, Wymore T, Nicholas H. 2003.** An algorithm for identification and ranking of family-specific residues, applied to the ALDH3 family. *Chem Biol Interact* 143-144: 23-28.

- Hong W, Lippman S, Itri L, Karp D, Lee J, Byers R, Schantz S, Kramer A, Lotan R, Peters L. 1990.** Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 323: 795-801.
- Hsu L, Chang W, Yoshida A. 2000.** Mouse type-2 retinaldehyde dehydrogenase (RALDH2): genomic organization, tissue-dependent expression, chromosome assignment and comparison to other types. *Biochim Biophys Acta* 1492: 289-293.
- Hsu L, Chang W, Hiraoka L, Hsieh C. 1994.** Molecular cloning, genomic organization, and chromosomal localization of an additional human aldehyde dehydrogenase gene, ALDH6. *Genomics* 24: 333-341.
- Hsu L, Chang W, Hoffmann I, Duester G. 1999.** Molecular analysis of two closely related mouse aldehyde dehydrogenase genes: identification of a role for Aldh1, but not Aldh-pb, in the biosynthesis of retinoic acid. *Biochem J* 339 (Pt 2): 387-395.
- Huang E, Hynes M, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, Fields J, Wicha M, Boman B. 2009.** Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* 69: 3382-3389.
- Höög J, Hedberg J, Strömberg P, Svensson S.** Mammalian alcohol dehydrogenase - functional and structural implications. *J Biomed Sci* 8: 71-76.
- IJpenberg A, et al. 2004.** In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *EMBO J* 23: 2083-2091.
- Jakoby W, Ziegler D. 1990.** The enzymes of detoxication. *J Biol Chem* 265: 20715-20718.
- Jelski W, Szmikowski M. 2008.** Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the cancer diseases. *Clin Chim Acta* 395: 1-5.
- Jiang J, Lin L, Lian G, Greiner T. 2008.** Vitamin A deficiency and child feeding in Beijing and Guizhou, China. *World J Pediatr* 4: 20-25.
- Jiménez-Lara A, Clarke N, Altucci L, Gronemeyer H. 2004.** Retinoic-acid-induced apoptosis in leukemia cells. *Trends Mol Med* 10: 508-515.
- Jörnvall H, Persson B, Krook M, Atrian S, González-Duarte R, Jeffery J, Ghosh D. 1995.** Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* 34: 6003-6013.
- Kalua K, Patel D, Muhit M, Courtright P. 2008.** Causes of blindness among children identified through village key informants in Malawi. *Can J Ophthalmol* 43: 425-427.
- Kanai M, Raz A, Goodman D. 1968.** Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest* 47: 2025-2044.

- Kang S, Duell E, Fisher G, Datta S, Wang Z, Reddy A, Tavakkol A, Yi J, Griffiths C, Elder J. 1995.** Application of retinol to human skin in vivo induces epidermal hyperplasia and cellular retinoid binding proteins characteristic of retinoic acid but without measurable retinoic acid levels or irritation. *J Invest Dermatol* 105: 549-556.
- Kastner P, Mark M, Chambon P. 1995.** Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* 83: 859-869.
- Kastner P, Krust A, Mendelsohn C, Garnier J, Zelent A, Leroy P, Staub A, Chambon P. 1990.** Murine isoforms of retinoic acid receptor gamma with specific patterns of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2700-2704.
- Kastner P, Grondona J, Mark M, Gansmuller A, LeMeur M, Decimo D, Vonesch J, Dollé P, Chambon P. 1994.** Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* 78: 987-1003.
- Kato M, Blaner W, Mertz J, Das K, Kato K, Goodman D. 1985.** Influence of retinoid nutritional status on cellular retinol- and cellular retinoic acid-binding protein concentrations in various rat tissues. *J Biol Chem* 260: 4832-4838.
- Kavanagh K, Jörnvall H, Persson B, Oppermann U. 2008.** Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell Mol Life Sci* 65: 3895-3906.
- Kiefer C, Hessel S, Lampert J, Vogt K, Lederer M, Breithaupt D, von Lintig J. 2001.** Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J Biol Chem* 276: 14110-14116.
- Kim C. 2008.** Roles of retinoic acid in induction of immunity and immune tolerance. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 8: 289-294.
- Kim H, Lapointe J, Kaygusuz G, Ong D, Li C, van de Rijn M, Brooks J, Pollack J. 2005.** The retinoic acid synthesis gene ALDH1a2 is a candidate tumor suppressor in prostate cancer. *Cancer Res* 65: 8118-8124.
- Koch J, et al. 2007.** Mammary tumor modifiers in BALB/cJ mice heterozygous for p53. *Mamm Genome* 18: 300-309.
- Koivusalo M, Baumann M, Uotila L. 1989.** Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett* 257: 105-109.
- Kopf E, Plassat J, Vivat V, de Thé H, Chambon P, Rochette-Egly C. 2000.** Dimerization with retinoid X receptors and phosphorylation modulate the retinoic acid-induced degradation of retinoic acid receptors alpha and gamma through the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 275: 33280-33288.

- Krezel W, Ghyselinck N, Samad T, Dupé V, Kastner P, Borrelli E, Chambon P. 1998.** Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice. *Science* 279: 863-867.
- Labrecque J, Dumas F, Lacroix A, Bhat P. 1995.** A novel isoenzyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-cis and all-trans retinoic acid. *Biochem J* 305 (Pt 2): 681-684.
- Lampen A, Meyer S, Nau H. 2001.** Effects of receptor-selective retinoids on CYP26 gene expression and metabolism of all-trans-retinoic acid in intestinal cells. *Drug Metab Dispos* 29: 742-747.
- Lampron C, Rochette-Egly C, Gorry P, Dollé P, Mark M, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P. 1995.** Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* 121: 539-548.
- Lee J, Newman R, Lippman S, Huber M, Minor T, Raber M, Krakoff I, Hong W. 1993.** Phase I evaluation of all-trans-retinoic acid in adults with solid tumors. *J Clin Oncol* 11: 959-966.
- Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart J, Staels B. 2006.** Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* 116: 571-580.
- Lehmann J, Zhang X, Pfahl M. 1992.** RAR gamma 2 expression is regulated through a retinoic acid response element embedded in Sp1 sites. *Mol Cell Biol* 12: 2976-2985.
- Leroy P, Nakshatri H, Chambon P. 1991.** Mouse retinoic acid receptor alpha 2 isoform is transcribed from a promoter that contains a retinoic acid response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 10138-10142.
- Levin A, Sturzenbecker L, Kazmer S, Bosakowski T, Huselton C, Allenby G, Speck J, Kratzeisen C, Rosenberger M, Lovey A. 1992.** 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature* 355: 359-361.
- Lewis C, Cler L, Bu D, Zöchbauer-Müller S, Milchgrub S, Naftalis E, Leitch A, Minna J, Euhus D. 2005.** Promoter hypermethylation in benign breast epithelium in relation to predicted breast cancer risk. *Clin Cancer Res* 11: 166-172.
- Li E, Norris A. 1996.** Structure/function of cytoplasmic vitamin A-binding proteins. *Annu Rev Nutr* 16: 205-234.
- Li E, Tso P. 2003.** Vitamin A uptake from foods. *Curr Opin Lipidol* 14: 241-247.
- Li E, Demmer L, Sweetser D, Ong D, Gordon J. 1986.** Rat cellular retinol-binding protein II: use of a cloned cDNA to define its primary structure, tissue-specific expression, and developmental regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 5779-5783.

- Lin M, Napoli J. 2000.** cDNA cloning and expression of a human aldehyde dehydrogenase (ALDH) active with 9-cis-retinal and identification of a rat ortholog, ALDH12. *J Biol Chem* 275: 40106-40112.
- Lin M, Zhang M, Abraham M, Smith SM, Napoli JL. 2003.** Mouse retinal dehydrogenase 4 (RALDH4), molecular cloning, cellular expression, and activity in 9-cis-retinoic acid biosynthesis in intact cells. *J Biol Chem* 278: 9856-9861.
- Loudig O, Babichuk C, White J, Abu-Abed S, Mueller C, Petkovich M. 2000.** Cytochrome P450RAI(CYP26) promoter: a distinct composite retinoic acid response element underlies the complex regulation of retinoic acid metabolism. *Mol Endocrinol* 14: 1483-1497.
- Luo T, Wagner E, Dräger U. 2009.** Integrating retinoic acid signaling with brain function. *Dev Psychol* 45: 139-150.
- Luo T, Sakai Y, Wagner E, Dräger U. 2006.** Retinoids, eye development, and maturation of visual function. *J Neurobiol* 66: 677-686.
- Maden M. 1994.** Distribution of cellular retinoic acid-binding proteins I and II in the chick embryo and their relationship to teratogenesis. *Teratology* 50: 294-301.
- . **2004.** Retinoids in lung development and regeneration. *Curr Top Dev Biol* 61: 153-189.
- Mader S, Chen J, Chen Z, White J, Chambon P, Gronemeyer H. 1993.** The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains. *EMBO J* 12: 5029-5041.
- Makita T, Hernandez-Hoyos G, Chen T, Wu H, Rothenberg E, Sucov H. 2001.** A developmental transition in definitive erythropoiesis: erythropoietin expression is sequentially regulated by retinoic acid receptors and HNF4. *Genes Dev* 15: 889-901.
- Malpel S, Mendelsohn C, Cardoso W. 2000.** Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development* 127: 3057-3067.
- Mangelsdorf D. 1994.** Vitamin A receptors. *Nutr Rev* 52: S32-44.
- Mangelsdorf D, Ong E, Dyck J, Evans R. 1990.** Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345: 224-229.
- Mangelsdorf D, Kliewer S, Kakizuka A, Umesono K, Evans R. 1993.** Retinoid receptors. *Recent Prog Horm Res* 48: 99-121.
- Mangelsdorf D, Umesono K, Kliewer S, Borgmeyer U, Ong E, Evans R. 1991.** A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* 66: 555-561.

- Mangelsdorf D, Borgmeyer U, Heyman R, Zhou J, Ong E, Oro A, Kakizuka A, Evans R. 1992.** Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* 6: 329-344.
- Marasca R, Zucchini P, Galimberti S, Leonardi G, Vaccari P, Donelli A, Luppi M, Petrini M, Torelli G. 1999.** Missense mutations in the PML/RARalpha ligand binding domain in ATRA-resistant As(2)O(3) sensitive relapsed acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 84: 963-968.
- Marchitti S, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V. 2008.** Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4: 697-720.
- Mark M, Ghyselinck N, Chambon P. 2004.** Retinoic acid signalling in the development of branchial arches. *Curr Opin Genet Dev* 14: 591-598.
- . **2006.** Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 451-480.
- Marlier A, Gilbert T. 2004.** Expression of retinoic acid-synthesizing and -metabolizing enzymes during nephrogenesis in the rat. *Gene Expr Patterns* 5: 179-185.
- Martras S, Alvarez R, Martínez S, Torres D, Gallego O, Duester G, Farrés J, de Lera A, Parés X. 2004.** The specificity of alcohol dehydrogenase with cis-retinoids. Activity with 11-cis-retinol and localization in retina. *Eur J Biochem* 271: 1660-1670.
- Mascrez B, Mark M, Krezel W, Dupé V, LeMeur M, Ghyselinck N, Chambon P. 2001.** Differential contributions of AF-1 and AF-2 activities to the developmental functions of RXR alpha. *Development* 128: 2049-2062.
- Mascrez B, Ghyselinck N, Watanabe M, Annicotte J, Chambon P, Auwerx J, Mark M. 2004.** Ligand-dependent contribution of RXRbeta to cholesterol homeostasis in Sertoli cells. *EMBO Rep* 5: 285-290.
- Matsuura T, Gad M, Harrison E, Ross A. 1997.** Lecithin:retinol acyltransferase and retinyl ester hydrolase activities are differentially regulated by retinoids and have distinct distributions between hepatocyte and nonparenchymal cell fractions of rat liver. *J Nutr* 127: 218-224.
- McCaffery P, Dräger U. 1997.** A sensitive bioassay for enzymes that synthesize retinoic acid. *Brain Res Brain Res Protoc* 1: 232-236.
- McSorley L, Daly A. 2000.** Identification of human cytochrome P450 isoforms that contribute to all-trans-retinoic acid 4-hydroxylation. *Biochem Pharmacol* 60: 517-526.

- Mesnil M, Crespin S, Avanzo J, Zaidan-Dagli M. 2005.** Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* 1719: 125-145.
- Miano J, Berk B. 2000.** Retinoids: versatile biological response modifiers of vascular smooth muscle phenotype. *Circ Res* 87: 355-362.
- Mic F, Haselbeck R, Cuenca A, Duester G. 2002.** Novel retinoic acid generating activities in the neural tube and heart identified by conditional rescue of Raldh2 null mutant mice. *Development* 129: 2271-2282.
- Mic F, Molotkov A, Fan X, Cuenca A, Duester G. 2000.** RALDH3, a retinaldehyde dehydrogenase that generates retinoic acid, is expressed in the ventral retina, otic vesicle and olfactory pit during mouse development. *Mech Dev* 97: 227-230.
- Miller WJ. 1998.** The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer. *Cancer* 83: 1471-1482.
- Million K, Tournier F, Houcine O, Ancian P, Reichert U, Marano F. 2001.** Effects of retinoic acid receptor-selective agonists on human nasal epithelial cell differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25: 744-750.
- Minucci S, Nervi C, Lo Coco F, Pelicci P. 2001.** Histone deacetylases: a common molecular target for differentiation treatment of acute myeloid leukemias? *Oncogene* 20: 3110-3115.
- Moise A, Noy N, Palczewski K, Blaner W. 2007.** Delivery of retinoid-based therapies to target tissues. *Biochemistry* 46: 4449-4458.
- Molotkova N, Molotkov A, Duester G. 2007.** Role of retinoic acid during forebrain development begins late when Raldh3 generates retinoic acid in the ventral subventricular zone. *Dev Biol* 303: 601-610.
- Montplaisir V, Lan N, Guimond J, Savineau C, Bhat P, Mader S. 2002.** Recombinant class I aldehyde dehydrogenases specific for all-trans- or 9-cis-retinal. *J Biol Chem* 277: 17486-17492.
- Montrone M, Martorelli D, Rosato A, Dolcetti R. 2009.** Retinoids as critical modulators of immune functions: new therapeutic perspectives for old compounds. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 9: 113-131.
- Moore S, Baker H, Blythe T, Kitson K, Kitson T, Baker E. 1998.** Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure* 6: 1541-1551.
- Moreb J, Baker H, Chang L, Amaya M, Lopez M, Ostmark B, Chou W. 2008.** ALDH isozymes downregulation affects cell growth, cell motility and gene expression in lung cancer cells. *Mol Cancer* 7: 87.

Morimoto K, Kim S, Tanei T, Shimazu K, Tanji Y, Taguchi T, Tamaki Y, Terada N, Noguchi S. 2009. Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression. *Cancer Sci* 100: 1062-1068.

Morriss-Kay G, Sokolova N. 1996. Embryonic development and pattern formation. *FASEB J* 10: 961-968.

Nagao A. 2004. Oxidative conversion of carotenoids to retinoids and other products. *J Nutr* 134: 237S-240S.

Napoli J. 1996. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin Immunol Immunopathol* 80: S52-62.

—. **1999.** Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 63: 139-188.

—. **2001.** 17beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 9 and other short-chain dehydrogenases/reductases that catalyze retinoid, 17beta- and 3alpha-hydroxysteroid metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 171: 103-109.

Napoli J, Race K. 1988. Biogenesis of retinoic acid from beta-carotene. Differences between the metabolism of beta-carotene and retinal. *J Biol Chem* 263: 17372-17377.

Newcomer M, Ong D. 2000. Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin. *Biochim Biophys Acta* 1482: 57-64.

Nezzar H, Chiambaretta F, Marceau G, Blanchon L, Faye B, Dechelotte P, Rigal D, Sapin V. 2007. Molecular and metabolic retinoid pathways in the human ocular surface. *Mol Vis* 13: 1641-1650.

Niederreither K, McCaffery P, Dräger U, Chambon P, Dollé P. 1997. Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech Dev* 62: 67-78.

Niederreither K, Vermot J, Fraulob V, Chambon P, Dollé P. 2002a. Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)- independent patterns of retinoic acid synthesis in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16111-16116.

Niederreither K, Fraulob V, Garnier J, Chambon P, Dollé P. 2002b. Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse. *Mech Dev* 110: 165-171.

Niederreither K, Abu-Abed S, Schuhbauer B, Petkovich M, Chambon P, Dollé P. 2002c. Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signaling during mouse development. *Nat Genet* 31: 84-88.

- Niles R. 2003.** Vitamin A (retinoids) regulation of mouse melanoma growth and differentiation. *J Nutr* 133: 282S-286S.
- Nohara A, Kobayashi J, Mabuchi H. 2009.** Retinoid X Receptor Heterodimer Variants and Cardiovascular Risk Factors. *J Atheroscler Thromb*.
- Nojd P, Lindroos AJ, Smolander A, Derome J, Lumme I, Helmisaari HS. 2009.** Artificial recharge of groundwater through sprinkling infiltration: Impacts on forest soil and the nutrient status and growth of Scots pine. *Sci Total Environ*.
- Noy N. 2000.** Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J* 348 Pt 3: 481-495.
- Okamura S, Ng C, Koyama K, Takei Y, Arakawa H, Monden M, Nakamura Y. 1999.** Identification of seven genes regulated by wild-type p53 in a colon cancer cell line carrying a well-controlled wild-type p53 expression system. *Oncol Res* 11: 281-285.
- Okuno M, Kojima S, Matsushima-Nishiwaki R, Tsurumi H, Muto Y, Friedman S, Moriwaki H. 2004.** Retinoids in cancer chemoprevention. *Curr Cancer Drug Targets* 4: 285-298.
- Ong D. 1994.** Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins. *Nutr Rev* 52: S24-31.
- Ono Y, Fukuhara N, Yoshie O. 1998.** TAL1 and LIM-only proteins synergistically induce retinaldehyde dehydrogenase 2 expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia by acting as cofactors for GATA3. *Mol Cell Biol* 18: 6939-6950.
- Paik J, Vogel S, Quadro L, Piantedosi R, Gottesman M, Lai K, Hamberger L, Vieira MM, Blaner W. 2004.** Vitamin A: overlapping delivery pathways to tissues from the circulation. *J Nutr* 134: 276S-280S.
- Pal R, Sagar V. 2008.** Antecedent risk factors of xerophthalmia among Indian rural preschool children. *Eye Contact Lens* 34: 106-108.
- Palczewski K, Saari J. 1997.** Activation and inactivation steps in the visual transduction pathway. *Curr Opin Neurobiol* 7: 500-504.
- Parisotto M, Brodeur H, Bhat P, Mader S. 2006.** [Retinoid metabolism and cancer]. *Med Sci (Paris)* 22: 1101-1106.
- Park J, Tsai S, Tsai M. 2003.** Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) actions. *Keio J Med* 52: 174-181.
- Parés X, Farrés J, Kedishvili N, Duester G. 2008.** Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. *Cell Mol Life Sci* 65: 3936-3949.

- Pelicano L, Chelbi-Alix M. 1998.** [Interferon and retinoic acid in the treatment of human cancer: mechanisms of action]. *Bull Cancer* 85: 313-318.
- Perozich J, Nicholas H, Lindahl R, Hempel J. 1999a.** The big book of aldehyde dehydrogenase sequences. An overview of the extended family. *Adv Exp Med Biol* 463: 1-7.
- Perozich J, Nicholas H, Wang B, Lindahl R, Hempel J. 1999b.** Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Sci* 8: 137-146.
- Persson B, Hedlund J, Jörnvall H. 2008.** Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the MDR superfamily. *Cell Mol Life Sci* 65: 3879-3894.
- Petkovich M. 1992.** Regulation of gene expression by vitamin A: the role of nuclear retinoic acid receptors. *Annu Rev Nutr* 12: 443-471.
- Petkovich P. 2001.** Retinoic acid metabolism. *J Am Acad Dermatol* 45: S136-142.
- Pettersson K, Gustafsson J. 2001.** Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiol* 63: 165-192.
- Pietruszko R. 1983.** Aldehyde dehydrogenase isozymes. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 8: 195-217.
- Pitha-Rowe I, Petty W, Kitareewan S, Dmitrovsky E. 2003.** Retinoid target genes in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 17: 1723-1730.
- Raner G, Vaz A, Coon M. 1996.** 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. *Mol Pharmacol* 49: 515-522.
- Ray W, Bain G, Yao M, Gottlieb D. 1997.** CYP26, a novel mammalian cytochrome P450, is induced by retinoic acid and defines a new family. *J Biol Chem* 272: 18702-18708.
- Reijntjes S, Gale E, Maden M. 2004.** Generating gradients of retinoic acid in the chick embryo: Cyp26C1 expression and a comparative analysis of the Cyp26 enzymes. *Dev Dyn* 230: 509-517.
- Reijntjes S, Blentic A, Gale E, Maden M. 2005.** The control of morphogen signalling: regulation of the synthesis and catabolism of retinoic acid in the developing embryo. *Dev Biol* 285: 224-237.
- Rexer B, Zheng W, Ong D. 2001.** Retinoic acid biosynthesis by normal human breast epithelium is via aldehyde dehydrogenase 6, absent in MCF-7 cells. *Cancer Res* 61: 7065-7070.

- Rochette-Egly C, Germain P. 2009.** Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal* 7: e005.
- Rochette-Egly C, Adam S, Rossignol M, Egly J, Chambon P. 1997.** Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* 90: 97-107.
- Romand R, Kondo T, Fraulob V, Petkovich M, Dollé P, Hashino E. 2006.** Dynamic expression of retinoic acid-synthesizing and -metabolizing enzymes in the developing mouse inner ear. *J Comp Neurol* 496: 643-654.
- Rowe A, Eager N, Brickell P. 1991.** A member of the RXR nuclear receptor family is expressed in neural-crest-derived cells of the developing chick peripheral nervous system. *Development* 111: 771-778.
- Ruff S, Ong D. 2000.** Cellular retinoic acid binding protein is associated with mitochondria. *FEBS Lett* 487: 282-286.
- Rzhetsky A, Ayala F, Hsu L, Chang C, Yoshida A. 1997.** Exon/intron structure of aldehyde dehydrogenase genes supports the "introns-late" theory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6820-6825.
- Salomoni P, Pandolfi P. 2002.** The role of PML in tumor suppression. *Cell* 108: 165-170.
- Semple R, Chatterjee V, O'Rahilly S. 2006.** PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest* 116: 581-589.
- Senoo H. 2004.** Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc* 37: 3-15.
- Sonoda J, Pei L, Evans R. 2008.** Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Lett* 582: 2-9.
- Soprano D, Soprano K, Goodman D. 1986.** Retinol-binding protein messenger RNA levels in the liver and in extrahepatic tissues of the rat. *J Lipid Res* 27: 166-171.
- Soprano D, Qin P, Soprano K. 2004.** Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr* 24: 201-221.
- Soref C, Di Y, Hayden L, Zhao Y, Satre M, Wu R. 2001.** Characterization of a novel airway epithelial cell-specific short chain alcohol dehydrogenase/reductase gene whose expression is up-regulated by retinoids and is involved in the metabolism of retinol. *J Biol Chem* 276: 24194-24202.
- Spinella M, Kerley J, White K, Curtin J. 2003.** Retinoid target gene activation during induced tumor cell differentiation: human embryonal carcinoma as a model. *J Nutr* 133: 273S-276S.

- Sporn M, Roberts A. 1984.** Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 73: 1381-1387.
- . **1994.** Cervical dysplasia regression induced by all-trans-retinoic acid. *J Natl Cancer Inst* 86: 476-477.
- Sporn M, Suh N. 2000.** Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis* 21: 525-530.
- Sucov H, Dyson E, Gumeringer C, Price J, Chien K, Evans R. 1994.** RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev* 8: 1007-1018.
- Suharno D, West C, Muhilal, Karyadi D, Hautvast J. 1993.** Supplementation with vitamin A and iron for nutritional anaemia in pregnant women in West Java, Indonesia. *Lancet* 342: 1325-1328.
- Szalai G, Duester G, Friedman R, Jia H, Lin S, Roe B, Felder M. 2002.** Organization of six functional mouse alcohol dehydrogenase genes on two overlapping bacterial artificial chromosomes. *Eur J Biochem* 269: 224-232.
- Szanto A, Narkar V, Shen Q, Uray I, Davies P, Nagy L. 2004.** Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ* 11 Suppl 2: S126-143.
- Taimi M, Helvig C, Wisniewski J, Ramshaw H, White J, Amad M, Korczak B, Petkovich M. 2004.** A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid. *J Biol Chem* 279: 77-85.
- Takahashi K, Weiner H. 1980.** Magnesium stimulation of catalytic activity of horse liver aldehyde dehydrogenase. Changes in molecular weight and catalytic sites. *J Biol Chem* 255: 8206-8209.
- Takase S, Ong D, Chytil F. 1986.** Transfer of retinoic acid from its complex with cellular retinoic acid-binding protein to the nucleus. *Arch Biochem Biophys* 247: 328-334.
- Takase S, Suruga K, Goda T. 2000.** Regulation of vitamin A metabolism-related gene expression. *Br J Nutr* 84 Suppl 2: S217-221.
- Tallman M, Nabhan C, Feusner J, Rowe J. 2002.** Acute promyelocytic leukemia: evolving therapeutic strategies. *Blood* 99: 759-767.
- Thielitz A, Abdel-Naser M, Fluhr J, Zouboulis C, Gollnick H. 2008.** Topical retinoids in acne--an evidence-based overview. *J Dtsch Dermatol Ges* 6: 1023-1031.
- Vasiliou V, Nebert D. 2005.** Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Hum Genomics* 2: 138-143.

- Vieira M, Paik J, Blaner W, Soares A, Mota R, Guerrant R, Lima A. 2008.** Carotenoids, retinol, and intestinal barrier function in children from northeastern Brazil. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 47: 652-659.
- Vigushin D, Coombes R. 2004.** Targeted histone deacetylase inhibition for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 4: 205-218.
- Vine A, Bertram J. 2002.** Cancer chemoprevention by connexins. *Cancer Metastasis Rev* 21: 199-216.
- . **2005.** Upregulation of connexin 43 by retinoids but not by non-provitamin A carotenoids requires RARs. *Nutr Cancer* 52: 105-113.
- Vine A, Leung Y, Bertram J. 2005.** Transcriptional regulation of connexin 43 expression by retinoids and carotenoids: similarities and differences. *Mol Carcinog* 43: 75-85.
- Wagner E, McCaffery P, Dräger U. 2000.** Retinoic acid in the formation of the dorsoventral retina and its central projections. *Dev Biol* 222: 460-470.
- Wan Y, et al. 2000.** Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor alpha as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver. *Mol Cell Biol* 20: 4436-4444.
- Warrell RJ. 1996.** Pathogenesis and management of acute promyelocytic leukemia. *Annu Rev Med* 47: 555-565.
- Wei S, Episkopou V, Piantedosi R, Maeda S, Shimada K, Gottesman M, Blaner W. 1995.** Studies on the metabolism of retinol and retinol-binding protein in transthyretin-deficient mice produced by homologous recombination. *J Biol Chem* 270: 866-870.
- White J, Ramshaw H, Taimi M, Stangle W, Zhang A, Everingham S, Creighton S, Tam S, Jones G, Petkovich M. 2000.** Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6403-6408.
- Willard S, et al. 2009.** Does "asymptomatic" mean without symptoms for those living with HIV infection? *AIDS Care* 21: 322-328.
- Wouters W, van Dun J, Dillen A, Coene M, Cools W, De Coster R. 1992.** Effects of liarozole, a new antitumoral compound, on retinoic acid-induced inhibition of cell growth and on retinoic acid metabolism in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 52: 2841-2846.
- www.biochimie.univ-montp2.fr**
- Xi J, Yang Z. 2008.** Expression of RALDHs (ALDH1As) and CYP26s in human tissues and during the neural differentiation of P19 embryonal carcinoma stem cell. *Gene Expr*

Patterns 8: 438-442.

Yamashita S, Tsujino Y, Moriguchi K, Tatematsu M, Ushijima T. 2006. Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. *Cancer Sci* 97: 64-71.

Yamauchi K, Tata J. 2001. Characterization of *Xenopus* cytosolic thyroid-hormone-binding protein (xCTBP) with aldehyde dehydrogenase activity. *Chem Biol Interact* 130-132: 309-321.

Yin S, Chou C, Lai C, Lee S, Han C. 2003. Human class IV alcohol dehydrogenase: kinetic mechanism, functional roles and medical relevance. *Chem Biol Interact* 143-144: 219-227.

Yonekura L, Nagao A. 2007. Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Mol Nutr Food Res* 51: 107-115.

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

Zanotti G, Berni R. 2004. Plasma retinol-binding protein: structure and interactions with retinol, retinoids, and transthyretin. *Vitam Horm* 69: 271-295.

Zelent A, Guidez F, Melnick A, Waxman S, Licht J. 2001. Translocations of the RARalpha gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 20: 7186-7203.

Zhang M, Chen W, Smith S, Napoli J. 2001. Molecular characterization of a mouse short chain dehydrogenase/reductase active with all-trans-retinol in intact cells, mRDH1. *J Biol Chem* 276: 44083-44090.

Zhang Q, Raner G, Ding X, Dunbar D, Coon M, Kaminsky L. 1998. Characterization of the cytochrome P450 CYP2J4: expression in rat small intestine and role in retinoic acid biotransformation from retinal. *Arch Biochem Biophys* 353: 257-264.

Zhuang R, Lin M, Napoli J. 2002. cis-Retinoic acid dehydrogenase, isozyme 3 (CRAD3): a short-chain dehydrogenase active in a reconstituted path of 9-cis-retinoic acid biosynthesis in intact cells. *Biochemistry* 41: 3477-3483.