Dérégulation du phosphoprotéome dans les cancers : conséquences sur l'activité transcriptionnelle et la dégradation des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR)

Marilyn Carrier

▶ **To cite this version:**

Marilyn Carrier. Dérégulation du phosphoprotéome dans les cancers : conséquences sur l'activité transcriptionnelle et la dégradation des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR). Cancer. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ012 . tel-01423861

HAL Id: tel-01423861
https://theses.hal.science/tel-01423861

Submitted on 24 Oct 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

INSERM U964; CNRS UMR7104

Thèse présentée par :

Marilyn CARRIER

Soutenue le : **26 juin 2015**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline : **Sciences du vivant**

Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

Dérégulation du phosphoprotéome dans les cancers : conséquences sur l'activité transcriptionnelle et la dégradation des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR)

THÈSE DIRIGÉE PAR :

Dr. Cécile Rochette-Egly	Université de Strasbourg

RAPPORTEURS EXTERNES:

Pr. Vincent Laudet	ENS, Lyon
Dr. Catherine Dargemont	Université Paris-Diderot

EXAMINATEUR INTERNE:

Dr. Catherine-Laure Tomasetto	Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord l'ensemble des membres de mon jury, le Pr. Vincent Laudet, le Dr. Catherine Dargemont et le Dr. Catherine-Laure Tomasetto, d'avoir accepté de prendre le temps d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie particulièrement le Dr. Cécile Rochette-Egly qui m'a accueillie dans son équipe et m'a donné l'opportunité de faire une thèse malgré mon parcours quelque peu atypique. Je la remercie pour sa patience, son encadrement, sa disponibilité et l'ensemble de ses précieux conseils.

J'adresse également un énorme MERCI à Régis, pour son aide constante et fidèle depuis le début de ma thèse, et sa patience infinie face à toutes mes petites demandes impromptues et - je l'avoue - mon côté plutôt exigeant. Je le remercie pour sa bonne compagnie, sa bonne humeur tranquille, ses blagues débiles. Un gros merci à Samia également, pour toute son aide, son travail toujours fait avec soin et sa bonne compagnie, et à Dina, pour sa bonne humeur et ses petits conseils de microscopie. Merci finalement à Ziad, Aleksandr, Éric, Gabriella, qui ont quitté l'équipe pour d'autres horizons depuis mon arrivée, pour leur aide et support à divers niveaux.

Un grand merci à tous les membres de la plateforme de protéomique de l'IGBMC, en particulier à Mathilde, pour son aide précieuse et indispensable et pour sa disponibilité et sa patience face à mes montagnes de questions et demandes diverses. Merci également au service de culture: Betty, Camille et les autres... pour leur aide face à toutes ces péripéties liées au défi des ballons de cellules. Merci au service d'anticorps de l'IGBMC qui a su me fournir en qualité et en quantité d'anticorps dont plusieurs de mes travaux dépendaient. Je remercie également le service de biologie moléculaire et d'imagerie de l'IGBMC pour leurs services et leur aide.

Je remercie à nouveau le Dr. Catherine Dargemont pour les cellules HeLa 6xHis-Ub et la construction pIRESpuro2-6xHis-Ub. Je remercie également le Dr. Henk Stunnenberg pour les anticorps anti-PRAME, le Dr Joan Conaway pour les cellules HEK293/FRT HA-PRAME et la construction pcDNA5/FRT 2xHA-PRAME et le Dr. Florence Cammas (équipe du Dr. Régine Losson) pour les cellules MEF TRIM24-/-.

Finalement, un E-N-O-R-M-E merci à Maxime pour sa présence, ses conseils, sa patience face à mes petits (ou gros) coups de stress... et son existence.

Et puis... un gros merci à ma lointaine famille qui m'a toujours supportée.

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Marilyn Carrier et Cécile Rochette-Egly. Control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors: post-translational and epigenetic regulatory mechanisms. (Revue) Dans: P. Dollé, K. Niederreither, Eds., The retinoids, biology, biochemistry and disease. Wiley-Blackwell Press, Hoboken USA, p. 96-116 (2015).

Marilyn Carrier, Mathilde Joint, Régis Lutzing, Adeline Page et Cécile Rochette-Egly. Phosphoproteome and Transcriptome of RA-responsive and RA-resistant breast cancer cell lines. Manuscrit en révision pour PLoS ONE.

Marilyn Carrier, Régis Lutzing, Samia Gaouar, Mathilde Joint, Adeline Page et. Cécile Rochette-Egly TRIM24: a novel function in the degradation of RARα by the ubiquitin-proteasome system. Manuscrit en préparation.

Gabriella Bodo-Pankotai, Samia Gaouar, **Marilyn Carrier**, Dina Andriamoratsiresy, Régis Lutzing, Nicolas Le May, Jean-Marc Egly et Cécile Rochette-Egly. DNA-PK regulate retinoic acid receptor alpha-mediated gene expression via the repair of double-strands DNA breaks. Manuscrit prêt à être soumis.

COMMUNICATIONS

Marilyn Carrier, Mathilde Joint, Régis Lutzing, Adeline Page et Cécile Rochette-Egly. Retinoic acid signaling in human breast cancer cells: a phosphoproteomic approach. IMPAKT 2015 Breast Cancer Conference, Bruxelles (Belgique) 7-9 mai 2015. Poster.

Marilyn Carrier, Mathilde Joint, Régis Lutzing, Samia Gaouar, Adeline Page, et Cécile Rochette-Egly. Retinoic acid receptor function in human breast cancer cells. Quatrième Journée « Récepteurs Nucléaires », Illkirch (France) 23 mai 2014. Présentation orale.

Marilyn Carrier, Mathilde Joint, Adeline Page et Cécile Rochette-Egly. Phosphoproteome analysis in human breast cancer cells. 7e Forum du Cancéropôle du Grand-Est, Strasbourg (France), 26 novembre 2013. Poster.

Marilyn Carrier et Cécile Rochette-Egly. Ubiquitylation and degradation of nuclear retinoic acid receptors. IGBMC's International PhD Program Travel Award Contest 2013, Illkirch (France) mai 2013. Présentation orale. Gagnante du 3^{e} prix.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS i

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS iii

LISTE DES FIGURES ix

LISTE DES TABLEAUX xi

LISTE DES ABBRÉVIATIONS xviii

INTRODUCTION 1

CHAPITRE 1: Vitamine A et acide rétinoïque 3

1.1. Découverte des vitamines et de la vitamine A : brève histoire 3

1.2. Vitamine A 4

1.3. Métabolisme de la vitamine A 5

1.3.1. Synthèse du rétinol 6

1.3.1.1. Voie de la vitamine A préformée 6

1.3.1.2. Voie des caroténoïdes 6

1.4. Stockage et transport du rétinol vers les cellules cibles 8

1.4.1. Métabolisme hépatique des rétinoïdes 8

1.4.2. Acheminement du rétinol vers les cellules cibles 9

CHAPITRE 2: Les récepteurs de l'acide rétinoïque 11

2.1. Structure des RAR 12

2.1.1. La région C ou domaine de liaison à l'ADN (DBD) 12

2.1.2. La région E ou domaine de fixation du ligand (LBD) 15

2.1.3. La région D 17

2.1.4. La région A/B ou domaine N-terminal (NTD) 17

2.1.5. La région F ou domaine C-terminal 18

2.2. Les éléments de réponse (RARE) 18

2.2.1. Les RARE canoniques 18
2.2.2. Un large répertoire de RARE non-canoniques 19
2.2.3. Éléments de réponse distants 21
CHAPITRE 3: Régulation de la transcription par l'acide rétinoïque 22
3.1. Le modèle classique 22
3.1.1. Répression en absence de ligand 22
3.1.2. Activation de la transcription en réponse au ligand 24
3.2. Au-delà du modèle classique 27
3.3. Régulation de la transcription AR-dépendante par les ARN non-codants 27
3.4. Corégulateurs non-conventionnels des RAR 28
3.4.1. Corégulateurs dépourvus de motif LXXLL 28
3.4.2. Corépresseurs à motif LXXLL 29
3.5. Association des RAR avec des ARNm et contrôle de la traduction 30
CHAPITRE 4: TRIM24, un corégulateur des RAR au rôle complexe 31
4.1. Organisation modulaire de TRIM24 31
4.1.1. Le domaine RING 32
4.1.2. Les boîtes B et la superhélice 33
4.1.3. Le domaine PHD-Bromo 33
4.2. TRIM24 et la transcription 34
4.2.1. Rôle activateur 35
4.2.2. Rôle inhibiteur 36
CHAPITRE 5: Rôle de la phosphorylation dans la signalisation de l'AR 38
5.1. Les effets non-génomiques de l'AR: l'activation de kinases 38
5.2. Phosphorylation des RAR 39
5.3. Rôle des phosphorylations dans l'activité des RAR 44
5.4. Phosphorylation aberrante des RAR et cancer 48

5.5. L'AR dans le traitement des cancers 49

5.6. Méthodes pour l'analyse de l'état de phosphorylation des RAR 50

CHAPITRE 6: Régulation de la transcription par le système ubiquitine-protéasome 52

6.1. Dégradation des protéines: généralités 52

6.2. Le système ubiquitine-protéasome 52

6.2.1. L'ubiquitine 53

6.2.1.1. Le processus d'ubiquitination 54

6.2.1.2. Le code d'ubiquitine 56

6.2.1.3. Régulation de l'ubiquitination par la phosphorylation 58

6.2.1.4. La déubiquitination 59

6.2.2. Le protéasome 26S 59

6.2.2.1. Le cœur catalytique 20S 60

6.2.2.2. Le complexe régulateur 19S 63

6.2.2.3. Le processus de dégradation ubiquitine-dépendant 64

6.2.2.4. Mécanismes non-classiques de dégradation par le protéasome 65

6.2.2.5. Phosphorylation et activité du protéasome 67

6.3. Rôle du protéasome dans la régulation transcriptionnelle 67

6.3.1. Rôles protéolytiques du protéasome dans la transcription 67

6.3.2. Rôles non-protéolytiques du protéasome dans la transcription 68

6.4. Dégradation des RAR par le protéasome 68

OBJECTIFS 71

RÉSULTATS ET DISCUSSION 77

I. Analyse protéomique des processus de phosphorylation régulés par l'AR et de leur dérégulation dans les cellules ERBB2+ (Publication 2) 80

I.I. Protéome global 81

I.II. Phosphoprotéome 81

I.II.I. Phosphoprotéome à l'état basal 82
I.II.II. Phosphoprotéome en réponse à l'AR 83
I.II.III. Limitations de la technique 84
I.III. Analyse de l'état de phosphorylation de RARα 85
II. Conséquences des altérations du phosphoprotéome sur la réponse à l'AR 90
II.I. Transcription des gènes cibles 90
II.I. Dégradation de RARα (Publication 3) 91
II.I. Conclusion 93
III. Mécanisme de la dégradation de RARα (Publication 3) 94
III.I. Analyse de l'ubiquitination de RARα 94
III.II. Identification des sites ubiquitinés de RARα 96
III.III. Rôle des corégulateurs non-conventionnels 99
III.I. TRIM24 interagit avec RARα et est recruté avec RARα aux RARE en réponse à l'AR. 101
III.I. TRIM24 n'est pas impliqué dans le recrutement du protéasome. 102
III.I.I. TRIM24 : un rôle dans la déubiquitination RARα? 105
III.II. Conclusion 109
IV. Bilan 110
V. Perspectives 113
RÉFÉRENCES 115
ANNEXES 155
PUBLICATION 1 157
PUBLICATION 2 185
PUBLICATION 3 221
ANNEXE 4 249

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure du rétinol. 4

Figure 2: Métabolisme de la vitamine A. 5

Figure 3: Principaux caroténoïdes provitamine A. 6

Figure 4: Clivage symétrique et asymétrique du β-carotène. 7

Figure 5: Métabolisme de l'acide rétinoïque dans les cellules cibles. 9

Figure 6: Synthèse de l'acide rétinoïque. 10

Figure 7: Organisation modulaire des RAR. 13

Figure 8: Organisation et structure tridimentionnelle du DBD. 14

Figure 9: Structure 3D du LBD 15

Figure 10: Structure de l'hétérodimère RAR/RXR sur l'ADN montrant l'interface de dimérisation. 16

Figure 11: Structure tridimensionnelle du LBD et changements conformationnels induits par la fixation du ligand. 17

Figure 12: Les différents types de RARE 20

Figure 13: RARE proximal et RARE distal: un rôle synergique 21

Figure 14: Modèle classique de l'activation de la transcription par les RAR 23

Figure 15: Corépresseurs et complexes associés. 24

Figure 16: Conformation du LBD en présence de coactivateurs ou de corépresseurs. 25

Figure 17: Coactivateurs et complexes associés. 26

Figure 18: Mode d'action général des corépresseurs à motif LXXLL 29

Figure 19: Organisation modulaire de TRIM24. 31

Figure 20: Structure générale du domaine RING C3HC4 32

Figure 21: Structure de la région C-terminale de TRIM24. 34

Figure 22: Le domaine PHD-bromo de TRIM24: un "histone code reader". 35

Figure 23: Activation de kinases par l'AR. 38

Figure 24: Principales phosphorylations des RAR. 40

Figure 25: Sites de phosphorylation conservés parmi les sous-types de RAR. 42

Figure 26: Cascade de phosphorylation de RARα en réponse à l'AR. 43

Figure 27: Contrôle de l'activité transcriptionnelle de RARγ par la vinexine β. 47

Figure 28: Enrichissement des phosphopeptides par la méthode IMAC. 51

Figure 29: Structure de l'ubiquitine. 53

Figure 30: Mécanisme d'ubiquitination des protéines. 55

Figure 31: Le code d'ubiquitine. 57

Figure 32: Les modifications similaires à l'ubiquitine. 58

Figure 33: Structure du protéasome 26S. 60

Figure 34: Structure du cœur catalytique 20S. 62

Figure 35: Processus de dégradation ubiquitination-dépendante par le protéasome. 66

Figure 36: Principales voies de signalisation activées par erbB-2. 79

Figure 37: L'AR induit la phosphorylation de RARα dans les MCF7 et non dans les BT474. 88

Figure 38: RARα est dégradé par le protéasome en réponse à l'AR. 91

Figure 39: L'inhibition de erbB-2 restaure la dégradation de RARα dans les cellules BT474. 93

Figure 40: La dégradation de RARα se fait de façon ubiquitination-dépendante. 94

Figure 41: Purification des protéines ubiquitinées à partir de cellules exprimant His-Ub. 95

Figure 42: RARα est ubiquitiné en réponse à l'AR. 97

Figure 43: Identification des sites d'ubiquitination par MS. 99

Figure 44: PRAME n'est pas impliqué dans la dégradation de RARα. 100

Figure 45: TRIM24 est impliqué dans la dégradation de RARα. 102

Figure 46: TRIM24 interagit avec RARα en réponse à l'AR. 103

Figure 47: Analyse par ChIP-qPCR du recrutement de RARα, TRIM24, PSMD1 et PSMB5 sur les promoteurs des gènes *Btg2* et *Cyp26a1* dans les MCF7 et les BT474. 104

Figure 48: TRIM24 n'est pas impliqué dans le recrutement du protéasome. 106

Figure 49: La suppression de TRIM24 augmente l'état d'ubiquitination de RARα. 107

Figure 50: Modèle du mécanisme de la dégradation de RARα. 112

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Sous-types des RAR et des RXR avec leurs isoformes et ligands respectifs. 12

Tableau 2: Sites de phosphorylation répertoriés de RARα et kinases associées. 41

Tableau 3: Sites de phosphorylation répertoriés de RXRα et kinases associées. 41

Tableau 4: Sous-unités du cœur catalytique 20S. 61

Tableau 5: Sous-unités du complexe régulateur 19S. 63

Tableau 6: DUB associées à TRIM24 dans les MCF7. 108

Tableau 7: DUB associées à TRIM24 dans les MCF7 et les BT474. 108

Tableau 8: DUB associées à RARα dans les MCF7. 109

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

AAA$^+$	*ATPases associated with diverse cellular activities*
ABP	*actin-binding protein*
ACTR	*acetyltransferase*
ADH	alcool déshydrogénase
ADN	acide désoxyribonucléique
AIB1	*amplified in breast 1*
Ala	Alanine
ALDH	aldéhyde déshydrogénase
APC/C	*anaphase-promoting complex/cyclosome*
AR	acide rétinoïque tout-*trans*
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARN Pol II	ARN polymérase II
Arg	Arginine
ATP	adénosine triphosphate
BCO1	β,β-carotène-15,15'-monooxygénase
BCO2	β,β-carotène-9',10'-oxygénase
CAK	*cdk-activating kinase*
CaMKII	*Ca(++)/calmodulin-dependent protein kinase*
CAR	*constitutive androstane receptor*
CARM1	*coactivator-associated arginine methyltransferase 1*
CBP	*CREB-binding protein*
cdk7,8	*cyclin-dependent kinase 8*
ChIP-seq	immunoprécipitation de chromatine suivie de séquençage haut débit
CK2	*Casein kinase II*
COUP-TFII	*COUP transcription factor 2*
CP	*core particle*
CRABP	*Cellular retinoic acid-binding protein*
CRL	*Cullin-RING E3 ubiquitin ligases*
CRBPI, II, III, IV	*cellular retinol-binding protein I, II, III, IV*
CTE	*C-terminal extension*
CYP26A1	cytochrome P450, famille 26, sous-famille A, polypeptide 1
DBD	*DNA-binding domain*
DGAT1	diacylglycérol O-acyltransférase 1

DR	*direct repeats*
DUB	*deubiquitinating enzyme*
ERα	*estrogen receptor α*
ERK1/2	*extracellular signal-regulated kinase 1/2*
ESI	*Electrospray Ionization*
FACT	*facilitates chromatin transcription*
FGT	facteurs généraux de transcription
FXR	*farnesoid X receptor*
GαQ	*G protein alpha Q*
Gbx2	*gastrulation brain homeobox 2*
GRIP1	*glucocorticoid receptor-interacting protein 1*
GST	Glutathion S-transférase
HDAC	histone déacetylase
HECT	*homologous to E6–AP carboxyl terminus*
HERC	*HECT and RCC1-like domain*
HNF1β	*hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B*
HP	*heterochromatin protein*
ile	isoleucine
IMAC	*immobilized metal affinity chromatography*
IR	*inverted repeats*
iTRAQ	*isobaric tag for relative and absolute quantitation*
JNK	*c-Jun N-terminal kinases*
KAP1	*KRAB-associated protein 1*
kb	kilobases
kDa	kilodalton
LBD	*ligand-binding domain*
LBP	*ligand-binding pocket*
LCoR	*ligand-dependent corepressor*
Leu	Leucine
Lefty-1	*left right determination factor 1*
lncRNA	*long noncoding RNAs*
LP	lipase pancréatique
LPA	leucémie promyélocytaire aiguë
LRAT	lécithine rétinol acéthyltransférase
LXR	*liver X receptors*
Lys	Lysine

MAT1	ménage à trois 1
Mdm2	*mouse double minute 2*
MEF	fibroblastes embryonnaires de souris
Met	Méthionine
miARN	micro-ARN
MR	*mineralocorticoid receptor*
MS	spectrométrie de masse
MSK1	*mitogen- and stress-activated protein kinase*
NCOA1,2,3	*nuclear receptor coactivator 1,2,3*
NCOR	*nuclear receptor corepressor*
NEDD8	*Neuronal-precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 8*
NRIP1	*Nuclear receptor-interacting protein 1*
NRNC	Nuclear Receptors Nomenclature Committee
NTD	*N-terminal domain*
NLS	*nuclear localization signal*
NRBS	*nuclear receptor binding site*
p38/42/44MAPK	*p38/42/44 mitogen-activated protein kinases*
pCAF	*p300/CBP-associated factor*
PHD	*plant homeo domain*
Phe	Phénylalanine
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
piRNA	*Piwi interactings RNA*
PKA	*cAMP-dependent protein kinase*
PKCδ	*Protein kinase C δ*
PLB	Phospholipase B
PLRP2	*pancreatic lipase related protein 2*
PPAR	*peroxisome proliferator-activated receptors*
PRC1,2	*Polycomb Repressive Complex 1,2*
PRAME	*preferentially expressed antigen in melanoma*
PRM	*proline-rich motif*
PRMT1	*Protein arginine N-methyltransferase 1*
PSM	*peptide spectrum match*
PXR	*pregnane X receptor*
RAC3	*receptor-associated coactivator 3*
RALDH	rétinyl alcohol déshydrogénase

RAR	*retinoic acid receptor*
RARE	*retinoic acid response element*
RBCC	*ring finger, B Box, coiled-coil*
RBP	*retinol binding protein*
RDH	rétinal déshydrogésase
REH	rétinyl ester hydrolase
RING	*really interesting new gene*
RIP1	*Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*
RIP140	*receptor-interacting protein 140*
RLD	*RCC1-Like Domains*
RMN	résonance magnétique nucléaire
RN	récepteur nucléaire
RORβ	*RAR-related orphan receptor beta*
RP	*regulatory particle*
Rpn	*regulatory particle non-ATPase subunit*
Rpt	*regulatory particle triple A subunit*
RXR	*retinoid X receptor*
S	sérine
SCF	*Skp-cullin-F box*
SDR	déshydrogénase/réductase à chaîne courte
SH3	*SRC Homology 3*
siRNA	*small interfering RNAs*
SILAC	*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*
SMRT	*silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*
SR-B1	*scavenger receptor class B type 1*
Src	*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*
SRC-1,2,3	*steroid receptor coactivator 1,2,3*
STRA6	*stimulated by retinoic acid 6*
SUG1	*suppressor for Gal 1*
SUMO	*Small ubiquitin-like modifier*
T	thréonine
TACC1	*transforming acidic coiled coil*
TAF	*TATA binding protein-associated factors*
TBL1	*transducin beta-like protein 1*
TBLR1	*TBL1-related protein 1*
TFIIH	*transcription factor IIH*

TIF1α	*transcriptional intermediary factor 1α*
Thr	Thréonine
TIF2	*transcriptional intermediary factor 2*
TMT	*tandem mass tag*
TR	*thyroid hormone receptor*
TR2/4	*testicular receptors 2/4*
TRAM1	*thyroid hormone receptor activator molecule 1*
TRIM24	*Tripartite motif containing 24*
Trp	Tryptophane
TSS	*transcription start site*
TTR	transthyrétine
Tyr	Tyrosine
UBA1,6	*ubiquitin-like modifier activating enzyme 1,6*
UbL	*ubiquitine-like*
ULM	*ubiquitine-like modifiers*
Ufm1	*Ubiquitin-fold modifier 1*
UICPA	Union internationale de chimie pure et appliquée
Val	Valine
VDR	*vitamin D receptor*

Introduction

CHAPITRE 1: VITAMINE A ET ACIDE RÉTINOÏQUE

1.1. Découverte des vitamines et de la vitamine A : brève histoire

L'existence des vitamines n'a réellement été établie qu'il y a un siècle environ. Néanmoins, plusieurs pathologies résultant de carences vitaminiques sont connues depuis des millénaires. Dès l'Antiquité, les Égyptiens et les Grecs ont rapporté des cas de cécité nocturne, de scorbut et de rachitisme, aujourd'hui attribués à une carence en vitamine A, C et D respectivement. Plus tardivement, le béribéri (carence en vitamine B_1 ou thiamine) et la pellagre (carence en vitamine B_3 ou niacine) ont été décrits aux XVII^{e} et XVIII^{e} siècles. Cependant, nombre de ces pathologies ont longtemps été attribuées à des intoxications ou à des causes infectieuses plutôt qu'à des carences alimentaires. En effet, jusqu'à la fin du XIX^{e} siècle, il était généralement admis qu'une diète complète ne nécessitait qu'un apport suffisant en lipides, protéines, hydrates de carbones, sels minéraux et eau (Lanska, 2010). Cette conception ne fût remise en question qu'à partir des années 1880, lorsqu'une série d'expériences menées chez l'animal montrèrent qu'une diète composée exclusivement de ces nutriments engendre des retards de croissance, des pertes de poids et éventuellement la mort. L'une des études pionnières marquantes dans le domaine fût publiée en 1912 par Frederick Gowland Hopkins, qui observa que des rats nourris avec un lait artificiel composé exclusivement de caséine, lipides, hydrates de carbones et sels accusaient un grave retard de croissance, lequel disparaissait lorsque les animaux recevaient de petites quantités de lait frais en plus de cette diète de base (Hopkins, 1912). Il en déduisit que des substances qu'il nomma « facteurs alimentaires accessoires » étaient présentes dans une diète dite normale et étaient nécessaires en petites quantités pour une croissance adéquate. Cette découverte lui valut le prix Nobel de physiologie ou médecine de 1929 qu'il reçut conjointement avec Christiaan Eijkman, découvreur du premier « facteur alimentaire accessoire » connu : la thiamine (ou vitamine B_1). C'est Casimir Funk qui parvint le premier à isoler la thiamine, qu'il nomma initialement « facteur b soluble dans l'eau ». La thiamine possédant une fonction amine, Funk proposa d'appeler cette famille de substances « vitamines », du latin *vita* qui signifie « vie » et du suffixe *amine*, c'est-à-dire « amines vitales ».

À la même époque, deux équipes, l'une dirigées par Elmer McCollum et l'autre par Thomas Osborne et Lafayette Mendel, ont montré de façon indépendante et simultanée l'existence d'une autre substance essentielle : le « facteur a liposoluble », qui deviendra « vitamine A » en 1920 (Semba, 2012). Par la suite, une période d'intenses recherches de 1920 à 1941 mèneront à la découverte de onze nouvelles vitamines, portant leur nombre total à treize. Toutes ne sont pas des amines; par conséquent, les vitamines sont aujourd'hui définies comme étant des substances essentielles à l'organisme mais ne pouvant pas être synthétisé par celui-ci (Piro *et al.*, 2010).

1.2. Vitamine A

La vitamine A ou rétinol est essentielle aux espèces animales de l'embranchement des chordés. Elle est vraisemblablement la plus multifonctionnelle des vitamines, jouant un rôle majeur dans le développement et la croissance embryonnaires, l'homéostasie tissulaire, la différenciation cellulaire, la fonction immunitaire, la vision, la reproduction et l'apoptose (Blomhoff et Blomhoff, 2006; Clagett-Dame et DeLuca, 2002; Clagett-Dame et Knutson, 2011; Gudas et Wagner, 2011; Mark *et al.*, 2009; Pino-Lagos *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2012). Le terme « vitamine A » désigne tout composé possédant l'activité biologique du rétinol (International Union of Pure and Applied Chemistry - International Union of Biochemistry (IUPAC-IUB), 1982). Ces composés font partie de la famille des rétinoïdes, qui inclut les formes naturelles de la vitamine A, les analogues du rétinol avec ou sans activité biologique, de même que des composé non analogues du rétinol mais ayant une activité rétinoïde (Blomhoff et Blomhoff, 2006).

Le rétinol ne pouvant être synthétisé *de novo* par l'animal, un apport alimentaire est nécessaire. Celui-ci peut provenir 1) de sources végétales (fruits et légumes) sous forme de caroténoïdes provitamine A (précurseurs nécessitant une conversion ultérieure en vitamine A), ou 2) de sources animales (foie, œufs, volailles, poissons) sous forme de vitamine A préformée. Cette dernière, rarement présente sous forme de rétinol libre, est majoritairement composée de rétinyl esters (RE), lesquels constituent la forme de stockage du rétinol dans les tissus animaux ayant déjà converti les caroténoïdes provitamine A en vitamine A (Biesalski *et al.*, 2007; Perusek et Maeda, 2013; Van Loo-Bouwman *et al.*, 2014).

Le rétinol, dont la structure fût initialement décrite par Paul Karrer et ses collaborateurs en 1931, est une molécule hydrophobe de petite taille comprenant un cycle β-ionone et une queue isoprénoïde se terminant avec une fonction alcool (Figure 1) (D. M. Benbrook *et al.*, 2014; Karrer *et al.*, 1931). Ses multiples liaisons doubles engendrent l'existence de plusieurs isomères. Six d'entre eux possèdent une activité biologique connue : le tout-*trans*, qui est la forme prédominante, de même que le 9-*cis*, le 11-*cis*, le 13-*cis*, le 9,13-di-*cis* et le 9,13-di-*cis* (Theodosiou *et al.*, 2010). Pour exercer ses fonctions, le rétinol doit cependant être transformé en métabolites actifs, incluant notamment le 11-*cis*-rétinal et l'acide rétinoïque tout-*trans* (AR[1]). Le 11-*cis*-rétinal est impliqué dans la vision par des mécanismes auxquels nous ne nous attarderons pas,

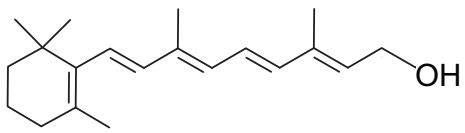


Figure 1: Structure du rétinol.

[1] Bien qu'il existe plusieurs formes d'acide rétinoïque, l'abréviation AR réfèrera par défaut à l'isomère tout-*trans* tout au long de ce manuscrit.

tandis que l'AR intervient dans la régulation de la transcription des gènes que j'aborderai plus loin (voir Chapitre 3) (Al Tanoury *et al.*, 2013; Wald, 1968).

1.3. Métabolisme de la vitamine A

La Figure 2 résume les principales étapes clés du métabolisme de la vitamine A. Celui-ci débute au niveau de la muqueuse intestinale, le site actif de l'absorption du rétinol libre, du clivage des caroténoïdes et de l'hydrolyse des RE chez les vertébrés (Dew et Ong, 1994).

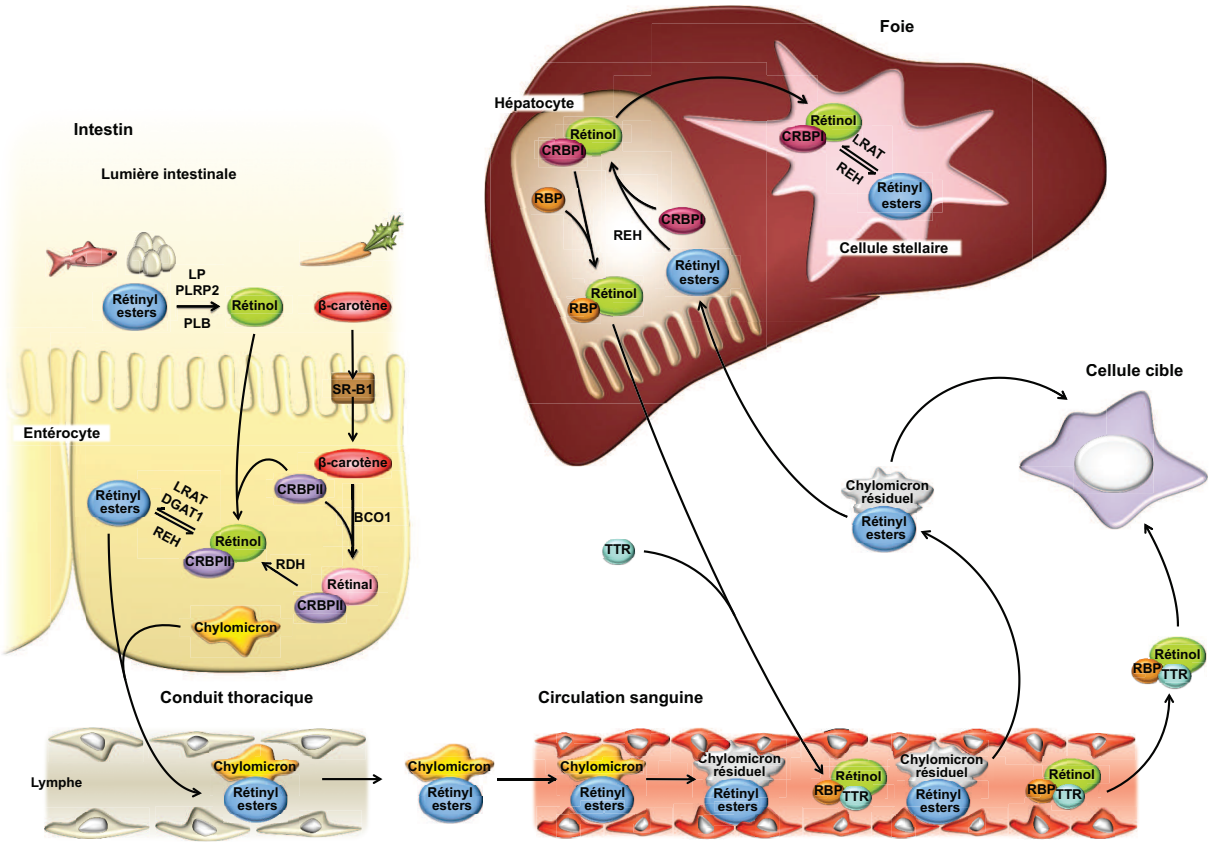


Figure 2: Métabolisme de la vitamine A.

Les diverses formes de vitamine A sont absorbées par les entérocytes (à gauche), qui en reconvertissent la majeure partie en rétinyl esters, forme de stockage et de transport. Ceux-ci sont ensuite être acheminés par voie sanguine vers le foie pour y être stockés dans les cellules stellaires ou vers les cellules cibles (à droite). Suivant les besoins, les rétinyl esters peuvent être réacheminés du foie vers les cellules cibles sous forme de rétinol lié aux protéines de transport RBP et TTR. Modifié de Blomhoff et Blomhoff (2006) et Ruiz *et al.* (2012).

1.3.1. Synthèse du rétinol

1.3.1.1. Voie de la vitamine A préformée

Les RE, principale source alimentaire de vitamine A préformée, doivent être convertis en rétinol dans la lumière de l'intestin avant leur assimilation par les entérocytes (Blomhoff et Blomhoff, 2006). Cette conversion est médiée par la lipase pancréatique (LP), la lipase apparentée de type II (*pancreatic lipase related protein 2,* PLRP2) et la phospholipase B (PLB) de la bordure en brosse (Blomhoff et Blomhoff, 2006; Harrison, 2005).

1.3.1.2. Voie des caroténoïdes

Alternativement, le rétinol peut être synthétisé au niveau de la muqueuse intestinale à partir des caroténoïdes, principalement le β-carotène, provenant de l'alimentation (Paik *et al.*, 2001). Cette voie est considérée comme la source "sécuritaire" d'apport en rétinoïdes: en effet, contrairement à la vitamine A préformée qui est facilement absorbée, la conversion du β-carotène est régulée par l'intestin en fonction du statut rétinoïde (Haskell, 2012; Y. Li *et al.*, 2014).

Les caroténoïdes sont des composés isoprénoïdes naturels présents chez tous les organismes photosynthétiques et responsables des colorations rouges, orangées et jaunes de nombreux végétaux, ainsi que de la coloration de certains oiseaux, insectes ou invertébrés marins qui ont ingéré ces végétaux (P. D. Fraser et Bramley, 2004). Ils représentent la famille de pigments la plus répandue dans la nature avec plus de 600 composés répertoriés (P. D. Fraser et Bramley, 2004). Environ 10 % d'entre eux sont des caroténoïdes provitamine A, c'est-à-dire pouvant être métabolisés en vitamine A, tels la β-cryptoxanthine, l'α-carotène et le β-carotène (Figure 3) (Shete et Quadro, 2013; Yeum et Russell, 2002). Le β-carotène est le mieux caractérisé, le plus abondant dans l'alimentation humaine

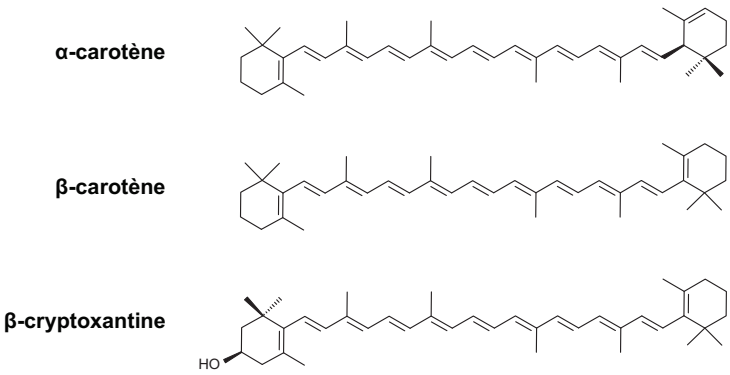


Figure 3: Principaux caroténoïdes provitamine A.
Adapté de Tang et Russell (2009).

et celui dont la conversion en vitamine A est la plus efficace (Shete et Quadro, 2013; Van Loo-Bouwman *et al.*, 2014).

L'absorption des caroténoïdes par les entérocytes se fait *via* un processus impliquant SR-B1 (*scavenger receptor class B type 1*) (Borel *et al.*, 2013; Valacchi *et al.*, 2011). Généralement, un clivage symétrique du β-carotène par la β,β-carotène-15,15'-monooxygénase (BCO1) donne lieu à deux molécules de rétinal (Figure 4, à gauche), qui sont ensuite réduites en rétinol par une rétinal déshydrogésase (RDH) ou oxydées en acide rétinoïque (D'Ambrosio *et al.*, 2011; Shete et Quadro, 2013). Alternativement, il peut y avoir clivage asymétrique par la β,β-carotène-9',10'-oxygénase (BCO2), résultant en la formation de β-apo-10'-caroténal et de β-ionone (Figure 4, à droite) (Kiefer *et al.*, 2001). Ces clivages asymétriques peuvent aussi cibler différentes liaisons doubles, engendrant des formes de β-apocaroténal et de β-apocaroténone plus ou moins longues (Shete et Quadro, 2013). Leur devenir est mal connu, mais Il a été suggéré qu'il pouvaient être convertis an acide rétinoïque par un mécanisme similaire à la β-oxydation des acides gras, bien que cela demeure controversé (Eroglu *et al.*, 2012; X. D. Wang *et al.*, 1996). De façon intéressante, certains travaux récents attribuent cependant à certaines de ces formes une activité antagoniste aux rétinoïdes (Eroglu *et al.*, 2012; Harrison *et al.*, 2012).

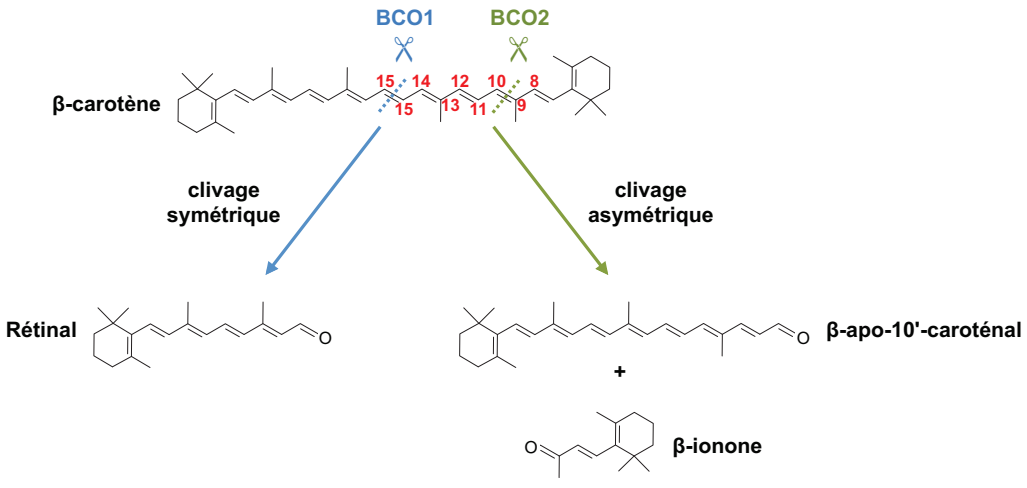


Figure 4: Clivage symétrique et asymétrique du β-carotène.

Modifié de Kiefer *et al.* (2001).

Le rétinol produit par la voie des caroténoïdes est métaboliquement identique à celui provenant de la voie de la vitamine A préformée; ainsi, une fois le rétinol synthétisé, ces deux voies convergent (D'Ambrosio *et al.*, 2011).

1.4. Stockage et transport du rétinol vers les cellules cibles

Dans les entérocytes, le rétinol se lie à CRBPII (*cellular retinol-binding protein*) (Blomhoff et Blomhoff, 2006). En effet, l'acheminement du rétinol liposoluble à travers les fluides aqueux, tels le cytosol, nécessite l'intervention de protéines de transport. Le rétinol intracellulaire est donc associé aux protéines de la famille des CRBP, dont les quatre isoformes humains (I, II, III et IV) sont différentiellement exprimés selon les types cellulaires (Kono et Arai, 2015).

La majorité du rétinol absorbé par les entérocytes est ré-estérifiée en RE. Ceux-ci, biologiquement inactifs, constituent la forme majeure de stockage et de transport de la vitamine A (Schreiber *et al.*, 2012). Cette conversion est majoritairement assurée par la lécithine rétinol acéthyltransférase (LRAT), avec l'aide de CRBPII qui dirige le rétinol vers celle-ci (Herr et Ong, 1992). Une autre enzyme, la diacylglycérol O-acyltransférase 1 (DGAT1) semble également impliquée, notamment en cas de présence d'excès de rétinol évitant ainsi un effet toxique (D'Ambrosio *et al.*, 2011; Shih *et al.*, 2009).

La majorité des RE formés est incorporée aux chylomicrons, qui sont de larges complexes lipoprotéiques composés notamment de triglycérides, de phospholipides et d'apolipoprotéines (Blomhoff *et al.*, 1982). Ceux-ci sont ensuite sécrétés des entérocytes vers le système lymphatique *via* le conduit thoracique avant de passer dans la circulation sanguine où ils seront décomposés en chylomicrons résiduels (Blomhoff et Blomhoff, 2006; Y. Li *et al.*, 2014). Cela permet leur transport vers le foie pour où ils seront stockés ou vers divers tissus cibles (moelle osseuse, rate, tissus adipeux, reins, muscles squelettiques et cellules sanguines périphériques (Blomhoff et Blomhoff, 2006; Goodman *et al.*, 1965). D'autres formes circulantes mineures des rétinoïdes ont aussi été répertoriées, tel l'acide rétinoïque lié à l'albumine ou les rétinyl-β-glucuronides et les rétinoyl-β-glucuronides, mais leur métabolisme demeure cependant mal caractérisé (Y. Li *et al.*, 2014).

1.4.1. Métabolisme hépatique des rétinoïdes

Dans le foie, deux types cellulaires distincts jouent un rôle central dans le métabolisme et le stockage des rétinoïdes: les cellules parenchymateuses hépatiques (hépatocytes) et les cellules stellaires. Dans les hépatocytes, les RE sont hydrolysés en rétinol dans les hépatocytes par les RE hydrolase (REH). Le rétinol formé se lie immédiatement à CRBPI, puis la majorité du rétinol est ré-estérifiée par la LRAT et stockée dans les cellules stellaires (Perusek et Maeda, 2013). La portion

restante du rétinol s'associe à la *retinol binding protein* (RBP, aussi connue sous le nom de RBP4) et rejoint la circulation sanguine (Theodosiou *et al.*, 2010).

1.4.2. Acheminement du rétinol vers les cellules cibles

Dans la circulation sanguine, le complexe rétinol-RBP est associé à la transthyrétine (TTR) qui empêche son élimination par les reins et assure son transport vers les tissus cibles (Theodosiou *et al.*, 2010). La liaison du complexe rétinol-RBP-TTR au récepteur transmembranaire STRA6 (*stimulated by retinoic acid 6*) de la membrane plasmique des cellules cibles permet le détachement de RBP et TTR et l'absorption du rétinol (Figure 5) (Perusek et Maeda, 2013). Le rétinol absorbé est converti dans le cytosol en son principal métabolite actif, l'AR, *via* deux oxydations successives

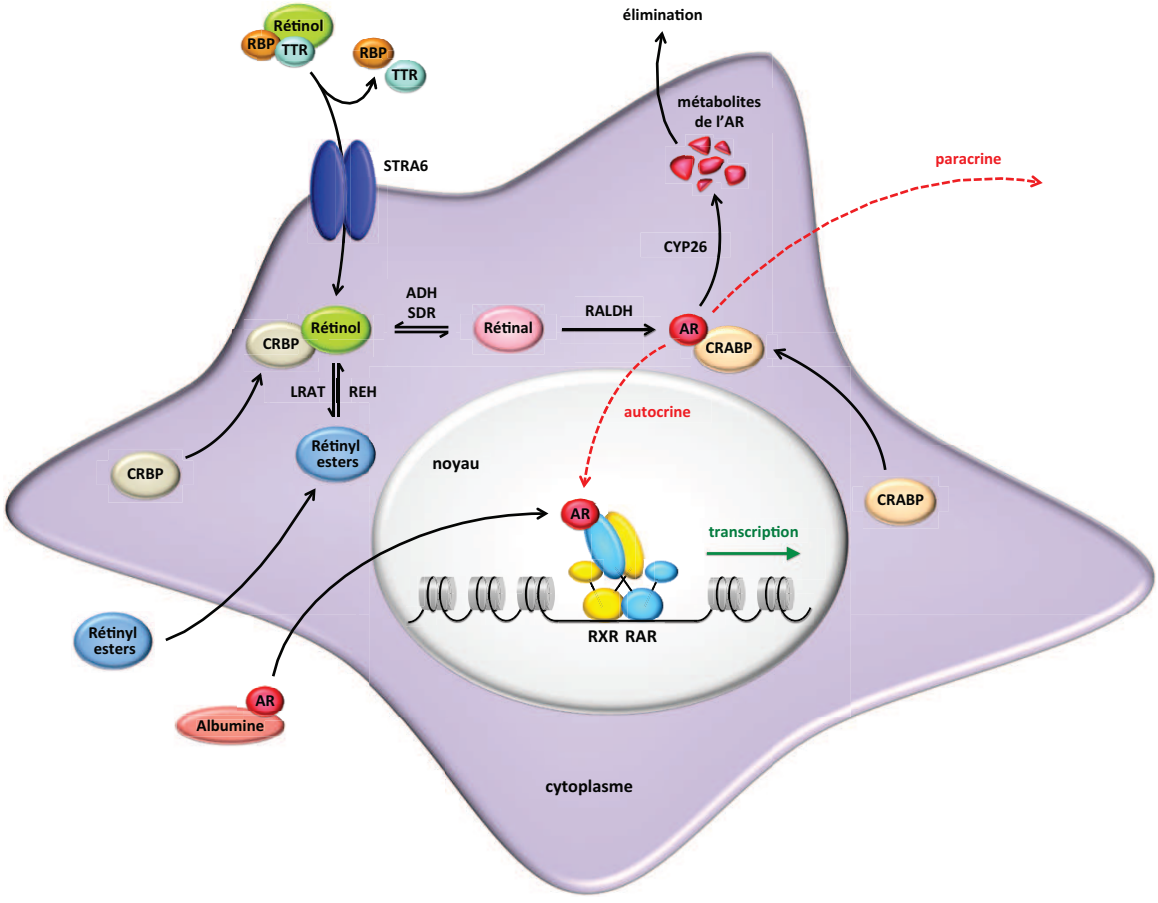


Figure 5: Métabolisme de l'acide rétinoïque dans les cellules cibles.

La liaison du complexe rétinol-RBP-TTR au récepteur transmembranaire STRA6 permet le détachement de RBP et TTR et l'absorption du rétinol. Celui-ci est converti dans le cytosol en son principal métabolite actif, l'AR, pouvant agir localement ou être transporté vers une autre cellule cible. Modifié de Pino-Lagos *et al.* (2010) et Theodosiou *et al.* (2010).

(Figure 6). Cela implique, dans un premier temps, l'oxydation réversible du rétinol en rétinal (ou rétinaldéhyde) par des alcool déshydrogénases (ADH) ou des déshydrogénases/réductases à chaîne courte (SDR) (Duester, 2000). Le rétinal est ensuite converti en AR par des aldéhyde déshydrogénases (ALDH ou RALDH) de façon irréversible. L'AR se lie aux protéines CRABPs cytosoliques (*cellular retinoic acid-binding proteins*) qui lui permettent soit de diffuser dans le noyau et d'exercer ses effets transcriptionnels (signalisation autocrine), soit d'être transporté vers une autre cellule cible environnante (signalisation paracrine) (Blomhoff et Blomhoff, 2006; Theodosiou *et al.*, 2010). L'excès d'AR peut également être dégradé en métabolites oxydés tels l'acide tout-*trans*-4-hydroxy-rétinoïque et l'acide tout-*trans*-4-oxo-rétinoïque par les enzymes de la famille de CYP26 (Thatcher et Isoherranen, 2009). L'équilibre entre la synthèse et le catabolisme permet le contrôle des niveaux d'AR dans les cellules et les tissus (Theodosiou *et al.*, 2010).

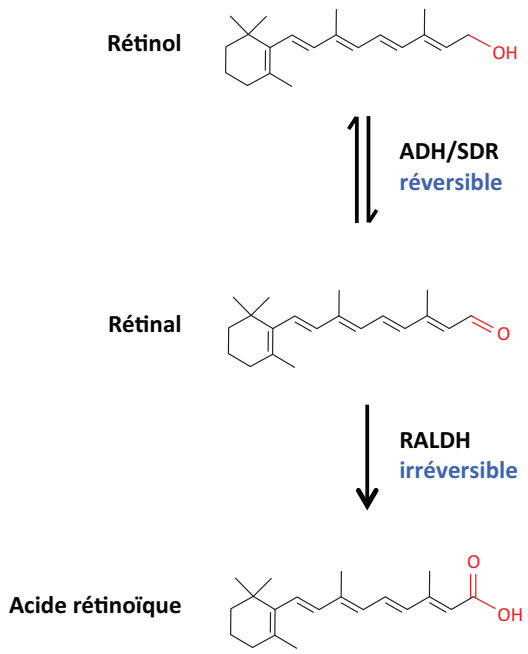


Figure 6: Synthèse de l'acide rétinoïque.

Conversion du rétinol en AR via deux oxydations successives. La conversion du rétinol en rétinal est réversible, alors que la conversion du rétinal en AR est irréversible.

CHAPITRE 2: LES RÉCEPTEURS DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE

Les mécanismes sous-jacents aux effets autres que visuels de la vitamine A sont demeurés inconnus jusqu'à ce que deux équipes indépendantes, celles de Pierre Chambon et Ronald Evans, découvrent et clonent en 1987 un récepteur activé spécifiquement pas l'acide rétinoïque tout-*trans* et appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires (RN) (D. M. Benbrook *et al.*, 2014; Giguere *et al.*, 1987; Kiefer *et al.*, 2001; Petkovich *et al.*, 1987). Ce premier récepteur de l'acide rétinoïque (*retinoic acid receptor*, RAR) est aujourd'hui appelé RARα. Peu de temps après, deux autre RAR, RARβ et RARγ, furent clonés (D. Benbrook *et al.*, 1988; Brand *et al.*, 1988; de The *et al.*, 1987; Krust *et al.*, 1989; Zelent *et al.*, 1989).

À travers ces récepteurs nucléaires, l'AR régule la transcription de plus de 500 gènes. Pour ce faire, les RAR se lient à des éléments de réponses RARE (*retinoic acid response elements*) situés au niveau du promoteur de leurs gènes cibles (voir Section 2.2) (Y. Li *et al.*, 2014). Cependant, il fût rapidement établi que la liaison des RAR aux RARE est fortement facilitée par leur hétérodimérisation avec un autre type de récepteur nucléaire, les RXR (*retinoid X receptor*) α, β et γ (Leid *et al.*, 1992). Ces derniers forment également des hétérodimères avec toute une panoplie d'autres récepteurs nucléaires: le récepteur des hormones thyroïdiennes (TR, *thyroid hormone receptor*), de la vitamine D (VDR, *vitamin D receptor*), des oxystérols (LXR, *liver X receptors*), des xénobiotiques (PXR, *pregnane X receptor*), des acides biliaires (FXR, *farnesoid X receptor*), des androstanes (CAR, *constitutive androstane receptor*) et le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR, *peroxisome proliferator-activated receptors*) (Germain *et al.*, 2006).

L'AR lie les 3 sous-types de RAR avec de fortes affinités de l'ordre du nanomolaire (Delescluse *et al.*, 1991; A. T. Johnson *et al.*, 1999). De plus, un autre isomère de l'acide rétinoïque, l'acide rétinoïque 9-*cis*, peut également lier les RAR (Bastien et Rochette-Egly, 2004). En revanche, les RXR ne peuvent pas lier L'AR avec une bonne affinité, mais peuvent lier l'acide rétinoïque 9-*cis* avec une affinité environ 40 fois supérieure (Heyman *et al.*, 1992; Levin *et al.*, 1992). Cependant, l'acide rétinoïque 9-*cis* n'ayant pu être détecté dans la majorité des tissus, l'existence d'un éventuel rôle *in vivo* de celui-ci fait toujours débat (Germain *et al.*, 2006). Il est à noter qu'une publication très récente a rapporté la découverte du premier ligand endogène des RXR : l'acide 9-*cis*-13,14-dihydrorétinoïque (Ruhl *et al.*, 2015).

De façon intéressante, l'AR peut également lier PPARβ/δ, bien qu'avec une affinité inférieure aux RAR. À travers ce récepteur, l'AR régule la transcription d'une autre panoplie de gènes cibles (Berry et Noy, 2007; Shaw *et al.*, 2003). D'après de récentes études menées *in vitro*, l'AR pourrait aussi lier les récepteurs RORβ (*RAR-related orphan receptor beta*), COUP-TFII (*COUP transcription*

factor 2), ou TR2/4 (*Testicular receptors 2/4*); cependant, la pertinence *in vivo* de ces observations reste à établir (Kruse *et al.*, 2008; Stehlin-Gaon *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2011).

Sous-type	Isoformes	Ligand (isomère de l'acide rétinoïque)
RARα (NR1B1)	RARα1, RARα2	tout-*trans*, 9-*cis*
RARβ (NR1B2)	RARβ1, RARβ2, RARβ3, RARβ4	tout-*trans*, 9-*cis*
RARγ (NR1B3)	RARγ1, RARγ2	tout-*trans*, 9-*cis*
RXRα (NR2B1)	RXRα1, RXRα2	9-*cis*
RXRβ (NR2B2)	RXRβ1, RXRβ2	9-*cis*
RXRγ (NR2B3)	RXRγ1, RXRγ2	9-*cis*

Tableau 1: Sous-types des RAR et des RXR avec leurs isoformes et ligands respectifs.

Les noms entre parenthèses correspondent à la nomenclature NRNC (NRNC, 1999). Adapté de P. Chambon (1996).

Les trois sous-types de RAR et de RXR sont codés par des gènes distincts situés sur des chromosomes différents (Almasan *et al.*, 1994; Ishikawa *et al.*, 1990; Mangelsdorf *et al.*, 1992; Mangelsdorf *et al.*, 1990; Mattei *et al.*, 1991; V. C. Yu *et al.*, 1991). Pour chaque sous-type, il existe plusieurs isoformes (Tableau 1) différant au niveau de leur région N-terminale et qui sont le résultat d'un épissage alternatif des ARN pré-messagers ou d'une utilisation différentielle des promoteurs (Giguere *et al.*, 1990; Kastner *et al.*, 1990; Leroy *et al.*, 1991; Nagpal *et al.*, 1992b; Zelent *et al.*, 1991).

2.1. Structure des RAR

Comme la plupart des récepteurs nucléaires, les RAR ont une structure modulaire composée de six régions désignées A à F (Figure 7). Cette structure comprend notamment deux domaines fonctionnels majeurs: le domaine de liaison à l'ADN, le DBD (*DNA-binding domain*) (région C) et le domaine de liaison au ligand, le LBD (*ligand-binding domain*) (région E), séparés par une région charnière (région D). Le domaine N-terminal (NTD, *N-terminal domain*) et le domaine C-terminal correspondent aux régions A/B et F respectivement.

2.1.1. La région C ou domaine de liaison à l'ADN (DBD)

Le DBD est le domaine le plus conservé et sa structure, révélée par résonance magnétique nucléaire (RMN) et cristallographie, confère aux RAR la capacité à se fixer à des séquences d'ADN spécifiques (Section 2.2) (M. S. Lee *et al.*, 1993; Luisi *et al.*, 1991; Schwabe *et al.*, 1993).

Ce domaine globulaire est composé de deux motifs en doigt de zinc (contenant les boîtes P et D), deux hélices α se croisant à angle droit et d'une extension C-terminale (*C-terminal extension*, CTE) comprenant deux boîtes nommées A et T (Figure 8) (Bastien et Rochette-Egly, 2004; Knegtel *et al.*, 1993; Rastinejad *et al.*, 2000). À l'intérieur de chaque motif en doigt de zinc, quatre résidus cystéine conservés coordonnent de façon tétraédrique un atome de zinc. Ces deux motifs sont repliés de façon à former une structure compacte et interdépendante (Aranda et Pascual, 2001). L'hélice α1 N-terminale, responsable de la reconnaissance de l'ADN, s'insère dans le sillon majeur de celui-ci (Rastinejad *et al.*, 2000). La boîte P, présente dans le motifs de doigt de zinc adjacent, permet la spécificité de cette reconnaissance (Aranda et Pascual, 2001). L'hélice α2 recouvre perpendiculairement l'hélice α1 et contribue à la stabilisation de la structure. Une autre boîte, la

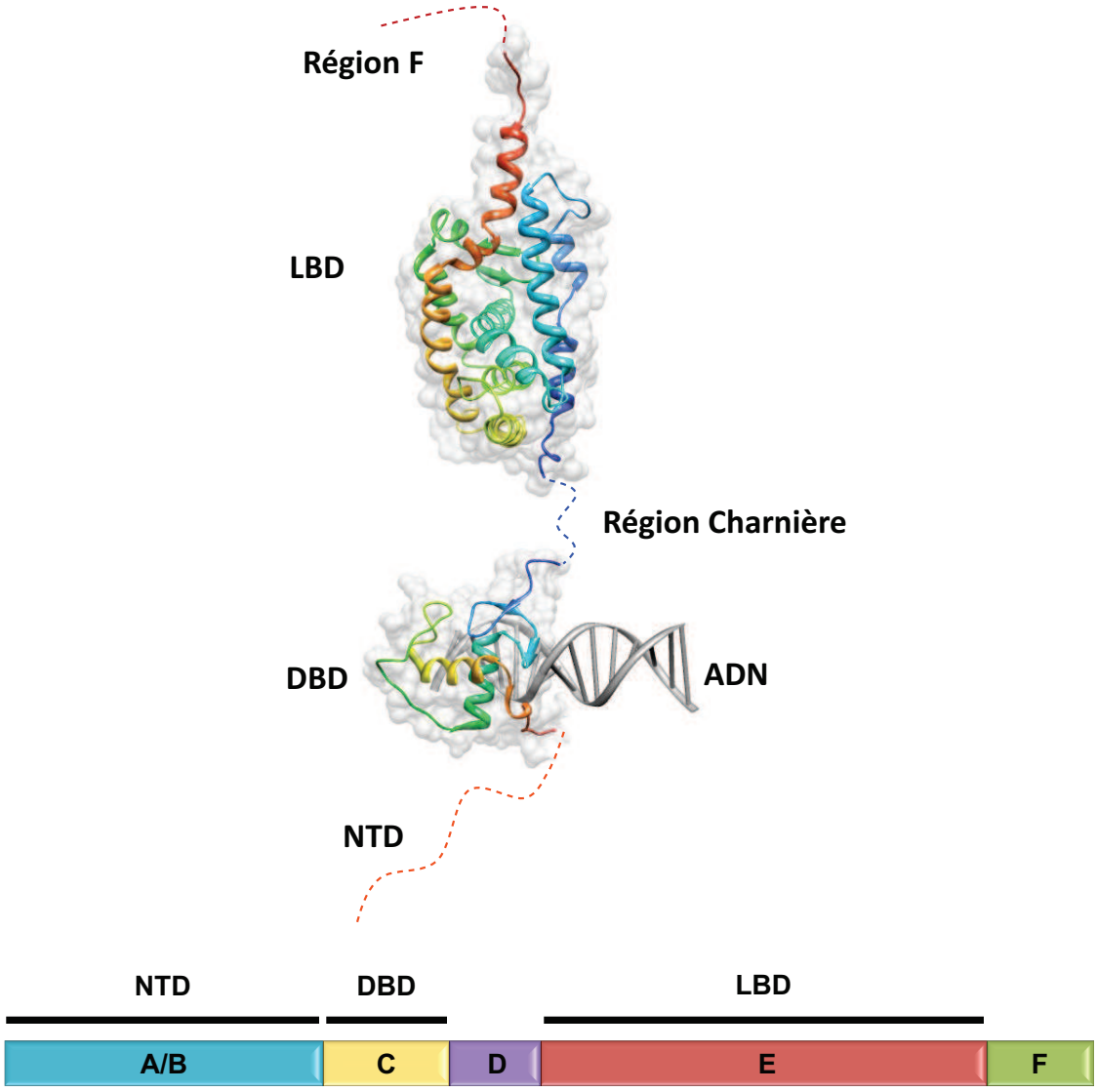


Figure 7: Organisation modulaire des RAR.

Adapté de Al Tanoury *et al.* (2013).

boîte D, présente dans le second motifs de doigt de zinc, est quant à elle impliquée dans la dimérisation (Aranda et Pascual, 2001).

La fixation sur l'ADN induit cependant des changements conformationnels, celui-ci agissant comme un effecteur allostérique (Gronemeyer et Bourguet, 2009; Lefstin et Yamamoto, 1998). Ainsi, les RXR possèdent une hélice α supplémentaire (α3) dans la boîte T en absence d'ADN, laquelle est

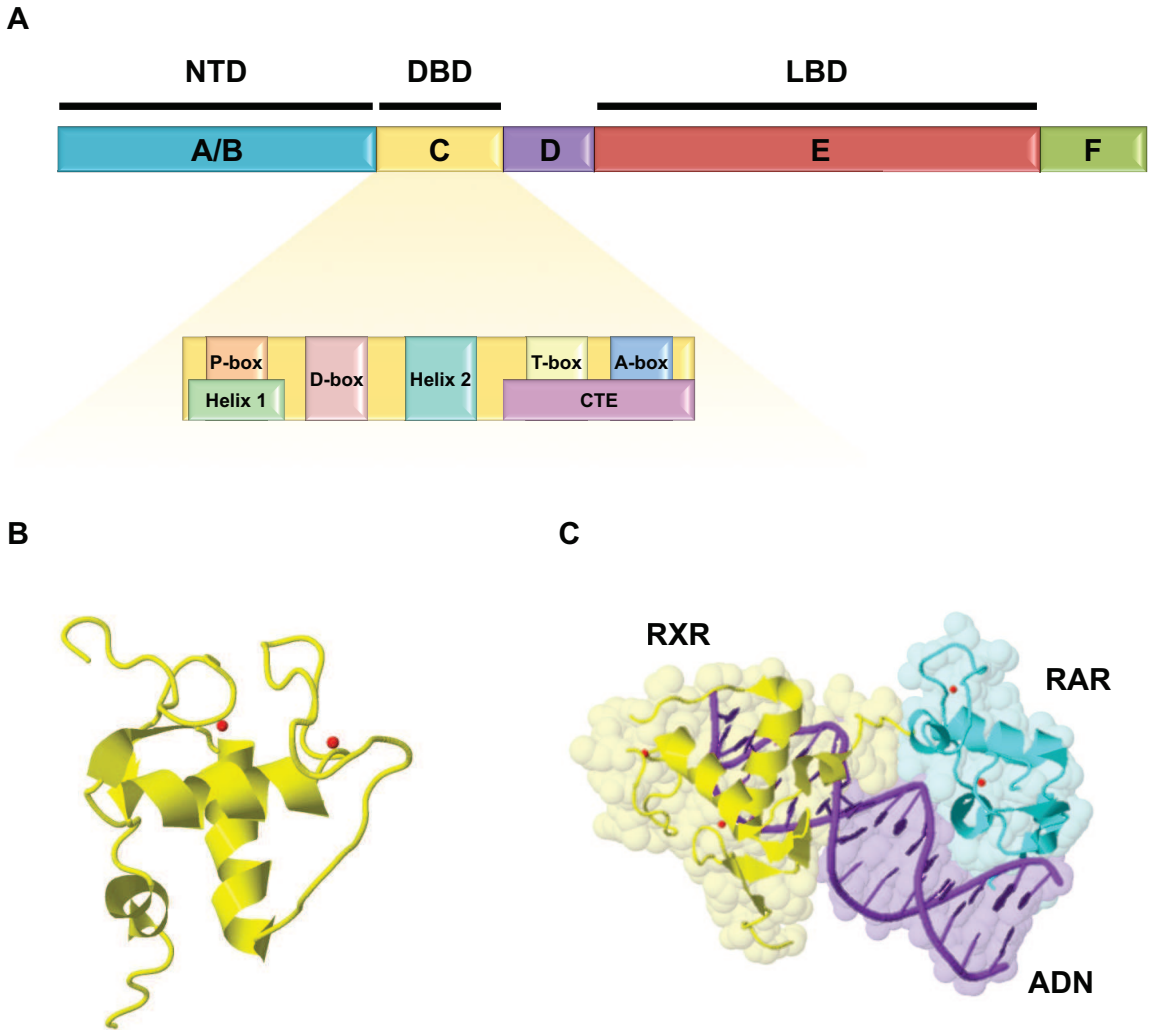


Figure 8: Organisation et structure tridimentionnelle du DBD.

A) Représentation schématique de l'organisation du DBD montrant la position relative des boîtes P, D, T et A, de même que les hélices α 1 et 2 et l'extension C-terminale (CTE). Adapté de Bain *et al.* (2007).

B) Structure du DBD de RXR. Les points rouges correspondent aux atomes de zinc. D'après Holmbeck *et al.* (1998b) (PDB 1RXR).

C) Structure des DBD du complexe RAR/RXR fixé sur un élément de réponse DR1 d'ADN. Les atomes de zinc sont illustrés en rouge. D'après Rastinejad *et al.* (2000)(PDB 1DSZ).

défaite lors de la fixation sur l'ADN (Holmbeck *et al.*, 1998a; Holmbeck *et al.*, 1998b).

2.1.2. La région E ou domaine de fixation du ligand (LBD)

La région E est la deuxième région la plus conservée après le DBD. C'est un domaine fonctionnel complexe, car il comprend une poche de liaison du ligand (LBP, *ligand-binding pocket*), un domaine de dimérisation et une fonction de transactivation dépendante du ligand (AF-2) (Bastien et Rochette-Egly, 2004). La structure du LBD, similaire entre RAR et RXR, est composée de douze hélices α (H1 à H12) et d'un feuillet β, situé entre les hélices H5 et H6 (Figure 9). Le tout forme une structure en "sandwich" de trois feuillets anti-parallèles avec H4, H5, H8 H9 et H11 comprises dans un feuillet central bordé de H1, H2, et H3 d'un côté et de H6, H7 et H10 de l'autre (Figure 9, à gauche) (Bastien et Rochette-Egly, 2004). L'hélice H12 C-terminale, qui englobe le domaine de transactivation AF-2 responsable des interactions avec les corégulateurs, pointe vers l'extérieur du LBD de RARα en absence de ligand.

Les hélices H7, H9, H10 et H11, de même que les boucles L8–9 and L9–10, représentent la

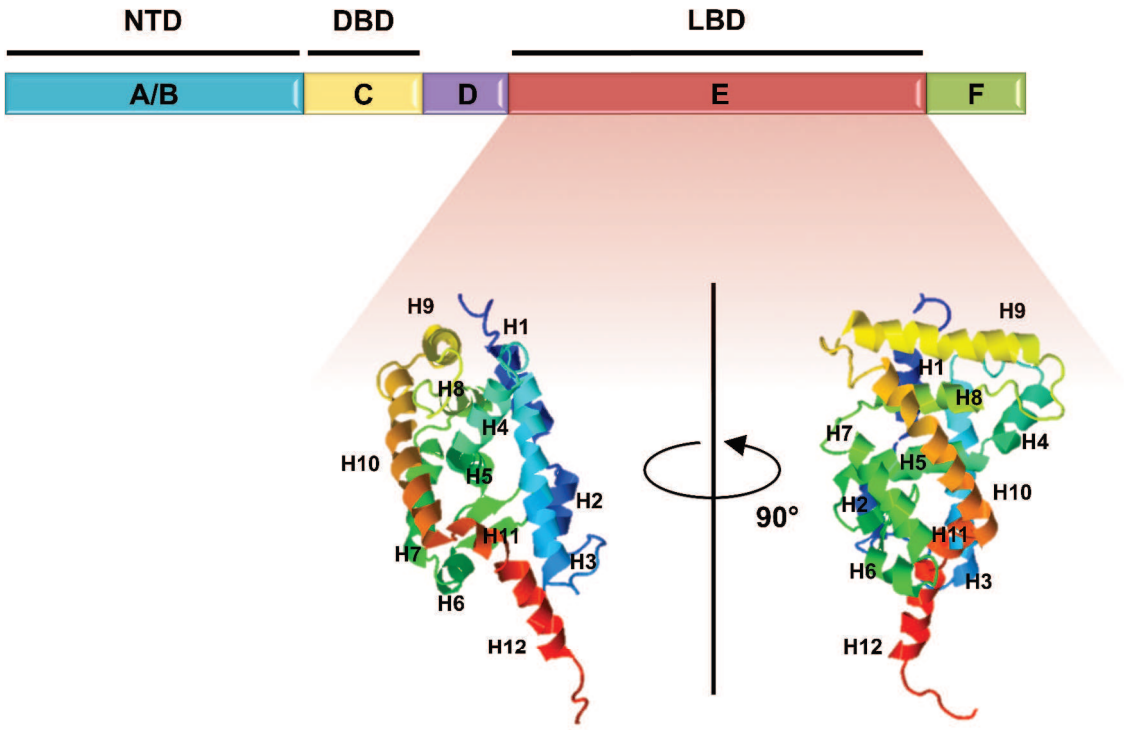


Figure 9: Structure 3D du LBD

Le LBD de RXRα est composé de douze hélices α (H1 à H12), illustrées ici sous forme de rubans, et d'un feuillet β, situé entre les hélices H5 et H6. Elles forment un "sandwich" de trois feuillets anti-parallèles (image de gauche). Adapté de Bourguet *et al.* (1995) (PDB1LBD).

surface d'hétérodimérisation (Figure 10) (Bourguet *et al.*, 2000). La LBP comprend quand à elle des résidus hydrophobes provenant majoritairement des hélices H3, H5 H7 et H11, de même que du feuillet β. Sa structure définit la spécificité et l'affinité du ligand *via* les interactions formées entre le ligand et les résidus impliqués, lesquels varient selon les sous-types de RAR. (Bourguet *et al.*, 2000; Gehin *et al.*, 1999; Klaholz *et al.*, 2000; Klaholz *et al.*, 1998). La fixation du ligand induit des changements conformationnels se traduisant par un repositionnement de l'hélice H11 en continuité avec H10 et par un repliement de l'hélice H12 sur H3 et H4, refermant ainsi la LBP comme un piège à souris (Figure 11) et stabilisant la structure (Bourguet *et al.*, 1995; Moras et Gronemeyer, 1998). De nouveaux résidus se trouvent ainsi exposés à la surface du LBD, formant un sillon hydrophobe (domaine AF-2) propice à la liaison des coactivateurs (voir Section 3.1.2). De plus, ces changements conformationnels se répercutent sur la surface de dimérisation, stabilisant ainsi l'hétérodimère RAR/RXR (Brelivet *et al.*, 2004; Pogenberg *et al.*, 2005).

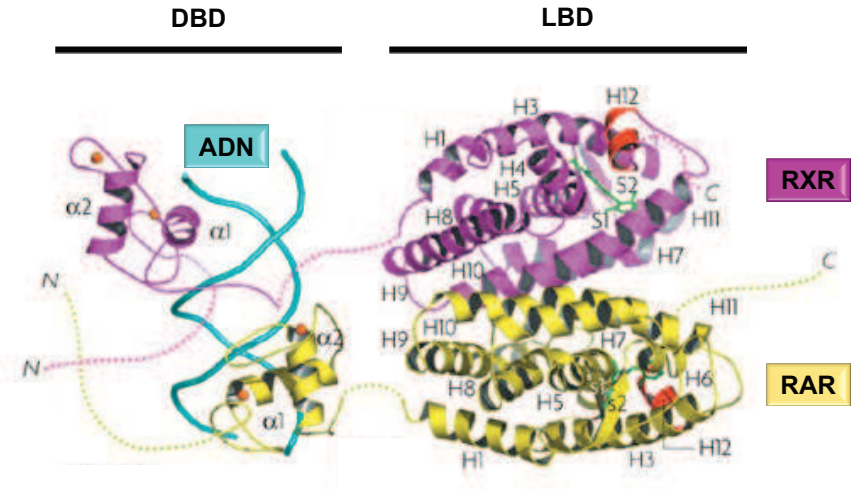


Figure 10: Structure de l'hétérodimère RAR/RXR sur l'ADN montrant l'interface de dimérisation.

RAR et RXR sont ici montrés en présence d'acide rétinoïque 9-*cis* (en vert). Les hélices α sont illustrées sous forme de rubans et identifiées α1 et α2 (DBD) ou H1 à H12 (LBD), H12 (AF-2) étant en rouge. Les feuillets β sont identifiés S1 et S2. Les atomes de zinc sont montrés en rouge. Modifié de de Lera *et al.* (2007).

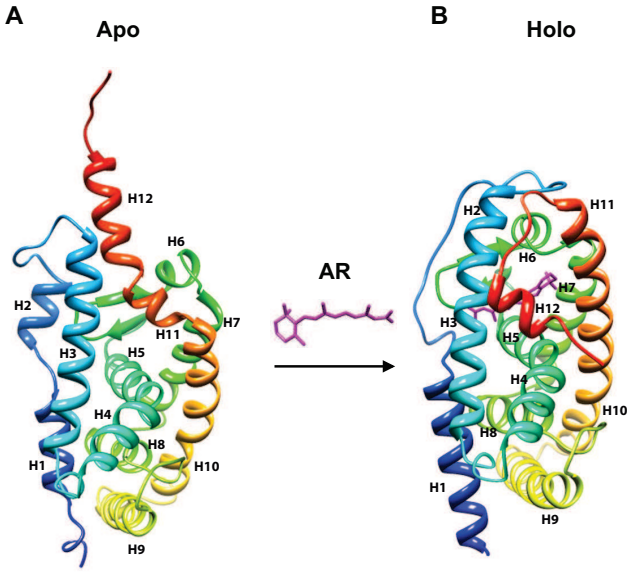


Figure 11: Structure tridimensionnelle du LBD et changements conformationnels induits par la fixation du ligand.

A) Structure du LBD de RXRα en absence de ligand (conformation apo). Adapté de Bourguet *et al.* (1995) (PDB1LBD).

B) Structure du LBD de RARγ après fixation du ligand (conformation holo). Suite à la liaison du ligand, l'hélice H12 (en rouge) se replie sur la poche de fixation du ligand. Adapté de Renaud *et al.* (1995) (PDB1LBD).

2.1.3. La région D

Cette région est peu conservée et sert de charnière entre le DBD et le LBD. Sa souplesse permet la rotation du DBD; ainsi, les hétérodimères RAR/RXR peuvent adopter une conformation adéquate et stable adaptée aux différents éléments de réponse (voir Section 2.2) (Aranda et Pascual, 2001). De plus, la région D contient une séquence de localisation nucléaire (NLS, *nuclear localization signal*) et serait impliquée dans l'interaction avec certains corépresseurs (Cohen *et al.*, 2000; Poon et Chen, 2008).

2.1.4. La région A/B ou domaine N-terminal (NTD)

Le NTD correspond aux régions A et B et comprend une fonction de transactivation AF-1 indépendante du ligand (Nagpal *et al.*, 1993; Nagpal *et al.*, 1992a). La région A est peu conservée entre les différents sous-types et isoformes (P. Chambon, 1996). En revanche, la région B est très conservée (Taneja *et al.*, 1997). La nature intrinsèquement désordonnée du NTD a empêché jusqu'à présent la caractérisation de sa structure (Martinez-Zapien *et al.*, 2014). Elle confère cependant une

flexibilité propice à l'ajout de modifications post-traductionnelles (Dyson et Wright, 2005). Par ailleurs, de telles régions non-structurées peuvent adopter des états conformationnels pseudo-structurés transitoires suite à l'interaction avec d'autres protéines ou en fonction d'effets allostériques liés à la liaison sur l'ADN (Warnmark *et al.*, 2003; Wright et Dyson, 2015). En effet, la région B contient un domaine riche en prolines (PRM, *proline-rich motif*) et les PRM ont la capacité d'interagir avec des protéines contenant des domaines SH3 (*SRC Homology 3*) ou WW (Macias *et al.*, 2002). De plus, le PRM est la cible de modifications post-traductionnelles (voir Section 5.2), ce qui peut engendrer la formation de pseudo-structures hélicoïdales et servir de point d'ancrage pour le recrutement d'autres complexes moléculaires (Bielska et Zondlo, 2006; Rochette-Egly *et al.*, 1997). De par la proximité du NTD avec le DBD, les interactions protéiques impliquant le NTD peuvent réguler la liaison des RAR sur l'ADN (Lalevee *et al.*, 2010).

Ainsi, malgré sa caractérisation insuffisante, le NTD constitue un domaine dont l'implication dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des RAR est de plus en plus reconnue.

2.1.5. La région F ou domaine C-terminal

La région F est très peu conservée en longueur et en séquence et est d'ailleurs absente de la plupart des récepteurs nucléaires dont les RXR. Sa structure tridimensionnelle est inconnue et sa fonction mal caractérisée. Il a été suggéré qu'en raison de sa proximité avec l'hélice H12 du LBD, elle favoriserait la liaison des corépresseurs en absence d'AR (voir Section 3.1.1) en stabilisant la conformation apo (Farboud et Privalsky, 2004). De plus, elle pourrait lier certains ARNm spécifiques (voir Section 3.5) (Poon et Chen, 2008).

2.2. Les éléments de réponse (RARE)

2.2.1. Les RARE canoniques

Les RARE ont été classiquement décrits comme des répétitions directes (*direct repeats*, DR) de deux séquences consensus 5'-RGKTSA-3' (où R = A ou G; K = G ou T, S = C ou G selon la nomenclature de l'UICPA) séparées par 1, 2 ou 5 nucléotides et notées DR1, DR2 et DR5 respectivement (Figure 12A) (Al Tanoury *et al.*, 2014; Balmer et Blomhoff, 2005; Bastien et Rochette-Egly, 2004). Ces RARE ont été identifiés dans les promoteurs de nombreux gènes cibles de l'AR impliqués dans des fonctions variées telles que la transcription, la signalisation cellulaire, le développement, les fonctions neuronales et la suppression des tumeurs (Al Tanoury *et al.*, 2013). Par exemple, les DR5 sont trouvés dans le promoteur des gènes RARβ2 (de The *et al.*, 1990), CYP26A1 (cytochrome P450, famille 26, sous-famille A, polypeptide 1) (Loudig *et al.*, 2000), Meis2 (Lalevee *et*

al., 2011) et de plusieurs gènes Hox (homeobox) (Dupe *et al.*, 1997). Les DR2 sont trouvés dans le promoteur des gènes CRBPI (W. C. Smith *et al.*, 1991) et CRABPII (Durand *et al.*, 1992) et DR1 dans le promoteur de CRBPII (Mangelsdorf *et al.*, 1991). Ces éléments de réponse étant intrinsèquement asymétriques, les hétérodimères RAR/RXR les lient de façon asymétrique. En effet, sur les DR2 et DR5, les hétérodimères adoptent une orientation 5'-RXR/RAR-3, alors que cette polarité est inversée sur les DR1 (5'-RAR/RXR-3) (Figure 12B et C) (P. Chambon, 1996; Rochel *et al.*, 2011). De plus, les régions du DBD impliquées dans l'interface de dimérisation varient selon le type de DR (Zechel *et al.*, 1994a; Zechel *et al.*, 1994b).

2.2.2. Un large répertoire de RARE non-canoniques

De façon intéressante, des analyses récentes par ChIP-seq (immunoprécipitation de chromatine suivie de séquençage haut débit) ont mis en évidence des sites non-canoniques IR0 (*inverted repeats*), DR0, DR7 et DR8 également liés par les RAR avec une forte affinité (Al Tanoury *et al.*, 2014; Moutier *et al.*, 2012). Dans le cas des DR8, en plus des DR8 classiques dits simples, une majorité comprennent trois demi-sites avec des espacements DR0 et DR2, donnant lieu à des DR8 composites fonctionnels. Les DR0, bien que très fréquents, ne semblent pas permettre à eux seuls une régulation transcriptionnelle par les RAR. Ils sont essentiellement occupés par les RAR en absence de ligand (Moutier *et al.*, 2012).

De plus, le schéma s'est complexifié avec la mise en évidence de sites de liaison atypiques par des expériences de ChIP associées à une hybridation sur puces à ADN (*ChIP on chip*). En effet, les RAR peuvent également se lier à des éléments de réponse dégénérés, c'est-à-dire différant par un ou plusieurs nucléotides de la séquence consensus classique, ou comprenant des séquences consensus classiques, mais anormalement espacées (Delacroix *et al.*, 2010). De façon intéressante, ces expériences ont montré que les sites occupés par les RAR varient d'un type cellulaire à l'autre. En effet, le contexte cellulaire (vocation de différenciation ou de prolifération) et physiologique, l'environnement chromatinien et la présence de facteurs de transcription spécifiques sont autant de paramètres qui diffèrent selon les types cellulaire et qui influencent l'accessibilité aux éléments de réponse (Delacroix *et al.*, 2010; Lalevee *et al.*, 2011). Par exemple, une étude récente a rapporté une redistribution génomique de l'occupation des hétérodimères RAR/RXR au cours du processus de différenciation des cellules F9 d'embryocarcinome de souris en endoderme primitif (Chatagnon *et al.*, 2015). Dans les cellules F9 non différenciées, les hétérodimères sont préférentiellement fixés aux DR0 alors que dans les cellules différenciées, ils fixent plutôt les RARE canoniques, en particulier les DR5. Cette accessibilité différentielle participe à la régulation fine de la transcription RAR-dépendante.

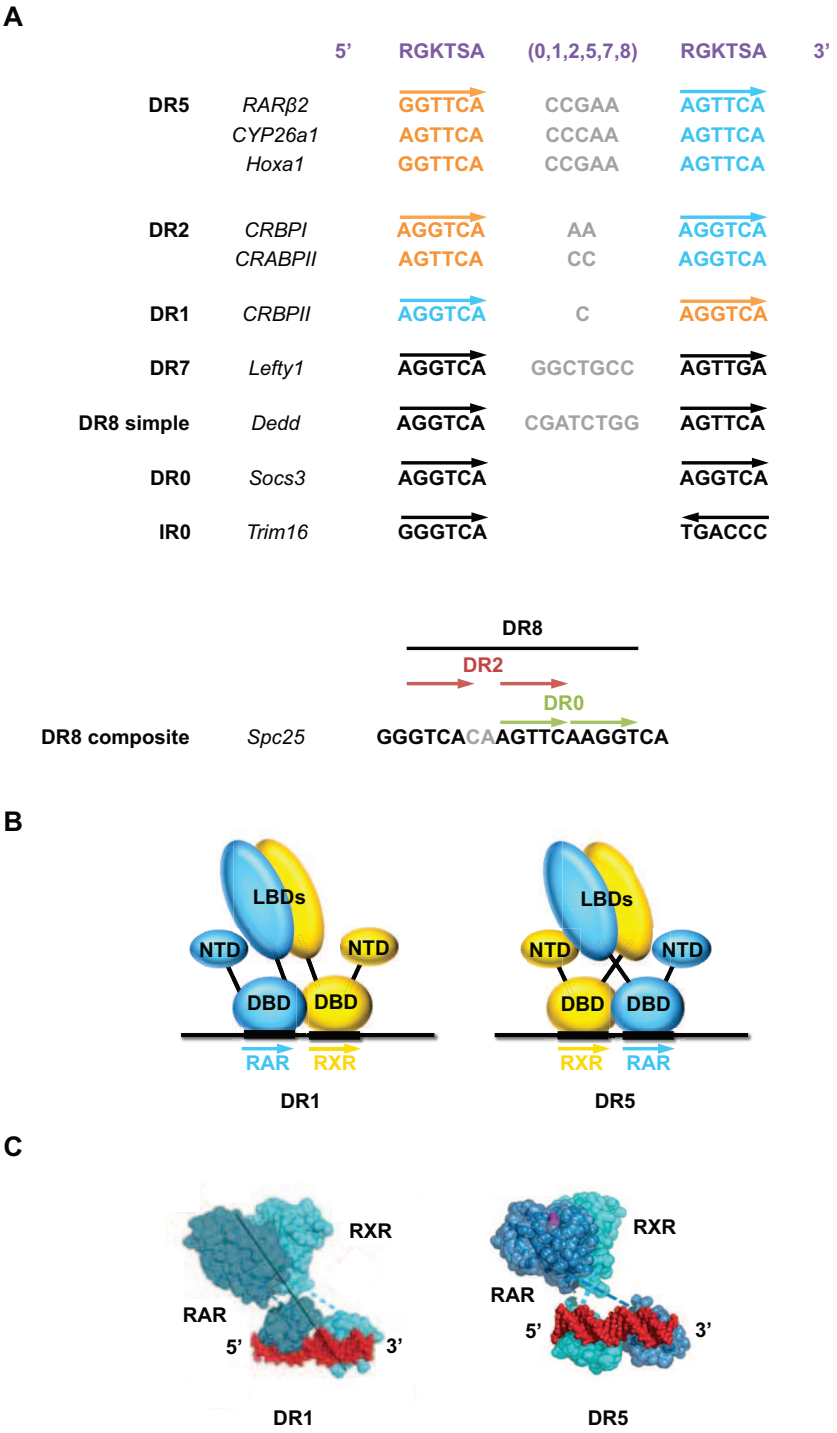


Figure 12: Les différents types de RARE.

A) Les éléments de réponse des hétérodimères RAR-RXR sont composés de deux répétitions directes (DR) ou inversées (IR) du motif hexamérique 5'-RGKTSA-3' espacées par 0 (DR0/IR0), 1 (DR1), 2 (DR2), 5 (DR5), 7 (DR7) ou 8 (DR8) nucléotides. Certains DR8, dits composites, comprennent trois demi-sites avec des espacements DR0 et DR2. Quelques exemples de RARE situés sur le promoteur de gènes cibles de l'AR sont montrés. Les séquences en bleu et en orange représentent le site de liaison des RAR et RXR respectivement.

B) Différentes orientations et **C)** structure des hétérodimères RAR/RXR selon le type de DR. Sur les DR1, le motif hexamérique 5' est occupé par RAR, alors que sur les DR5, il est occupé par RXR.

Modifié de Moutier *et al.* (2012), Bastien et Rochette-Egly (2004) et Rochel *et al.* (2011).

2.2.3. Éléments de réponse distants

Dans le cas de certains gènes cibles, dont l'exemple type est *CYP26A1*, l'existence de deux RARE fonctionnels a été montrée (Figure 13) (Loudig *et al.*, 2000). Le second RARE, dit distal (R2), peut se trouver à une distance allant jusqu'à 200 kilobases (kb) du site d'initiation de la transcription (TSS, *transcription start site*) près duquel se trouve le RARE proximal (R1) (Biddie *et al.*, 2010). La formation de boucles de chromatine permet néanmoins à ces deux RARE distants d'interagir physiquement dans un contexte de coopérativité en vue du recrutement de cofacteurs et de la machinerie transcriptionnelle (Biddie *et al.*, 2010; Bruck *et al.*, 2009; Doyle *et al.*, 2014). Ainsi, ce RARE distal joue un rôle d'un "*enhancer*" et synergise avec le RARE proximal afin d'amplifier la réponse transcriptionnelle à l'AR (Loudig *et al.*, 2000).

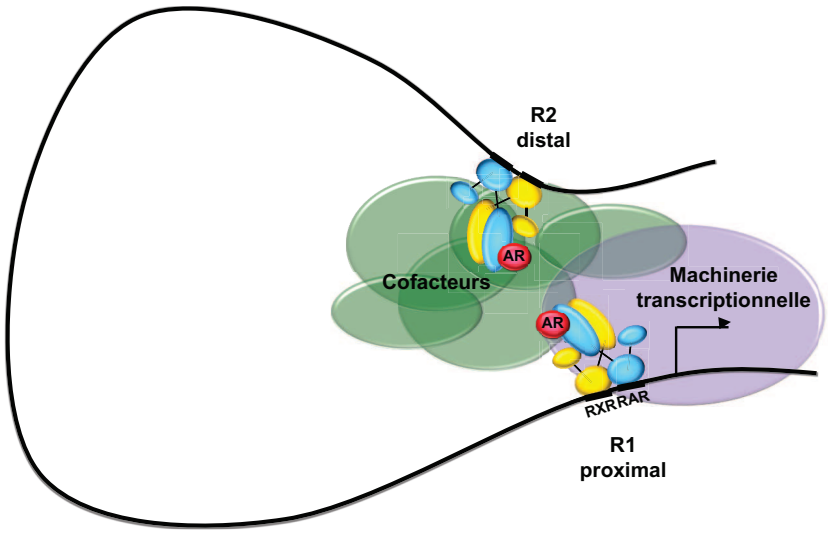


Figure 13: RARE proximal et RARE distal: un rôle synergique.

Dans le cas de certains gènes tels *CYP26A1*, deux RARE fonctionnels coexistent: un RARE proximal (R1) et un RARE distal (R2), qui synergisent pour permettre une réponse maximale à l'AR. Modifié de Bruck *et al.* (2009)

CHAPITRE 3: RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION PAR L'ACIDE RÉTINOÏQUE

3.1. Le modèle classique

Les RAR sont des facteurs de transcription inductibles par le ligand. Selon le modèle classique de la régulation transcriptionnelle par les RAR (Figure 14), les RARE accessibles grâce à un contexte chromatinien favorable peuvent être occupés par les hétérodimères RAR/RXR. (Dilworth et Chambon, 2001). En absence d'AR, ils répriment l'activité transcriptionnelle en favorisant le maintien d'une chromatine compacte impropre à la transcription. Puis, suite à la fixation de l'AR, ils activent l'expression des gènes. Selon ce modèle, l'AR module la transcription des gènes cibles en agissant comme un interrupteur au niveau des RAR déjà présents sur l'ADN.

3.1.1. Répression en absence de ligand

En absence de ligand, les hétérodimères RAR/RXR présents sur les RARE des gènes cibles sont associés à de larges complexes protéiques (Figure 14 A, Figure 15) (Stewart et Wong, 2009). Ces complexes exercent diverses activités enzymatiques sur les histones (déacétylation, méthylation/déméthylation, ubiquitination) qui compactent la chromatine et la maintiennent ainsi dans un état répressif. Ils peuvent également méthyler les îlots CpG de l'ADN à proximité des promoteurs, empêchant la fixation des facteurs de transcription (Bird, 1986; Perissi *et al.*, 2010). Ces modifications et les complexes impliqués sont détaillés dans la Publication 1. Brièvement, le cœur du complexe répresseur principal repose sur deux protéines appelées "corépresseurs": NCoR (*nuclear receptor corepressor*) et SMRT (*silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*) (J. D. Chen et Evans, 1995; Horlein *et al.*, 1995; Sande et Privalsky, 1996). Ceux-ci sont très apparentés, tant au niveau de leur séquence que de leur fonction (J. D. Chen *et al.*, 1996a). Ils n'ont aucune activité enzymatique intrinsèque connue, mais interagissent avec RARα en absence de ligand et y jouent le rôle de plateforme pour un recrutement des autres protéines du complexe répresseur comme TBL1 (*transducin beta-like protein 1*), TBLR1 (*TBL1-related protein 1*) et des histones déacetylases (HDAC) (Perissi *et al.*, 2010). En effet, NCoR et SMRT possèdent un domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires (CoRNR-box) contenant une séquence consensus LXX I/H I XXX I/L et formant une hélice pointant vers l'extérieur (Perissi *et al.*, 1999). Ce domaine peut ainsi interagir avec RARα *via* le sillon hydrophobe formé par ses hélices H3 et H4 en absence de ligand. Ce faisant, NCoR et SMRT masquent la surface d'interaction de l'hélice H12 de RARα, rendant exclusive l'interaction des corépresseurs au détriment des coactivateurs (Figure 16) (Hu et Lazar, 1999). Bien que NCoR et SMRT peuvent tous deux lier RARα, celui-ci interagit cependant préférentiellement avec SMRT (Cohen *et al.*, 2001).

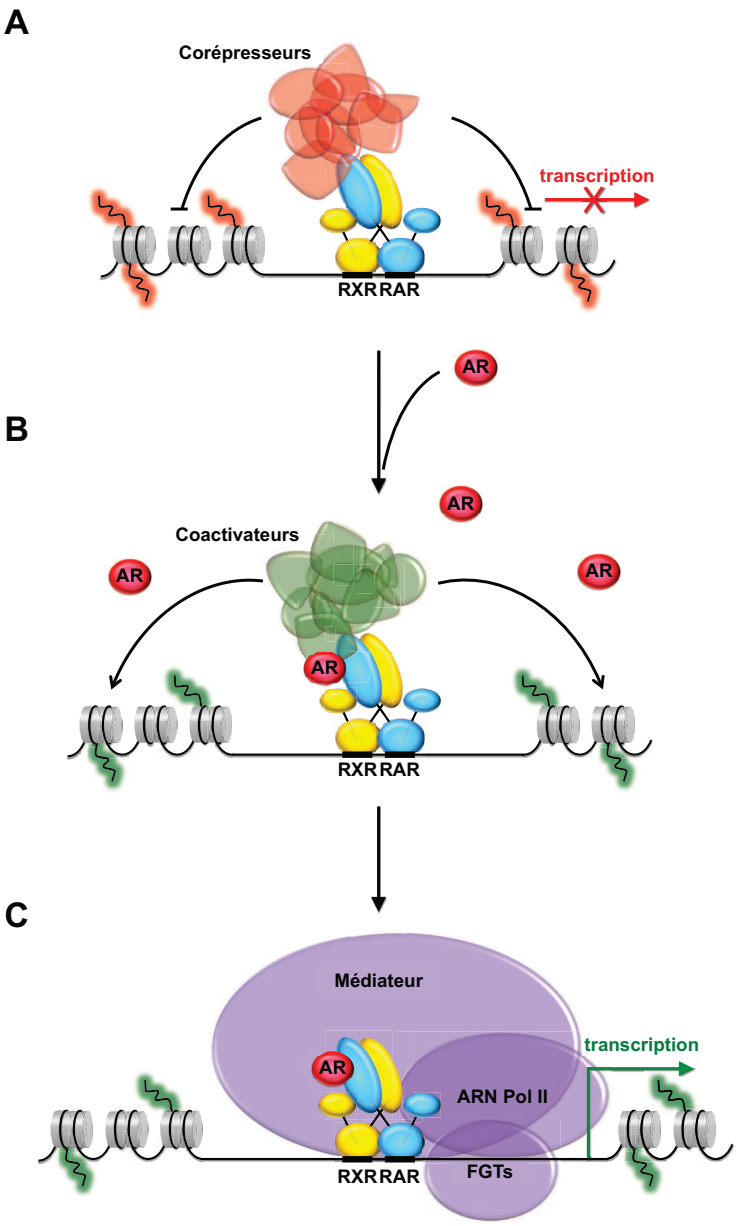


Figure 14: Modèle classique de l'activation de la transcription par les RAR.

A) En absence de ligand, les hétérodimères RAR/RXR sont liés au promoteur des gènes cibles et sont associés à des corépresseurs. Ceux-ci maintiennent la chromatine dans un état compact *via* des modifications inhibitrices des queues d'histones, réprimant ainsi la transcription.

B) La fixation de l'AR provoque la dissociation des complexes de corépresseurs, permettant ainsi le recrutement de coactivateurs qui décompactent la chromatine par des modifications activatrices des histones et déplacent les nucléosomes encombrant la région proximale du promoteur.

C) La machinerie transcriptionnelle, composée du complexe médiateur, de l'ARN polymérase II (ARN Pol II) et des facteurs généraux de transcription (FGT) peut ainsi être recrutée et initier la transcription.

Modifié de Bour *et al.* (2007).

Cependant, il existe aussi toute une panoplie d'autres protéines répressives qui n'interviennent pas *via* SMRT et NCoR. C'est le cas notamment de Sin3 (également appelé mSin3A), des complexes PRC1 et PRC2 (*Polycomb Repressive Complex* 1 et 2). Il existe également des corépresseurs ligand-dépendants non-conventionnels (voir Section 3.4.2) (Gillespie et Gudas, 2007a; Gillespie et Gudas, 2007b; M. G. Lee *et al.*, 2007; Nagy *et al.*, 1997).

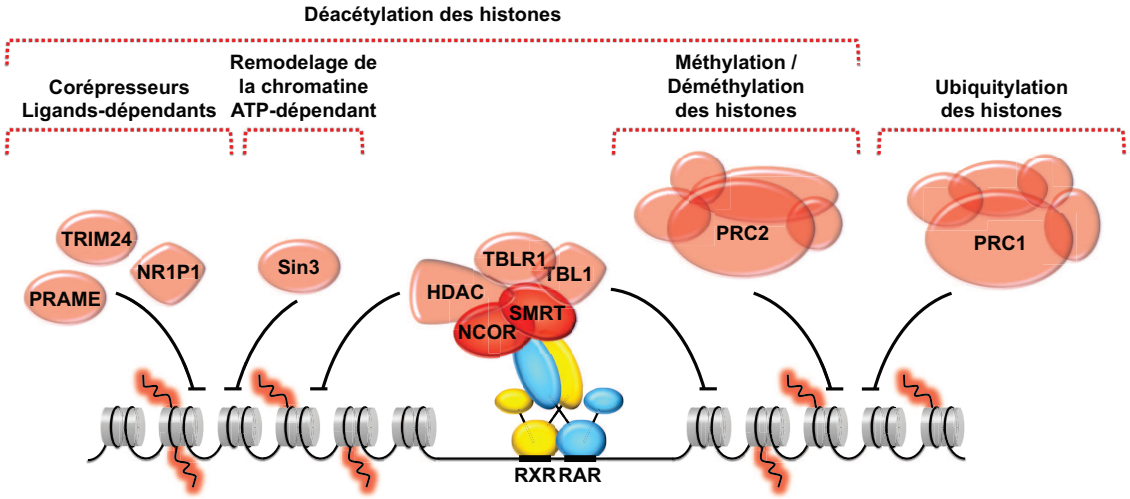


Figure 15: Corépresseurs et complexes associés.

Présentation des principaux corépresseurs et de leurs complexes, regroupés par les fonctions auxquels ils sont associés. Modifié de Perissi *et al.* (2010).

Il est important de noter que la fixation à l'ADN de RARβ et RARγ en absence de ligand n'est généralement pas associée à la répression. En effet, contrairement à RARα, RARβ et RARγ interagissent peu avec les corépresseurs. Il a été proposé que chez ces deux sous-types, H12 interagit avec H3 même en absence de ligand, obstruant ainsi le site d'ancrage des corépresseurs (Farboud *et al.*, 2003; Hauksdottir *et al.*, 2003).

3.1.2. Activation de la transcription en réponse au ligand

Tel que mentionné précédemment, la fixation du ligand induit des changements conformationnels du LBD de RARα se traduisant par une réorientation de l'hélice H12 (Figure 16). Cela résulte en la formation d'un sillon hydrophobe entre H3, H4 et H12. Deux résidus chargés, un acide glutamique de l'hélice H12 et une lysine de l'hélice H3, jouent le rôle d'une "pince" chargée permettant l'interaction avec le motif LXXLL (NR-box) des coactivateurs de la famille des p160 (Perissi et Rosenfeld, 2005). Cette conformation du LBD induite par le ligand n'est plus compatible

avec la fixation de corépresseurs dont le motif d'interaction LXX I/H I XXX I/L est trop long pour s'insérer dans la pince chargée (Perissi *et al.*, 1999).

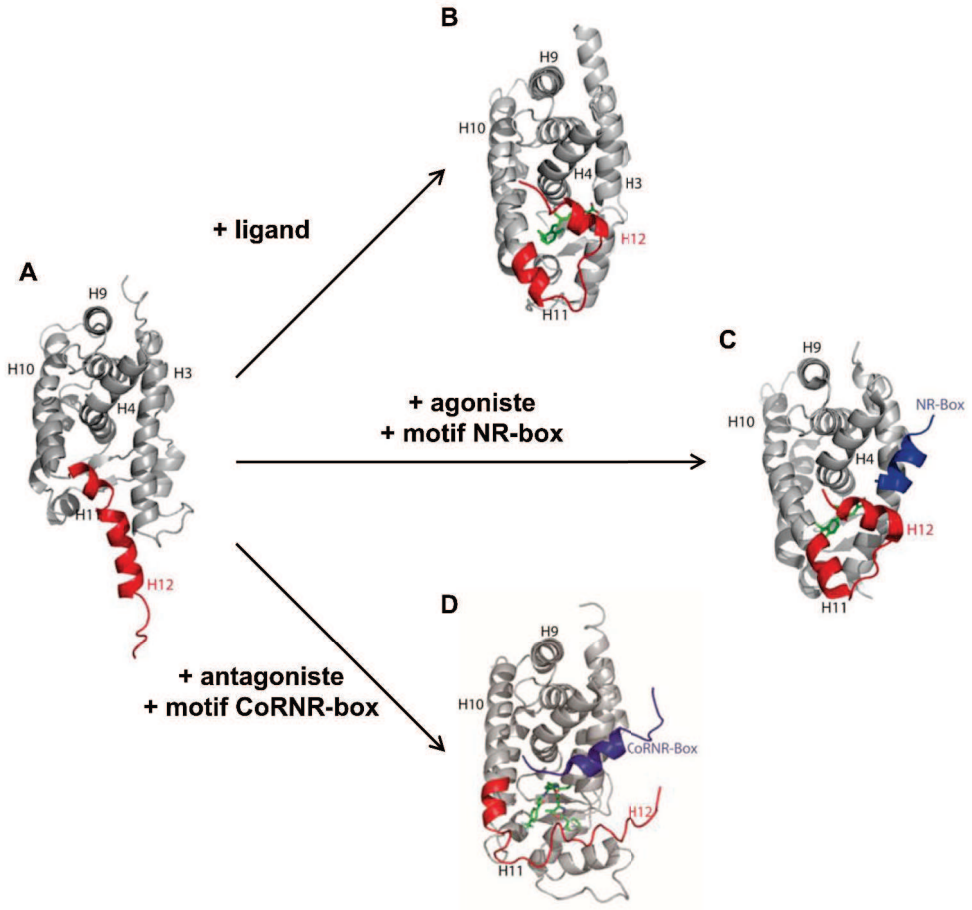


Figure 16: Conformation du LBD en présence de coactivateurs ou de corépresseurs.

A) Structure du LBD de RXRα en absence de ligand (PDB1LBD).

B) Structure du LBD de RARγ en présence de ligand (PDB2LBD).

C) Structure du LBD de RXRα en présence d'un agoniste et d'un motif coactivateur (NR-box) (PDB1MVC).

D) Structure du LBD de PPARα en présence d'un antagoniste et d'un motif corépresseur (CoRNR-box) (PDB1KKQ).

Modifié de de Lera *et al.* (2007).

Les coactivateurs de la famille p160 ou SRC (*steroid receptor coactivator*), forment une famille de trois membres: SRC-1 (également appelé NCOA1 (*nuclear receptor coactivator 1*)), SRC-2 (NCOA2 (*nuclear receptor coactivator 2*), GRIP1 (*glucocorticoid receptor-interacting protein 1*) ou

TIF2 (*transcriptional intermediary factor 2*)) et SRC-3 (NCOA3 (*nuclear receptor coactivator 3*), AIB1 (*amplified in breast 1*), ACTR (*acetyltransferase*), RAC3 (*receptor-associated coactivator 3*) ou TRAM1 (*thyroid hormone receptor activator molecule 1*)). Ils possèdent une activité acétyltransférase intrinsèque et servent aussi de plateforme pour le recrutement d'autres protéines permettant le remodelage de la chromatine incluant notamment les méthyltransférases CARM1 (*coactivator-associated arginine methyltransferase 1*) et PRMT1 (*Protein arginine N-methyltransferase 1*), de même que les acétyltransférases p300/CBP (*CREB-binding protein*) et pCAF (*p300/CBP-associated factor*) (Figure 17) (Lefebvre *et al.*, 2005). Ces modifications, détaillées dans la Publication 1, décondensent la chromatine et créent un "code des histones" permettant le recrutement d'autres complexes activateurs comme les complexes STAGA, MLL5, NURF et le complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant SWI/SNF afin d'obtenir une décompaction optimale (Cosgrove *et al.*, 2004; Dilworth *et al.*, 2000; Fujiki *et al.*, 2009; Ruthenburg *et al.*, 2007; Wysocka *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2008).

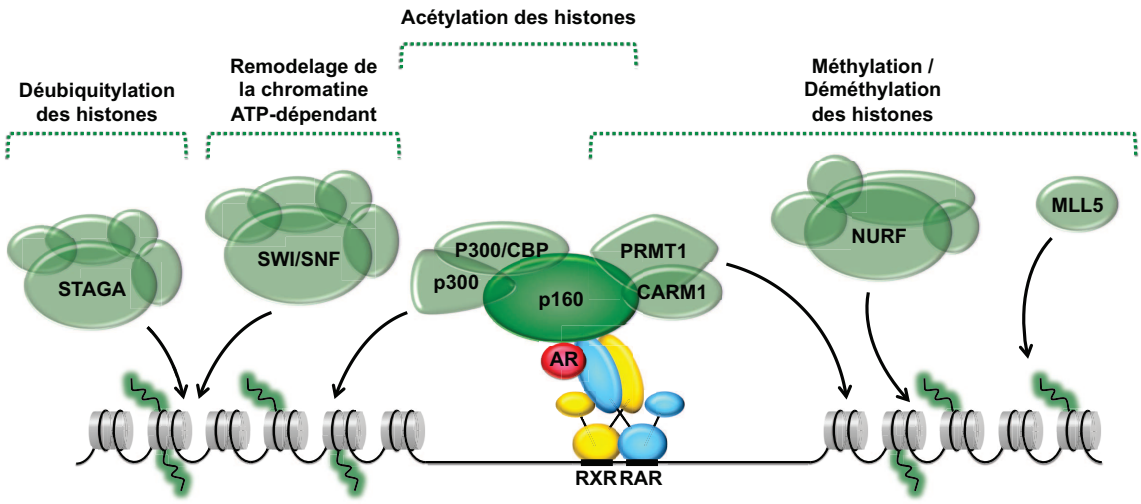


Figure 17: Coactivateurs et complexes associés.

Présentation des principaux corépresseurs et de leurs complexes, regroupés par les fonctions auxquels ils sont associés.

Ainsi, l'ensemble de ces modifications établissent un contexte favorable au recrutement de la machinerie transcriptionnelle *via* le complexe médiateur. Ce complexe interagit avec le domaine AF-2 des RAR liés au ligand *via* la sous-unité DRIP205/TRAP220 qui contient un motif LXXLL (Malik et Roeder, 2000; Woychik et Hampsey, 2002). La machinerie recrutée inclut l'ARN polymérase II (ARN Pol II), de même que six facteurs généraux de transcription (FGTs) (Orphanides *et al.*, 1996).

3.2. Au-delà du modèle classique

Bien que le modèle classique ait été validé expérimentalement, il semble que l'activation de la transcription RAR-dépendante puisse également s'opérer selon des mécanismes différents. En effet, des expériences récentes de CHIP-seq ont révélé que seule une faible proportion des RARE sont occupés par les RAR de façon constitutive (Bruck *et al.*, 2009; Delacroix *et al.*, 2010; Mahony *et al.*, 2011; Moutier *et al.*, 2012). Par contre, un grand nombre de RARE deviennent occupés par les RAR en réponse au ligand.

Il a été proposé qu'en absence de ligand, les RARE sont constitutivement inaccessibles, et donc inoccupés, en raison de l'état compact de la chromatine. Cela implique que l'AR doit donner le signal à l'initiation d'une cascade d'événements permettant la décompaction de la chromatine en vue de rendre les RARE accessibles aux RAR. D'après des travaux récents du laboratoire, ce réarrangement de la chromatine serait attribuable à d'autres effets de l'AR comme l'activation de kinases. En effet, ces kinases phosphorylent les histones, les RAR de même que plusieurs complexes protéiques impliqués dans le remodelage de la chromatine (voir Section 5.1) (Gillespie et Gudas, 2007b).

Finalement, dans certains cas, le complexe médiateur et l'ARN Pol II occupent déjà le promoteur avec RARα en absence de ligand (Pavri *et al.*, 2005; Rochette-Egly et Germain, 2009). Dans ce contexte, l'initiation de la transcription et le recrutement des FGT dépendent de la dissociation de la sous-unité inhibitrice cdk8 (*cyclin-dependent kinase 8*) du complexe médiateur (Andrau *et al.*, 2006; Elmlund *et al.*, 2006).

3.3. Régulation de la transcription AR-dépendante par les ARN non-codants

Des données récentes indiquent que le remodelage de la chromatine et la méthylation de l'ADN fait également intervenir des ARN non-codants, incluant les micro-ARN (miARN), les longs ARN non-codants (*long noncoding RNAs* (lncRNAs)), les ARN interagissants avec Piwi (*Piwi interactings RNAs* (piRNAs)) et les petits ARN interférents (*small interfering RNAs* (siRNAs)) (Holoch et Moazed, 2015; Mattick et Makunin, 2005; Roberts *et al.*, 2014; Wassenegger, 2005). Ceux-ci agissent comme un échafaudage permettant le recrutement d'enzymes modifiant les histones et l'ADN (Holoch et Moazed, 2015).

De façon intéressante, l'AR a récemment été impliqué dans l'expression de micro-ARN, introduisant ainsi un niveau additionnel de complexité dans la régulation transcriptionnelle par l'AR (Zardo *et al.*, 2012a; Zardo *et al.*, 2012b). La liste grandissante des micro-ARN régulés par l'AR comprend let-7a (Garzon *et al.*, 2007) let-7c (Pelosi *et al.*, 2013) miR-15a/16-1 (Gao *et al.*, 2011) miR-

663 (Jian *et al.*, 2011) miR-302b (P. H. Chen *et al.*, 2014). Ceux-ci, à leur tour, participent à la régulation de la transcription non seulement *via* le remodelage de la chromatine et la méthylation de l'ADN, mais également en dégradant les ARNm codant pour certains corégulateurs. Par exemple, l'AR induit l'expression de miR-10a, lequel diminue le niveau protéique de SMRT (Takahashi *et al.*, 2012).

3.4. Corégulateurs non-conventionnels des RAR

En plus des corégulateurs classiques décrits précédemment, des corégulateurs dits non-conventionnels ont été identifiés. Ceux-ci incluent des corégulateurs dépourvus de motif LXXLL et des corépresseurs à motif LXXLL recrutés en présence de ligand.

3.4.1. Corégulateurs dépourvus de motif LXXLL

Les principaux sont:

- CRABPII, qui s'associe à la cycline D3. La fixation de CRABPII augmente la fixation de l'AR, favorisant ainsi l'activité transcriptionnelle (Budhu et Noy, 2002; Delva *et al.*, 1999; Despouy *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 1999).
- SUG1 (*suppressor for Gal 1*), une sous-unité du complexe régulateur 19S du protéasome ayant une activité ATP-ase. SUG1 interagit avec le domaine AF-2 des RAR et régule leur activité transcriptionnelle en induisant leur dégradation par le protéasome (Ferry *et al.*, 2009; Gianni *et al.*, 2002a).
- La cycline H, qui interagit avec la boucle L8-9 et le début de H9 du LBD, région distincte de la surface d'interaction avec les coactivateurs. Elle permet le recrutement de TFIIH (*Transcription factor IIH*) et de sa kinase associée, cdk7 (*cyclin-dependent kinase 7*), qui phosphoryle le NTD de RARα (voir Section 5.2) (Bour *et al.*, 2005a).
- TACC1 (*transforming acidic coiled coil*), qui interagit avec RARα en absence de ligand et joue un rôle d'échafaudage dans la formation du complexe transcriptionnel (Guyot *et al.*, 2010).
- L'actine et des protéines liant l'actine (ABP, *actin-binding proteins*) (Zheng *et al.*, 2009). Une ABP, la vinexine β, a été identifiée par notre laboratoire comme étant un partenaire de RARγ. La vinexine β interagit avec le PRM du NTD de RARγ et réprime son activité transcriptionnelle en le séquestrant à l'extérieur de la chromatine (voir Section 5.3) (Bour *et al.*, 2005b; Lalevee *et al.*, 2010).

3.4.2. Corépresseurs à motif LXXLL

Ces corégulateurs interagissent avec les RAR en présence de leur ligand *via* un motif LXXLL. Cependant, contrairement au modèle classique, ces corégulateurs répriment l'activité transcriptionnelle des RAR. En effet, ils servent de plateforme pour le recrutement de complexes

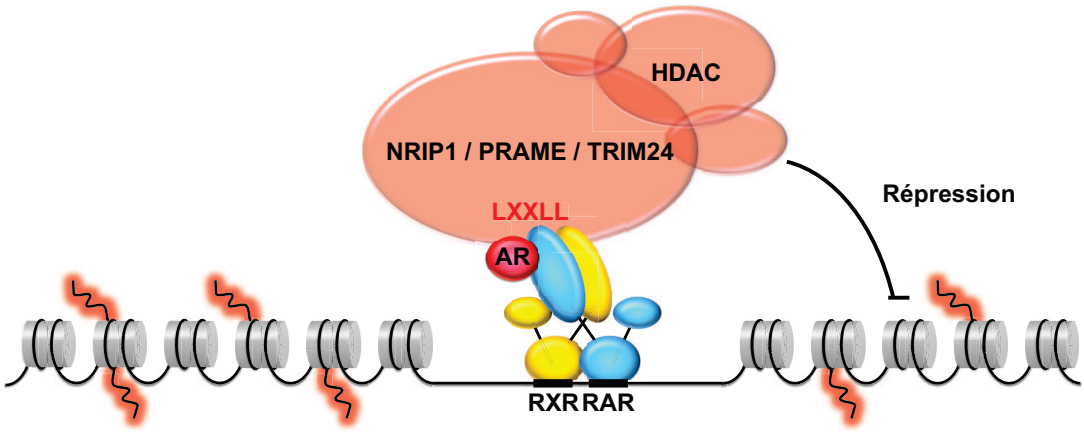


Figure 18: Mode d'action général des corépresseurs à motif LXXLL.

Les corépresseurs à motif LXXLL se fixent au niveau du domaine AF-2 des récepteurs liés à leur ligand et recrutent des HDAC ou d'autres corépresseurs qui maintiennent la chromatine dans un état répressif. Adapté de Gurevich *et al.* (2007).

répresseurs qui compactent la chromatine (Figure 18) (Gurevich *et al.*, 2007). En général, ces corégulateurs sont recrutés plus tard que les coactivateurs classiques et ils participeraient à la fin de la transcription des gènes cibles.

Les principaux d'entre eux sont:

- NRIP1 (*Nuclear receptor-interacting protein 1*), également appelé RIP140 (*receptor-interacting protein 140*), qui réprime la transcription en recrutant des HDAC (Heery *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2000).
- PRAME (*preferentially expressed antigen in melanoma*), qui exerce son action répressive en recrutant la sous-unité EZH2 du complexe PRC2 (Epping *et al.*, 2005). Cependant, ce corégulateur n'est exprimé que dans un nombre très restreint de types cellulaires, excluant un rôle général dans la transcription (Costessi *et al.*, 2011; Yin, 2011).
- TRIM24 (*Tripartite motif containing 24*), anciennement nommé TIF1α (*transcriptional intermediary factor 1α*), est classiquement décrit comme un corépresseur agissant notamment via le recrutement de HDAC (Nielsen *et al.*, 1999). Cependant, comme nous le verrons plus loin,

certaines études récentes attribuent également à ce corégulateur atypique un rôle activateur (Herquel *et al.*, 2011a; Kikuchi *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2010). En raison de son intérêt particulier dans le cadre de ma thèse, son mode d'action est décrit plus en détail au chapitre suivant.

3.5. Association des RAR avec des ARNm et contrôle de la traduction

Récemment, un nouveau rôle indépendant de son activité transcriptionnelle a été mis en évidence pour RARα. En effet, dans des cultures de neurones, l'AR joue un rôle dans la dynamique de libération et d'action de certains neurotransmetteurs au niveau des synapses et cet effet est dépendant de RARα (N. Chen et Napoli, 2008; Maghsoodi *et al.*, 2008; Poon et Chen, 2008). RARα interagit directement *via* son domaine C-terminal avec certains ARNm, empêchant ainsi leur traduction. Par exemple, RARα interagit avec les ARNm codants pour le récepteur du glutamate GluR1 au niveau des dendrites des neurones (Maghsoodi *et al.*, 2008; Poon et Chen, 2008). Cette interaction séquestre cet ARNm et bloque sa traduction, empêchant de ce fait la libération du glutamate. Suite à la fixation de l'AR et aux changements conformationnels du LBD qui en résultent, ces ARNm sont relâchés et rapidement traduits (Poon et Chen, 2008). Ainsi, *via* des effets non génomiques, RARα et l'AR seraient impliqués dans la plasticité synaptique en régulant finement la traduction d'ARNm (Aoto *et al.*, 2008).

CHAPITRE 4: TRIM24, UN CORÉGULATEUR DES RAR AU RÔLE COMPLEXE

4.1. Organisation modulaire de TRIM24

TRIM24 fait partie de la famille de protéines à motif tripartite (TRIM) comptant plus de 70 membres. Ces protéines possèdent une structure N-terminale caractéristique comprenant trois domaines en doigt de zinc (un motif RING (*really interesting new gene*) et un ou deux motifs de type "*B-box*" (boîtes B)), de même qu'une superhélice (domaine "*coiled-coil*"), le tout constituant un motif TRIM/RBCC (*ring finger, B Box, coiled-coil*) (Figure 19). La région C-terminale, variable, définit le classement des protéines TRIM en 12 sous-groupes (Carthagena *et al.*, 2009). Dans la sous-famille C-VI, comprenant TRIM24, TRIM28 (également appelé TIF1β ou KAP1 (*KRAB-associated protein 1*) et TRIM33 (TIF1γ), cette région C-terminale comprend un doigt de zinc PHD (*plant homeo domain*) associé à un bromodomaine (bromo) (Nisole *et al.*, 2005). La portion centrale, peu conservée et de fonction inconnue, comprend néanmoins dans le cas de TRIM24 un site de fixation aux récepteurs nucléaires NRBS (*nuclear receptor binding site*) contenant un motif LXXLL. C'est par ce NRBS que TRIM24 peut lier le domaine AF-2 de plusieurs RN, dont RARα, en présence de ligand (Le Douarin *et al.*, 1996; Thenot *et al.*, 1997).

Figure 19: Organisation modulaire de TRIM24.

Représentation schématique de TRIM24 avec, dans sa partie N-terminale, un domaine RING, deux boîtes B et une superhélice (*coiled-coil*), et dans sa partie C-terminale un doigt de zinc PHD et un bromodomaine (bromo). La portion centrale comprend un domaine de fixation aux récepteurs nucléaires (NRBS) à motif LXXLL. Modifié de Tsai *et al.* (2010).

Il existe deux variants de TRIM24 résultant d'un épissage alternatif: les isoformes "a" et "b". Ils sont identiques dans leurs régions N- et C-terminales, mais l'isoforme "b" est légèrement plus court en raison de l'absence d'un fragment de 34 acides aminés au centre de sa séquence (M. Chambon *et al.*, 2011). Le rôle exact de l'existence de ces deux isoformes demeure cependant obscur.

4.1.1. Le domaine RING

Le domaine structural RING de TRIM24 est un motif en doigt de zinc du type C3HC4 ($Cys_3HisCys_4$). Ce motif de 40 à 60 acides aminés contient huit résidus cruciaux, sept cystéines et une histidine, liant deux cations de zinc (Figure 20A) (Borden et Freemont, 1996; Freemont, 1993; Nalepa *et al.*, 2006). Les séquences d'acides aminés séparant ces résidus conservés sont de nature et de longueur variable selon la protéine; néanmoins, les domaines RING C3HC4 partagent une structure tridimentionnelle similaire (Figure 20B) (Nalepa *et al.*, 2006). Ils jouent un rôle important dans les interactions protéine-protéine (Borden, 2000). De façon intéressante, plusieurs domaines RING ont

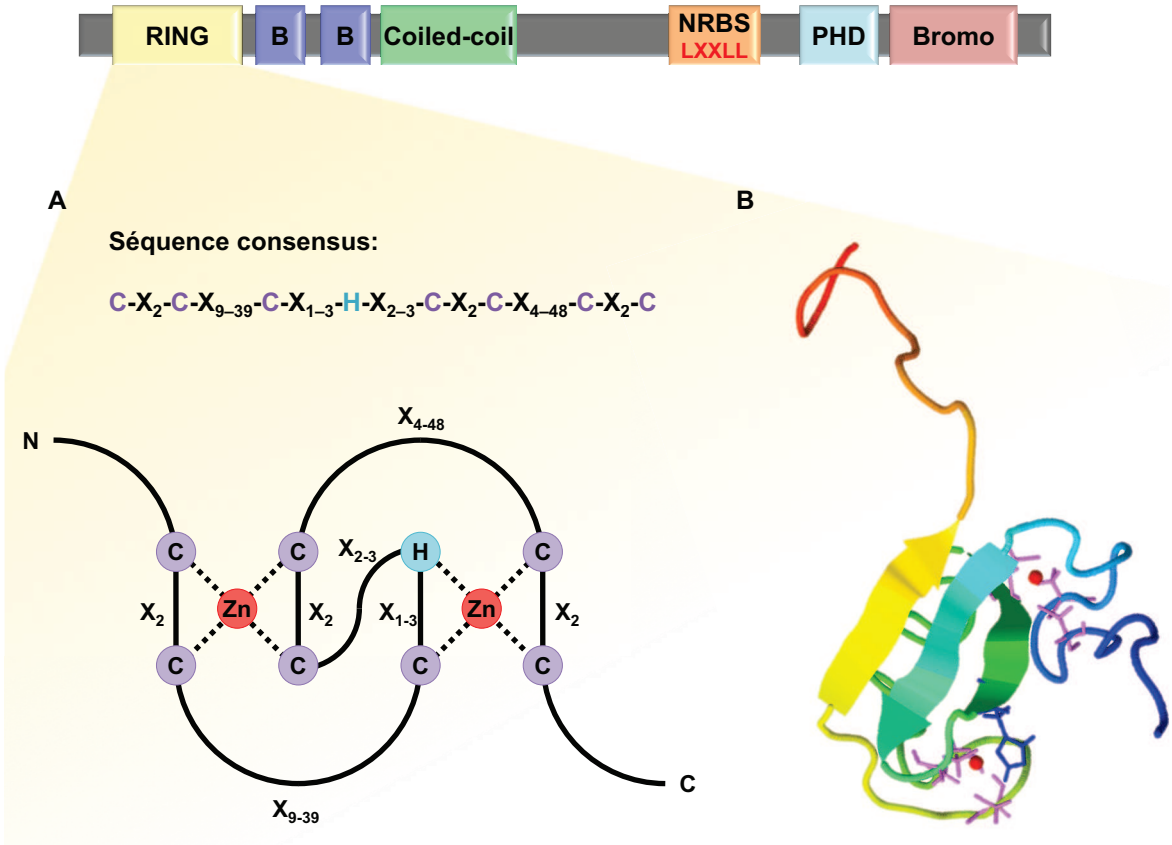


Figure 20: Structure générale du domaine RING C3HC4

A) Séquence consensus et représentation schématique du motif C3HC4 RING. Celui-ci comprend deux atomes de zinc ("Zn", en rouge) coordonnés à quatre résidus cystéines ("C", en violet) / histidine ("H", en bleu). Ces résidus conservés sont espacés de séquences X_n, où "n" est le nombre de résidus et "X" correspond à n'importe quels acides aminés. D'après Nalepa *et al.* (2006).

B) Structure tridimentionnelle du motif C3HC4 RING telle que déterminée par RMN du proton. Les résidus cystéines (violet) et histidine (bleu) coordonnant les atomes de zinc (rouge) sont représentés par bâtonnets (PDB1CHC). D'après Barlow *et al.* (1994).

été associés à une activité E3 ubiquitine-ligase, c'est-à-dire qu'ils peuvent catalyser l'étape finale de la réaction d'ubiquitination d'un substrat (Freemont, 2000; Joazeiro et Weissman, 2000). C'est le cas de TRIM24, qui par exemple ubiquitine p53 *via* son domaine RING, provoquant sa dégradation par le protéasome (Allton *et al.*, 2009; Jain et Barton, 2009). Les mécanismes généraux d'ubiquitination et de dégradation par le protéasome font l'objet du Chapitre 6.

4.1.2. Les boîtes B et la superhélice

Le rôle des boîtes B du motif TRIM est mal compris. La superhélice amphipathique voisine est quant à elle nécessaire aux interactions impliquant le TRIM comme l'oligomérisation. En effet, TRIM24 forme des oligomères avec d'autres protéines de la famille TRIM comme TRIM28 et TRIM33 (H. Peng *et al.*, 2000; H. Peng *et al.*, 2002). L'oligomérisation permettrait l'alignement approprié du RING et des boîtes B afin de permettre la reconnaissance des autres protéines avec lesquelles ils interagissent (H. Peng *et al.*, 2002).

Lors de l'identification des protéines formant des complexes avec TRIM24, TRIM33 fût détecté en proportions quasi-stœchiométriques par rapport à TRIM24. Il est donc considéré comme un partenaire majeur de celui-ci (Herquel *et al.*, 2011b; Nielsen *et al.*, 1999). TRIM28, lui, fût détecté en moindres proportions et ne semble interagir avec TRIM24 qu'en présence de TRIM33 (Herquel *et al.*, 2011b).

4.1.3. Le domaine PHD-Bromo

Le domaine PHD a une organisation similaire au RING (Figure 21A). Cependant, contrairement aux RING qui sont présents dans une grande variété de protéines aux fonctions diverses, les domaine PHD et bromo (Figure 21B) ne sont présents que dans certaines protéines nucléaires impliquées dans des interactions avec la chromatine (Aasland *et al.*, 1995; Freemont, 1993; Jeanmougin *et al.*, 1997; Saurin *et al.*, 1996). En effet, le domaine PHD-bromo permet la reconnaissance très sélective de modifications d'histones (Mellor, 2006). En général, le domaine PHD interagit avec les histones de façon dépendante à leur statut de méthylation, tandis que le domaine bromo interagit plutôt avec les histones acétylées (Lan *et al.*, 2007; Wysocka *et al.*, 2006; Zeng et Zhou, 2002). Le domaine PHD-bromo permet ainsi à TRIM24 de jouer un rôle de "*histone code reader*" (lecteur de code d'histones): en effet, il peut reconnaitre des modifications d'histones spécifiques et combinatoires pouvant être localisées sur une même queue d'histone (Figure 22) (Tsai *et al.*, 2010).

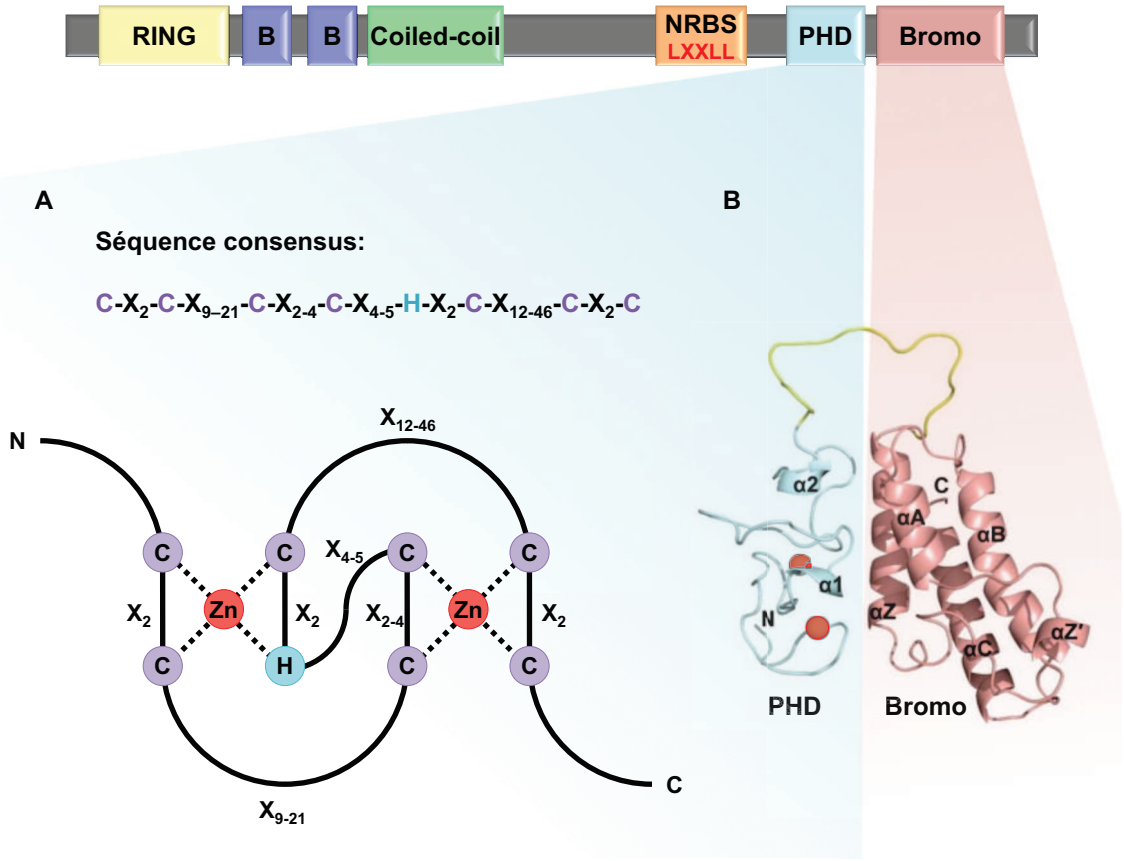


Figure 21: Structure de la région C-terminale de TRIM24.

A) Séquence consensus et représentation schématique du motif en doigt de zinc PHD. Comme le motif RING, il comprend deux atomes de zinc ("Zn", en rouge) coordonnés à quatre résidus cystéines ("C", en violet) / histidine ("H", en bleu); cependant, la position du H diffère par rapport au RING. Ces résidus conservés sont espacés de séquences X_n, où "n" est le nombre de résidus et "X" correspond à n'importe quels acides aminés. D'après Kosarev *et al.* (2002).

B) Structure cristallographique de la région C-terminale comprenant les motifs PHD (bleu) et bromo (rose) de TRIM24. Les atomes de zinc du motif PHD sont illustrés en rouge (PDB3O33). Modifié de Tsai *et al.* (2010).

4.2. TRIM24 et la transcription

Le rôle de TRIM24 en tant que régulateur transcriptionnel des RN est complexe. En effet, bien qu'initialement décrit comme un corépresseur des RN (Le Douarin *et al.*, 1996; Le Douarin *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 1999), certaines études récentes attribuent également à TRIM24 un rôle activateur (Herquel *et al.*, 2011a). Il a été suggéré que l'oligomérisation jouerait un rôle d'interrupteur régulant le passage entre les actions activatrices et répressives de TRIM24 (H. Peng *et al.*, 2002).

4.2.1. Rôle activateur

TRIM24 agit comme un coactivateur de plusieurs RN comme le récepteur des androgènes, le récepteur des œstrogènes ERα (*estrogen receptor* α) et les RARs (Kikuchi *et al.*, 2009; Tisserand *et al.*, 2011; Tsai *et al.*, 2010).

En raison de son profil d'expression, il a été postulé que TRIM24 agirait comme un catalyseur augmentant la vitesse de la réponse transcriptionnelle dans les cellules à division rapide caractérisées par une activité transcriptionnelle élevée (Remboutsika *et al.*, 1999). En effet, bien qu'ubiquitaire, TRIM24 est exprimé préférentiellement à des stades précoces du développement dans des cellules non différenciées et pluripotentes (cellules souches embryonnaires de souris (mES), cellules d'embryocarcinome de souris F9 et P19). Puis, cette expression diminue au cours de l'organogenèse et de la différenciation (Remboutsika *et al.*, 1999). TRIM24 est aussi fortement exprimé dans plusieurs cancers, tels ceux des voies aérodigestives supérieures, du poumon, du sein, de la vessie, de l'estomac, le glioblastome et le cancer colorectal, et sa surexpression est fréquemment associée à un mauvais pronostic (M. Chambon *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2013; H. Li *et al.*, 2012; Miao *et al.*, 2015; Tsai *et al.*, 2010; J. Wang *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2015; L. H. Zhang *et al.*, 2015). En effet, TRIM24 stabilise l'interaction de ERα avec la chromatine, activant ainsi la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération et le développement tumoral (Tsai *et al.*, 2010).

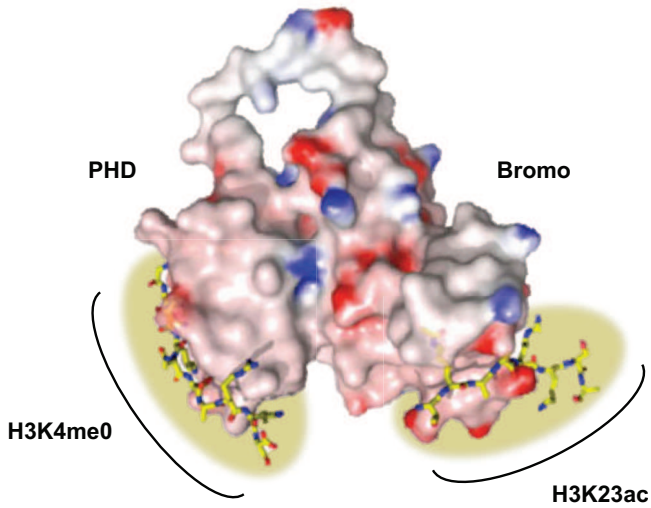


Figure 22: Le domaine PHD-bromo de TRIM24: un "histone code reader".

Structure tridimentionnelle des domaines PHD et bromo de TRIM24 montrant leur interaction simultanée avec respectivement H3K4me0 et H3K23ac d'une même queue d'histone. Modifié de Tsai *et al.* (2010).

En raison de sa capacité à interagir avec des protéines de la chromatine, mais non avec l'ADN directement, Il a été proposé que TRIM24 jouerait un rôle de facteur intermédiaire se fixant à la chromatine et facilitant l'ancrage des RN, des facteurs de transcription et des corégulateurs au

niveau des gènes cibles (Le Douarin *et al.*, 1996; Le Douarin *et al.*, 1995; Remboutsika *et al.*, 1999). En effet, TRIM24 est préférentiellement associé aux régions accessibles et transcriptionnellement actives de l'euchromatine où se trouve l'ARN Pol II (Remboutsika *et al.*, 1999). En effectuant un balayage restreint aux régions ouvertes de la chromatine plutôt qu'à l'échelle du génome entier, TRIM24 permettant ainsi une reconnaissance rapide et efficace des sites de fixation. De plus, le contexte épigénétique affinerait cette reconnaissance par TRIM24. Par exemple, dans des cellules de cancer du sein, le domaine PHD de TRIM24 reconnait spécifiquement la marque H3K4me0 (histone 3 avec la lysine 4 non méthylée) et, de façon simultanée, le domaine bromo reconnait soit H3K23ac (histone 3 avec la lysine 23 acétylée) de la même queue d'histone, soit diverses acétylations de d'autre histone (Figure 22) (Tsai *et al.*, 2010). La reconnaissance de cette signature chromatinienne non canonique est associée à l'activation transcriptionnelle de ERα (Tsai *et al.*, 2010).

TRIM28 et TRIM33 ne peuvent pas lier directement les RN ni l'ADN, mais seraient impliqués dans la régulation de l'activité transcriptionnelle par TRIM24 *via* des mécanismes épigénétiques impliquant des protéines liées à l'hétérochromatine et des protéines modifiant les histones (Le Douarin *et al.*, 1996; Remboutsika *et al.*, 1999; Venturini *et al.*, 1999). De plus, TRIM33 peut agir directement sur le complexe d'initiation de la transcription en permettant le recrutement de facteurs d'élongation et du complexe FACT (*facilitates chromatin transcription*) afin de contrer les pauses de l'ARN Pol II (Bai *et al.*, 2010).

Certaines modifications post-traductionnelles modulent également l'activité de TRIM24. En effet, TRIM24 est une phosphoprotéine qui devient hyperphosphorylée après interaction avec les RN (R. A. Fraser *et al.*, 1998). Il a été suggéré que cette hyperphosphorylation diminue l'activité répressive de TRIM24, permettant l'activation de la transcription (R. A. Fraser *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 1999). Finalement, de par son activité kinase intrinsèque, TRIM24 peut s'auto-phosphoryler et phosphoryler sélectivement les HP1, certains FGTs et TAFs (*TATA binding protein-associated factors*) (R. A. Fraser *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 1999). TRIM24 régule donc également la transcription par la modulation de l'activité des composants de la machinerie transcriptionnelle *via* leur phosphorylation. Les conséquences exactes de ces phosphorylations sur l'activité transcriptionnelle demeurent cependant à éclaircir.

4.2.2. Rôle inhibiteur

Un rôle inhibiteur de TRIM24 a été rapporté pour RARα et VDR (Ignat *et al.*, 2008; Khetchoumian *et al.*, 2008; Nielsen *et al.*, 1999). Par exemple, dans certains cancers du foie, Trim24 peut jouer le rôle de suppresseur de tumeurs en bloquant l'activation RARα-dépendante de la voie de signalisation pro-inflammatoire IFN/STAT (Tisserand *et al.*, 2011).

L'action répressive de TRIM24 est notamment attribuable à sa capacité à recruter des HDAC (1 et 2) et à interagir avec les protéines de l'hétérochromatine (*heterochromatin protein*) HP1α, β et γ initialement associées à la répression (Koonin *et al.*, 1995; Nielsen *et al.*, 1999). Son partenaire TRIM28 peut lui aussi recruter les HP1, de même que des enzymes modifiant la chromatine et des corépresseurs comme N-CoR (Herquel *et al.*, 2011a; Matsui *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 1999; Schultz *et al.*, 2002; Schultz *et al.*, 2001; Sripathy *et al.*, 2006; Underhill *et al.*, 2000). Ces observations valurent initialement à TRIM28 d'être associé spécifiquement à la répression. Plus récemment, il fût cependant observé que les HP1 peuvent également participer favorablement à l'activité transcriptionnelle (Kwon et Workman, 2008). TRIM28 jouerait en fait à la fois un rôle répresseur, *via* la formation de structures de chromatine condensées de type hétérochromatine et, à l'inverse, un rôle activateur *via* la formation de structures ouvertes de type euchromatine (Le Douarin *et al.*, 1996). De plus, TRIM28 peut aussi réprimer l'activité transcriptionnelle en modulant les pauses de l'ARN Pol II et le processus d'élongation d'un grand nombre de gènes (Bunch *et al.*, 2014).

La reconnaissance d'histones par TRIM33 participe également à la répression. Contrairement à TRIM24, TRIM33 n'interagit qu'avec H3: son domaine PHD reconnait les résidus K4me0 et R2me0 et son domaine bromo reconnait l'acétylation d'au moins deux lysines successives (Agricola *et al.*, 2011). La reconnaissance de ces marques par TRIM33 a été associée à une activité répressive. Ainsi, le code d'histones présent à proximité du promoteur des gènes cibles peut être en faveur d'une activation ou d'une répression de l'activité transcriptionnelle. TRIM28, lui, ne semble pas pouvoir lier les histones (Zeng *et al.*, 2008). Il possède cependant une propriété atypique et unique parmi les TIF1: son domaine PHD-bromo peut s'auto-sumoyler, ce qui lui permet de réprimer la transcription en coordonnant l'assemblage de complexes protéiques impliqués dans le remodelage de la chromatine (Ivanov *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2008).

Cependant, dans certains cas, ces partenaires peuvent également lever la répression induite par TRIM24 et restaurer l'activité transcriptionnelle des RN (H. Peng *et al.*, 2002). Par exemple, par un effet d'interférence/"squelching", TRIM33 peut rompre l'interaction entre TRIM24 et les RN et ainsi lever la répression induite par TRIM24 (H. Peng *et al.*, 2002). De plus, TRIM33 possède lui aussi une activité E3 ubiquitine-ligase grâce à laquelle il peut s'auto-ubiquitiner et ubiquitiner d'autres cibles, modulant ainsi leur activité (Agricola *et al.*, 2011).

En bref, la régulation de l'activité transcriptionnelle par TRIM24 est un phénomène complexe modulé par le code d'histones, des partenaires directs et indirects et des modifications post-traductionnelles diverses qui s'associent dans une logique combinatoire précise pour permettre une réponse transcriptionnelle adaptée à un contexte spécifique.

CHAPITRE 5: RÔLE DE LA PHOSPHORYLATION DANS LA SIGNALISATION DE L'AR

5.1. Les effets non-génomiques de l'AR: l'activation de kinases

En plus de leurs effets transcriptionnels, dits génomiques, il est aujourd'hui admis que plusieurs récepteurs nucléaires dont les RAR ont également des effets non-génomiques. En effet, plusieurs études ont montré que l'AR peut activer des cascades de kinases. Récemment, le laboratoire a montré qu'une petite sous-population de RARα est ancrée au niveau des radeaux lipidiques (*lipid rafts*) de la membrane plasmique (Piskunov et Rochette-Egly, 2012). Cette localisation inattendue a été corrélée à l'activation rapide et transitoire de plusieurs cascades de kinases en réponse à l'AR, lesquelles varient selon les types cellulaires (Figure 23). Ainsi, dans plusieurs types cellulaires, comme les fibroblastes, les cellules d'embryocarcinome murin et certaines cellules de cancer du sein et de leucémie, l'AR active la voie des p38MAPKs (*P38 mitogen-activated protein kinases*) *via* la formation de complexes entre RARα et la protéine Gαq (*G protein alpha Q*) des radeaux lipidiques et l'activation de Rho-GTPases (Alsayed *et al.*, 2001; Bruck *et al.*, 2009; Gianni *et al.*, 2002a; Piskunov et Rochette-Egly, 2012). Dans d'autres types cellulaires, comme

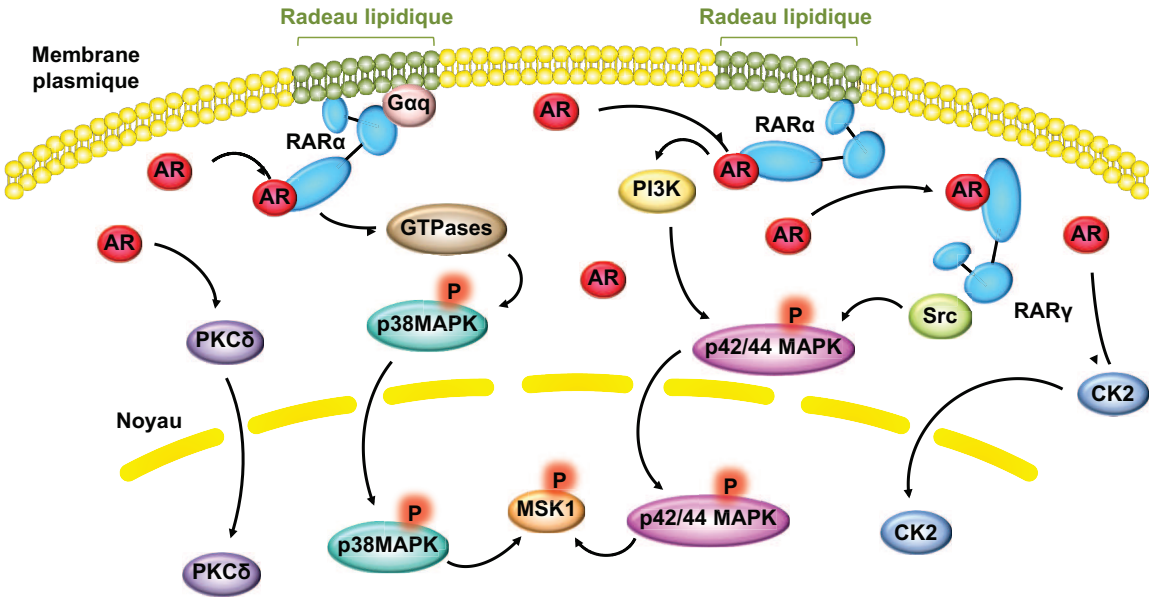


Figure 23: Activation de kinases par l'AR.

En réponse à l'AR, une sous-population de RARα localisée au niveau des radeaux lipidiques de la membrane plasmique active des cascades de kinases. Ces kinases, qui varient selon les types cellulaires, incluent la p38MAPK, activée *via* l'interaction entre RARα et Gαq, et la p42/44MAPK *via* la PI3K. La p42/44MAPK peut également être activée par l'AR *via* RARγ et Src. Les p38 et p42/44MAPK sont ensuites transloquées dans le noyau où elles phosphorylent MSK1. Finalement, l'AR peut aussi activer PKCδ ou CK2.

les cellules neuronales, les cellules de Sertoli ou les cellules souches, l'AR active plutôt la voie des p42/44MAPKs (aussi appelées ERK1/2, *extracellular signal-regulated kinase 1/2*) *via* la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) ou Src (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*) (N. Chen et Napoli, 2008; Dey *et al.*, 2007; Masia *et al.*, 2007; Stavridis *et al.*, 2010; Zanotto-Filho *et al.*, 2008). Finalement, dans certaines cellules de cancer du sein et de leucémie, l'AR peut aussi activer la PKCδ (*Protein kinase C δ*) (Kambhampati *et al.*, 2003), ou dans les cellules musculaires lisses vasculaires, la CK2 (*Casein kinase II*) (Zheng *et al.*, 2011).

Ces kinases activées par l'AR sont ensuite transloquées dans le noyau où elles phosphorylent d'autres cibles. Parmi ces cibles, on compte plusieurs acteurs de la signalisation de l'AR, comme des corégulateurs des RAR. La phosphorylation d'une protéine pouvant altérer sa structure, son activité et ses interactions, les effets non-génomiques de l'AR constituent un mécanisme de régulation important de la transcription par les RAR (Hunter, 1995; Rochette-Egly et Germain, 2009). Par exemple, la phosphorylation de SMRT par les MAPKs le relâche de RARα (Jonas *et al.*, 2007). De plus, elle provoque la dissociation des autres protéines des complexes répresseurs qui lui sont associés (HDAC, TBL1, TBLR1) (Varlakhanova *et al.*, 2011). Il a été suggéré que la phosphorylation des corépresseurs permet le recrutement du protéasome, provoquant ainsi leur dégradation. Les coactivateurs, tels SRC-3, peuvent également être phosphorylés en réponse à l'AR *via* la p38MAPK (Gianni *et al.*, 2006). La phosphorylation de SRC-3 provoque sa dissociation de RARα, puis son ubiquitination et sa dégradation (Ferry *et al.*, 2011). Ainsi, la dissociation et la dégradation phosphorylation-dépendantes des différents corégulateurs participe à leur échange et à la dynamique de la transcription par les RAR (Perissi *et al.*, 2008).

Une autre cible des MAPK est MSK1 (*mitogen- and stress-activated protein kinase*), qui peut être activée par la p38MAPK et la p42/44MAPK (Piskunov et Rochette-Egly, 2011). MSK1 phosphoryle à son tour les queues d'histones à proximité des RARE (Bruck *et al.*, 2009). De ces phosphorylations découlent des acétylations d'histones, le recrutement du complexe SWI/SNF et le départ de certains corépresseurs tel PRC2, le tout participant ainsi au réarrangement de la chromatine (Bruck *et al.*, 2009; Drobic *et al.*, 2010; Gehani *et al.*, 2010).

5.2. Phosphorylation des RAR

Il est maintenant bien établi que les RAR, comme la plupart des RN incluant les RXR, sont des phosphoprotéines. En effet, les RAR sont la cible de kinases variées et plusieurs sites de phosphorylation situés dans différents domaines des RAR ont été décrits jusqu'à présent. Ces phosphorylations ont été associées à la régulation de fonctions diverses telles la localisation

intracellulaire, la dimérisation, la dégradation et l'interaction avec des partenaires (Figure 24) (Rochette-Egly, 2003; Rochette-Egly et Germain, 2009).

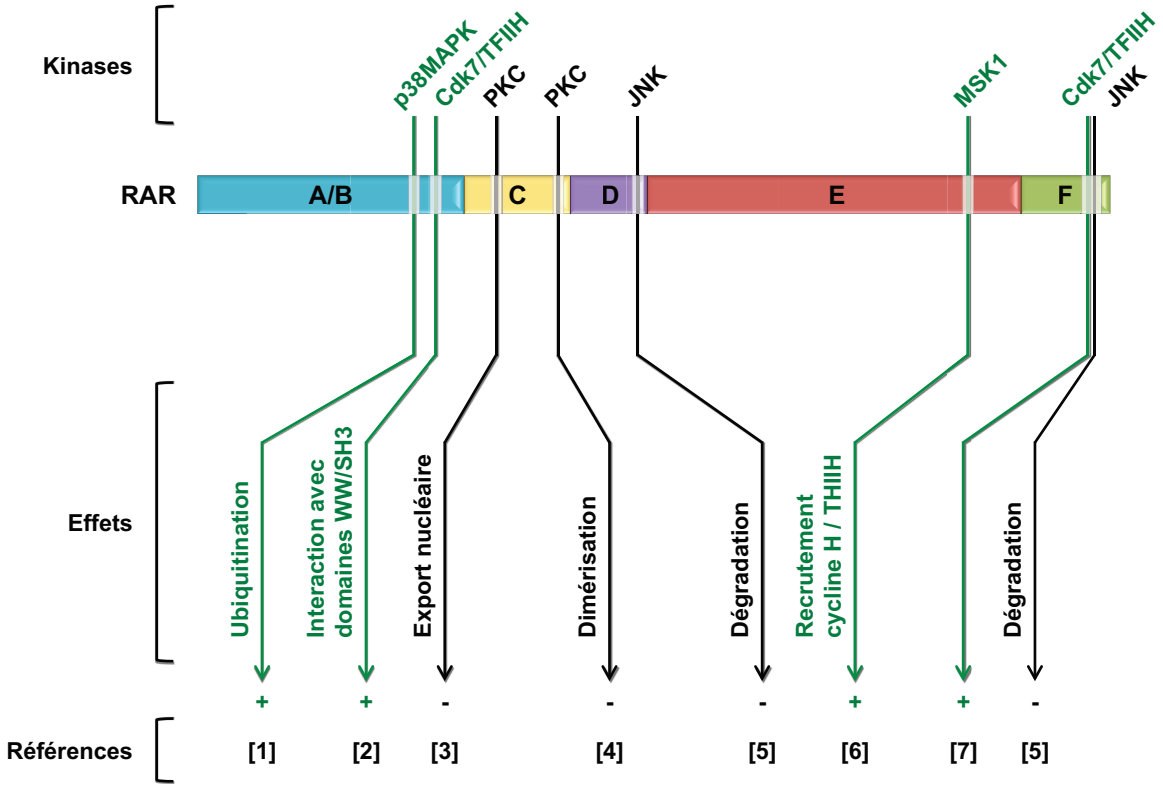


Figure 24: Principales phosphorylations des RAR.

Récapitulation des principales phosphorylations des RAR. Les kinases impliquées et les principaux effets sont indiqués. Les voies en indiquées en vert sont celles qui sont induites par l'AR. La conséquence transcriptionnelle (positive ou négative) des phosphorylations est indiquée par un " + " ou un " – ". [1] Gianni *et al.* (2002a) [2] Bour *et al.* (2005b) [3] K. Sun *et al.* (2007) [4] Delmotte *et al.* (1999) [5] Srinivas *et al.* (2005) [6] Bruck *et al.* (2009) [7] Rochette-Egly *et al.* (1997). Modifié de Rochette-Egly et Germain (2009).

Les sites de phosphorylation connus de RARα et de RXRα sont détaillés dans le Tableau 2 et le Tableau 3 respectivement. Dans le cas de RARα (Tableau 2), le DBD renferme trois sites de phosphorylation connus: les sérines (S) S96, S115, et S157, qui régulent la transactivation, la localisation intracellulaire et l'hétérodimérisation respectivement (Delmotte *et al.*, 1999; Srinivas *et al.*, 2006; K. Sun *et al.*, 2007). Des sites de phosphorylation ont également été répertoriés dans la région charnière (Thréonine (T) T181) et la région F (S445, S449, S456 et S461). Leur rôle demeure à éclaircir, mais T181, S445 et S461 semblent être impliqués dans la stabilité et la dégradation de RARα (Bastien *et al.*, 2000; Rochette-Egly *et al.*, 1997; Srinivas *et al.*, 2005). Le LBD comprend

également plusieurs sites de phosphorylation régulant l'activité de RARα, dont la région T209/T210 et S219 (Santos et Kim, 2010; Si *et al.*, 2007).

Domaine	Résidus	Kinase	Référence
NTD	S77	cdk7/TFIIH	Rochette-Egly *et al.* (1997)
DBD	S96	AKT	Srinivas *et al.* (2006)
	S115	PKC	K. Sun *et al.* (2007)
	S157	PKC	Delmotte *et al.* (1999)
région D	T181	JNK	Srinivas *et al.* (2005)
LBD	T209/T210	CAMKIIγ	Si *et al.* (2007)
	S219	PKA	Santos et Kim (2010)
	S369	PKA	Rochette-Egly *et al.* (1995)
	S369	MSK1	Bruck *et al.* (2009)
région F	S445, S449, S456, S461	cdk7	Rochette-Egly *et al.* (1997)
	S445, S461	JNK	Srinivas *et al.* (2005)

Tableau 2: Sites de phosphorylation répertoriés de RARα et kinases associées.

Domaine	Résidus	Kinase	Référence
NTD	S22	cdk/cycline	Adam-Stitah *et al.* (1999), Bastien *et al.* (2002)
	S32	JNK	Mann *et al.* (2005)
	S61, S75, S87	JNK	Adam-Stitah *et al.* (1999)
DBD	T162	PKC	K. Sun *et al.* (2007)
LBD	S265	JNK	Adam-Stitah *et al.* (1999)
	Y248, Y397	MKK4	H. Y. Lee *et al.* (2000)

Tableau 3: Sites de phosphorylation répertoriés de RXRα et kinases associées.

Le laboratoire s'est intéressé particulièrement à deux sites de phosphorylation majeurs situés dans le LBD et dans le NTD (Figure 25). Ces sites sont rapidement phosphorylés suite à l'activation des MAPK par l'AR. Le site du LBD, correspondant à S369 dans le cas de RARα, est un résidu exposé localisé entre les hélices H9 et H10 du LBD. Il fait partie d'un motif riche en arginine/lysine correspondant à une séquence consensus reconnue par plusieurs kinases, comme MSK1 et la PKA (*cAMP-dependent protein kinase*) (Figure 25). Des expériences menées *in vitro* et avec des cellules en culture ont montré que RARα peut effectivement être phosphorylé au niveau de S369 par la PKA ou par MSK1, suggérant que plusieurs voies de signalisation pourraient converger vers ce résidu (Bruck *et al.*, 2009; Gaillard *et al.*, 2006; Rochette-Egly *et al.*, 1995).

L'autre site de phosphorylation majeur, correspondant à S77 dans le cas de RARα, est conservé parmi les RAR et fait partie du PRM au sein du NTD (Figure 25) (Samarut *et al.*, 2011). Ce résidu est phosphorylé par cdk7, kinase dont l'activité dépend de son association avec la cycline H et MAT1 (ménage à trois 1), le tout formant le complexe ternaire CAK (*cdk-activating kinase*) de TFIIH (Rochette-Egly *et al.*, 1997).

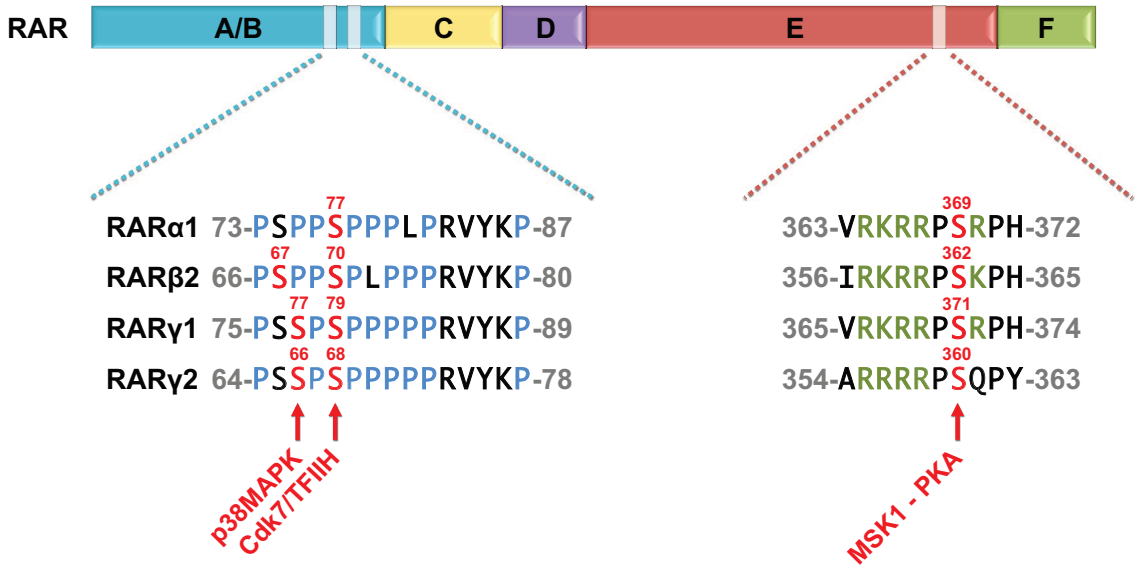


Figure 25: Sites de phosphorylation conservés parmi les sous-types de RAR.

Représentation des sites de phosphorylation du NTD et du LBD des RAR. Le domaine N-terminal (à gauche) comprend un PRM dans lequel se trouvent un ou deux sites de phosphorylés par la p38MAPK ou cdk7/TFIIH. Le LBD (à droite) comprend quant à lui un motif riche en arginine/lysine correspondant à une séquence consensus reconnue par plusieurs kinases, incluant MSK1 et la PKA. La phosphorylation présumée de RARβ2 reste cependant à valider. Adapté de Al Tanoury *et al.* (2013), Lalevee *et al.* (2010), et Rochette-Egly (2015).

De manière intéressante, il a été montré que dans le cas de RARα, la phosphorylation du NTD requiert la phosphorylation préalable du LBD (Gaillard *et al.*, 2006). En effet, la phosphorylation du NTD requiert le bon positionnement de cdk7, lequel est assuré par l'ancrage de la cycline H sur un site spécifique du LBD localisé au niveau de la boucle L8-9 (Bour *et al.*, 2005a). Des simulations de dynamique moléculaire du LBD de RARα ont montré que la phosphorylation de S369 induit des changements dans la dynamique structurale de L8-9. Ceux-ci se traduisent par une augmentation de l'affinité pour la fixation de la cycline H, permettant de ce fait la phosphorylation de S77 par cdk7 (Chebaro *et al.*, 2013; Samarut *et al.*, 2011). En résumé, l'activation de MSK1 *via* les effets non-

génomiques de l'AR permet dans un premier temps la phosphorylation du LBD, laquelle favorise la fixation de la cycline H et donc la phosphorylation du NTD par cdk7 (Figure 26).

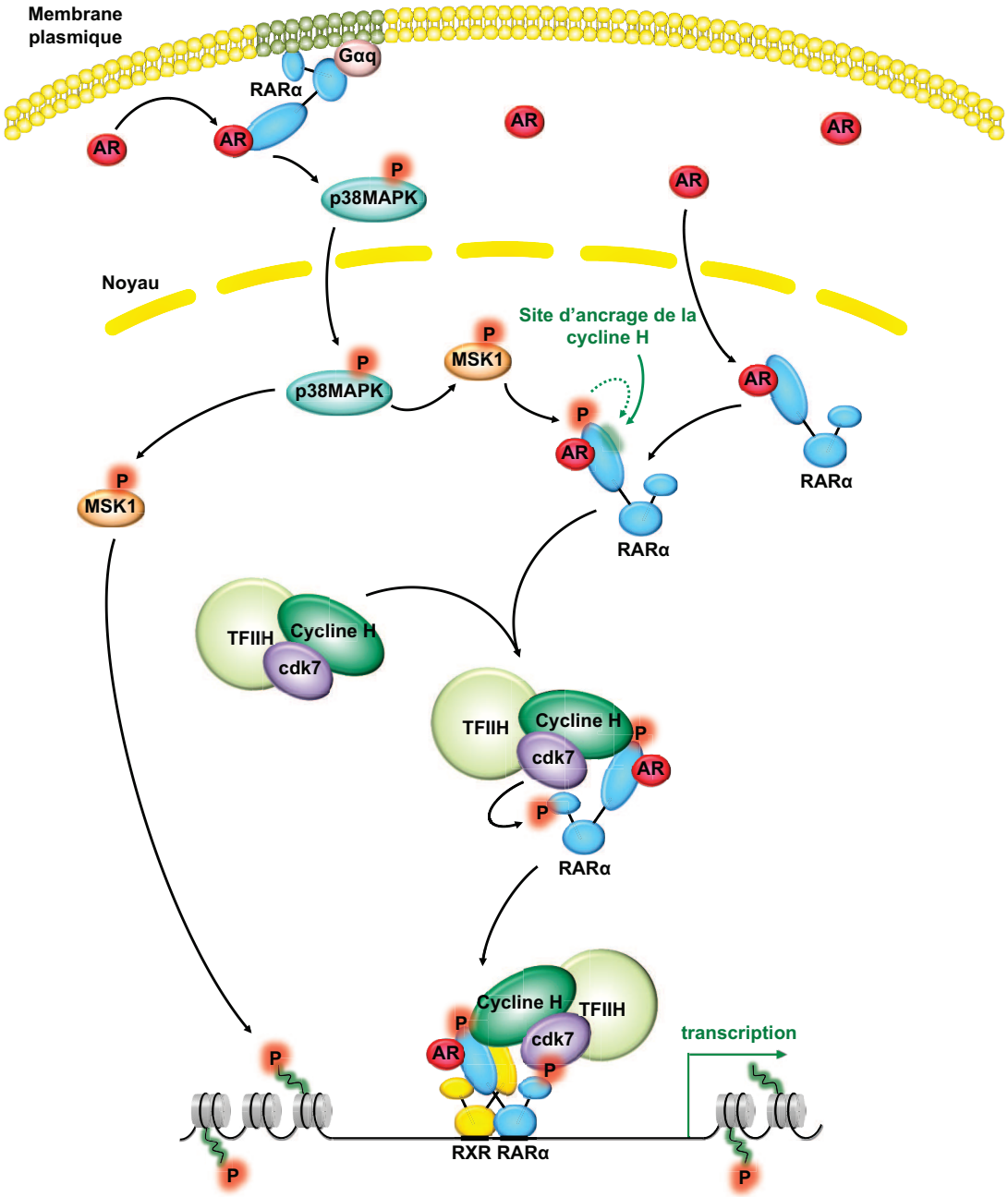


Figure 26: Cascade de phosphorylation de RARα en réponse à l'AR.

MSK1 est rapidement activée par l'AR *via* des mécanismes non-génomiques impliquant la voie des p38MAPK. MSK1 activée peut ainsi phosphoryler RARα au niveau du LBD. Cette première phosphorylation crée une surface d'ancrage propice à la fixation de la cycline H (halo vert). L'interaction RAR-cycline H permet le bon positionnement de cdk7 pour phosphoryler RARα au niveau du NTD. Cela permet le recrutement de tout le complexe sur le RARE du promoteur du gène cible. En parallèle, MSK1 phosphoryle des queues d'histones, et de ces modifications découlent de multiples réarrangements au niveau chromatinien.

Ces sites de phosphorylation sont également présents chez RARγ (Figure 25) (Bastien *et al.*, 2000; Lalevee *et al.*, 2010; Rochette-Egly *et al.*, 1995; Taneja *et al.*, 1997). La même cascade du LBD au NTD a été observée pour RARγ (manuscrit en préparation). De façon intéressante, le NTD de RARγ1 et RARγ2 comprend en fait deux sites de phosphorylation (S77 et S79 dans RARγ1, S66 et S68 dans RARγ2) (Bastien *et al.*, 2000). La p38MAPK est responsable de la phosphorylation du deuxième site (S77 chez RARγ1, S66 dans RARγ2) (Gianni *et al.*, 2002a; Gianni *et al.*, 2002b). Lors de mon arrivée au laboratoire, la S77 constituait le seul site de phosphorylation répertorié dans le NTD de RARα.

5.3. Rôle des phosphorylations dans l'activité des RAR

La découverte de la phosphorylation des RAR a mené à un questionnement quant à son éventuel rôle *in vivo*. Malheureusement, la complexité du phénomène et des voies de signalisation mises en jeu rendent délicate l'analyse du rôle physiologique de la phosphorylation chez l'animal (Mark *et al.*, 2009; Samarut et Rochette-Egly, 2012). Cependant, le rôle critique de la phosphorylation dans l'activité des RAR a pu être mis en évidence dans plusieurs modèles cellulaires, comme les cellules d'embryocarcinome de souris (cellules F9) et les cellules souches embyronnaires de souris (mES) à partir desquelles ont été générées des lignées stables RARγ-/- réexprimant le RARγ WT ou muté au niveau des sites de phosphorylation ("*rescue*"), de même que dans des lignées cellulaires stables de fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) RAR(α,β,γ)-/- réexprimant RARα WT ou muté au niveau des sites de phosphorylation (Al Tanoury *et al.*, 2014; Bruck *et al.*, 2009; Rochette-Egly, 2015; Rochette-Egly et Chambon, 2001).

L'une des fonctions régulées par les RAR de façon phosphorylation-dépendante est la différenciation. Dans les cellules F9, le processus de différenciation en endoderme primitif est régulé par l'AR *via* RARγ2 (Taneja *et al.*, 1997). Or, il fût montré que la mutation de RARγ2 au niveau du site de phosphorylation ciblé par cdk7 (S68) bloque la différenciation, suggérant que la phosphorylation du NTD de RARγ2 est requise pour ces processus (Taneja *et al.*, 1997). Plus récemment, les mES ont permis d'effectuer des observations similaires. En effet, la différenciation neuronale à partir des mES pluripotentes est induite par l'AR et implique également le sous-type RARγ2. Elle est cependant bloquée par la mutation de S68 de RARγ2 (Al Tanoury *et al.*, 2014; Rochette-Egly, 2015).

La phosphorylation est également requise pour la transcription de certains gènes cibles spécifiques. En effet, dans les cellules F9 et les mES, la mutation des sites de phosphorylation de RARγ2 induit une perte de l'activation de certains gènes cibles par l'AR (Al Tanoury *et al.*, 2014; Taneja *et al.*, 1997). Des expériences de RNA-seq effectuées dans les mES à l'aide de phosphomutants de RARγ2 ont montré qu'environ 50% des gènes cibles de RARγ2 sont régulés par

la phosphorylation (Al Tanoury *et al.*, 2014; Moutier *et al.*, 2012; Rochette-Egly, 2015). Ces gènes sont principalement impliqués dans le développement neuronal et incluent *Lefty-1* (*left right determination factor 1*) et les gènes "*homeobox*" *Gbx2* (*gastrulation brain homeobox 2*), *HNF1β* (*hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B*) and *Meis2* (Rochette-Egly, 2015). Ces résultats suggèrent que la différenciation neuronale des mES induite par l'AR repose sur des effets transcriptionnels phosphorylation-dépendants de RARγ2.

Similairement, des expériences menées dans des MEF RAR(α,β,γ)-/- réexprimant RARα WT ou muté au niveau des sites de phosphorylation ont montré que certains effets transcriptionnels de RARα sont également dépendants de la phosphorylation (Bruck *et al.*, 2009). Certaines manifestations pathologiques semblent d'ailleurs découler d'un défaut de phosphorylation de RARα. En effet, chez les patients souffrant de *Xeroderma Pigmentosum*, des mutations affectent la sous-unité XPD du complexe de THIIH, empêchant la phosphorylation du NTD de RARα par cdk7 (Keriel *et al.*, 2002). Cela se traduit par des déficiences dans l'expression de plusieurs gènes cibles qui ont été corrélées aux manifestations cliniques observées chez les patients (Egly, 2001).

De plus, la phosphorylation semble jouer un rôle déterminant dans le recrutement de RARα et RARγ au niveau des RARE (Al Tanoury *et al.*, 2014; Bruck *et al.*, 2009). Dans le cas de RARγ2, des expériences de CHIP-seq effectuées dans les mES ont montré que la majorité des gènes cibles régulés par la phosphorylation sont associés spécifiquement à certains types de RARE: les DR7, RARE atypiques peu fréquents, et les DR5 (Al Tanoury *et al.*, 2014; Moutier *et al.*, 2012; Rochette-Egly, 2015). Dans ce contexte, il est probable que la phosphorylation apporte une certaine sélectivité quant au choix des gènes cibles régulés dans un contexte donné.

Par quels mécanismes la phosphorylation régule-t-elle l'activité des RAR? Globalement, il a été montré que la phosphorylation peut affecter le fonctionnement des RN à plusieurs niveaux. Elle peut d'abord affecter leur localisation à l'intérieur des cellules (Lombardi *et al.*, 2008; K. Sun *et al.*, 2007; Weigel et Moore, 2007). Par exemple, il a été montré que dans certains cas, la phosphorylation de RARγ au niveau du NTD favorise sa rétention dans le cytoplasme. La localisation intracellulaire des RAR étant à la base de l'équilibre entre les réponses génomiques et non-génomiques à l'AR, sa régulation constitue un moyen rapide et réversible de permettre une réponse cellulaire adéquate en fonction des signaux environnementaux et des conditions physiologiques (Y. H. Han *et al.*, 2009).

En outre, l'état de phosphorylation des RAR peut affecter leur interaction avec certains partenaires. En effet, le site de phosphorylation du NTD fait partie d'un PRM, motif adapté aux interaction avec les protéines à domaines SH3 ou WW (Sudol *et al.*, 1995; H. Yu *et al.*, 1994). Or, la

phosphorylation d'un résidu sérine situé dans ce PRM peut affecter favorablement ou défavorablement ces interactions (Kay *et al.*, 2000; Macias *et al.*, 2002; Sudol *et al.*, 2001; Zarrinpar et Lim, 2000). Ainsi, de récents travaux effectués au laboratoire ont montré qu'en absence d'AR, la vinexine β interagit avec le PRM de RARγ non-phosphorylé au niveau du NTD *via* l'un de ses trois domaines SH3 et, ce faisant, séquestre RARγ hors de la chromatine (Figure 27A). En réponse à l'AR, la phosphorylation de RARγ au niveau du PRM permet la dissociation de la vinexine β et des éventuels complexes associés, permettant ainsi le recrutement de RARγ sur l'ADN et l'initiation de la transcription (Lalevee *et al.*, 2010). Le fait que le PRM soit situé à proximité du DBD (Figure 27C) pourrait expliquer l'influence de sa phosphorylation et de ses partenaires sur la capacité de liaison à l'ADN. Dans le cas de RARγ2, la dissociation phosphorylation-dépendante de la vinexine β semble être requise spécifiquement pour la liaison aux RARE de type DR5 et DR7 (Figure 27B). L'architecture des hétérodimères RAR-RXR étant définie par l'espacement des RARE, il est possible que les protéines à domaines SH3 comme la vinexine β n'entravent le recrutement des hétérodimères RARγ2/RXR que sur les RARE associés à un certain type d'architecture (Rochette-Egly, 2015).

La phosphorylation de la S77 localisée dans le PRM du NTD de RARα régule également le recrutement de certains partenaires. Ainsi, la prolyl-isomérase Pin1, qui reconnait le motif pSer/Thr-Pro, interagit avec RARα phosphorylé au niveau de S77 (Brondani *et al.*, 2005). Le recrutement phosphorylation-dépendant de Pin1 peut lui-même affecter le recrutement d'autres protéines. En effet, Pin1 peut procéder à l'isomérisation *cis-trans* du résidu proline voisin du site de phosphorylation, ce qui affecte la reconnaissance d'autres partenaires (Bao *et al.*, 2004; Brondani *et al.*, 2005).

Finalement, la phosphorylation semble jouer un rôle important dans le mécanisme entourant la dégradation des RAR (Gianni *et al.*, 2002a; Kopf *et al.*, 2000). Comme nous le verrons au chapitre suivant, la dégradation des RAR par le protéasome, étape marquant la fin du signal transcriptionnel, est importante pour la dynamique de la transcription en permettant une réévaluation continuelle des besoins transcriptionnels en fonction des signaux transmis par l'AR. Il a été montré que la phosphorylation de RARγ est nécessaire à son ubiquitination et à sa dégradation (voir Section 6.4) (Gianni *et al.*, 2002a; Kopf *et al.*, 2000).

Globalement, l'ensemble de ces données suggèrent une coopération entre les effets génomiques et non-génomiques de l'AR pour la régulation transcriptionnelle. Ainsi, les effets non-génomiques participent à la dynamique et à la spécificité de la régulation transcriptionnelle par les RAR, permettant à la cellule une réponse efficace et adaptée au contexte physiologique.

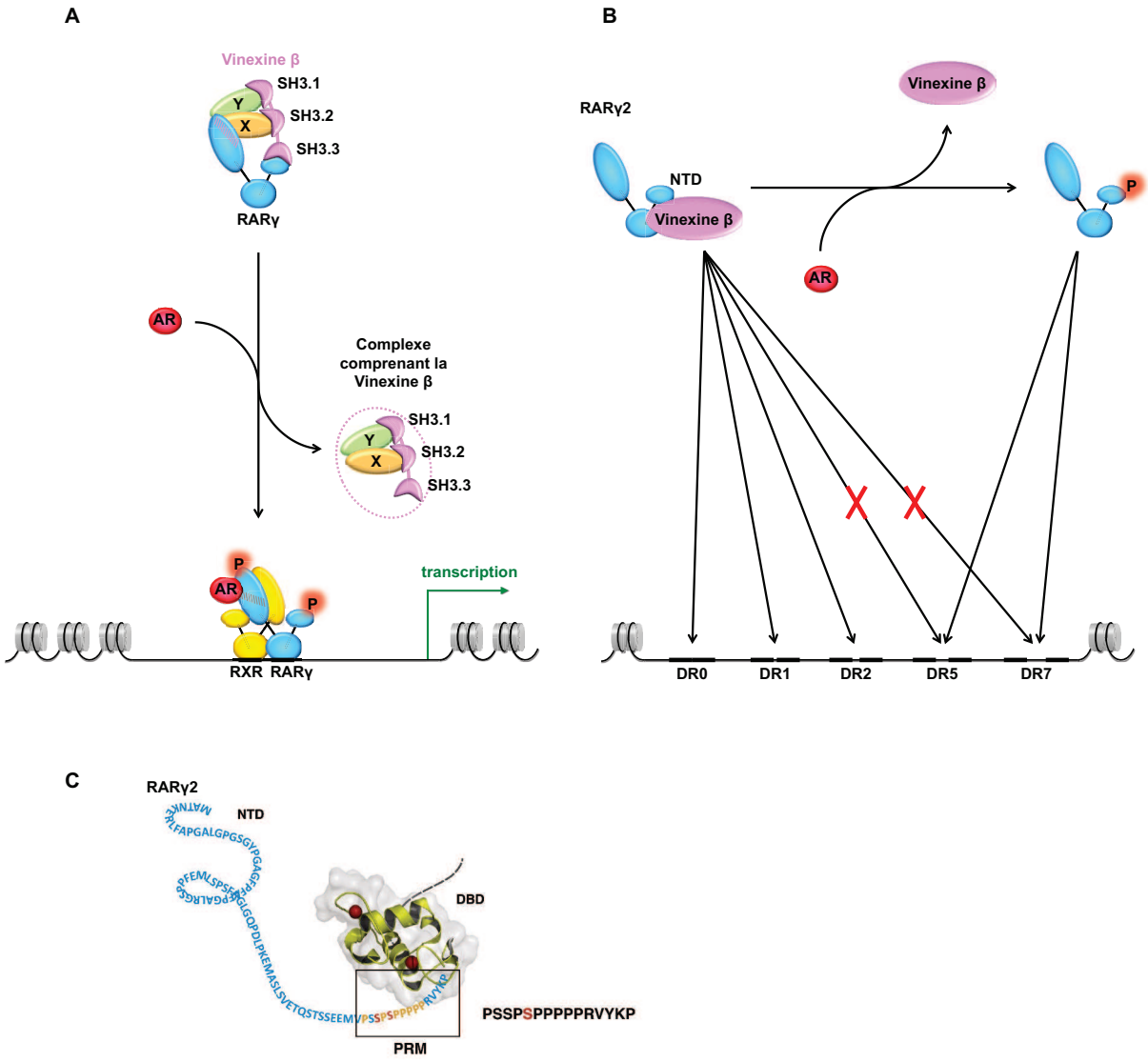


Figure 27: Contrôle de l'activité transcriptionnelle de RARγ par la vinexine β.

A) En absence d'AR, le troisième domaine SH3 de la vinexine β interagit avec le PRM non phosphorylé du NTD de RARγ. *Via* ses deux autres domaines SH3, la vinexine β peut également jouer le rôle d'échafaud liant le NTD au LBD par l'intermédiaire de complexes protéiques (représentés par X et Y). Ce complexe séquestre ainsi RARγ à l'extérieur de la chromatine, empêchant la transcription. En réponse à l'AR, les changements conformationnels du LBD et la phosphorylation du PRM coopèrent pour provoquer la dissociation du complexe comprenant la vinexine β. Cela permet la dimérisation de RARγ avec RXR, la fixation aux éléments de réponse et l'initiation de la transcription. Adapté de Lalevee *et al.* (2010).

B) Dans le cas de RARγ2, la forme non-phosphorylée du récepteur est associée à la vinexine β, l'empêchant de lier spécifiquement les RARE de type DR5 et DR7. La phosphorylation du NTD de RARγ2 en réponse à l'AR induit la dissociation de la vinexine β, permettant le recrutement de RARγ2 sur les éléments DR5 et DR7. D'après Rochette-Egly (2015).

C) Représentation schématique du NTD de RARγ2 montrant la proximité du PRM (et du site de phosphorylation qu'il comprend) par rapport au DBD. D'après Rochette-Egly (2015).

5.4. Phosphorylation aberrante des RAR et cancer

En réponse à divers stress environnementaux (UV, choc thermique, choc osmotique), facteurs de croissance ou cytokines, de nombreuses voies kinasiques sont activées (Davis, 2000; Dent *et al.*, 2003). Les protéines phosphorylées par ces voies incluent divers facteurs de transcription dont les RAR. Bien que la phosphorylation des RAR puisse affecter divers sites qui varient selon les agents de stress, elle aboutit généralement dans ce contexte à la répression de l'activité transcriptionnelle des RAR. Par exemple, en réponse aux UV, les JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) sont activées et phosphorylent RARα au niveau de trois résidus: T181, S445 et S461. Ces phosphorylations conduisent à l'ubiquitination du récepteur et à sa dégradation rapide par le protéasome, ce qui inhibe sa transactivation (Srinivas *et al.*, 2005).

De manière intéressante un grand nombre de cancers sont caractérisés par une activité kinasique aberrante, laquelle peut être dérégulée ou amplifiée (Blume-Jensen et Hunter, 2001). Ainsi, il s'ensuit une perturbation de l'activité de kinases telles que AKT, JNK, p38MAPK et p42/44MAPK et PKC. Ces cancers sont fréquemment associés à une inhibition de l'activité des RAR et à une résistance aux effets antiprolifératifs de l'AR (Matsushima-Nishiwaki *et al.*, 2001; Neri *et al.*, 2003; Petty *et al.*, 2005; Slamon *et al.*, 1987; Tari *et al.*, 2002; Warrell, 1993).

Par exemple, certaines leucémies sont caractérisées par une translocation chromosomique entre les gènes BCR et ABL, produisant une protéine de fusion Bcr-Abl possédant une activité kinase constitutive (Deininger *et al.*, 2000). Ainsi, Bcr-Abl active constitutivement plusieurs protéines, dont la kinase CaMKIIγ (Si et Collins, 2008). Or, dans certaines leucémies, CaMKIIγ interagit avec RARα *via* son motif LXXLL et le phosphoryle sur un ou plusieurs résidus thréonine, ce qui a pour effet de favoriser l'interaction avec les corépresseurs et d'inhiber son activité transcriptionnelle (Si *et al.*, 2007).

De même, l'hyperactivité de la PKC entraîne une diminution de l'activité transcriptionnelle de RARα. En effet, la PKC phosphoryle RARα au niveau de la S157, ce qui réduit l'efficacité de l'hétérodimérisation, et de la S115, ce qui favorise l'export nucléaire de RARα (Delmotte *et al.*, 1999).

De plus, dans certaines cellules de cancer du poumon NSCLC (*non-small cell lung cancer cells*), AKT est constitutivement actif dû à l'amplification des gènes codant pour la sous-unité catalytique p110a de PI3K et de membres de la famille des erbB (Srinivas *et al.*, 2006). Dans ces cellules, qui sont résistantes à l'AR, AKT phosphoryle RARα au niveau de S96 et inhibe ainsi sa transactivation (Srinivas *et al.*, 2006). L'inhibition d'AKT dans ces cellules permet de restaurer l'activité de RARα et l'effet antiprolifératif de l'AR.

Similairement, certains cancers du sein dits ERBB2+ sont caractérisés par une amplification du gène ERBB2 (également appelé HER2) codant pour le récepteur à tyrosine-kinase erbB-2, de laquelle découle une hyperactivité de la voie PI3K/Akt située en aval (Liao et Hung, 2003; She *et al.*, 2008). Ces cancers sont généralement résistants aux effets antiprolifératifs de l'AR (Tari *et al.*, 2002). De façon intéressante, dans de telles lignées cellulaires, comme les SKBR3 ou les BT474, l'interaction entre RARα et Gαq n'est pas observée et la voie p38MAPK n'est pas activée (Piskunov and Rochette-Egly, 2012). Par conséquent, dans ces cellules, les effets transcriptionnels de RARα sont sévèrement affectés (Bruck *et al.*, 2009).

Dans l'ensemble, ces observations suggèrent qu'une phosphorylation aberrante puisse être corrélée à une activité dérégulée des RAR et à une résistance à l'AR (Duong et Rochette-Egly, 2011). En effet, l'importance des phosphorylations dans l'activité des RAR semble suggérer que l'intégrité des voies de signalisation et de l'activité kinasique soient requises au fonctionnement normal des RAR. Par conséquent, il peut être postulé que leur dérégulation puisse avoir des conséquences néfastes sur la signalisation de l'AR et les processus régulés par les RAR, tel la prolifération et la différenciation.

5.5. L'AR dans le traitement des cancers

L'AR contrôle notamment l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaires. Or, la dérégulation de ces mécanismes est une caractéristique majeure des cancers. Ainsi, une signalisation aberrante de l'AR est souvent impliquée dans la cancérogénèse, et la restauration d'une signalisation normale de l'AR constitue l'une des approches thérapeutiques utilisées (Coyle *et al.*, 2013; Spinella et Dmitrovsky, 2000; S. Y. Sun et Lotan, 2002). Les effets antioxydants, antiprolifératifs, pro-apoptotiques et pro-différenciation de l'AR et d'autres rétinoïdes ont été mis à profit dans plusieurs cancers comme agents chimiothérapeutiques et chimiopréventifs. Ainsi, chez l'humain, les rétinoïdes sont utilisés pour traiter des lésions épithéliales précancéreuses, des dysplasies cervicales, certaines leucémies et certains cancers du sein. De plus ils exercent un effet protecteur contre le cancer du poumon, du foie et du sein (Bushue et Wan, 2010; Clarke *et al.*, 2004; Decensi *et al.*, 2000; di Masi *et al.*, 2015; Paroni *et al.*, 2012; Puntoni et Decensi, 2009).

Un exemple type de cancers caractérisés par des anomalies de la signalisation de l'AR sont les leucémies promyélocytaires aigües (LPA). Ces leucémies sont caractérisées par des translocations chromosomiques engendrant des protéines de fusion telles que PML-RARα and PLZF-RARα (Z. Chen *et al.*, 1996b). Celles-ci, *via* le recrutement aberrant de corépresseurs, empêchent l'expression des gènes cibles de l'AR et bloquent ainsi la différenciation des promyélocytes (Altucci et Gronemeyer,

2001). Dans ce cas, l'utilisation de doses pharmacologiques d'AR permet de restaurer la différenciation (J. W. Zhang *et al.*, 2000).

5.6. Méthodes pour l'analyse de l'état de phosphorylation des RAR

L'analyse des phosphorylation des RAR a débuté il y a environ une vingtaine d'années. Initialement, les méthodes utilisées pour l'identification des sites de phosphorylation *in vivo* requéraient le traçage des phosphorylations par l'introduction d'ATP marqué au ^{32}P radioactif dans les cellules (Adam-Stitah *et al.*, 1999; H. Y. Lee *et al.*, 2000; Rochette-Egly *et al.*, 1997; Rochette-Egly *et al.*, 1995). Après immunoprécipitation des récepteurs, ceux-ci étaient digérés à la trypsine et les phosphopeptides tryptiques radioactifs obtenus pouvaient être fractionnés par diverses méthodes, notamment sur plaques de cellulose deux-dimensions. Cette cartographie deux-dimensions permettait la localisation des phosphopeptides radioactifs par autoradiographie, lesquels pouvaient être récupérés, purifiés, et séquencés par dégradation d'Edman afin d'en déduire la localisation des sites de phosphorylation.

Ces techniques, bien qu'ayant permis l'identification de plusieurs sites de phosphorylation, avaient néanmoins plusieurs limitations (Adam-Stitah *et al.*, 1999; H. Y. Lee *et al.*, 2000; Rochette-Egly *et al.*, 1997; Rochette-Egly *et al.*, 1995). En plus d'être laborieuses et de nécessiter l'utilisation de radioactivité, leur sensibilité était relativement faible (Patterson et Aebersold, 2003). Dans le cas des RAR, peu abondants, elles requéraient une grande quantité de récepteurs recombinants.

Par la suite, le développement d'anticorps reconnaissant spécifiquement certaines formes phosphorylées ont rendue possible l'analyse des phosphorylation des RAR endogènes en réponse à leur ligand (Bruck *et al.*, 2009). Malgré un net avantage en termes de rapidité et de sensibilité, leur utilisation impliquait néanmoins la connaissance préalable de l'existence des sites de phosphorylation étudiés.

Avec les années, la spectrométrie de masse (MS) s'est progressivement imposée pour l'identification des sites de phosphorylation en raison de sa sensibilité et de sa fiabilité. La MS est une méthode destructive donnant accès à des informations qualitatives et quantitatives sur les molécules d'un échantillon. Elle mesure les rapports masse-sur-charge (m/z) de molécules ionisées et permet ainsi d'en déduire leur masse moléculaire. L'apparition de sources d'ionisation douces comme l'ionisation par électronébuliseur (ESI, *Electrospray Ionization*), particulièrement adaptées à l'analyse de molécules de masse moléculaire élevée comme les peptides, a contribué à en faire une méthode de choix. (Resing et Ahn, 1997; Rogers et Foster, 2009; Sickmann et Meyer, 2001). Ainsi, l'analyse d'un digestat protéique permet d'en établir la composition; en effet, outre la détermination de leur masse, la fragmentation des peptides suivie de l'analyse des sous-produits engendrés permet

de reconstituer la séquence des différents peptides s'y trouvant. L'ajout d'un groupement phosphate sur un peptide étant associé à un écart de masse précis et caractéristique par rapport à la masse théorique du peptide, cela permet de détecter la présence et le nombre de phosphorylations présentes sur un peptide. L'analyse du profil de fragmentation permet quant à elle de les attribuer à un acide aminé en particulier.

Malgré cela, pendant plusieurs années, l'identification de sites de phosphorylation avec les techniques de MS disponibles requérait une grande quantité de protéine purifiée et ne permettait généralement d'identifier qu'un nombre de sites très restreints. De ce fait, les études à l'échelle du protéome demeuraient impossibles (Rogers et Foster, 2009).

De récents développements technologiques ont néanmoins permis l'émergence d'appareillages MS de dernière génération de type Orbitrap qui allient hautes résolution, sensibilité et précision de masse. Ceux-ci sont mieux adaptés à la fois à l'identification de modifications post-traductionnelles et à l'analyse de mélanges complexes. Cela ouvre ainsi la porte, d'une part, à la découverte de nouveaux sites de phosphorylation dont la détection se heurtait au manque de sensibilité des méthodes préexistantes et, d'autre part, à l'analyse des phosphorylations à l'échelle protéomique. Malgré cela, en raison de leur faible abondance et faible stœchiométrie, ou de leur grande hétérogénéité dans le cas des études phosphoprotéomiques, l'enrichissement des phosphopeptides est une étape cruciale pour l'optimisation de leur détection. L'une des méthodes d'enrichissement les plus utilisées est l'IMAC (*immobilized metal affinity chromatography*). Cette technique est basée sur l'utilisation d'ions métalliques, généralement Fe^{3+}, Ga^{3+} ou autres (ex: Zr^{4+}), liés à un groupe chélateur (H. Y. Wu et Liao, 2008). Ainsi, en raison de l'affinité des groupes phosphate pour ces ions métalliques (Figure 28), les peptides phosphorylés peuvent être isolés de l'ensemble des peptides non-phosphorylés (Andersson et Porath, 1986; Posewitz et Tempst, 1999).

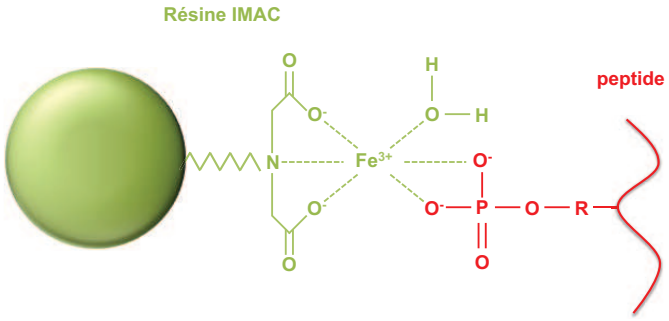


Figure 28: Enrichissement des phosphopeptides par la méthode IMAC.

La résine IMAC (en vert) chargée en ions métalliques chargés positivement (ici Fe^{3+}) lie avec haute affinité les groupes phosphate chargés négativement des peptides phosphorylés (en rouge). Adapté de Rogers et Foster (2009).

CHAPITRE 6: RÉGULATION DE LA TRANSCRIPTION PAR LE SYSTÈME UBIQUITINE-PROTÉASOME

Les chapitres précédents ont mis l'emphase sur les évènements précédant l'initiation de la transcription et sur leur régulation. Cependant, la transcription est également régulée en fin de signal par l'arrêt de l'activité de la polymérase et d'autres protéines (Tansey, 2001). L'un des moyens utilisés par la cellule pour mettre fin à l'activité des protéines est leur dégradation.

6.1. Dégradation des protéines: généralités

La dégradation des protéines est une fonction nécessaire à plusieurs égards. Elle assure l'homéostasie lorsque les structures cellulaires doivent être continuellement remodelées, en particulier durant le développement ou en réponse à des stimuli extérieurs. De plus, les protéines incorrectement repliées à cause de mutations ou de stress (thermique, oxydatif, ...) doivent être éliminées pour empêcher leur agrégation. En plus de ces fonctions "d'entretien", la dégradation est un moyen efficace pour interrompre la fonction de protéines régulatrices à des moments précis, comme les cyclines, les composants des voies de signalisation et les facteurs de transcription (Baumeister *et al.*, 1998; Coux *et al.*, 1996; Hilt et Wolf, 1996).

Pour des raisons évidentes, la dégradation des protéines doit s'opérer sous un contrôle temporel et spatial strict afin d'empêcher la destruction de protéines qui ne sont pas destinées à la dégradation. Pour cette raison, le processus de dégradation est soumis à une compartimentation de son activité, c'est-à-dire à un confinement du site détenant une activité protéolytique, afin que seules les protéines porteuses d'un signal de dégradation puissent y accéder (Baumeister *et al.*, 1998). L'un des compartiments protéolytiques des eucaryotes est le lysosome, un organite délimité par une membrane, vers lesquels les protéines à dégrader sont importées *via* des mécanismes spécifiques. Cependant, les lysosomes ne sont responsables que de la dégradation de certains types particuliers de protéines (protéines membranaires ou étrangères (provenant de bactérie, virus)) (Sorokin *et al.*, 2009). En effet, la vaste majorité des protéines (80-90%) sont dégradées par un autre système auto-compartimenté: le système-ubiquitine-protéasome (Zwickl *et al.*, 1999).

6.2. Le système ubiquitine-protéasome

Le système ubiquitine-protéasome est un système protéolytique cytosolique et nucléaire très conservé et présent dans toutes les cellules eucaryotes. Ce système comporte deux composantes principales: un système de conjugaison de l'ubiquitine sur des substrats protéiques spécifiques, et un système protéolytique associé, le protéasome.

6.2.1. L'ubiquitine

Le protéasome est capable de dégrader n'importe quelles protéines de la cellule et il s'acquitte de cette fonction avec une grande spécificité. Il peut même extraire et dégrader spécifiquement une sous-unité d'un complexe tout en laissant le reste du complexe intact (Hochstrasser et Varshavsky, 1990; E. S. Johnson *et al.*, 1990; Verma *et al.*, 2001). Une telle spécificité est notamment rendue possible par l'utilisation d'un système d'étiquetage: l'ubiquitination (Komander et Rape, 2012).

L'ubiquitination (ou ubiquitylation) est une modification post-traductionnelle caractérisée par la fixation covalente d'une ou de plusieurs ubiquitine(s) sur un résidu accepteur d'une protéine. L'ubiquitine est une protéine très conservée d'environ 8,5 kDa comptant 76 acides aminés (Figure 29). Ses attributs les plus importants sont son résidu glycine de l'extrémité C-terminale, qui permet son attachement à un substrat, de même que le résidu méthionine N-terminal et les sept lysines de la protéine, qui représentent les sites d'attachement pour la formation de chaines de

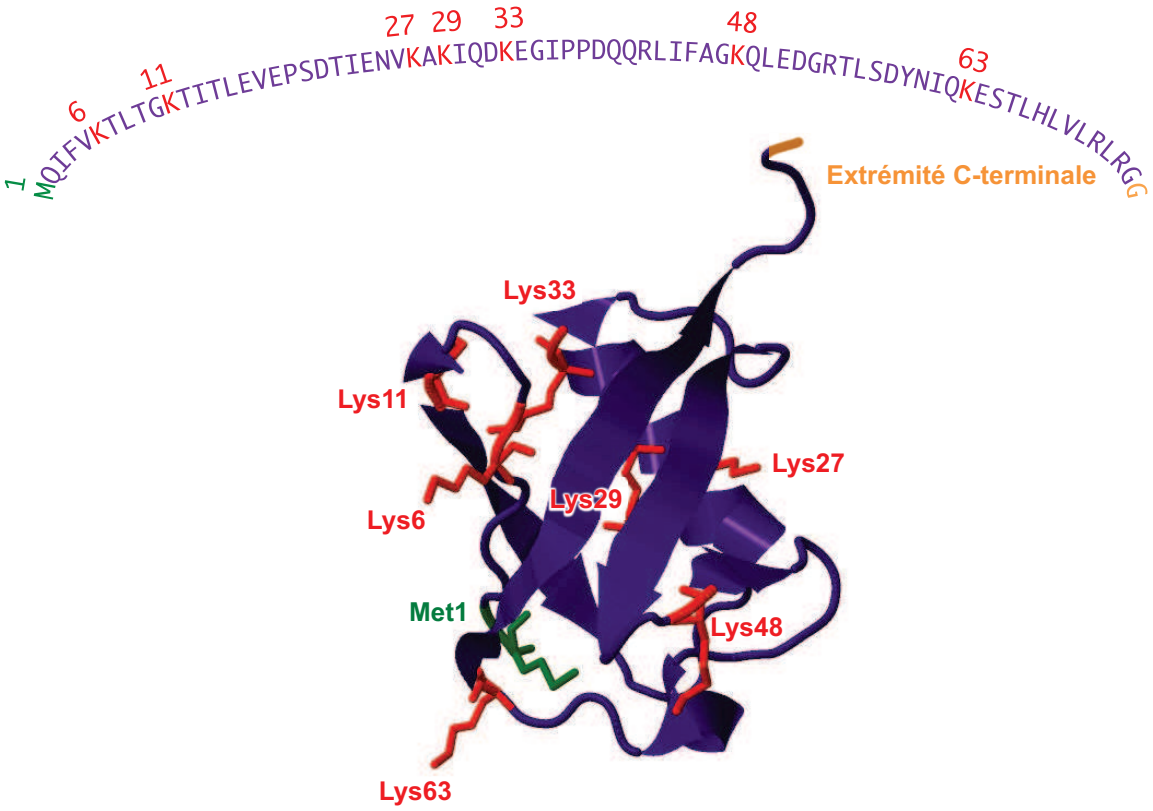


Figure 29: Structure de l'ubiquitine.

Séquence et structure de l'ubiquitine montrant les sept résidus lysine (en rouge) et le résidu méthionine (en vert) permettant l'ancrage d'autres ubiquitines. La glycine de l'extrémité C-terminale (en orange) permet l'attachement de l'ubiquitine au substrat (PDB1UBQ).

polyubiquitines définissant le code d'ubiquitine (voir Section 6.2.1.2).

6.2.1.1. Le processus d'ubiquitination

L'ubiquitination est réalisée par une cascade de réactions catalysées par trois types d'enzymes: E1, E2, et E3 (Figure 30). Dans un premier temps, une enzyme activatrice de l'ubiquitine (E1) active l'ubiquitine à l'aide d'ATP en formant un lien thioester à haut potentiel énergétique. L'ubiquitine est ensuite transférée à une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2). Finalement, avec la coopération d'une E3 ubiquitine-ligase, un lien covalent est formé entre le résidu glycine de l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine et le groupement amine ε d'une lysine d'une protéine substrat (Perrett *et al.*, 2011). Le processus peut s'arrêter après l'ajout d'une seule ubiquitine (monoubiquitination) ou se répéter plusieurs fois et ainsi former une chaine d'ubiquitines (polyubiquitination). Une nouvelle classe d'enzyme, les E4, semble parfois être impliquée dans l'élongation des chaines d'ubiquitine en collaboration avec les E1, E2 et E3 (Hoppe, 2005; Koegl *et al.*, 1999; Micel *et al.*, 2013). Leur mécanisme d'action demeure cependant à élucider.

Seules deux enzymes E1 sont connues: UBA1 et UBA6 (*ubiquitin-like modifier activating enzymes*) (P. C. Lee *et al.*, 2013b). Les enzymes E2 sont plus nombreuses avec trente-cinq membres répertoriés chez l'humain (van Wijk et Timmers, 2010). C'est cependant le groupe des E3 qui compte le plus de membres (>600 chez l'humain) (Berndsen et Wolberger, 2014). Celles-ci sont très diverses, à l'image des substrats dont elles assurent la reconnaissance spécifique. La plupart d'entre elles appartiennent à deux familles majeures: celles à domaine RING comprenant les sous-groupes CRL (*Cullin-RING E3 ubiquitin ligases*) et APC/C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*), et celles à domaine HECT (*homologous to E6–AP carboxyl terminus*) comprenant les trois sous-familles *Nedd4/Nedd4-like E3* à domaine WW, HERC (*HECT and RCC1-like domain*) à domaine RLD (*RCC1-Like Domains*), et les autres HECT sans domaine WW ni RLD (Deshaies et Joazeiro, 2009; Scheffner et Kumar, 2014). Une autre famille, les U-Box, possède un motif similaire au RING et est par conséquent souvent considérée comme faisant partie de la famille RING (Ardley et Robinson, 2005). Ces familles se distinguent à la fois par leur séquence, leur structure et leurs propriétés catalytiques (Huibregtse *et al.*, 1995; Lorick *et al.*, 1999). En effet, les membres de la famille HECT ubiquitinent le substrat en deux temps: l'ubiquitine est d'abord transférée de la E2 à un site actif de la E3, puis l'ubiquitine est transférée de la E3 au substrat (Figure 30) (Berndsen et Wolberger, 2014). Cependant, dans le cas des E3 RING, les plus nombreuses, une association fonctionnelle entre E2 et E3 est nécessaire puisqu'elles sont dépourvues d'activité enzymatique. Dans ce cas, la E3 lie à la fois la E2 et le substrat et permet le transfert direct de l'ubiquitine de la E2 au substrat en jouant un rôle

d'échafaudage (Perrett *et al.*, 2011). Finalement, les E3 RING et les E3 HECT peuvent agir seules ou sous formes de complexes comme ceux de type SCF (*Skp-cullin-F box*) (Ardley et Robinson, 2005).

Une E2 peut coopérer avec différentes E3 et *vice-versa* (Polge *et al.*, 2015). De façon intéressante, c'est l'enzyme E2 qui détermine le caractère mono ou poly de l'ubiquitination, de même que le type de chaines d'ubiquitines qui sera construite; ainsi, c'est donc elle qui fixe le devenir du substrat conformément au code d'ubiquitine (Polge *et al.*, 2015). De plus, la nature des complexes E2-E3 définit de par leur structure leur positionnement sur le substrat et ainsi le choix du résidu à ubiquitiner (David *et al.*, 2010; Napolitano *et al.*, 2011; van Wijk et Timmers, 2010). Ainsi, la combinaison E2-E3 permet un processus d'ubiquitination hautement spécifique en définissant la

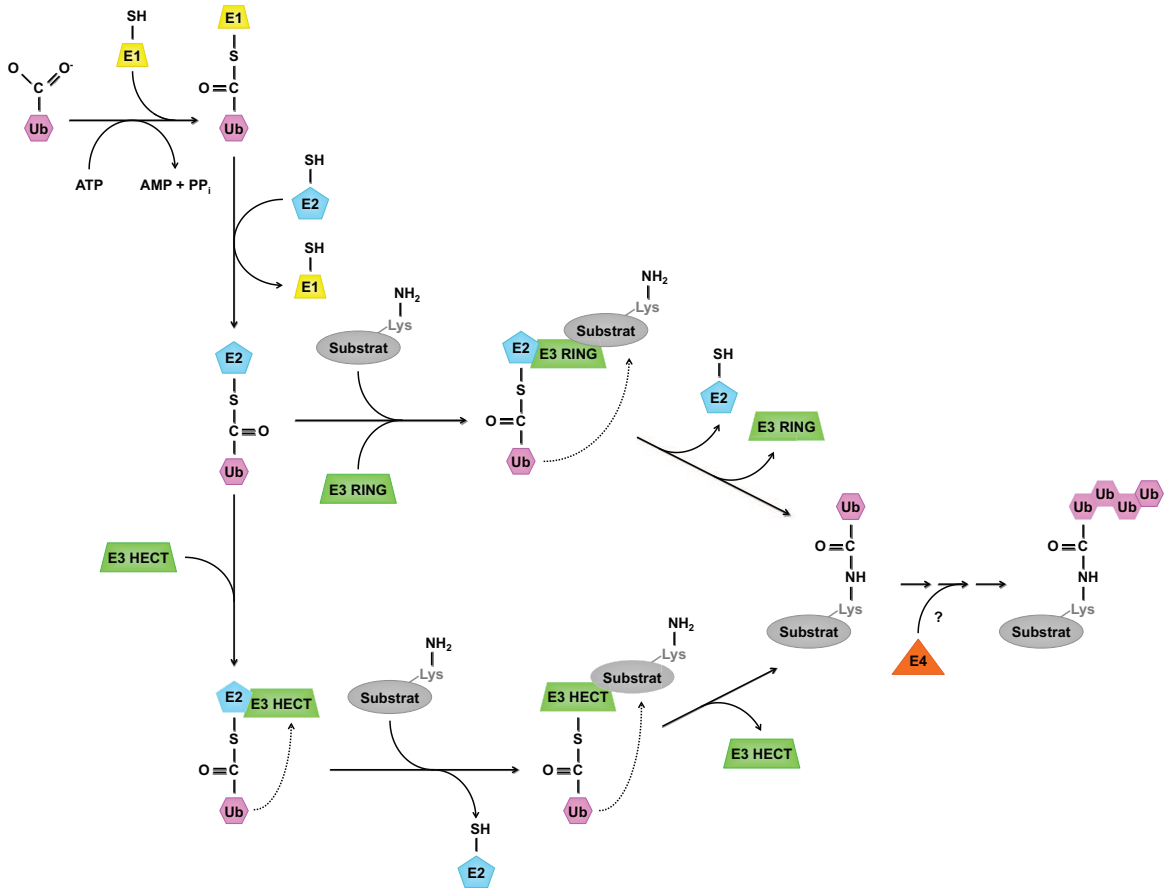


Figure 30: Mécanisme d'ubiquitination des protéines.

L'enzyme activatrice de l'ubiquitine (E1) réagit avec l'ubiquitine (Ub) en formant un lien thioester selon un processus ATP-dépendant. L'ubiquitine est ensuite transférée à une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2) *via* la formation d'un autre lien thioester. L'ubiquitine du complexe E2-Ub peut ensuite soit être transférée directement de la E2 au substrat lorsque celui-ci complexé avec une E3 ligase de type RING, soit être transférée de la E2 à une E3 ligase de type HECT qui dans un deuxième temps transfère l'ubiquitine au substrat. Éventuellement, la répétition du processus mène à l'élongation des chaines d'ubiquitine *via* la possible implication d'une E4 par un mécanisme non élucidé. Modifié de Demasi et Laurindo (2012).

protéine et le résidu à ubiquitiner, ainsi que le type d'ubiquitination.

6.2.1.2. Le code d'ubiquitine

L'ubiquitination peut se dérouler selon plusieurs scénarios possibles. Ceux-ci, selon les fonctions auxquels ils sont associés, signalent ainsi le devenir du substrat (Figure 31). De ce fait, l'ubiquitination joue le rôle d'un code permettant le stockage et le transfert d'information.

L'ajout d'une seule molécule d'ubiquitine à un substrat correspond à une monoubiquitination. Il peut également y avoir multi-monoubiquitination lorsque plusieurs résidus d'un substrat sont monoubiquitinés. Les monoubiquitinations sont généralement associées à des rôles non-protéolytiques et régulent plutôt des processus tels que les interactions protéine-protéine, le remodelage de la chromatine, la transcription, la localisation et l'endocytose (Gregory *et al.*, 2003; Hicke et Dunn, 2003; Hoege *et al.*, 2002; Muratani et Tansey, 2003).

Une ubiquitine peut subir elle-même l'ajout d'une autre ubiquitine, soit à son extrémité N-terminale (résidu Met1), soit sur l'un de ses sept résidus lysine (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 et Lys63) (Figure 29), ce qui donne lieu à la formation de chaines polymériques d'ubiquitines de longueur variable et pouvant contenir plus de dix ubiquitines (Komander et Rape, 2012). Ces chaines sont dites homogènes si le même résidu est modifié tout au long de l'élongation, ou hétérogènes si les sites d'ancrage utilisés par les différentes ubiquitines sont variables. Tous les types de liens possibles ont été détectés dans les cellules (J. Peng *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2009). Cependant, pour les chaines liées *via* Lys6, Lys27, Lys29, ou Lys33, peu de substrats existent et leur rôle demeure mal compris (Komander et Rape, 2012). Les chaines homogènes d'au moins quatre ubiquitines liées *via* Lys48, ou parfois *via* Lys11, sont généralement associées à la dégradation par le protéasome (Polge *et al.*, 2015; Thrower *et al.*, 2000). Les chaines liées *via* Met1 (également appelées linéaires) ou Lys63 sont quant à elles plutôt associées à un rôle dans la signalisation (activation de kinases, réponse au stress, réparation de l'ADN) et l'échafaudage (assemblage de complexes) (Perrett *et al.*, 2011; C. J. Wu *et al.*, 2006). La différence de rôle entre les différents types de chaines d'ubiquitine pourrait être en partie attribuable aux différentes conformations qu'elles adoptent. En effet, les chaines liées *via* Lys6, Lys11, Lys27, ou Lys48 adoptent une conformation fermée, alors que les chaines liées *via* Lys29, Lys33, Lys63, ou Met1 adoptent une configuration étendue (Fushman et Walker, 2010). Finalement, la longueur de la chaine est également un paramètre important. Par exemple, une longueur minimale peut être nécessaire à la reconnaissance de la chaine lorsque celle-ci se fait *via* des sites de liaison multiples.

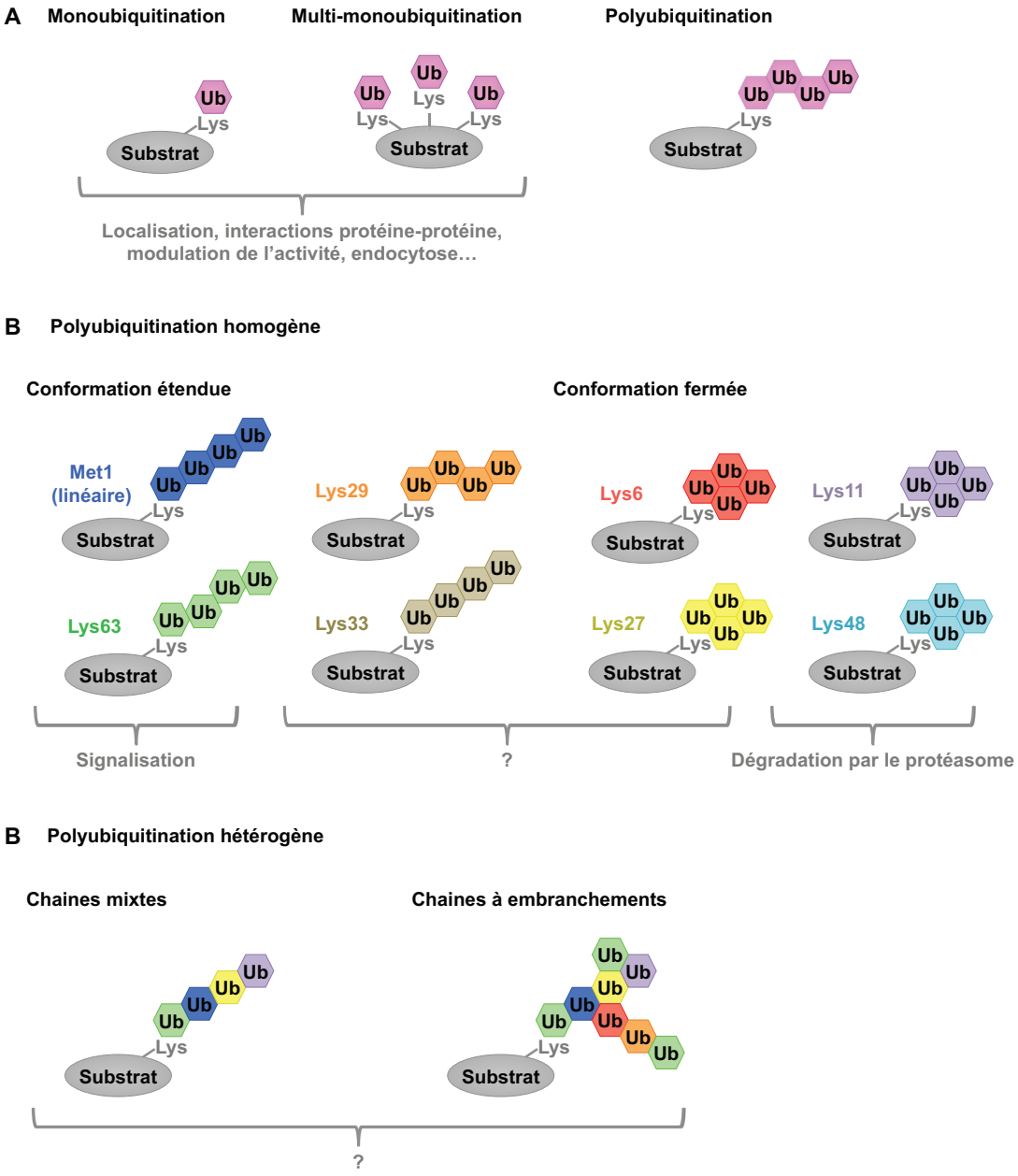


Figure 31: Le code d'ubiquitine.

Illustration des différentes formes d'ubiquitination et de leurs fonctions associées.

A) Les trois types généraux d'ubiquitination: la monoubiquitination, la multi-mono-ubiquitination et la polyubiquitination.

B) Les différentes formes de polyubiquitination homogène, dont les chaines ne sont composées que d'un seul type de lien. En fonction du type de lien, les chaines de polyubiquitine adoptent une conformation étendue (Met1, Lys29, Lys33, Lys63) ou fermée (Lys6, Lys11, Lys27, Lys48).

C) La polyubiquitination hétérogène peut prendre la forme de chaines composées de plusieurs types de liens. Il peut également y avoir présence d'embranchements (attachement de plusieurs ubiquitines sur une même ubiquitine *via* des types de liens différents).

Modifié de Komander (2009).

Finalement, la présence d'embranchements (attachement de plusieurs ubiquitines sur une même ubiquitine) est également possible. L'ubiquitine peut même être combinée à d'autres modifications similaires de type "*ubiquitine-like modifiers*" (ULM) (Ciechanover et Stanhill, 2014; Kravtsova-Ivantsiv et Ciechanover, 2012; Ravid et Hochstrasser, 2008). Les ULM, qui incluent NEDD8 (*Neuronal-precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 8*), SUMO (*Small ubiquitin-like modifier*) et Ufm1 (*Ubiquitin-fold modifier 1*), ont indépendamment de leur séquence une structure très similaire à l'ubiquitine avec une glycine C-terminale *via* laquelle ils peuvent être attachés à un substrat (Figure 32) (Ha et Kim, 2008). Cependant, la fonction de telles configurations reste à déterminer (Komander et Rape, 2012).

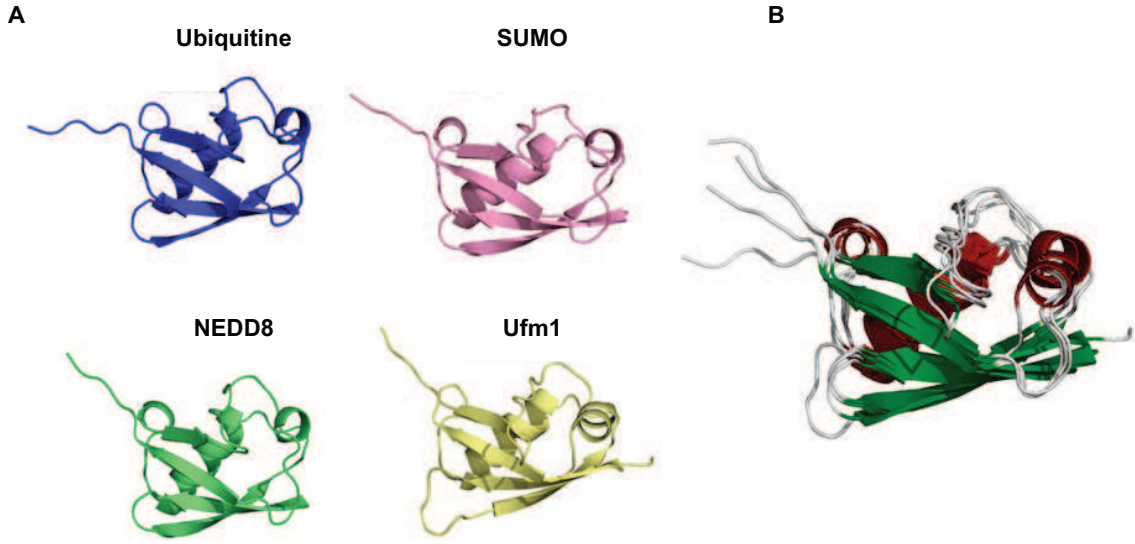


Figure 32: Les modifications similaires à l'ubiquitine.

A) Représentation sous forme de rubans de la structure de l'ubiquitine et des ULM SUMO, NEDD8 et Ufm1 montrant leur structure secondaire commune de type ββαααββαβ et leur structure tertiaire en "β-*grasp*".

B) Superposition des structures présentées en "A". Les feuillets β sont représentés en vert et les hélices α en rouge.

D'après Ha et Kim (2008).

6.2.1.3. Régulation de l'ubiquitination par la phosphorylation

La phosphorylation peut jouer un rôle critique dans la régulation du processus d'ubiquitination d'une protéine. En effet, la phosphorylation d'une protéine est parfois requise pour

sa reconnaissance par la E3 ligase (Carrano *et al.*, 1999; Ganoth *et al.*, 2001). De plus, la phosphorylation de la E3 ligase peut être nécessaire à son activité. L'ubiquitination du récepteur des androgènes est un bon exemple de processus phosphorylation-dépendant. En effet, la phosphorylation du récepteur par AKT est nécessaire à sa reconnaissance par l'E3 ligase Mdm2 (*mouse double minute 2*). Parallèlement, la phosphorylation de Mdm2 par AKT est nécessaire à son activité E3 ligase. La combinaison de ces deux évènements est requise pour l'ubiquitination et la dégradation du récepteur (H. K. Lin *et al.*, 2002). Cependant, la phosphorylation ne favorise pas toujours l'ubiquitination (Fujimoto *et al.*, 2010; Rajbhandari *et al.*, 2014). Elle peut parfois permettre le recrutement de certaines protéines au détriment des E3 ligases. Par exemple, la phosphorylation de PPARγ au niveau d'une sérine de sa région AF-1 permet le recrutement de la protéine Pin1, qui reconnait le motif phosphorylé ainsi formé et s'y fixe *via* son domaine WW. Ce faisant, Pin1 entre en compétition avec les E3 ligases à motif WW, ce qui bloque la polyubiquitination de PPARγ et ralentit son *turnover* (Fujimoto *et al.*, 2010).

6.2.1.4. La déubiquitination

L'ubiquitination constitue un processus dynamique et réversible. En effet, des protéases spécifiques, les déubiquitinases (DUB, *deubiquitinating enzyme*), peuvent cliver l'ubiquitine d'un substrat. La centaine de DUBs recensées chez l'humain jouent un rôle dans de nombreux processus cellulaires (remodelage de la chromatine *via* la déubiquitination d'histones, la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, ...). De plus, elles permettent la régulation de la dégradation par le protéasome (voir Section 6.2.2.2) et le maintien du *pool* d'ubiquitine libres de la cellule en permettant leur recyclage (Reyes-Turcu *et al.*, 2009).

6.2.2. Le protéasome 26S

Le protéasome peut exister sous de multiples formes, mais chez les mammifères, la forme 26S (le "S" se référant au coefficient de sédimentation de Svedberg) est prédominante. Le protéasome 26S est une énorme protéase de plus de 2,5 mégadaltons et constituée de plus de soixante protéines associées de façon ordonnée (Figure 33). Il est constitué d'une partie centrale cylindrique, le cœur catalytique 20S (ou CP, *core particle*), coiffée d'une ou deux particules régulatrices RP (*regulatory particle*) 19S. Théoriquement, le protéasome 26S et le protéasome 30S correspondent à un cœur catalytique 20S associé à une ou deux particules 19S respectivement; cependant, l'appellation "protéasome 26S" est généralement acceptée et utilisée pour ces deux espèces (Day *et al.*, 2013).

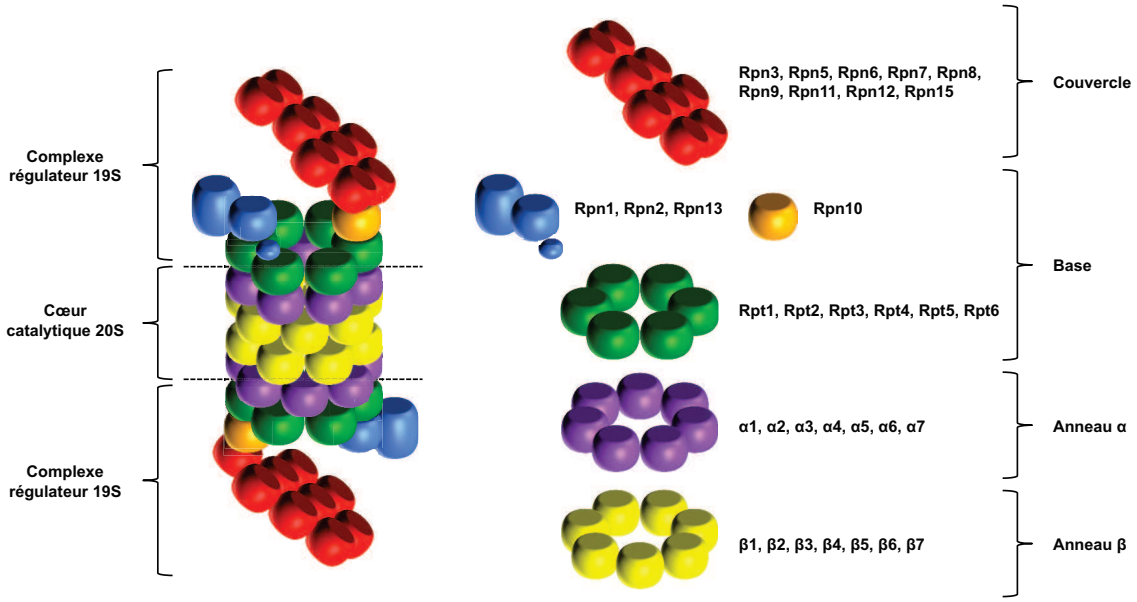


Figure 33: Structure du protéasome 26S.

Le protéasome 26S est composé d'un cœur catalytique 20S et de deux complexes régulateurs 19S. Le cœur catalytique 20S comprend deux anneaux β centraux bordés de deux anneaux α composés de sept sous-unités chacun. Chaque complexe régulateur 19S comprend une base, incluant un anneau de six sous-unités à activité ATP-ase (Rpt1-6), et un couvercle dépourvu d'activité ATP-ase. La sous-unité RPN10 est localisée à l'interface entre la base et le couvercle. Adapté de Murata *et al.* (2009).

6.2.2.1. Le cœur catalytique 20S

Le cœur catalytique 20S constitue l'unité protéolytique du protéasome 26S. Il est composé de 28 sous-unités réparties en quatre anneaux heptamériques superposés de façon à former un cylindre allongé creux (Figure 33, Figure 34) (Bochtler *et al.*, 1999). Son organisation générale, très conservée au cours de l'évolution, comprend deux anneaux centraux identiques constitués de sept sous-unités β et deux anneaux extérieurs identiques constitués de sept sous-unités α (Heinemeyer *et al.*, 1994; Lowe *et al.*, 1995). Chez les archaebactéries, les sept sous-unités α et β sont toutes identiques (conformation $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$), alors qu'elles sont différentes chez l'humain (conformation $\alpha_{1\text{-}7}\beta_{1\text{-}7}\beta_{1\text{-}7}\alpha_{1\text{-}7}$) (Tableau 4) (Heinemeyer *et al.*, 1994).

Des analyses structurales ont montré que le cylindre 20S renferme trois cavités continues: deux cavités distales formées conjointement par un anneau α et un anneau β, puis une cavité centrale formée par les deux anneaux β (Groll *et al.*, 1997). C'est cette cavité centrale qui abrite les sites actifs responsables de l'hydrolyse des liaisons peptidiques du substrat. Ainsi, les anneaux α contrôlent l'accès à la chambre catalytique formée par les deux anneaux β.

Sous-unité	Activité catalytique	Noms (levure)	Noms (humain)
α1	-	Scl1/Prc2/Prs2/C7	PSMA6/Pros27/Iota
α2	-	Pre8/Prs4/Y7	PSMA2/C3/Lmpc3
α3	-	Pre9/Prs5/Y13	PSMA4/C9
α4	-	Pre6	PSMA7/C7/XAPC7
α5	-	Pup2/Doa5	PSMA5/Zeta
α6	-	Pre5	PSMA1/C2/Pros30
α7	-	Pre10/Prc1/Prs1/C1	PSMA3/C8
β1	type caspase	Pre3	PSMB6/Y/delta/LMPY/LMP1
β2	type trypsine	Pup1	PSMB7/Z/Mmc14
β3	-	Pup3	PSMB3/C10
β4	-	Pre1/C11	PSMB2/C7
β5	type chymotrypsine	Pre2/Doa3/ Prg1	PSMB5/X/MB1
β6	-	Pre7/Prs3/ Pts1/C5	PSMB1/C5
β7	?	Pre4	PSMB4/N3/beta/LMP3

Tableau 4: Sous-unités du cœur catalytique 20S.

D'après Sorokin *et al.* (2009).

Chez les eucaryotes, seules trois sous-unités β sont responsables de l'activité catalytique: β1, β2 et β5, soit six sites par cœur catalytique 20S (P. Chen et Hochstrasser, 1996; Groll *et al.*, 1997; Heinemeyer *et al.*, 1997). Les quatre autres sous-unités β, à l'instar des sous-unités α, sont catalytiquement inactives, bien que l'existence d'une activité catalytique ait été proposée pour β7 chez les mammifères (Unno *et al.*, 2002). Les sous-unités β1, β2 et β5 utilisent le groupement hydroxyl de leur résidu thréonine N-terminal comme nucléophile pour exercer des activités catalytiques distinctes. Ainsi, β1 exerce une activité de type caspase (clivage après des résidus acides), β2 de type trypsine (clivage après des résidus basiques), et β5 de type chymotrypsine (clivage après des résidus hydrophobes) (Kisselev *et al.*, 2006). La combinaison de ces activités protéolytiques concentrées au sein de la chambre catalytique assure une grande efficacité de protéolyse.

Lorsque le cœur catalytique 20S n'est pas coiffé de complexes régulateurs, l'entrée de la cavité interne du cylindre est obstruée par les extrémités N-terminales des sous-unités α (Figure 34 B et C) (Finley, 2009; Groll *et al.*, 1997). Le passage de l'état fermé à l'état ouvert correspond à l'activation du protéasome et dépend de la fixation d'un complexe activateur tel le complexe 19S (Groll *et al.*, 2000). Cependant, même ouvert, le canal demeure trop étroit pour (≈13 Å) pour permettre l'entrée de protéines intactes; par conséquent, les protéines doivent être préalablement dépliées et déubiquitinées, fonctions assurées par le complexe 19S (Bajorek et Glickman, 2004).

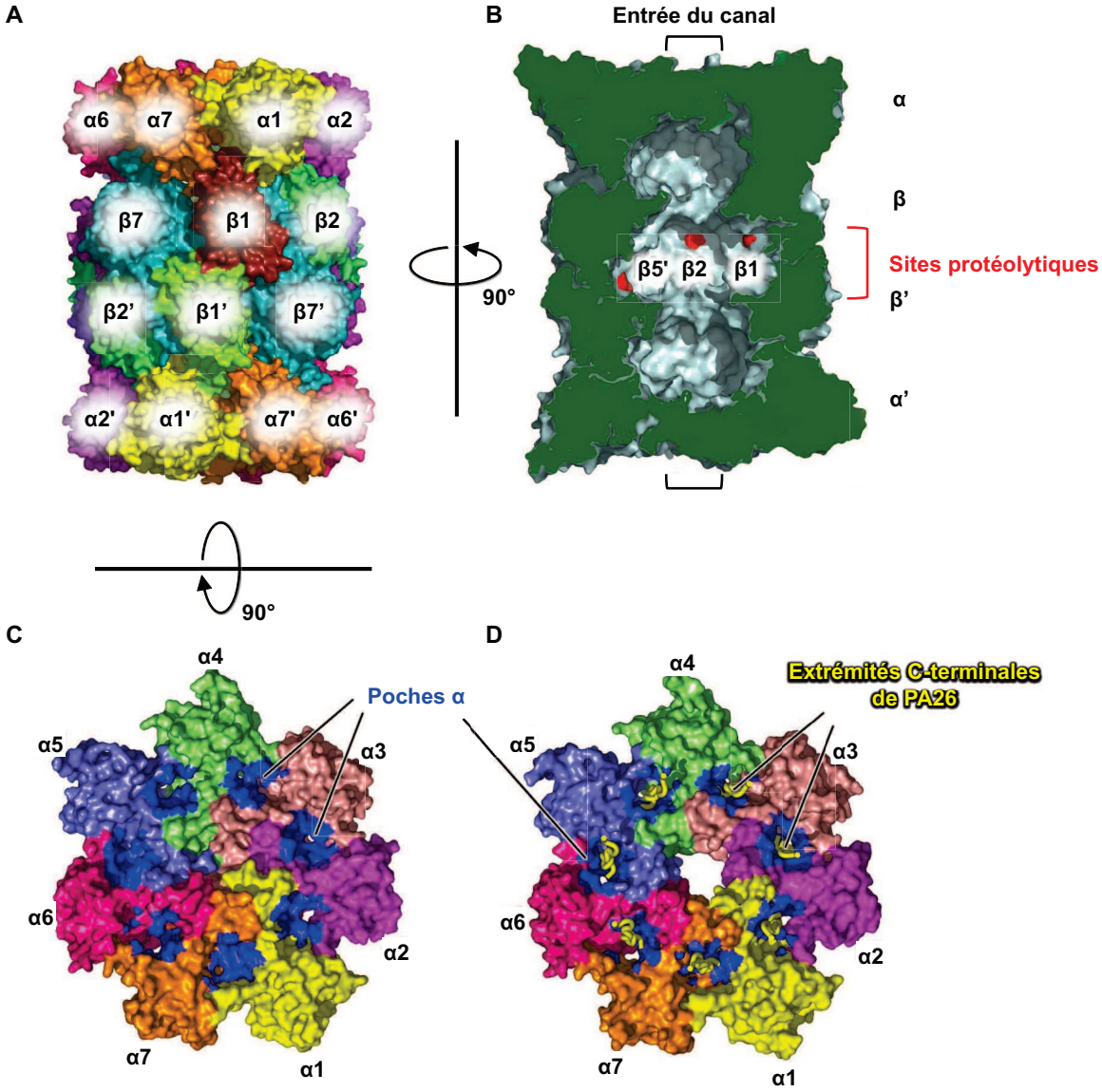


Figure 34: Structure du cœur catalytique 20S.

A) Vue latérale du cœur catalytique 20S montrant l'empilement cylindrique des anneaux heptamériques α et β.

B) Représentation en coupe du canal fermé. Le plan de coupe est indiqué en vert et les sites protéolytiques sont marqués en rouge. L'emplacement de l'entrée du canal, ici obstruée, est indiqué.

C) Anneau α du complexe 20S en absence de complexe activateur, vue de la face interagissant avec ce dernier, montrant la fermeture du canal. Les poches α qui accueillent les extrémités C-terminales du complexe activateur sont indiquées en bleu.

D) Surface de l'anneau α du complexe 20S et ouverture du canal après fixation du complexe activateur PA26, dont les extrémités C-terminales figurent en jaune.

D'après Finley (2009).

6.2.2.2. Le complexe régulateur 19S

Plusieurs complexes régulateurs existent chez les mammifères et peuvent s'assembler avec le complexe 20S: le complexe 11S (PA28), PA200, et 19S (PA700). Le complexe régulateur majeur et le mieux caractérisé demeure cependant le 19S (Stadtmueller et Hill, 2011). Le 19s est un complexe macromoléculaire dont l'organisation et la composition sont très conservés de la levure aux mammifères (Glickman et Ciechanover, 2002). Il comprend plusieurs sous-unités détaillées dans le Tableau 5. Ce complexe joue un rôle déterminant dans la dégradation des substrats en assurant trois rôles principaux: la reconnaissance, la déubiquitination et le dépliement des substrats. La reconnaissance des substrats peut être directe (par des sous-unités intrinsèques) ou indirecte (par l'intermédiaire de récepteurs) (Elsasser et Finley, 2005; Miller et Gordon, 2005). La déubiquitination, dans le cas des protéines ubiquitinées, s'appuie à la fois sur des sous-unités intrinsèques (PSMD14) et sur des DUB extrinsèques (Amerik et Hochstrasser, 2004; Guterman et Glickman, 2004a;

Sous-complexe	Activité	Nom (levure)	Nom (humain)	Autres noms
Base	AAA-ATPase	Rpt1	PSMC2	Cim5
	AAA-ATPase	Rpt2	PSMC1	
	AAA-ATPase	Rpt3	PSMC4	
	AAA-ATPase	Rpt4	PSMC6	Sug2
	AAA-ATPase	Rpt5	PSMC3	
	AAA-ATPase	Rpt6	PSMC5	Sug1, Cim3
	Échafaudage	Rpn1	PSMD2	
	Échafaudage	Rpn2	PSMD1	
	récepteur Ub	Rpn10	PSMD4	
	récepteur Ub	Rpn13	ADRM1	
Couvercle		Rpn3	PSMD3	
		Rpn5	PSMD12	
		Rpn6	PSMD11	
		Rpn7	PSMD6	
		Rpn8	PSMD7	Mov34
		Rpn9	PSMD13	
	DUB	Rpn11	PSMD14	Pad1, Poh1
		Rpn12	PSMD8	
		Rpn15	PSMD9	Sem1, Dss1

Tableau 5: Sous-unités du complexe régulateur 19S.

D'aprés Finley (2009).

Guterman et Glickman, 2004b). Finalement, le complexe 19S permet le dépliement des substrats et leur translocation vers le cœur catalytique 20S. Cette étape, peu comprise, nécessite néanmoins l'énergie générée par l'hydrolyse de l'ATP par les six sous-unités ATP-ases situées dans la base du complexe 19S (Sakata *et al.*, 2009; Striebel *et al.*, 2009).

Contrairement au complexe 20S, il n'existe pas de données cristallographiques quant à la structure du complexe 19S. Son organisation précise n'est donc pas déterminée de façon formelle, mais on sait néanmoins qu'elle comprend deux sous-complexes: la base, adjacente au complexe 20S, et le couvercle (Figure 33).

La base est constituée d'un anneau constitué de six ATPases (Rpt1-6 (Rpt: *regulatory particle triple A subunit*) ou PSMC1-6 chez l'humain) qui appartiennent à la famille des ATPases AAA^+ (*ATPases associated with diverse cellular activities*) et de trois sous-unités dépourvues d'activité ATPase (Rpn1, 2 et 13 (Rpn: *regulatory particle non-ATPase subunit*) (Glickman et Ciechanover, 2002; Sorokin *et al.*, 2009). L'anneau d'ATPases est en contact direct avec l'anneau α du complexe 20S et la queue C-terminale des Rpt, en particulier Rpt2 et Rpt5, participe directement à l'ouverture de l'anneau α et donc à l'activation du protéasome (D. M. Smith *et al.*, 2007). Les sous-unités Rpt sont aussi responsables du dépliement des protéines, lequel nécessite l'hydrolyse de l'ATP, et assurent sa translocation vers la cavité protéolytique (Benaroudj et Goldberg, 2000; Braun *et al.*, 1999).

Le couvercle contient au moins neuf sous-unités (Rpn 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 15) non ATPasiques (Finley, 2009). À l'exception de Rpn11, possédant une activité DUB, le rôle des sous-unités du couvercle n'est pas connu (Verma *et al.*, 2002; Yao et Cohen, 2002).

La sous-unité Rpn10 (PSMD4 chez l'humain) se situe à l'interface entre la base et le couvercle et en stabilise l'association (Glickman *et al.*, 1998). Avec Rpn13, elle peut lier l'ubiquitine, permettant la reconnaissance des substrats ubiquitinés (Fu *et al.*, 1998; Husnjak *et al.*, 2008). Rpn13 recrute également l'enzyme de déubiquitination UCH37; ainsi, la reconnaissance de l'ubiquitine et la déubiquitination du substrat sont fonctionnellement couplées au sein du protéasome.

6.2.2.3. Le processus de dégradation ubiquitine-dépendant

La dégradation par le protéasome fonctionne de manière processive (Figure 35). Ainsi, le substrat polyubiquitiné est reconnu par le complexe 19S *via* la structure quaternaire de la chaine de polyubiquitine. Le substrat est ensuite fixé par les sous-unités Rpn1 et Rpn2, permettant aux sous-unités ATPases du complexe 19S de le déplier. L'interaction de Rpt2 et Rpt5 avec l'anneau α provoque l'ouverture du canal, permettant ainsi l'entrée du substrat et sa translocation vers la chambre protéolytique du cœur 20S avec l'aide des sous-unités ATPases. En parallèle, la sous-unité

Rpn11 du complexe 19S ainsi que d'autres DUBs détachent les ubiquitines du substrat pour en permettre le recyclage. Les sous-unités à activité protéase β1, β2, et β5 procèdent à l'hydrolyse des liens peptidiques, relarguant des peptides de petite taille (3 à 25 résidus). Ceux-ci seront ensuite rapidement hydrolysés par des peptidases intracellulaires en acides aminés, qui seront réutilisés pour la synthèse de nouvelles protéines (Kisselev *et al.*, 1999; Nussbaum *et al.*, 1998).

6.2.2.4. Mécanismes non-classiques de dégradation par le protéasome

Selon le modèle classique, une polyubiquitination préalable du substrat impliquant généralement Lys48 est nécessaire à sa reconnaissance et sa dégradation par le protéasome. Or, un nombre croissant de données dressent un portrait beaucoup plus complexe des mécanismes entourant la reconnaissance du substrat et le déroulement de la dégradation (Ravid et Hochstrasser, 2008).

En effet, des études récentes ont montré que des types d'ubiquitinations atypiques peuvent dans certains cas être reconnus par le protéasome (pour revue, voir Kravtsova-Ivantsiv et Ciechanover (2012)). Par exemple, dans certains cas, des chaines de polyubiquitines qui ne sont généralement pas associées à la dégradation, telles celles attachées par Lys63 ou certaines chaines hétérogènes, peuvent être reconnues par le protéasome (Saeki *et al.*, 2009). Des études récentes ont même rapporté l'existence d'ubiquitinations effectuées via la fixation d'ubiquitines à des résidus thréonine, sérine ou cystéine du substrat et reconnues par le protéasome (McDowell *et al.*, 2010; Tait *et al.*, 2007; Vosper *et al.*, 2009). Finalement, certaines monoubiquitinations ou multi-monoubiquitinations peuvent également mener à une dégradation (Kravtsova-Ivantsiv et Ciechanover, 2012).

La dégradation peut également suivre un processus indépendant de l'ubiquitination (Orlowski et Wilk, 2003). La plupart des protéines dégradées sans ubiquitination préalable possèdent une région non structurée, soit intrinsèquement, soit parce qu'elles sont endommagées. La présence d'une région désordonnée faciliterait l'initiation de la dégradation avec ou sans ubiquitination (Inobe et Matouschek, 2014; Prakash *et al.*, 2004). Dans d'autres cas, la dégradation peut être ATP-indépendante ou ne requérir que le complexe 20S (X. Li *et al.*, 2007; Tofaris *et al.*, 2001). Finalement, certains cas de dégradation partielle permettant la génération de protéines tronquées dans un mécanisme co-traductionnel ont également été rapportés (L. Lin *et al.*, 1998) (Z. Zhang *et al.*, 2013).

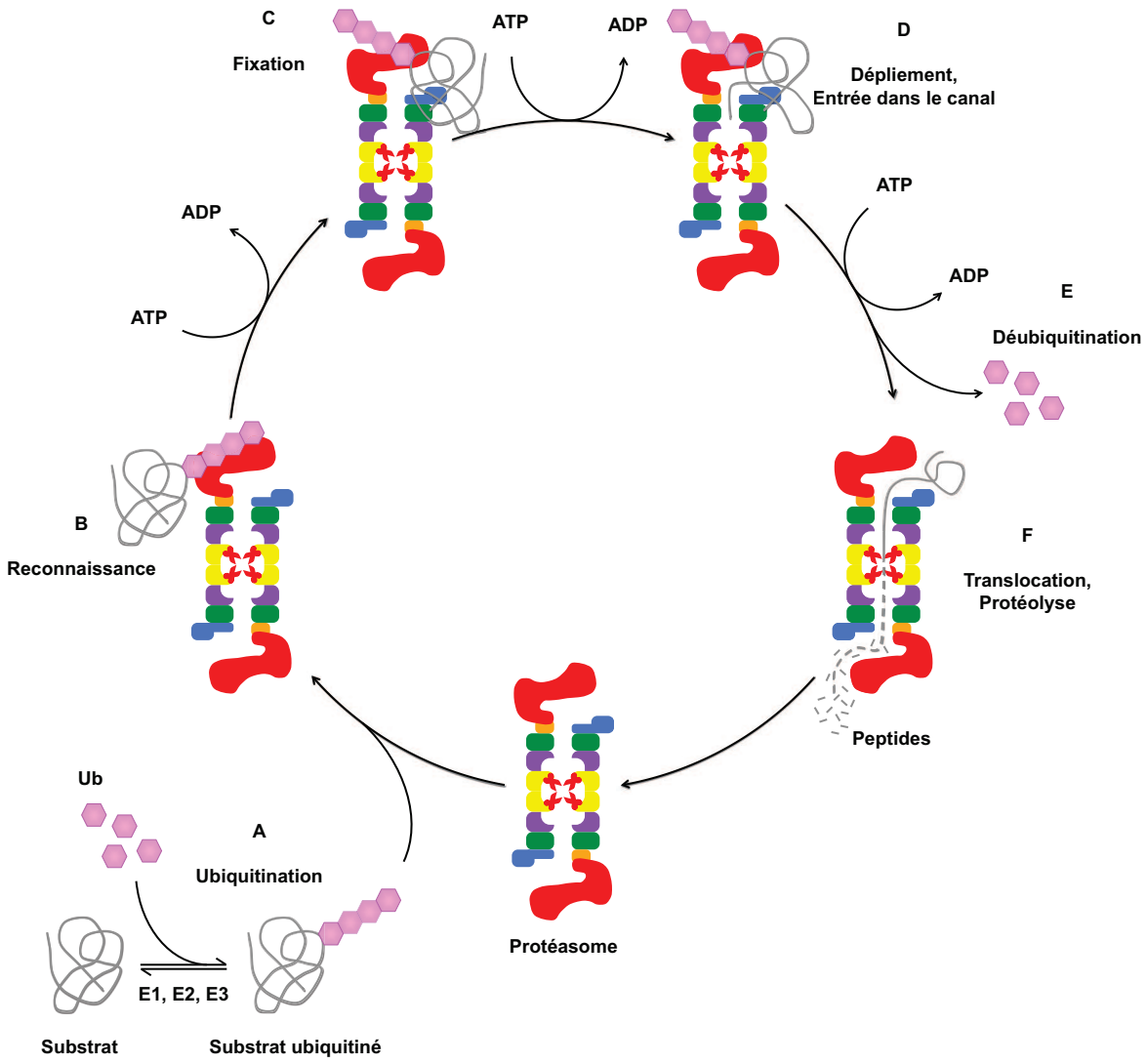


Figure 35: Processus de dégradation ubiquitination-dépendante par le protéasome.

A) Le substrat est polyubiquitiné *via* le processus d'ubiquitination impliquant les enzymes E1, E2, et E3 (Ub: ubiquitine).

B) Le complexe 19S reconnait la structure quaternaire de la chaine de polyubiquitines.

C) Le substrat est fixé *via* les sous-unités Rpn1 et Rpn2.

D) Les sous-unités ATPases du complexe 19S déplient le substrat. L'interaction de Rpt2 et Rpt5 avec l'anneau α provoque l'ouverture du canal, permettant ainsi l'entrée du substrat.

E) La sous-unité Rpn11 du complexe 19S ainsi que d'autres DUBs détachent les ubiquitines du substrat.

F) La chaine polypeptidique du substrat est transloquée dans la chambre protéolytique du cœur 20S avec l'aide des sous-unités ATPases du complexe 19S. Ainsi, les sous-unités à activité protéase β1, β2, et β5 procèdent à l'hydrolyse des liens peptidiques, relarguant des peptides de petite taille.

Adapté de Sorokin *et al.* (2009).

6.2.2.5. Phosphorylation et activité du protéasome

Le protéasome est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles (>100). Bien que le rôle de la plupart d'entre elles demeure obscur, certaines modifications ont un rôle avéré dans la modulation l'activité du protéasome (Sorokin *et al.*, 2009). Parmi celles-ci, plusieurs phosphorylations peuvent affecter l'assemblage, la localisation ou l'activité catalytique du protéasome (Konstantinova *et al.*, 2008). Par exemple, la phosphorylation *in vitro* des sous-unités α1, α2, α3, β2, β3, and β7 du complexe 20S par la PKA augmente l'activité de type caspase et chymotrypsine (Zong *et al.*, 2006). De plus, la phosphorylation de plusieurs sous-unités sur des résidus tyrosine détermine la localisation intracellulaire du protéasome; ainsi, par exemple, la phosphorylation de α2 sur Y120 est requise pour la localisation nucléaire du protéasome (Benedict *et al.*, 1995; K. Tanaka *et al.*, 1990; H. R. Wang *et al.*, 1997). Finalement, la phosphorylation/déphosphorylation de certaines sous-unités affecte l'assemblage du protéasome, notamment en favorisant ou non la fixation des particules régulatrices au complexe 20S (Bose *et al.*, 2001; Bose *et al.*, 1999; Bose *et al.*, 2004).

6.3. Rôle du protéasome dans la régulation transcriptionnelle

6.3.1. Rôles protéolytiques du protéasome dans la transcription

Tel que décrit au Chapitre 3, la plupart des corégulateurs interagissent avec les RN *via* le domaine AF-2 de manière mutuellement exclusive. Cela suggère un recrutement séquentiel et, dans ce contexte, la dégradation des corépresseurs/coactivateurs par le protéasome régulerait leur recrutement et leur départ, mécanisme nécessaire à l'initiation et à la dynamique de la transcription (Collins et Tansey, 2006; Dennis et O'Malley, 2005; Lipford et Deshaies, 2003; Metivier *et al.*, 2003; Perissi *et al.*, 2004).

De plus, plusieurs RN dont ERα, GR, TR, MR (*mineralocorticoid receptor*) et les RAR sont dégradés en réponse à leur ligand (Lonard et O'Malley, 2009). Il a été suggéré que leur dégradation par le protéasome permettrait de limiter leur fonction et/ou de faciliter l'initiation de plusieurs cycles de transcription *via* un apport constant de nouveaux RN (Nawaz et O'Malley, 2004). Dans certains cas, bien que ce ne soit pas généralisé, l'inhibition du protéasome entraine un blocage des effets transcriptionnels (Lonard et O'Malley, 2009). Pour des raisons encore non élucidées, le protéasome semble avoir des fonctions différentes selon le type de promoteur (Auld *et al.*, 2006).

Finalement, le protéasome pourrait lever les blocages engendrés par l'accumulation de l'ARN Pol II sur des sites de pause, de terminaison ou d'ADN endommagé, jouant ainsi un rôle dans l'élongation et la terminaison de la transcription (Gillette *et al.*, 2004).

6.3.2. Rôles non-protéolytiques du protéasome dans la transcription

Le protéasome semble également être impliqué dans la régulation transcriptionnelle par des procédés n'impliquant pas de protéolyse (Collins et Tansey, 2006; Muratani et Tansey, 2003). En effet, les sous-unités ATP-ases du sous-complexe régulateur 19S du protéasome peuvent déplier ou replier les composants des complexes régulateurs de la transcription afin de favoriser ou défavoriser leur fixation au niveau des promoteurs ou leur interactions avec d'autres corégulateurs (D. Lee *et al.*, 2005). Elles reconfigurent également localement la chromatine afin de permettre le recrutement d'enzymes modifiant les histones (Ezhkova et Tansey, 2004). De plus, SUG-1, l'une des six ATP-ases du complexe 19S, interagit avec les RAR et SRC-3 et est nécessaire à la transactivation de RARγ (Ferry *et al.*, 2009; Gianni *et al.*, 2002a; vom Baur *et al.*, 1996).

6.4. Dégradation des RAR par le protéasome

Les RAR et les RXR sont dégradés par le protéasome en réponse à l'AR (Gianni *et al.*, 2002b; Kopf *et al.*, 2000; T. Tanaka *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1999). Le mécanisme exact de cette dégradation demeure à élucider, mais il existe néanmoins quelques informations relatives à sa régulation.

Des travaux effectués au laboratoire ont montré que dans le cas de RARγ, il s'agit d'un mécanisme ubiquitination- et phosphorylation-dépendant. En effet, RARγ est polyubiquitiné en réponse à l'AR et ce processus requiert la phosphorylation des deux résidus du NTD. La mutation des deux sites de phosphorylation du NTD empêche l'ubiquitination et la dégradation de RARγ. Cela suggère que le NTD signalerait la dégradation par le protéasome *via* sa phosphorylation en réponse à l'AR (Gianni *et al.*, 2002a; Kopf *et al.*, 2000). De plus, le domaine AF-2 semble intervenir dans la dégradation de RARγ *via* le recrutement de la sous-unité SUG-1 appartenant au complexe 19S du protéasome (Gianni *et al.*, 2002a). Dans le cas de RARγ, il semble donc y avoir une superposition des domaines impliqués dans la transactivation (AF-1 et AF-2) avec la dégradation par le protéasome. Le blocage de la dégradation à travers l'inhibition de la phosphorylation ou du protéasome affectant négativement la transactivation, il semble que transactivation et *turnover* soient intimement liés dans le cas de RARγ (Gianni *et al.*, 2002a). Dans ce contexte, la phosphorylation de RARγ semble à la fois jouer un rôle d'activation de sa transcription et un rôle de marquage en vue de sa prise en charge subséquente par la machinerie ubiquitine-protéasome après la transcription (Tansey, 2001).

Ainsi, la dégradation permettrait dans ce contexte l'enlèvement de RARγ de l'ADN afin d'empêcher l'initiation de cycles de transcription excessifs par un seul et même hétérodimère (Tansey, 2001). Cette limitation de la fonction des RAR est importante pour la dynamique de la

transcription en permettant une réévaluation continuelle des besoins transcriptionnels en fonction des signaux transmis par l'AR.

Dans le cas de RARα, il existe cependant peu d'informations entourant sa dégradation. Celle-ci semble néanmoins être soumise à un mécanisme différent de celui de RARγ. En effet, à la différence de RARγ, la dégradation de RARα ne semble pas faire intervenir SUG-1 (Ferry *et al.*, 2009). Des travaux ont néanmoins montré qu'elle requiert le domaine AF-2, lequel pourrait être impliqué dans le recrutement de la machinerie d'ubiquitination et/ou de dégradation (Kopf *et al.*, 2000). La dégradation de RARα a également été corrélée au recrutement de Pin1 au niveau du PRM phosphorylé (Brondani *et al.*, 2005; Gianni *et al.*, 2009). Dans ce contexte, Pin1 déstabiliserait RARα, mais de façon ligand-indépendante. La contribution éventuelle de la phosphorylation et/ou de l'ubiquitination dans la dégradation de RARα induite par le ligand reste cependant à déterminer.

OBJECTIFS

L'équipe du Dr. Cécile Rochette-Egly s'intéresse depuis plusieurs années au rôle des processus de phosphorylation sur l'activité des RAR.

L'équipe a tout d'abord montré que les RAR sont des phosphoprotéines, puis a identifié des sites de phosphorylation inductibles par l'AR localisés dans le NTD et le LBD. Récemment, elle a révélé que ces phosphorylations, très rapides, mettent en jeu des cascades de kinases activées par l'AR via des effets non-transcriptionnels et extranucléaires. Ces kinases migrent dans le noyau où elles phosphorylent non seulement les RAR, mais aussi leurs corégulateurs et de nombreux autres substrats comme les histones. Ces phosphorylations jouent un rôle crucial dans l'expression des gènes cibles des RAR. En effet, elles contrôlent le recrutement des RAR au niveau de leurs éléments de réponse et l'interaction des RAR avec leurs corégulateurs.

Le laboratoire a aussi montré que l'AR induit la dégradation des RAR par le protéasome. Il a été proposé que la dégradation des RAR serait un signal d'arrêt censé marquer la fin de la transcription de leurs gènes cibles. Cette dégradation requiert l'intégrité du domaine de fixation des corégulateurs, suggérant que le protéasome serait recruté *via* ce domaine. Dans le cas du sous-type RARγ, la dégradation est contrôlée par la phosphorylation et l'ubiquitination du récepteur. Cependant le mécanisme de la dégradation de RARα n'a pas encore été élucidé.

De façon intéressante, certaines cellules tumorales caractérisées par des aberrations du « kinome » sont résistantes aux effets antiprolifératifs de l'AR. Cependant, les mécanismes sous-jacents à cette résistance sont mal connus et les conséquences de la dérégulation des kinases sur le phosphoprotéome global et sur la signalisation de l'AR n'ont jamais été étudiées.

J'ai émis l'hypothèse que, dans ces types de cancers, les altérations du kinome pourraient affecter les cascades de kinases activées par l'AR et, par conséquent, la phosphorylation des RAR et de nombreuses autres protéines. J'ai choisi comme modèle de travail des cellules mammaires tumorales d'origine humaine qui expriment le sous-type RARα et j'ai comparé des cellules qui surexpriment (ERBB2+) ou non (ERBB2-) le recepteur à activité tyrosine kinase erbB-2. Avec ces modèles, j'ai analysé les conséquences des altérations des voies de signalisation caractéristiques des cellules ERBB2+ et résistantes à l'AR sur:

- le profil à l'échelle du génome des gènes activés par l'AR (RNA-seq)

- le phosphoprotéome global et la phosphorylation de RARα

À cette fin, j'ai utilisé les récentes technologies de spectrométrie de masse nano-LC-LTQ-Orbitrap à haute résolution disponibles à l'IGBMC. Cette approche a nécessité de nombreuses mises

au point techniques pour l'immunoprécipitation du RARα phosphorylé, la détermination des conditions optimales de digestion et l'enrichissement des phosphopeptides.

- la dégradation de RARα

J'ai analysé le mécanisme du recrutement du protéasome par RARα ainsi que le rôle de l'ubiquitination et de la phosphorylation du récepteur dans ce processus.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Afin d'étudier les conséquences d'altérations du kinome sur la réponse à l'AR, j'ai utilisé comme modèle des lignées de cellules dérivées de tumeurs mammaires humaines surexprimant ou non le récepteur à activité tyrosine kinase erbB-2. ErbB-2 est un récepteur transmembranaire sans ligand direct connu qui est présent sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères formés avec l'un des autres récepteurs de la famille erbB (erbB-1, erbB-3 ou erbB-4) (Galvez-Contreras *et al.*, 2013; Yarden et Pines, 2012). L'activation du dimère de récepteurs provoque leur transphosphorylation et la stimulation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires, telles PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MEK/p42/44 MAPK, PLCγ/PKC et Src (Figure 36) (Arteaga et Engelman, 2014; Galvez-Contreras *et al.*, 2013). L'ensemble de ces voies de signalisation contrôlent divers processus cellulaires comme la division, la prolifération, la migration, la survie, l'adhésion et la différenciation, ainsi que le métabolisme (Niu *et al.*, 2008; Yarden et Sliwkowski, 2001).

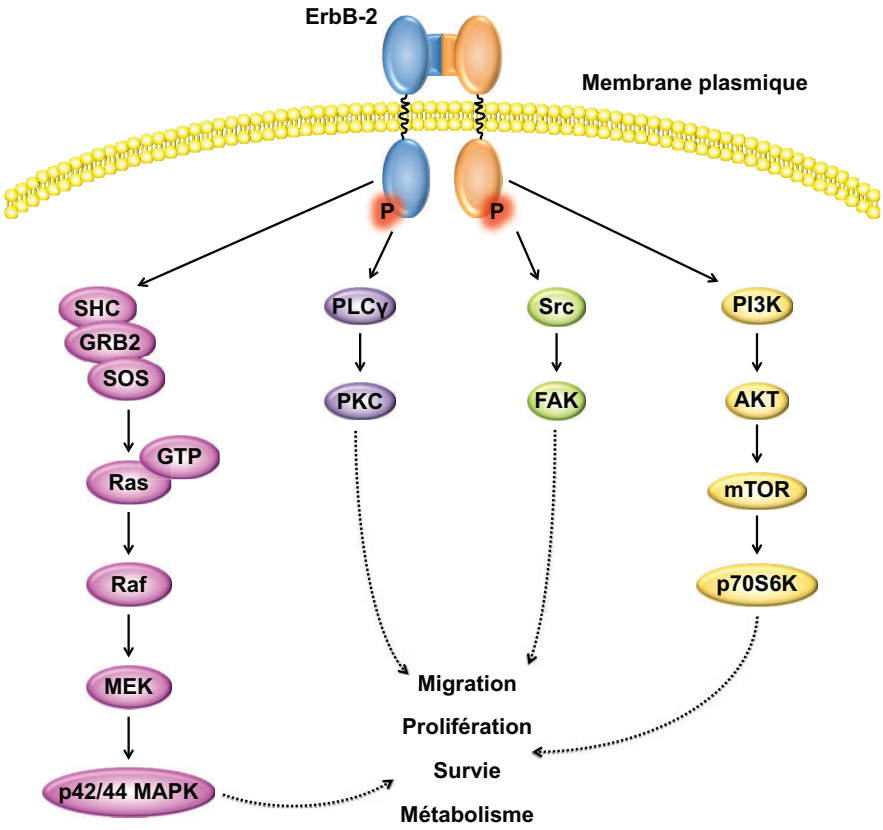


Figure 36: Principales voies de signalisation activées par erbB-2.

L'homodomérisation ou l'hétérodimérisation de erbB-2 avec d'autres récepteurs de la famille erbB (erbB-1, erbB-3 ou erbB-4) active les domaines tyrosine kinase, entrainant une phosphorylation croisée des récepteurs. Ces phosphorylations créent des sites d'ancrage pour diverses protéines, permettant ainsi l'activation de plusieurs voies de signalisation contrôlant des fonctions cellulaires comme la migration, la prolifération, la survie et le métabolisme. Modifié de Galvez-Contreras *et al.* (2013).

Environ 20 à 25% des tumeurs mammaires sont caractérisées par une surexpression de erbB-2, conséquence d'une amplification du gène ERBB2, entrainant une activation constitutive et aberrante de plusieurs voies de signalisation (Montemurro et Scaltriti, 2014). Ces tumeurs, dites ERBB2+, sont fréquemment associées à une résistance aux effets antiprolifératifs de l'AR (Tari *et al.*, 2002). De plus, l'équipe a montré que dans des lignées cellulaires dérivées de tumeurs mammaires humaines ERBB2+, la voie de la MAPK n'est pas activée par l'AR (Piskunov et Rochette-Egly, 2012), suggérant que la dérégulation des voies de signalisation aurait un impact sur la signalisation de l'AR. Cependant, lors mon arrivée dans le laboratoire, ces conséquences demeuraient à caractériser.

J'ai donc entrepris d'évaluer l'impact de la dérégulation des voies de phosphorylation sur i) le phosphoprotéome global ii) la phosphorylation de RARα iii) la transcription des gènes cibles de RARα et iv) la dégradation de RARα. À cette fin, j'ai utilisé et comparé des lignées de cellules dérivées de tumeurs mammaires humaines ERBB2- [1] (MCF7) et ERBB2+ (BT474), qui expriment toutes deux RARα à un niveau similaire.

I. Analyse protéomique des processus de phosphorylation régulés par l'AR et de leur dérégulation dans les cellules ERBB2+ (Publication 2)

Afin d'évaluer les conséquences de la signalisation aberrante des cellules ERBB2+ sur les processus de phosphorylation AR-dépendants, j'ai effectué la première analyse de ces processus à l'échelle protéomique par MS nano-LC-LTQ-Orbitrap. J'ai ainsi comparé le protéome et le phosphoprotéome à l'état basal et en réponse à l'AR dans les cellules MCF7 et BT474 (voir le schéma illustrant le design expérimental dans la Publication 2, Figure 1A). Ces cellules ont été soumises à un traitement court par l'AR (30 minutes) - les effets non-génomiques de l'AR étant rapides - puis fractionnées sous forme d'extraits cytosoliques et nucléaires. Les protéines ne pouvant être analysées par MS sous leur forme intacte en raison de leur masse moléculaire trop élevée, des digestions protéiques (décrites plus loin) ont été nécessaires afin de générer des peptides d'une masse appropriée à la détection, c'est-à-dire environ 500-3000 Daltons. Une fraction des peptides générés a été utilisée pour l'analyse du protéome global, puis la fraction restante a servi à l'analyse du phosphoprotéome.

Pour l'ensemble de ces analyses, seules les protéines détectées avec et sans AR ont été considérées. En effet, il semble peu probable que l'AR induise des changements dans le niveau protéique en seulement 30 minutes. Les protéines détectées dans seulement une des deux conditions, généralement présentes en quantités à la limite du seuil de détection (fixé à 2 PSM (*peptide spectrum match*), ont donc été éliminées.

[1] Le terme ERBB2- réfère aux tumeurs sans amplification du gène ERBB2, et donc ne surexprimant pas la protéine erbB-2.

I.I. Protéome global

Pour chaque échantillon, une quantité égale de protéines a été prélevée et digérée avec la trypsine, une endoprotéinase hydrolysant les liaisons peptidiques en C-terminal des résidus lysine ou arginine. La trypsine est l'enzyme la plus couramment utilisée en MS puisqu'elle génère des peptides dont la masse moyenne se situe dans l'intervalle de détectabilité (Vandermarliere *et al.*, 2013). Pour une meilleure efficacité de digestion, j'ai combiné la trypsine avec la Lys-C, une autre enzyme coupant en C-terminal des lysines.

Tout d'abord, l'analyse du protéome a révélé des différences dans l'expression de certaines protéines entre les deux lignées. En effet, pour un compartiment cellulaire donné, 20 à 25% des protéines détectées dans une lignée cellulaire ne l'étaient pas dans l'autre (Publication 2, Figure 4A). Cette différence pourrait s'expliquer par des variations au niveau de la transcription des gènes entre les deux lignées (voir Section II.I). En effet, une analyse récente de l'expression globale des gènes chez les mammifères a montré qu'environ 40% des variations des niveaux protéiques sont directement attribuables à des variations des niveaux d'ARN messagers (Schwanhausser *et al.*, 2011). Généralement, les niveaux d'ARN messagers sont directement liés à leur taux de transcription, plutôt qu'à d'autres facteurs comme leur stabilité (Schwanhausser *et al.*, 2011). Le niveau de transcription a donc fréquemment un impact direct sur le niveau d'expression protéique. La signalisation de erbB-2 jouant un rôle important dans le contrôle de la transcription en général, il est probable que les différences d'expression de plusieurs protéines résultent de la dérégulation de l'expression du gène qui leur est associé (Amin *et al.*, 2004; Ariazi *et al.*, 2007; Le *et al.*, 2007).

Cependant, on ne peut exclure un impact de la surexpression de erbB-2 sur la régulation de la synthèse protéique. En effet, les voies de signalisation RAS, MAPK, PI3K/AKT et PKC, participent non seulement à la régulation de la transcription, mais également à la régulation de la traduction *via* la phosphorylation des facteurs de traduction ou des protéines ribosomales, de même que *via* la modulation de la stabilité des ARNm (Grzmil et Hemmings, 2012; Proud, 2007).

En conclusion, il est probable qu'une signalisation aberrante telle que celle engendrée par la surexpression de erbB-2 ait des répercussions sur le niveau d'expression de certaines protéines en affectant la transcription des gènes correspondants et/ou la traduction des ARNm.

I.II. Phosphoprotéome

Ensuite, je me suis intéressée au phosphoprotéome. La détection des phosphorylations est plus délicate et, à ce titre, certaines modifications expérimentales ont été nécessaires (Publication 2, Figure 1A).

Contrairement à l'analyse du protéome pour laquelle une seule séquence peptidique suffit généralement pour identifier une protéine, l'analyse du phosphoprotéome nécessite une couverture de séquence maximale. En fonction des sites de coupures qui lui sont associés, une enzyme donnée génère pour une certaine protéine une panoplie de peptides de différentes masses, dont seuls ceux ayant une masse comprise dans l'intervalle de détectabilité pourront être analysés. La somme des portions détectables de la séquence protéique générées par la digestion représente la couverture de séquence. Plus cette couverture de séquence est élevée, plus la probabilité qu'un site de phosphorylation donné en fasse partie et soit identifié est élevée. Afin de maximiser la couverture de séquence de l'ensemble des protéines, j'ai donc effectué deux digestions peptidiques en parallèle sur tous les échantillons destinés à l'analyse phosphoprotéomique: une avec la combinaison trypsine/Lys-C et une avec la chymotrypsine, qui coupe en C-terminal des acides aminés aromatiques (Tyr, Trp, Phe) ou hydrophobes (Leu). L'analyse a été effectuée sur la combinaison des jeux de données obtenus pour les deux digestions.

De plus, les phosphorylations sont des modifications de très faible stoechiometrie. En effet, certains auteurs estiment que les formes phosphorylées représentent en moyenne 0,5 % du contenu total d'une protéine donnée (Temporini *et al.*, 2008). La mise au point et l'utilisation de techniques d'enrichissement des phosphopeptides a donc été nécessaire pour optimiser leur détection. En effet, l'enrichissement par IMAC a permis de détecter environ quatre fois plus de protéines phosphorylées qu'avant enrichissement.

I.II.I. Phosphoprotéome à l'état basal

Les résultats obtenus montrent de nombreuses différences entre les deux lignées qui sont détaillées dans la Publication 2. De façon attendue, la protéine erbB-2 a été détectée sous sa forme phosphorylée avec environ 70 fois plus de PSM dans les BT474 que dans les MCF7.

Cependant, de façon surprenante, le nombre de protéines phosphorylées, de phosphopeptides et de sites de phosphorylation à l'état basal est inférieur d'environ 13% dans les cellules BT474 comparativement aux MCF7 (Publication 2, Figures 2A, 2B et 4B). La suractivation des voies de signalisation en aval de erbB-2 ne semble donc pas résulter en une augmentation du niveau global de phosphorylation, mais plutôt en une diminution. Bien que ce résultat soit quelque peu contre-intuitif, il existe certaines pistes d'explications possibles.

D'une part, il est possible que certaines des kinases suractivées dans les cellules ERBB2+ participent au maintien de phosphorylations inhibitrices bloquant l'activité d'autres kinases (Roskoski, 2005). Il est donc possible que certaines kinases subissent une hyperphosphorylation sur

de tels sites et que cela inhibe leur activité, réduisant le degré de phosphorylation de l'ensemble de leurs cibles.

De plus, la régulation des voies de signalisation repose sur l'action coordonnée non seulement des kinases, mais également des phosphatases (Tonks, 2006). En effet, les kinases et les phosphatases agissent de façon complémentaire: les kinases contrôlent principalement l'amplitude de la réponse de signalisation, alors que les phosphatases régulent plutôt la rapidité et la durée de la réponse (Heinrich *et al.*, 2002; Hornberg *et al.*, 2005). Or, comme pour les kinases, l'activité des phosphatases est souvent régulée par la phosphorylation, soit *via* leur propre phosphorylation, soit *via* la phosphorylation des protéines régulant leur activité (Eto, 2009; Seshacharyulu *et al.*, 2013). Dans certains cas, la phosphorylation des phosphatases augmente leur activité (Vogel *et al.*, 1993). Il est donc possible que certaines phosphatases soient suractivées dans les BT474 et que cela réduise davantage le niveau global de phosphorylation.

L'homéostasie du phosphoprotéome repose donc sur un équilibre entre l'action des kinases et des phosphatases (Hoekstra *et al.*, 2012). À ce titre, il est intéressant de noter qu'un déséquilibre entre les fonctions kinases et phosphatases a été associé à plusieurs manifestations pathologiques incluant les cancers (Ostman *et al.*, 2006). Le cas de cellules cancéreuses ERBB2+ comme les BT474 semble être un bon exemple de la perturbation de cet équilibre.

I.II.II. Phosphoprotéome en réponse à l'AR

De façon intéressante, les analyses ont révélé que l'AR a eu un impact différent sur le nombre global de phosphoprotéines entre les deux lignées. Dans les MCF7, l'AR n'a pas beaucoup modifié le nombre de phosphoprotéines cytosoliques, mais a diminué de 20% le nombre de phosphoprotéines nucléaires (Publication 2, Figures 2A, 2B et 4C). Cependant, dans les BT474, l'AR a induit une augmentation du nombre de phosphoprotéines d'environ 20% à la fois dans le cytosol et dans le noyau (Publication 2, Figures 2A, 2B et 4C).

Dans les MCF7, l'AR a augmenté le niveau de phosphorylation de certains acteurs des voies de signalisation des kinases, confirmant que l'AR active des cascades de kinases. Par exemple, l'AR augmente la phosphorylation de PAK2 au niveau du résidu S141, une modification associée à une augmentation de son activité (Publication 2, Tableau 1) (Zhan *et al.*, 2003). PAK2 est un effecteur agissant en aval des petites GTPases et activant la voie des MAPK (Menges *et al.*, 2012), confirmant le résultat de travaux effectués antérieurement au laboratoire ayant montré que l'AR active la voie des MAPK dans ces cellules (Bruck *et al.*, 2009; Piskunov et Rochette-Egly, 2012). Par contre, dans les BT474, l'AR n'a pas eu d'effets sur le niveau de phosphorylation des acteurs de la voie des MAPK, mais en a activé d'autres comme celle d'Akt, qui bloque la voie des MAPK (Carracedo et Pandolfi,

2008; Zimmermann et Moelling, 1999). Ce résultat est cohérent avec les travaux du laboratoire ayant montré que l'activation de la p38MAPK par l'AR est bloquée dans les BT474 (Piskunov et Rochette-Egly, 2012).

De façon intéressante, le niveau de phosphorylation de plusieurs protéines impliquées dans le maintien de la chromatine dans un état répressif a augmenté en réponse à l'AR dans les BT474, mais non dans les MCF7. Par exemple, la phosphorylation de HDAC1 au niveau de S421 et S423 et HDAC2 au niveau de S422 et S424 augmente suite au traitement à l'AR dans les BT474 et non dans les MCF7 (Publication 2, Tableau 2). Or, ces phosphorylations ont associées à une augmentation de l'activité répressive de HDAC1 et HDAC2 (Delcuve *et al.*, 2012; Segre et Chiocca, 2011).

I.II.III. Limitations de la technique

Certains points limitent cependant l'interprétation de ces résultats:

- L'analyse des données est basée sur le nombre de PSM, qui correspond au nombre de fois qu'un peptide donné est détecté. Or, ce nombre ne permet pas de comparer l'abondance ou le niveau de phosphorylation de protéines différentes entre elles. En effet, la longueur d'une protéine et sa couverture de séquence associée à une enzyme de digestion donnée sont autant de facteurs variant d'une protéine à l'autre et pouvant grandement influer sur le nombre de PSM détectés. Ainsi, deux protéines d'abondance égale dans un échantillon peuvent être détectées avec un nombre de PSM très différent. De ce fait, avec cette méthode d'analyse, les comparaisons doivent se limiter aux PSM obtenus pour une même protéine. Malgré cela, certains biais peuvent être induits pas la présence de modifications post-traductionnelles pouvant inhiber le clivage enzymatique. Par exemple, dans le cas de la trypsine, la présence d'ubiquitines sur un résidu lysine empêche le clivage en C-terminal de ce résidu (Kirkpatrick *et al.*, 2005). De plus, le clivage tryptique est inhibé en présence d'un résidu Ser ou Thr phosphorylé situé à une distance de un à trois acides aminés du site de clivage (Boehm *et al.*, 2012; Thiede *et al.*, 2000; Winter *et al.*, 2009).
- Les comparaisons doivent être effectuées avec une certaine prudence, car cette méthode d'analyse n'est pas à proprement parler quantitative. Même si la comparaison des nombre de PSM apporte un certain degré d'information, certaines méthodes développées récemment et permettant la quantification des modifications post-traductionnelles auraient permis une analyse plus rigoureuse (Chaube, 2014). Celles-ci incluent notamment i) des méthodes de marquage métabolique comme le SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*), impliquant l'incorporation *in vivo* d'acides aminés (Leu, Lys, Arg) marqués avec des isotopes stables (légers ou lourds) (Ong *et al.*, 2002), ii) des marquage post-

métaboliques ou chimiques comme le TMT (*tandem mass tag*) ou l'iTRAQ (*isobaric tag for relative and absolute quantitation*) effectués par le marquage des acides aminés N-terminaux ainsi que des lysines des peptides (Gan *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2003) et iii) des méthodes sans marquage (*label free*) (Nahnsen *et al.*, 2013). Les méthodes avec marquage permettent la combinaison des différents échantillons avant leur analyse simultanée, réduisant ainsi les biais liés à la préparation et à l'injection des échantillons. Elles ont cependant certains désavantages, comme leur coût élevé et une couverture protéomique généralement plus faible due à la sélectivité du marquage et à des différences dans son efficacité (Goodlett et Yi, 2003; Lill, 2003).

- Finalement, il est important de noter que malgré leur sensibilité à l'AR et l'absence de surexpression de erbB-2, les cellules MCF7 demeurent des cellules cancéreuses et, à ce titre, ne peuvent être considérées comme un référentiel de normalité. On ne peut donc pas exclure que certaines des phosphorylations observées dans ces cellules soient pathologiques et résultent d'aberrations indépendantes de erbB-2. De plus, les cellules MCF7 et les BT474 n'étant pas isogéniques, les différences observées dans leurs phosphoprotéomes respectifs ne sont pas forcément attribuables à leur caractère ERBB2- ou ERBB2+. L'utilisation de lignées de cellules isogéniques, comme par exemple la comparaison de cellules MCF7 surexprimant ou non erbB-2 de façon stable ou transitoire, aurait probablement facilité l'interprétation des données à ce niveau.

I.III. Analyse de l'état de phosphorylation de RARα

L'analyse protéomique et phosphoprotéomique globale n'a pas permis de détecter RARα. En effet, la faible abondance des RAR représente un problème majeur à leur analyse par MS. Malgré tous les progrès technologiques récents ayant grandement amélioré les capacités de détection, il n'en demeure pas moins que pour être efficaces, les analyses par MS doivent idéalement être effectuées sur des échantillons à complexité limitée. En effet, l'analyse d'échantillons complexes, c'est-à-dire composés d'une grande variété de peptides, représente un obstacle à la détection. Le problème ne relève pas tant d'un manque de sensibilité des technologies actuelles, mais plutôt du fait que la détection des protéines à forte abondance se fait au détriment de celles à faible abondance (Brewis et Brennan, 2010). Or, le protéome des mammifères est extrêmement complexe et une seule lignée cellulaire exprime les protéines issues d'environ 10000 gènes (Choudhary et Mann, 2010). Dans ce contexte, l'identification des protéines de faible abondance est aujourd'hui considérée comme le défi majeur de la protéomique (Brewis et Brennan, 2010). Cette limitation

engendre la nécessité d'un effort substantiel dans la préparation de l'échantillon afin d'en réduire la complexité (H. Wang et Hanash, 2005).

L'identification des sites de phosphorylation de RARα a donc représenté un double défi technique, d'une part, de par la faible abondance de la protéine au niveau endogène, et d'autre part de par la très faible stoechiometrie des formes phosphorylées en général. Pour ces raisons, les tentatives d'identification des sites de phosphorylation de RARα par MS effectuées avant mon arrivée au laboratoire se sont soldées par des échecs.

Afin de contourner le problème de la faible abondance de RARα, j'ai mis au point des conditions d'immunoprécipitation de RARα à grande échelle. Pour ce faire, j'ai d'abord mis au point des conditions de culture cellulaire permettant l'amplification de grandes quantités de cellules en suspension. Ces conditions d'amplification en suspension ont plusieurs avantages: elles permettent l'amplification massive et homogène d'une très grande quantité de cellules et sont idéales pour des traitements courts comme les traitements de 30 minutes avec l'AR. En effet, cela garantit une uniformité du traitement et une récolte des cellules simultanée et rapide.

J'ai aussi élaboré un protocole d'immunoprécipitation de RARα et en ai optimisé chaque étape en vue d'obtenir un rendement optimal. Grâce à ces optimisations, le nouveau protocole que j'ai mis au point permet un rendement 4 à 5 fois supérieur à celui du protocole précédemment utilisé au laboratoire. J'ai également inclus dans ce protocole plusieurs précautions nécessaires au maintien des phosphorylations, qui sont des modifications parfois très instables (présence permanente d'inhibiteurs de phosphatases à haute dose, contrôle de la température, ...). De plus, la présence de phosphorylations pouvant dans certains cas empêcher la reconnaissance par l'anticorps lors de l'immunoprécipitation, j'ai choisi d'utiliser un mélange de deux anticorps monoclonaux ciblant des régions différentes RARα (le NTD et la région F) afin d'éviter que certaines formes phosphorylées ne puissent être immunoprécipitées.

Généralement, l'analyse des phosphorylations d'une protéine après immunoprécipitation se fait *via* une migration de l'éluat sur gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomasie ou au nitrate d'argent et à partir duquel la bande correspondant à la protéine d'intérêt est localisée et découpée en vue de la digestion protéique et de l'analyse MS. J'ai cependant choisi d'utiliser directement l'éluat total de l'immunoprécipitation. En effet, de par sa taille, RARα migre sur gel au niveau des chaînes lourdes d'immunoglobuline qui masquent complètement son signal suite à la coloration. Généralement, la fixation covalente de l'anticorps aux billes associée à l'utilisation de méthodes d'élution douces peut éviter ce problème en empêchant l'élution de l'anticorps; cependant, l'ensemble des nombreuses stratégies testées ont eu pour effet une perte importante de

rendement. D'autre part, la présence de modifications post-traductionnelles affecte la migration des protéines sur gel de par leur masse et, dans le cas des phosphorylation, de par leur charge (Boehm *et al.*, 2012; Kinoshita *et al.*, 2009). Ainsi, certaines formes phosphorylées auraient pu se trouver hors de la zone de découpage et être perdues. Pour ces raisons, j'ai donc opté pour une analyse sur éluat total, ce qui n'avait jamais été tenté au service de protéomique de l'IGBMC.

Des mises au point ont également été nécessaires pour déterminer le choix de l'enzyme de digestion à utiliser. En effet, mes premiers essais avec la trypsine et la chymotrypsine se sont avérés peu fructueux. Par exemple, dans le cas de RARα, la trypsine permet une couverture de séquence d'environ 50 % seulement, avec une couverture quasi nulle de la région N-terminale. Après avoir effectué des simulations informatiques de digestion, j'ai opté pour la thermolysine, qui coupe en N-terminal des acides aminés hydrophobes Leu, Phe, Val, Ile, Ala et Met. L'utilisation de cette enzyme permet une couverture de séquence nettement supérieure, notamment au niveau de la portion N-terminale de la protéine.

Pour résumer, j'ai donc traité de larges quantités de cellules MCF7 et BT474 avec ou sans AR, immunoprécipité RARα, digéré l'éluat total contenant la protéine à la thermolysine et analysé les phosphopeptides par nano-LC-LTQ-Orbitrap MS après enrichissement par IMAC (Publication 2 Figure 1B).

L'analyse a permis de détecter quatre sites de phosphorylation: S36, S74 et S77, localisés dans le domaine N-terminal, et S445 localisé dans la région F (Publication 2 Figure 5A). Ces quatre sites de phosphorylation étaient répartis sur quatre types de peptides: des peptides contenant S36, S77 ou S445 seules et des peptides contenant à la fois S74 et S77 (Publication 2 Figure 5B).

La phosphorylation de S77 et S445 avait déjà été rapportée (Rochette-Egly et al., 1997). Cependant, ces expériences démontrent pour la première fois la phosphorylation de S36 et S74. Bien que l'ensemble de ces phosphorylations aient été détectées dans les deux lignées avec ou sans AR, des différences importantes existent quant au nombre de PSM détectés entre les différents échantillons. D'abord, l'abondance relative des phosphopeptides est généralement plus faible dans les BT474 que dans les MCF7 (Publication 2, Figure 5C). La différence la plus frappante relève cependant de la variation du niveau de phosphorylation de S74 + S77 en réponse à l'AR. En effet, dans les MCF7, cette double phosphorylation augmente fortement en réponse à l'AR, mais pas dans les BT474. J'ai pu confirmer ce résultat par des expériences d'immunoprécipitation menées suite à l'aide d'un nouvel anticorps que nous avons synthétisé et qui reconnait spécifiquement RARα phosphorylé au niveau des deux résidus S74 et S77 (Figure 37).

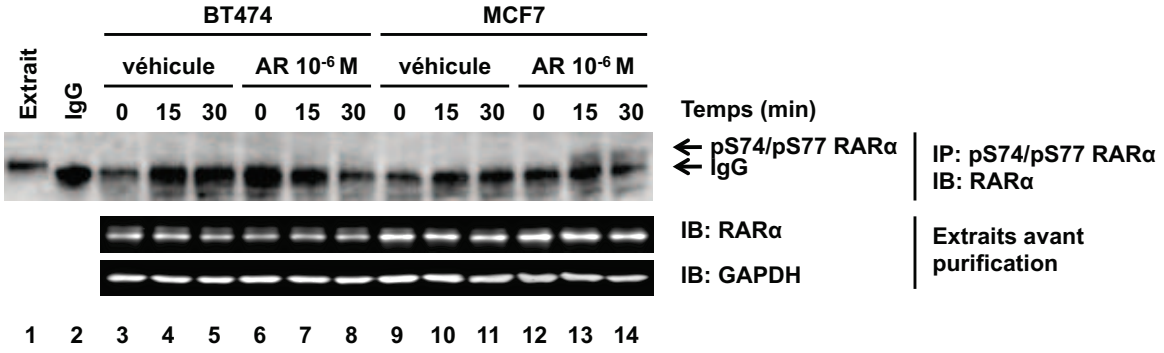


Figure 37: L'AR induit la phosphorylation de RARα dans les MCF7 et non dans les BT474.

L'immunoprécipitation du RARα phosphorylé au niveau de S74 et S77 confirme l'induction de ces phosphorylation dans les MCF7 et non dans les BT474.

L'induction de la phosphorylation de S77 en réponse à l'AR avait déjà été rapportée dans les MCF7 (Bruck *et al.*, 2009). Ces résultats montrent cependant pour la première fois que l'induction de cette phosphorylation est généralement associée à celle de S74. Il est à noter que tous les peptides (sans exception) présentant une phosphorylation de S74 étaient également phosphorylés au niveau de S77, suggérant que la phosphorylation préalable de S77 est requise pour la phosphorylation de S74. La kinase à l'origine de la phosphorylation de S74 demeure à identifier, mais on peut supposer qu'il s'agit d'une kinase reconnaissant un motif consensus phosphorylé. La fonction exacte de la phosphorylation de S74 n'est pas connue et n'a pas été à proprement parler étudiée. Cependant, plusieurs travaux ont été effectués antérieurement au laboratoire afin d'étudier le rôle de la phosphorylation de S77 (Bruck *et al.*, 2009). Lors de ces travaux, l'activité transcriptionnelle de RARα a été analysée après mutation de la S77. Ces analyses ont révélé que lorsque RARα est muté sur ce site, il n'est pas recruté efficacement au niveau des promoteurs de ses gènes cibles *Cyp26A1* et *btg2* et n'induit pas leur transcription (Bruck *et al.*, 2009). Comme la phosphorylation de S74 semble dépendre de la phosphorylation préalable de S77, il peut être postulé que la mutation de S77 dans ces analyse a non seulement empêché la phosphorylation de ce résidu en réponse à l'AR, mais également la phosphorylation de S74. Puisque mes résultats montrent qu'en réponse à l'AR, RARα phosphorylé sur S74 et S77 représente la forme phosphorylée prédominante par rapport à RARα phosphorylé sur S77 seulement (Publication 2, Figure 5C), les effets observés étaient probablement attribuables à la perte de ces deux phosphorylations.

La perte de l'induction de la phosphorylation de S74 et S77 par l'AR dans les BT474 semble être en partie attribuable à la surexpression de erbB-2. En effet, en présence de trastuzumab, un anticorps monoclonal humanisé ciblant erbB-2 (commercialisé sous le nom d'Herceptin) et utilisé en

thérapie anticancéreuse, l'induction de cette double phosphorylation par l'AR est partiellement rétablie dans les BT474 (non illustré). Bien que le mécanisme sous-jacent demeure à élucider, il pourrait être postulé que le l'inhibition de erbB-2 permettrait le rétablissement d'une signalisation normale des voies en aval de erbB-2, ce qui permettrait de restaurer un phosphoprotéome normal propice au déblocage des effets non-génomiques de l'AR. À ce titre, il serait intéressant de vérifier expérimentalement si l'AR parvient à activer la voie de la p38MAPK dans les BT474 en présence de trastuzumab.

La phosphorylation de S36 ne semble pas quant à elle être modulée par l'AR, bien qu'il ne peut pas être exclu qu'il en soit autrement dans des conditions expérimentales différentes (comme des temps de traitement à l'AR différents) ou dans d'autres types cellulaires. De façon intéressante, il est possible que ce site soit conservé parmi les sous-types de RAR. En effet, lors d'une expérience préliminaire d'identification des sites de phosphorylation de RARγ dans les MCF7, j'ai également détecté la phosphorylation de S36. Je n'ai pas étudié la phosphorylation de RARβ, mais ce sous-type possède un résidu sérine en position 37 pouvant peut-être correspondre à un site de phosphorylation équivalent, bien que cela demeure à démontrer.

La fonction de la phosphorylation de S36 n'est pas connue. À ce stade, je ne peux que spéculer sur son rôle, ce qui s'avère ardu puisque la fonction de la région A des RAR, dans laquelle est localisée la S36, demeure à ce jour très peu caractérisée. Cependant, en raison de la variabilité de la séquence de cette région entre les différents sous-types de RAR, il a été postulé que la région A pourrait participer à déterminer la spécificité des interactions des RAR avec d'autres protéines, interactions qui pourraient être responsable de la divergence du répertoire de gènes cibles régulés par chaque sous-type (Newell et Hong, 2012). Il peut donc être supposé que la phosphorylation de S36 puisse jouer un rôle dans la modulation de ces interactions, et ce faisant, qu'elle contribuerait à la spécificité de la régulation transcriptionnelle par les différents sous-types. Il est à noter que certains travaux ont montré que la suppression de la région A de RARα ou RARγ n'a pas d'effet sur l'activité transcriptionnelle ou la dégradation de ces récepteurs (Gianni *et al.*, 2002a; Kastner *et al.*, 1992; Melnick et Licht, 1999; Rousselot *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1999). Cette phosphorylation n'est donc probablement pas requise pour l'activité transcriptionnelle en soi, mais pourrait plutôt intervenir dans des mécanismes de régulation fine sous-type dépendants.

Il est à noter que la phosphorylation de S369, dont l'existence dans les MCF7 est pourtant documentée (Bruck *et al.*, 2009), n'a pas été détectée. Cela peut être dû au caractère très labile de cette phosphorylation, qui aurait pu être perdue lors de la préparation des échantillons ou dont l'induction aurait pu nécessiter une durée de traitement différente.

Finalement, plusieurs des résidus phosphorylables décrits dans la Section 5.2 n'ont pas non plus été détectés. La plupart d'entre eux avaient été recensés dans des types cellulaires différents, voire en réponse à certains stress. Par conséquent, il est possible qu'ils soient spécifiques à ces types cellulaires ou à ces stress.

II. Conséquences des altérations du phosphoprotéome sur la réponse à l'AR

II.I. Transcription des gènes cibles

La transcription RARα-dépendante étant régulée à plusieurs niveaux par des processus de phosphorylations, j'ai émis l'hypothèse que les modifications du phosphoprotéome découlant de la suractivation de erbB-2 auraient un impact sur la transcription des gènes cibles de RARα.

L'analyse à l'échelle du génome des gènes régulés par l'AR semble corréler la résistance à l'AR à la dérégulation de ses gènes cibles. En comparant les profils d'expression avec et sans ajout d'AR dans les MCF7 et les BT474 par RNA-seq (Publication 2), j'ai pu identifier le répertoire des gènes régulés par l'AR dans ces deux lignées. Ceux-ci correspondent aux gènes dont le nombre de transcrits a été modulé à la hausse ou à la baisse par l'AR d'au moins un facteur 2. Parmi les gènes répondant à l'AR répertoriés, plus de 92% répondaient différemment entre les deux lignées (Publication 2, Figure 6), soit parce que leur niveau d'expression n'a varié en réponse à l'AR que dans une seule des deux lignées, soit parce que leur niveau d'expression a varié dans les deux lignées, mais en suivant une tendance inverse. Sur les 8% de gènes suivant la même tendance (généralement une augmentation de l'expression en réponse à l'AR), plusieurs ont été moins efficacement induits dans les BT474 que dans les MCF7, comme par exemple les gènes cibles canoniques *Cyp26A1* et *Btg2*. Cette induction altérée de l'expression de *Cyp26A1* et de *Btg2* par l'AR dans les BT474 a été confirmée par RT-qPCR (Publication 2, Figure 7).

De plus, des expériences de ChIP ont montré que RARα est recruté au niveau du promoteur de ces gènes cibles en réponse à l'AR dans les MCF7, mais que ce recrutement est inefficace voire absent dans les BT474 (Publication 2, Figure 7). Il est important de noter que le laboratoire avait déjà mis en évidence une perte de recrutement au niveau des RARE de *Cyp26A1* et de *Btg2* lorsque le site de phosphorylation du NTD de RARα est muté, confirmant l'importance de la phosphorylation de RARα pour le recrutement de RARα sur l'ADN (Bruck *et al.*, 2009).

La perte de l'induction AR-dépendante de l'expression de certains gènes cibles de RARα dans les BT474 pourrait être expliquée, d'une part, par un défaut de phosphorylation de RARα au niveau de S74 et S77 (voir Section I.III), et d'autre part, par des modifications du phosphoprotéome

bloquant les effets non-génomiques de l'AR et favorisant le maintien de la chromatine dans un état répressif (voir Section I.II.II).

II.I. Dégradation de RARα (Publication 3)

Le laboratoire a précédemment montré que RARα est dégradé en réponse à l'AR (Kopf *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 1999). J'ai confirmé cette observation dans plusieurs lignées cellulaires, comme les MCF7, les MEF et les HeLa (cellules issues d'un cancer du col de l'utérus) (Figure 38). Cette dégradation est abolie en présence d'un inhibiteur du protéasome, le MG132 (Figure 38B, puits 3 et 4), confirmant que RARα est dégradé par celui-ci.

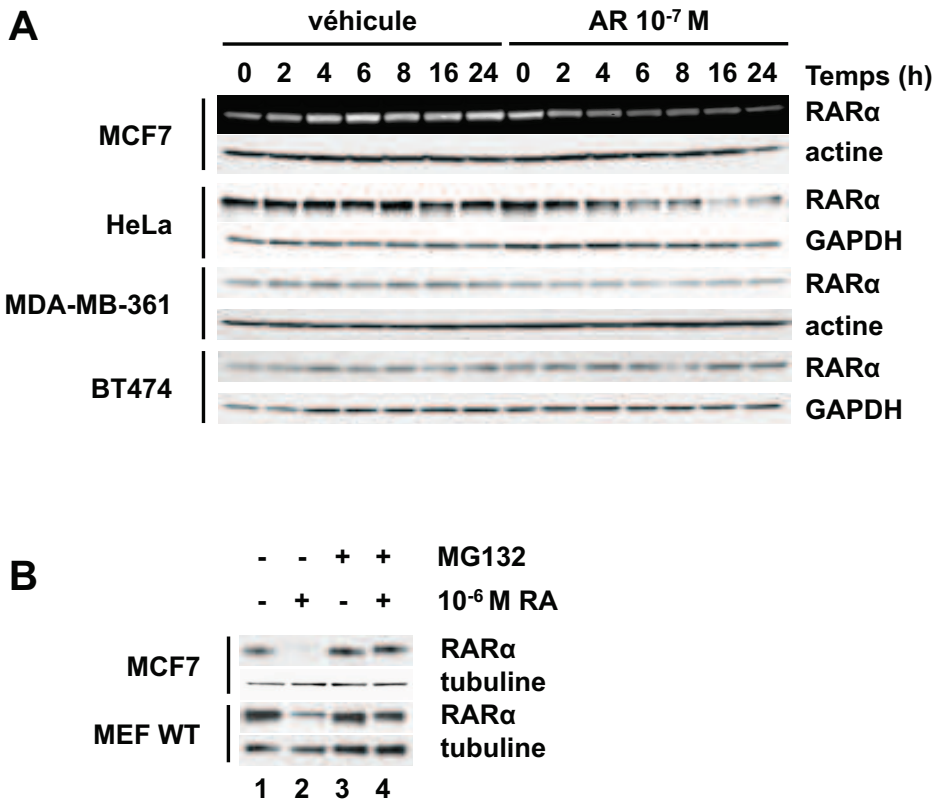


Figure 38: RARα est dégradé par le protéasome en réponse à l'AR.

A) Des cellules MCF7, HeLa, MDA-MB-361 et BT474 ont été traitées à l'AR ou au véhicule durant les temps indiqués, puis les niveaux protéiques de RARα ont été analysés par *immunoblotting*. L'AR induit une baisse des niveaux protéiques RARα dans les MCF7 et les HeLa, mais non dans les MDA-MB-361 et les BT474.

B) Des cellules MCF7 et MEF ont été traitées ± AR et ± MG132, un inhibiteur du protéasome. Dans les deux lignées cellulaires, le MG132 a inhibé la dégradation de RARα en réponse à l'AR.

Cependant, la dégradation n'a pas lieu dans certaines lignées cellulaires, comme les BT474 et les MDA-MB-361, une autre lignée dérivée de tumeur mammaire humaine ERBB2+ (Wilson *et al.*, 2002). Cela suggère que l'intégrité des voies de signalisation des kinases serait requise pour la dégradation de RARα. Une piste d'explication possible pourrait résider dans le fait que la phosphorylation de RARα est nécessaire à son recrutement sur l'ADN et à son activité transcriptionnelle (Bruck *et al.*, 2009). La fonction présumée de la dégradation des RN étant de marquer la fin du signal transcriptionnel, on peut présumer en toute logique qu'elle touche les RN transcriptionnellement actifs et donc aptes à se fixer sur l'ADN. Or, dans les BT474, RARα n'est pas phosphorylé au niveau du NTD en réponse à l'AR (Publication 2 Figure 5C), possiblement en raison de l'absence d'activation de la p38MAPK dans ces cellules. Ce défaut de phosphorylation est corrélé avec un recrutement inefficace du récepteur sur les promoteurs et un défaut d'induction des gènes cibles (Publication 2, Figure 7). L'absence de dégradation dans les BT474 pourrait donc être attribuable au fait que RARα est peu transcriptionnellement actif dans ces cellules en raison d'une absence de recrutement sur l'ADN. Il est d'ailleurs intéressant de noter que certains travaux ont montré que la mutation du DBD au niveau d'un résidu clé requis pour la fixation sur l'ADN empêche la dégradation de RARα (Zhu *et al.*, 1999). Cette observation serait en faveur d'un lien entre la fixation sur l'ADN et la dégradation du récepteur, en cohérence avec mes résultats.

L'absence de dégradation dans les cellules ERBB2+ pourrait également résulter d'autres effets des perturbations des processus de phosphorylation. En effet, la phosphorylation intervient à de multiples niveaux pour réguler la dégradation, notamment en régulant le processus d'ubiquitination (voir Section 6.2.1.3) ou l'activité du protéasome (voir Section 6.2.2.5). Il est donc possible que ces mécanismes soient altérés dans les BT474, bien que nous ne disposons pas de données à ce sujet pour l'instant.

Afin de déterminer si la surexpression de erbB-2 est responsable de l'absence de dégradation de RARα dans les BT474, j'ai analysé la dégradation de RARα dans ces cellules en présence de trastuzumab (Figure 39). Ces résultats montrent que l'inhibition de erbB-2 permet de restaurer la dégradation de RARα dans ces cellules et suggèrent donc que la surexpression de erbB-2 est responsable du blocage de la dégradation de RARα. Il est possible que le trastuzumab restaure la dégradation en rétablissant les effets non-génomiques de l'AR. En effet, erbB-2 active Akt en le phosphorylant au niveau du résidu S473 (Clark *et al.*, 2002; Longva *et al.*, 2005). L'inhibition de erbB-2 par le trastuzumab se traduit par une diminution de cette forme phosphorylée et active d'Akt (pAkt) (Figure 39). Ce faisant, le trastuzumab pourrait permettre de lever l'inhibition induite par Akt sur la voie p38MAPK.

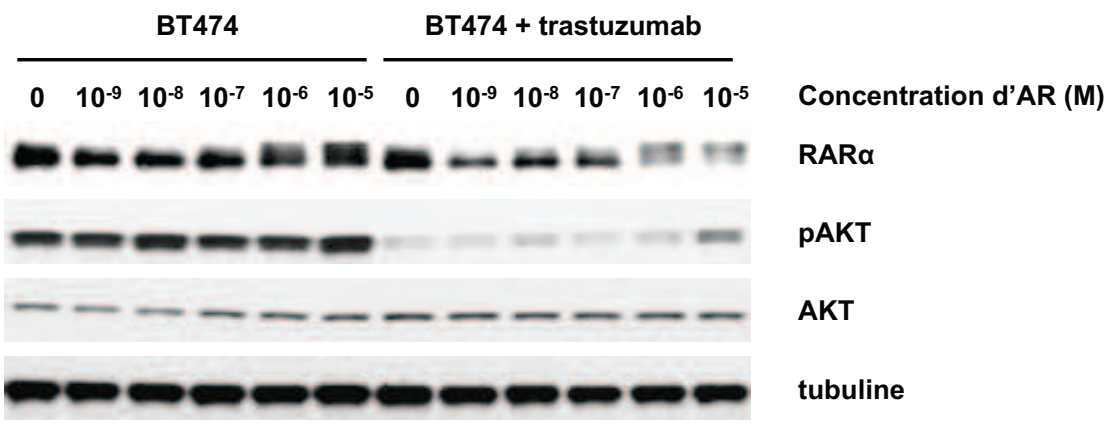


Figure 39: L'inhibition de erbB-2 restaure la dégradation de RARα dans les cellules BT474.

II.I. Conclusion

L'ensemble de ces résultats montrent qu'il existe de nombreuses différences entre les cellules MCF7 ERBB2- et BT474 ERBB2+, relevant du moins en partie de la différence du niveau d'expression de erbB-2. Celles-ci se manifestent au niveau du phosphoprotéome en général et affecte, d'une part, les niveaux de phosphorylations à l'état basal de plusieurs protéines et, d'autre part, l'effet de l'AR sur le niveau de phosphorylation. Les phosphorylations pouvant avoir un impact sur la structure, l'activité et les interactions d'une protéine, des conséquences sur la fonction de plusieurs protéines semblent plausibles.

Ces perturbations affectent également les effets non-génomiques de l'AR et la phosphorylation de RARα. Dans les BT474 où la phosphorylation de RARα est déficiente, en particulier de par l'absence d'induction par l'AR de la double phosphorylation de S74 et S77, RARα n'est pas recruté sur le promoteur de certains gènes cibles canoniques, n'y induit pas la transcription et n'est pas dégradé en réponse à l'AR. Ces résultats suggèrent que l'intégrité des voies de signalisation des kinases serait nécessaire au maintien d'un phosphoprotéome « normal », à la phosphorylation de RARα et à son recrutement sur le promoteur de ses gènes cibles en vue de l'induction de la transcription et finalement de la dégradation de RARα par le protéasome. Ces résultats soulèvent cependant un questionnement quant au mécanisme entourant la dégradation de RARα.

III. MÉCANISME DE LA DÉGRADATION DE RARα (PUBLICATION 3)

Les résultats présentés dans cette section (de même que dans la section II.I) n'ont pas encore été publiés et font l'objet d'un manuscrit en cours de préparation (voir Publication 3).

III.I. Analyse de l'ubiquitination de RARα

Afin de déterminer si la dégradation de RARα se fait de façon dépendante de l'ubiquitination, j'ai analysé la dégradation du récepteur en réponse à l'AR dans des cellules MCF7 et HeLa pré-traitées avec PYR-41, un inhibiteur de l'activité des enzymes E1 (Figure 40). Dans les deux lignées, PYR-41 a bloqué la dégradation de RARα en réponse à l'AR (comparer par exemple les puits 5 et 6 avec les puits 17 et 18). Ce résultat suggère que la dégradation de RARα requiert son ubiquitination préalable. J'ai donc émis l'hypothèse que l'AR induit l'ubiquitination de RARα en vue de sa dégradation.

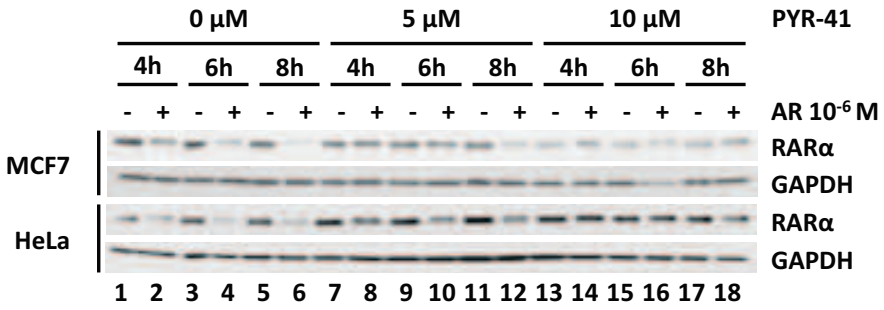


Figure 40: La dégradation de RARα se fait de façon ubiquitination-dépendante.

Des cellules MCF7 et HeLa ont été pré-traitées avec les concentrations indiquées de PYR-41, un inhibiteur des enzymes E1, puis ont été traitées à l'AR pour 4, 6 ou 8h. Le prétraitement au PYR-41 a inhibé la dégradation de RARα dans les deux lignées cellulaires.

Afin de déterminer si RARα est ubiquitiné en réponse à l'AR, j'ai optimisé une méthode de purification des protéines ubiquitinées. Cette méthode est basée sur celle publiée par Tatham *et al.* (2009) et utilise des cellules exprimant de façon stable ou transitoire l'ubiquitine fusionnée à une étiquette poly-histidine (6xHis-Ub). Les protéines ubiquitinées qui ont incorporé l'étiquette 6xHis sont ensuite isolées à l'aide de billes d'agarose chargées en nickel, puis analysées par *immunoblotting* (Figure 41).

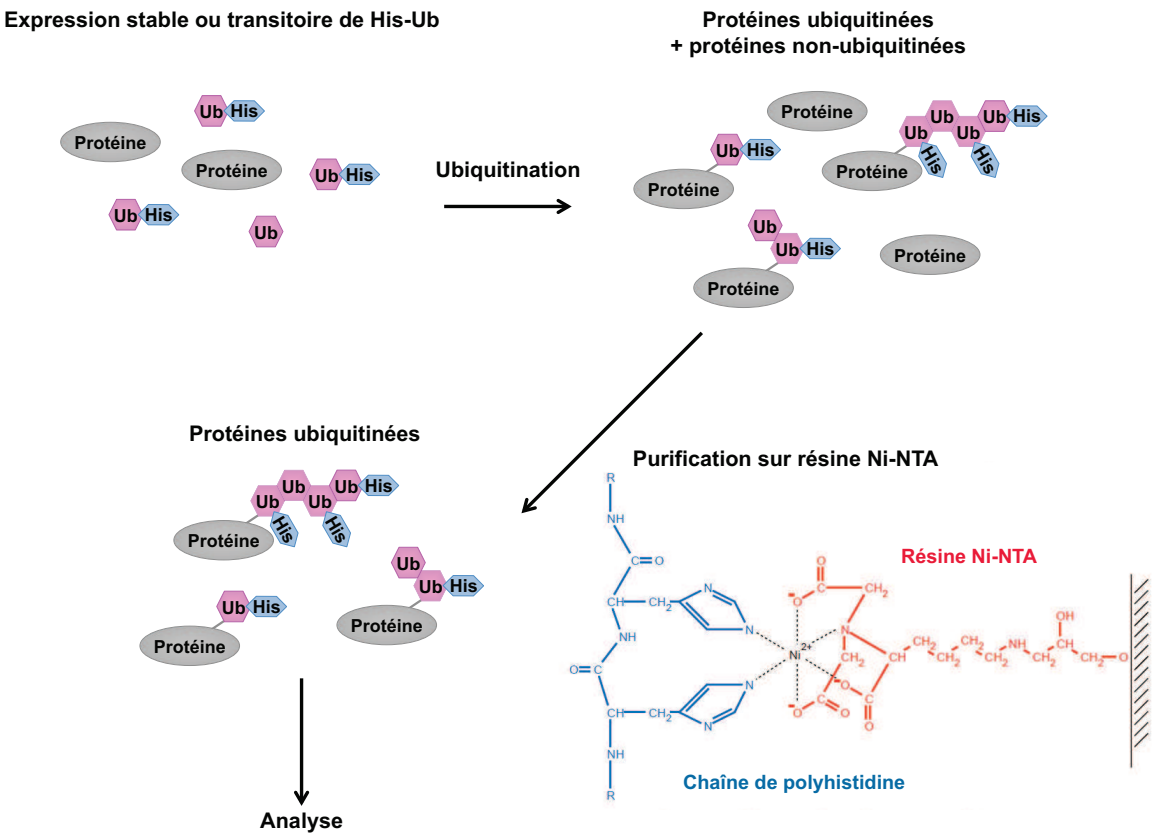


Figure 41: Purification des protéines ubiquitinées à partir de cellules exprimant His-Ub.

Dans des cellules surexprimant de façon stable ou transitoire l'ubiquitine fusionnée à une étiquette polyhistidine (6xHis-Ub), l'ubiquitination induit un marquage des protéines ubiquitinées. L'utilisation de résine Ni-NTA permet de purifier les protéines liées à 6xHis-Ub *via* la forte affinité des ions Ni^{2+} pour les queues de polyhistidines.

J'ai d'abord transfecté des cellules MCF7 de façon transitoire avec le vecteur pIRESpuro2-6xHis-Ub (offert par Dr. Catherine Dargemont (Paris, France)), puis je les ai traitées ± AR et ± MG132, un inhibiteur du protéasome (Figure 42A). Les cellules ont ensuite été lysées avec un tampon dénaturant à base de chlorure de guanidinium, qui permet d'une part d'inhiber l'activité des DUB afin de garder les ubiquitinations intactes, et d'autre part de réduire la fixation de protéines contaminantes lors de la purification (Na et Peng, 2012). La purification de l'ensemble des protéines ubiquitinées a permis l'analyse des formes ubiquitinées de RARα par *immunoblotting*. Suite à l'addition d'AR, j'ai observé l'apparition de formes à plus haut poids moléculaire de la protéine correspondant à des formes ubiquitinées et qui s'accumulent en présence de MG132 (Figure 42A, à droite). Une expérience analogue a été effectuée à l'aide de cellules HeLa exprimant de façon stable 6xHis-Ub (offertes par Dr. Catherine Dargemont) et surexprimant transitoirement RARα. De façon similaire, une accumulation de formes ubiquitinées de RARα est observée en présence de MG132 et

est maximale suite au traitement combiné du MG132 et de l'AR. Ces résultats suggèrent que l'AR induit l'ubiquitination de RARα en vue de sa dégradation. Bien que la masse moléculaire apparente des formes ubiquitinées de RARα suggère la présence de formes polyubiquitinées, le type de chaines de polyubiquitines en question n'a pas été identifié. Afin de vérifier si le type de polyubiquitination induit par l'AR est de nature à promouvoir la dégradation de RARα - la dégradation par le protéasome étant préférentiellement signalée par la présence de chaines de polyubiquitines liées via Lys48 (voir Section 6.2.1.2) - ces expériences auraient pu être effectuées de nouveau en utilisant des cellules exprimant 6xHis-Ub mutée au niveau de Lys48 (Thrower et al., 2000) (T. Wang et al., 2008). La perte des formes polyubiquitinées suite à la mutation aurait alors confirmé la présence de chaines de polyubiquitines liées via Lys48.

III.II. Identification des sites ubiquitinés de RARα

La méthode d'analyse de l'ubiquitination mentionnée précédemment ne donne aucune indication quant au(x) site(s) ciblé(s) par l'ubiquitination. J'ai donc tenté d'identifier le ou les acides aminés ubiquitinés de RARα par une autre méthode.

La méthode d'identification des sites d'ubiquitination la plus couramment utilisée est basée sur la mutagénèse dirigée des résidus lysine, généralement en les remplaçant par des résidus arginine, suivie de l'analyse de l'impact de chaque mutation sur le niveau d'ubiquitination. Cette méthode a cependant plusieurs limitations. En effet, elle peut s'avérer laborieuse, surtout si la protéine d'intérêt contient de nombreuses lysines: l'isoforme humain de RARα1, par exemple, en contient 27. De plus, des redondances fonctionnelles peuvent résulter en l'ubiquitination de sites alternatifs lorsqu'un site préférentiel d'ubiquitination est muté. À l'inverse, une mutation peut inhiber l'ubiquitination d'un autre site en empêchant l'interaction entre le substrat et la E3 ligase, menant à une inhibition de l'ubiquitination même si le résidus muté n'est pas le site d'ubiquitination (Anania *et al.*, 2014).

Pour ces raisons, la MS est une méthode de choix de plus en plus utilisée pour l'identification de sites ubiquitinés. L'identification des sites par cette technique s'est pendant longtemps avérée ardue. En effet, tout comme les phosphorylations, les ubiquitinations sont des modifications de faible stoechiométrie difficilement détectables sans purification préalable. Or, jusqu'à récemment, il n'existait aucune méthode d'enrichissement des peptides ubiquitinés. Les diverses stratégies utilisées pour contourner ce problème (surexpression et purification de la protéine d'intérêt, découpage sur gel de bandes de haut poids moléculaire pouvant correspondre à des formes ubiquitinées de la protéine, etc...), lorsqu'elles sont possibles, ne suffisent pas toujours à atteindre le degré de sensibilité requis.

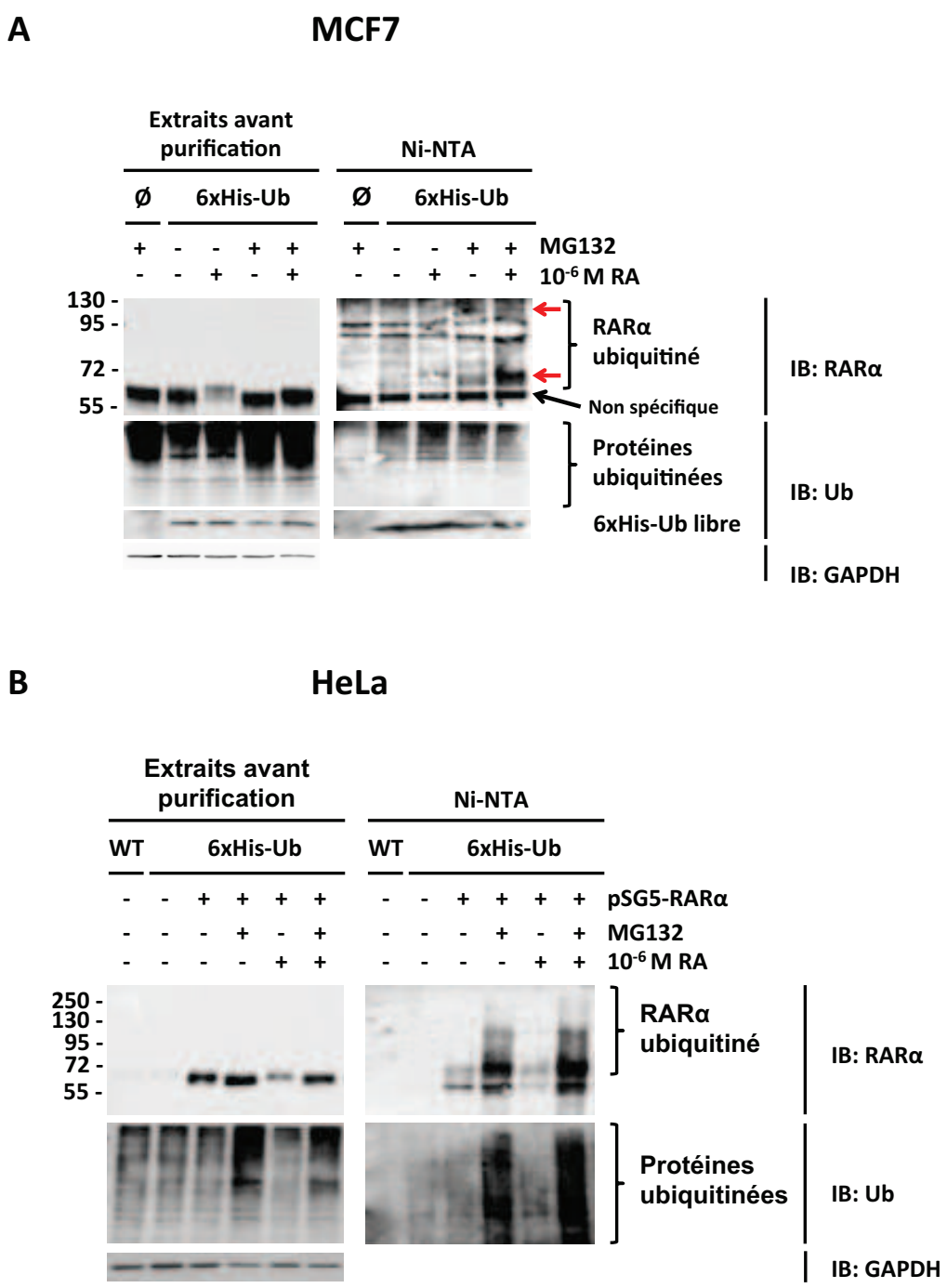


Figure 42: RARα est ubiquitiné en réponse à l'AR.

A) Des cellules MCF7 ont été transfectées de façon transitoire avec le vecteur pIRESpuro2-6xHis-Ub et traitées ± 10^{-6} M AR et ± 10 µM MG132 durant 6h. Le contrôle sans vecteur est identifié "ø". Les extraits après purification des protéines ubiquitinées (Ni-NTA, à droite) montrent une accumulation de RARα ubiquitiné en présence de MG132 et d'AR.

B) Des cellules HeLa exprimant 6x His-Ub de façon stable et surexprimant RARα de façon transitoire ont été traitées ± 10^{-6} M AR et ± 10 µM MG132 durant 3h avant purification et analyse des protéines ubiquitinées comme en "A". Des HeLa WT ont été utilisées comme contrôle négatif de la purification.

Depuis peu, la purification de peptides ubiquitinés est devenue possible grâce à la génération d'anticorps reconnaissant le motif K-ε-GG. En effet, la digestion à la trypsine laisse un fragment résiduel diglycyl (ou Gly-Gly) sur le groupement amine ε de la lysine où était ancrée l'ubiquitine, formant un motif K-ε-GG. Ainsi, les peptides qui en sont porteurs peuvent être enrichis grâce à ces anticorps et analysés par MS. Le fragment Gly-Gly caractéristique peut ainsi être détecté et localisé sur la séquence peptidique (Figure 43) (Udeshi *et al.*, 2013). L'avènement de cette récente stratégie a permis l'identification de sites d'ubiquitination auparavant indétectables par MS faute d'enrichissement. Cette méthode ne permet cependant pas de discriminer entre mono- et poly-ubiquitination, puisque seul le motif Gly-Gly de l'ubiquitine demeure après digestion. De plus, certaines modifications de type ubiquitine comme Nedd8 ou ISG15 peuvent engendrer après digestion à la trypsine un motif K-ε-GG indiscernable de celui de l'ubiquitine. Bien que ces modifications soient peu fréquentes, il convient néanmoins de valider les potentiels sites d'ubiquitination par une méthode alternative (Kim *et al.*, 2011).

Les publications parues jusqu'à présent citent l'utilisation de cette méthode pour des analyses de l'ubiquitinome. J'ai tenté de combiner cette méthode à la purification de RARα à grande échelle afin d'identifier le ou les sites d'ubiquitination de RAR. À cette fin, j'ai utilisé des cellules MCF7 traitées à l'AR et/ou au MG132 à partir desquelles j'ai immunoprécipité RARα comme décrit précédemment pour l'analyse de la phosphorylation. Les éluats totaux obtenus ont été soumis à une digestion à la trypsine afin de purifier les peptides à motif Gly-Gly. Malheureusement, aucun peptide attribué à RARα et portant le motif Gly-Gly n'a pu être détecté. Cependant, des peptides à motif Gly-Gly appartenant à d'autres protéines co-immunoprécipitées avec RARα ont été détectées, suggérant l'existence d'un problème de détection et non de purification. Il est possible que les peptides RARα à motif Gly-Gly, s'il y en avait, aient été en quantité trop faible pour être détectés. Il est également possible que les ubiquitinations se trouvent hors de la séquence couverte, car dans le cas de RARα, la trypsine ne permet la détection que d'environ 50% de la séquence, avec notamment une très faible couverture de la région N-terminale. Finalement, tel que mentionné précédemment, la présence de modifications post-traductionnelles peut entraver la digestion protéique. Dans le cas de la trypsine, la présence d'ubiquitines sur un résidu lysine empêche le clivage en C-terminal de ce résidu (Kirkpatrick *et al.*, 2005). De plus, le clivage tryptique est inhibé en présence d'un résidu Ser ou Thr phosphorylé situé à une distance de un à trois acides aminés du site de clivage (Boehm *et al.*, 2012; Thiede *et al.*, 2000; Winter *et al.*, 2009).

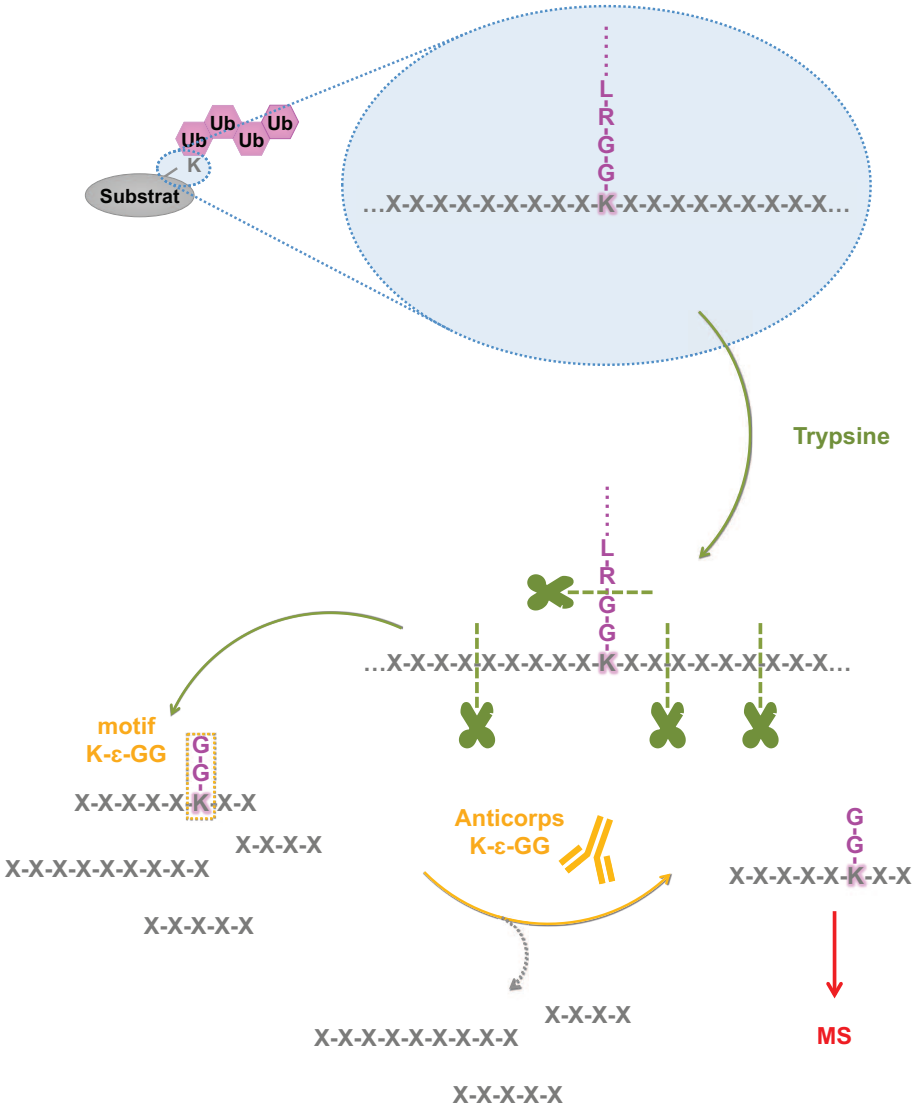


Figure 43: Identification des sites d'ubiquitination par MS.

Une ubiquitine ancrée sur le groupement amine ε d'une lysine laisse après digestion à la trypsine un fragment résiduel Gly-Gly, formant ainsi un motif K-ε-GG. L'utilisation d'un anticorps reconnaissant ce motif permet l'enrichissement des peptides porteurs du fragment Gly-Gly, puis leur analyse par MS.

III.III. Rôle des corégulateurs non-conventionnels

La dégradation de RARα dépend de l'intégrité du domaine de recrutement des coactivateurs (voir Section 3.1.2). Certains coactivateurs non-conventionnels ont un rôle répresseur et sont associés à des activités ubiquitine-ligase, comme PRAME et TRIM24 (voir Sections 3.4.2 et 4.1.1) (Costessi *et al.*, 2011; Jain *et al.*, 2014). J'ai donc tenté de déterminer si ces deux corégulateurs jouent un rôle dans la dégradation de RARα.

- Rôle de PRAME

L'analyse des niveaux d'expression endogènes de PRAME dans diverses lignées cellulaires a révélé que cette protéine n'est pas exprimée dans la plupart des types cellulaires (Figure 44A), conformément à ce qui est rapporté dans la littérature (Epping et Bernards, 2006)(Costessi et al., 2011; Yin, 2011). En effet, parmi les lignées cellulaires testées, seules les cellules leucémiques K562

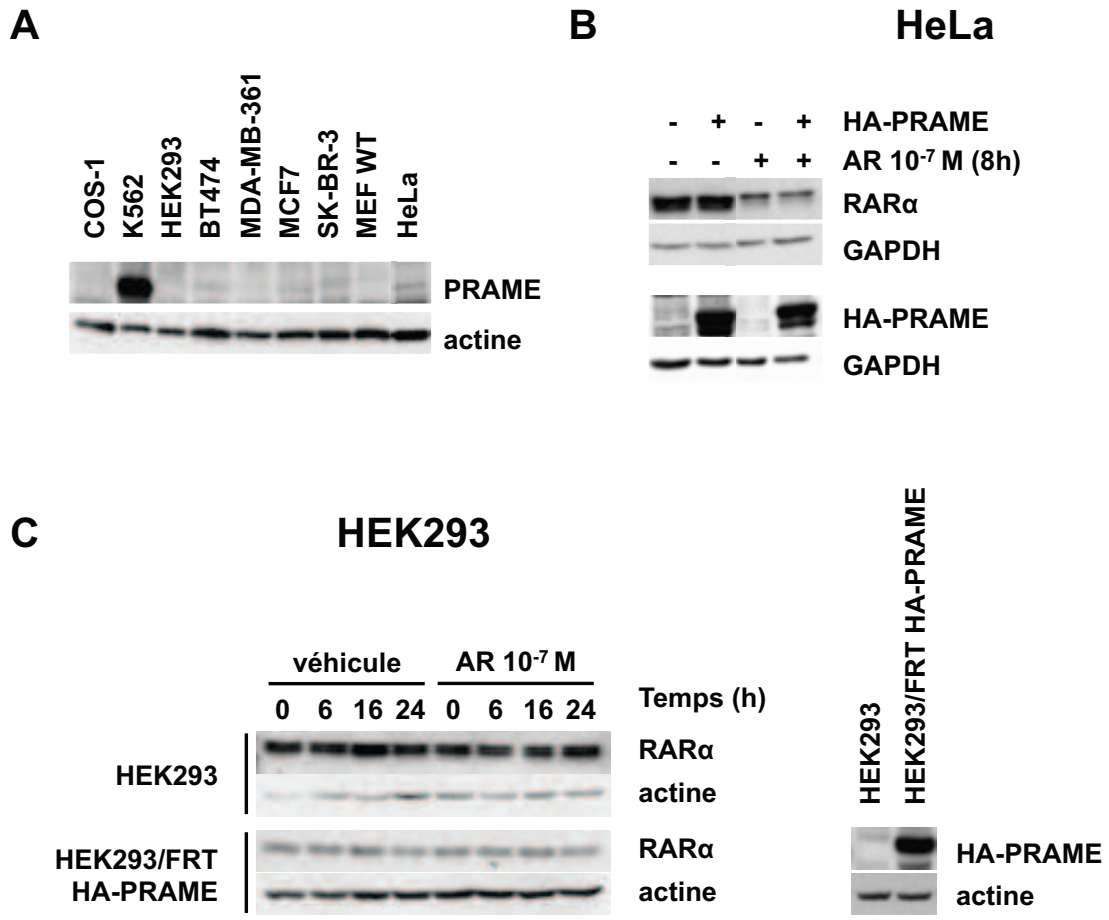


Figure 44: PRAME n'est pas impliqué dans la dégradation de RARα.

A) Niveaux protéiques endogènes de PRAME dans diverses lignées cellulaires: les COS-1 (cellules dérivées de rein de singe), les cellules leucémiques K562, les cellules embryonnaires humaines de rein HEK293, les cellules de tumeurs mammaires humaines BT474, MDA-MB-361 et SK-BR-3, les MEF et les HeLa. Seules les cellules K562 expriment PRAME à un niveau substantiel.

B) La surexpression transitoire de HA-PRAME dans les cellules HeLa n'a pas d'effet sur la dégradation de RARα.

C) RARα n'est pas dégradé en réponse à l'AR dans les cellules HEK293, ni dans les cellules HEK293/FRT surexprimant HA-PRAME de façon stable.

expriment un niveau notable de PRAME. Ce constat semble donc exclure un rôle général de PRAME dans la dégradation de RARα.

J'ai néanmoins vérifié si, lorsqu'il est présent, PRAME peut avoir un impact dur la dégradation RARα. Dans un premier temps, j'ai surexprimé PRAME fusionné à une étiquette HA (hémagglutinine) (HA-PRAME) dans des cellules HeLa afin d'évaluer les éventuelles conséquences sur la dégradation de RARα (Figure 44B). RARα est cependant dégradé en réponse à l'AR avec la même intensité avec ou sans la présence de PRAME. Dans les cellules embryonnaires humaines de rein HEK293, RARα n'est pas dégradé en réponse à l'AR pour une raison inconnue (Figure 44C). Dans une lignée similaire surexprimant HA-PRAME (HEK293/FRT HA-PRAME, offertes par Joan Conaway (Kansas City, Missouri, États-Unis)), RARα n'est pas davantage dégradé. PRAME ne semble donc pas impliqué dans la régulation de la dégradation de RARα.

- Rôle de TRIM24

Contrairement à PRAME, TRIM24 est exprimé de façon ubiquitaire (Figure 45A). Afin de déterminer s'il est impliqué dans la dégradation de RARα, j'ai utilisé des MEF invalidés pour ce facteur. La comparaison de la dégradation de RARα en réponse à l'AR dans les MEF WT et MEF TRIM24-/- (Figure 45B) montre que l'efficacité de la dégradation est grandement diminuée dans les MEF TRIM24-/-, suggérant un rôle pour TRIM24 dans la dégradation de RARα.

III.I. TRIM24 interagit avec RARα et est recruté avec RARα aux RARE en réponse à l'AR.

Dans des expériences de co-immunoprécipitation, j'ai montré que TRIM24 et RARα interagissent dans le noyau et que cette interaction augmente en réponse à l'AR (Figure 46C, puits 4, 6 et 8). La quantité de RARα co-immunoprécipité augmente après 1h de traitement à l'AR (Figure 46C, puit 6), puis diminue après 3h de traitement au moment où la dégradation de RARα débute (Figure 46C, puit 8).

De plus, dans des expériences de ChIP-qPCR, j'ai montré que TRIM24 est recruté au niveau des RARE de *Btg2* et *Cyp26a1* dans les MCF7 (Figure 47 A1, B1, C1, A2, B2). Un recrutement similaire a été observé dans des MEF (non illustré). De plus, le recrutement de TRIM24 a lieu en même temps que celui de RARα est dépendant de celui-ci (Figure 47 A2, B2). En effet, aucun recrutement de TRIM24 n'est observé suite au *knockdown* de RARα par des siRNA spécifiques (Figure 47 A2, B2). Cependant, dans les BT474, ni RARα ni TRIM24 ne sont recrutés (Figure 47 A4, B4, C4).

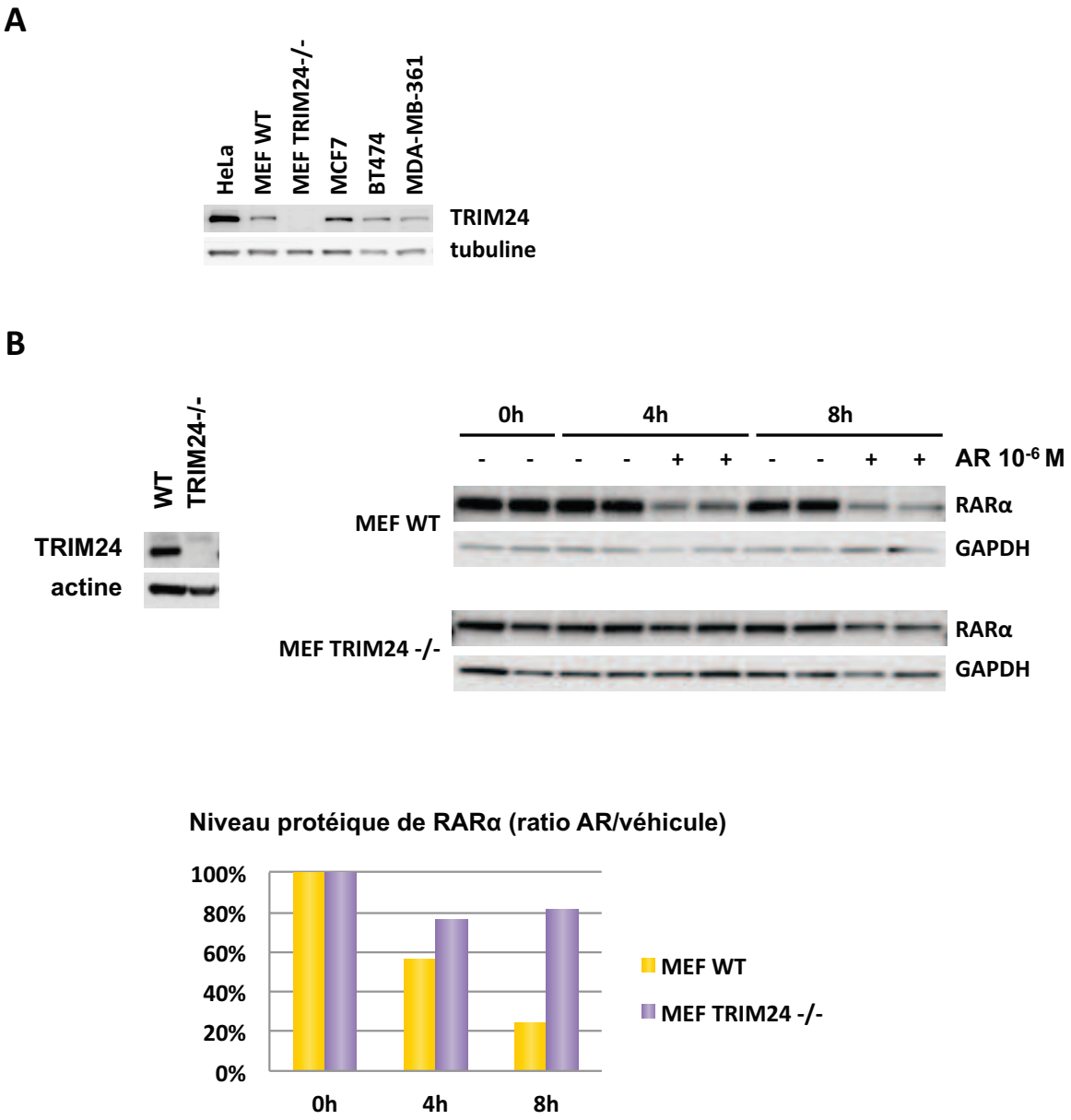


Figure 45: TRIM24 est impliqué dans la dégradation de RARα.

A) Niveaux protéiques endogènes de TRIM24 dans les MCF7, HeLa, MDA-MB-361, BT474, MEF WT et MEF TRIM24-/-.

B) Des MEF WT et TRIM24-/- ont été traitées durant 2 à 24 heures avec l'AR ou le véhicule. Les *immunoblottings* et la quantification de leurs bandes montrent une dégradation de RARα déficiente dans les MEF TRIM24-/-.

III.I. TRIM24 n'est pas impliqué dans le recrutement du protéasome.

Des expériences de ChIP-qPCR ont également montré que deux sous-unités du protéasome, PSMD1 (appartenant au complexe régulateur 19S) et PSMB5 (appartenant au cœur catalytique 20S)

Figure 46: TRIM24 interagit avec RARα en réponse à l'AR.

Immunoprécipitation (IP) de TRIM24 à partir d'extraits cytosoliques (C) et nucléaires (N) provenant de cellules MCF7 traitées à l'AR durant les temps indiqués. Les *immunoblottings* (IB) montrent la présence de RARα co-immunoprécipité dans les extraits nucléaires avec une interaction maximale après 1h de traitement.

sont recrutées au niveau des RARE des gènes *CYP26A1* et *Btg2* dans les MCF7 en même temps que RARα et TRIM24 (Figure 47 A3, B3, C3). Elles ne sont cependant pas recrutées suite au knockdown de RARα, suggérant que le protéasome n'est recruté sur les promoteurs des gènes cibles de RARα qu'en présence du récepteur. Comme TRIM24 et le protéasome sont tous deux recrutés sur l'ADN, j'ai émis l'hypothèse que TRIM24 serait le médiateur pour le recrutement du protéasome.

Il est à noter qu'il n'y a aucun recrutement de RARα, de TRIM24 ou du protéasome dans les BT474 (Figure 47 A4, B4, C4). Cela est cohérent avec le fait que RARα présente un défaut de phosphorylation dans ces cellules. Le RARα non phosphorylé des BT474 n'est donc pas recruté sur l'ADN, d'où l'absence de recrutement de TRIM24 et du protéasome sur l'ADN et donc l'absence de dégradation.

Dans l'éventualité d'un rôle de TRIM24 dans le recrutement du protéasome, j'ai tout d'abord émis l'hypothèse qu'il jouerait un rôle d'échafaudage. J'ai donc entrepris de déterminer s'il fait partie des complexes protéiques associés au protéasome 26S. Pour ce faire, j'ai eu recours à une méthode d'isolement des protéasomes (*Proteasome Isolation Kit* (Calbiochem)) basée sur l'utilisation de billes d'agarose auxquelles a été couplée la Glutathion S-transférase (GST) fusionnée à un domaine *ubiquitin-like* (UbL). Ce domaine UbL, qui provient de la protéine RAD23B, est capable d'interagir directement avec le protéasome 26S *via* la sous-unité Rpn10 du complexe régulateur 19S (Hiyama *et al.*, 1999). L'utilisation de billes d'agarose GST-UbL permet donc l'isolement de protéasomes entiers et biologiquement actifs de même que des protéines qui lui sont associées.

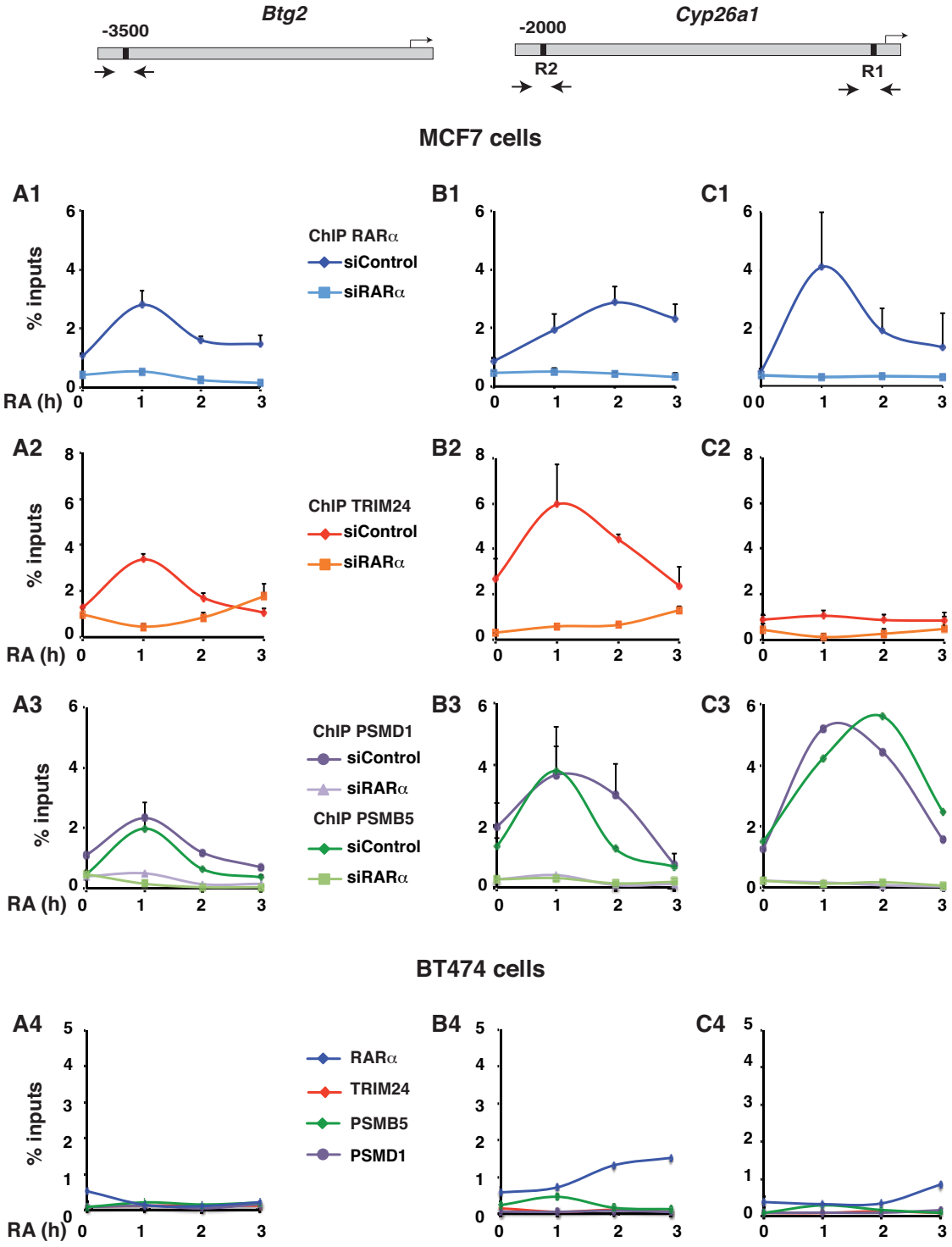


Figure 47: Analyse par ChIP-qPCR du recrutement de RARα, TRIM24, PSMD1 et PSMB5 sur les promoteurs des gènes *Btg2* et *Cyp26a1* dans les MCF7 et les BT474.

Le recrutement au niveau du promoteur de *Btg2* (A) et du promoteur distal (B) et proximal (C) de *Cyp26a1* montre le recrutement de RARα, TRIM24, PSMD1 et PSMB5 dans les MCF7. Le recrutement de TRIM24 et du protéasome est dépendant de celui de RARα. Aucun recrutement n'est observé dans les BT474.

L'application de cette méthode à des extraits de cellules MCF7 traitées par l'AR durant 0, 1, 2, 3 ou 4 heures a révélé la présence de sous-unités du protéasome comme SUG1 ainsi que la présence de RARα (Figure 48A). De plus, la quantité de RARα associée au protéasome augmente en réponse à l'AR, en accord avec le fait que la dégradation de RARα est induite par l'AR. Cependant, TRIM24 n'a pas pu être détecté dans les complexes associés au protéasome. La même expérience a été effectuée avec des MEF WT et des MEF TRIM24-/- (Figure 48B). Le résultat obtenu avec les MEF WT est très similaire à celui des MCF7. Dans le cas des cellules TRIM24 -/-, la quantité de RARα associée au protéasome n'a pas varié en réponse à l'AR, ce qui semble cohérent avec le fait que RARα est dégradé moins efficacement dans ces cellules. Globalement, ces résultats suggèrent que TRIM24 ne forme pas de complexe avec RARα et le protéasome, et donc qu'il ne participe pas directement au recrutement du protéasome.

III.I.I. TRIM24 : un rôle dans la déubiquitination RARα?

TRIM24 a une activité E3 ubiquitine ligase et son implication dans l'ubiquitination et la dégradation d'autres protéines est maintenant bien établie. J'ai donc émis l'hypothèse que TRIM24 pourrait permettre le recrutement du protéasome *via* l'induction d'une ubiquitination de RARα donnant le signal à la reconnaissance par le protéasome. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai analysé l'état d'ubiquitination de RARα dans des MEF WT et TRIM24-/- en réponse à l'AR et au MG132. J'ai ensuite lysé les cellules et purifié l'ensemble des protéines ubiquitinées avec le kit UbiQapture®-Q dans le but d'analyser le RARα ubiquitiné par *immunoblotting*. De façon surprenante, l'état d'ubiquitination de RARα en réponse à l'AR combiné au MG132 était grandement supérieur dans les MEF TRIM24-/- par rapport aux MEF WT (Figure 49, puits 4 et 7). Ces résultats semblent suggérer que TRIM24 n'est pas impliqué dans l'ubiquitination de RARα. Cependant, l'utilisation de cellules exprimant TRIM24 amputé de son domaine RING (TRIM24ΔRING), domaine conférant à TRIM24 son activité E3 ubiquitine ligase, aurait permis d'exclure définitivement un rôle de TRIM24 dans l'ubiquitination de RARα (Allton *et al.*, 2009).

Dans l'éventualité où un rôle TRIM24 dans l'ubiquitination de RARα serait exclu, une possibilité serait qu'il soit plutôt impliqué dans un processus de déubiquitination (voir Section 6.2.1.4). Il convient de rappeler que la déubiquitination est une étape nécessaire à la dégradation. En effet, certaines études ont suggéré que la présence de chaines de polyubiquitines causerait un encombrement stérique empêchant la translocation du substrat à l'intérieur du canal du protéasome, faisant de la déubiquitination une étape requise à la translocation du substrat et donc à sa dégradation (voir Sections 6.2.1.4 et 6.2.2.3) (Verma *et al.*, 2002; Yao et Cohen, 2002). Bien que le protéasome possède une certaine activité déubiquitinase intrinsèque *via* sa sous-unité PSMD14 (voir

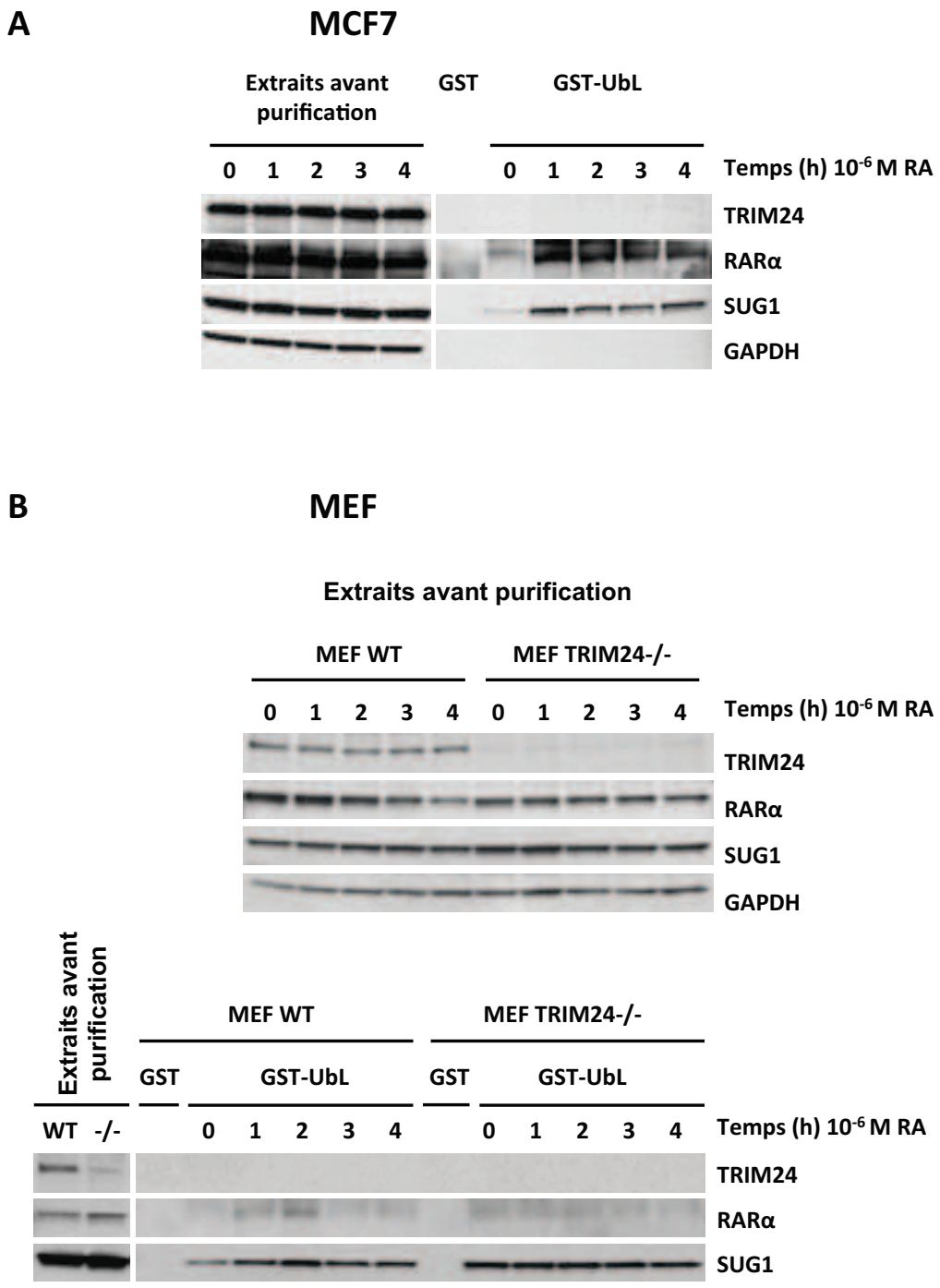


Figure 48: TRIM24 n'est pas impliqué dans le recrutement du protéasome.

A) Des cellules MCF7 ou **B)** des MEF WT et TRIM24-/- ont été traitées à l'AR durant 0, 1, 2, 3, ou 4 heures, lysées, puis les protéasomes 26S ont été isolés à l'aide de billes d'agarose GST-UbL. Les immunoblottings révèlent que RARα, mais non TRIM24, est copurifié avec le protéasome dans les MCF7 et les MEF WT, et plus faiblement dans les MEF TRIM24-/-. L'interaction entre RARα et le protéasome augmente en réponse à l'AR dans les MCF7 et les MEF WT, mais non dans les MEF TRIM24-/-. SUG1, une sous-unité du complexe régulateur 19S, est ici utilisé comme contrôle de la purification du protéasome.

Section 6.2.2.2), plusieurs études suggèrent que l'intervention d'autres DUB puisse être nécessaire à la déubiquitination complète et à la dégradation de certains substrats (Amerik et Hochstrasser, 2004; Borodovsky *et al.*, 2001; Guterman et Glickman, 2004a; Guterman et Glickman, 2004b; Holzl *et al.*, 2000; Lam *et al.*, 1997; Leggett *et al.*, 2002; T. Li *et al.*, 2000; Maytal-Kivity *et al.*, 2002; Papa *et al.*, 1999).

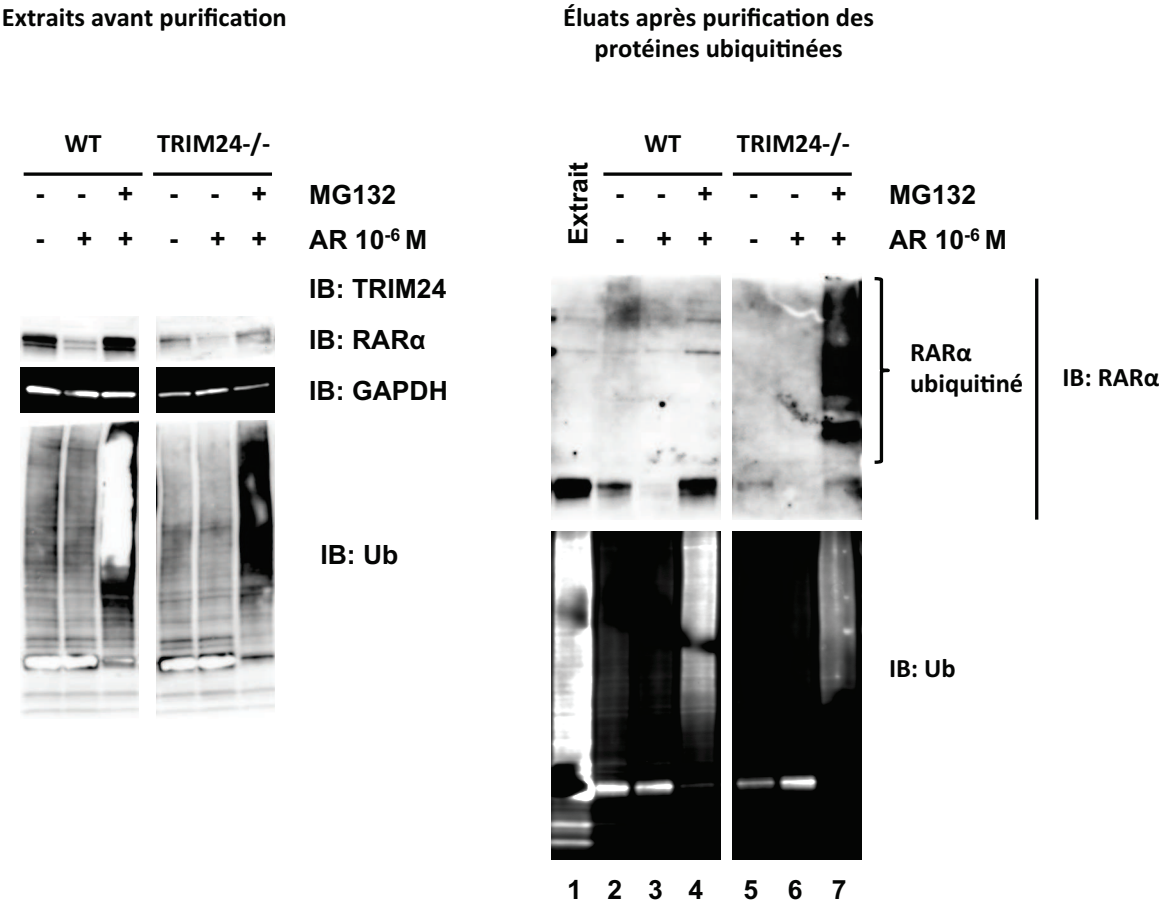


Figure 49: La suppression de TRIM24 augmente l'état d'ubiquitination de RARα.

Des cellules MEF WT et TRIM24-/- ont été traitées à l'AR avec ou sans MG132 durant 6h avant purification des protéines ubiquitinées et analyse par *immunoblotting* (IB) avec les anticorps indiqués. La suppression de TRIM24 favorise l'apparition de formes ubiquitinées de RARα en réponse à l'AR et au MG132.

Puisque TRIM24 n'a aucune activité déubiquitinase rapportée jusqu'à présent, j'ai émis l'hypothèse qu'il puisse agir en recrutant des DUB. Il est intéressant de noter que lors d'expériences d'immunoprécipitation de TRIM24 suivie de l'identification des partenaires co-immunoprécipités par

MS, j'ai pu identifier plusieurs DUB. Lors d'une première expérience préliminaire de mise au point effectuée à partir de cellules MCF7 non traitées, l'éluat a été déposé sur SDS-PAGE et plusieurs bandes de gel contenant des protéines de 100 à 200 KDa, localisées après coloration au nitrate d'argent, ont été découpées et analysées pour en identifier la composition. Cette expérience visait en premier lieu à vérifier la présence de TRIM24 et sa détectabilité par MS, mais elle a tout de même permis d'identifier une panoplie de protéines co-immunoprécipitées de masse moléculaire similaire à TRIM24 (Tableau 6). Parmi celles-ci, plusieurs DUB ont été identifiées, incluant notamment USP7 et USP32 qui fûrent détectées avec des nombres de PSM élevés.

DUB	Masse moléculaire (kDa)	∑PSM MCF7
Bap1	95	12
USP7	128	80
USP8	130	8
USP9X	220	15
USP10	105	4
USP20	120	2
USP28	122	2
USP32	182	58
USP36	123	3
USP40	140	8
USP43	123	7
USP47	158	14
USP48	119	7

Tableau 6: DUB associées à TRIM24 dans les MCF7.

De plus, dans d'autres expériences d'immunoprécipitation de TRIM24 suivie de l'identification des partenaires co-immunoprécipités par MS, j'ai pu comparer les partenaires présents dans les MCF7 et les BT474 avec ou sans traitement à l'AR. L'analyse MS, bien qu'effectuée à partir d'éluats totaux et donc moins sensible, a permis d'identifier trois DUB (Tableau 7). Leur absence du contrôle négatif d'immunoprécipitation effectué avec des immunoglobulines non-spécifiques suggère qu'il s'agit de signal spécifique. Parmi ces DUB, USP7 a été détectée dans les cellules MCF7 traitées à l'AR et non dans les cellules BT474. Finalement, une analyse des partenaires de RARα par MS à partir de cellules MCF7 a également révélé la présence de DUB dont USP7

DUB	∑PSM MCF7 -AR	∑PSM MCF7 +AR	∑PSM BT474 -AR	∑PSM BT474 +AR
USP3	3	3	0	3
USP7	0	3	0	0
USP10	3	5	0	0

Tableau 7: DUB associées à TRIM24 dans les MCF7 et les BT474.

(Tableau 8). Bien que ces résultats requièrent davantage de validation, ils suggèrent d'intéressantes pistes de recherche pour l'étude d'une éventuelle association de TRIM24 avec une ou des DUB dans le contexte de la dégradation de RARα.

DUB	∑PSM MCF7
UCHL5	2
USP7	6
USP10	7
USP36	6

Tableau 8: DUB associées à RARα dans les MCF7.

Dans ce contexte, il est intéressant de noter qu'une étude récente a rapporté qu'une autre enzyme E3 ligase de la famille TRIM, TRIM27, s'associe avec la DUB USP7 pour former un complexe à fonction ubiquitination/déubiquitination (Zaman et al., 2013). En effet, TRIM27 ubiquitinerait USP7 et cette ubiquitination serait nécessaire à USP7 pour déubiquitiner sa cible, la protéine RIP1 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1) dans le cas présent. On peut donc imaginer que ce nouveau concept puisse également s'appliquer à TRIM24, et donc que TRIM24 soit impliqué dans des activités de déubiquitination, *via* le recrutement d'une DUB, en lien avec la dégradation de RARα.

Plusieurs rapports faisant état d'associations entre DUB et RN ont récemment émergé dans la littérature : USP17/RORγt (L. Han *et al.*, 2014), USP7/PPARγ (K. W. Lee *et al.*, 2013a), USP12/récepteur des androgènes (Burska *et al.*, 2013) et OTUB1/ERα (Stanisic *et al.*, 2009). Il est vrai que dans ces exemples, la déubiquitination permet de stabiliser les RN en inhibant leur dégradation. Cela semble à priori contraire à notre hypothèse d'une déubiquitination favorisant la dégradation de RARα. Cependant, il est possible que selon le contexte, la déubiquitination puisse favoriser ou défavoriser la dégradation des RN. En effet, les DUB peuvent avoir des modes d'actions variés : elles peuvent interagir avec les E3 ubiquitines ligases et en réguler l'activité, altérer le niveau d'ubiquitination d'une protéine, hydrolyser et remodeler les ubiquitinations préexistantes sur un substrat, agir localement de façon à altérer la localisation d'un substrat dans la cellule ou agir directement au niveau du protéasome pour faciliter ou inhiber la protéolyse (Eletr et Wilkinson, 2014). Il est donc possible que selon le RN, la DUB, le moment de la déubiquitination (avant ou après la reconnaissance par le protéasome, notamment) et toute une autre panoplie d'autres facteurs, la déubiquitination se solde par un effet différent sur la dégradation du RN.

III.II. Conclusion

Les résultats présentés dans cette section suggèrent que la dégradation de RARα est un mécanisme ubiquitination-dépendant et protéasome-dépendant faisant intervenir TRIM24. Puisque mes données suggèrent que TRIM24 serait associé à des activités déubiquitinases *via* le recrutement

d'une DUB, la baisse d'efficacité de dégradation de RARα observée dans les MEF TRIM24-/- pourrait relever d'un défaut de déubiquitination de RARα.

IV. BILAN

Les travaux effectués antérieurement au laboratoire ont permis d'établir qu'en plus de se fixer aux RAR pour réguler l'association et la dissociation des corégulateurs, l'AR active des cascades de kinases qui phosphorylent RARα et diverses cibles (facteurs de transcription, corégulateurs, histones, facteurs de traduction...). Le laboratoire a suggéré que l'ensemble de ces phosphorylations coopèreraient pour permettre le recrutement de RARα au niveau des promoteurs des gènes cibles et l'initiation de la transcription (Figure 50).

Un tel modèle suggère l'existence d'un lien entre les processus de phosphorylation et la fixation de RARα sur l'ADN. Mes travaux de thèse, dont un des intérêts majeurs vient des nouvelles approches technologiques utilisées, semblent en accord avec ce modèle. En effet, j'ai effectué une analyse phosphoprotéomique comparative par spectrométrie de masse de cellules dérivées de tumeurs mammaires humaines résistantes (BT474, ERBB2+) ou sensibles (MCF7, ERBB2-) à l'AR. Il s'agit de la première caractérisation à l'échelle protéomique des processus de phosphorylation régulés par l'AR dans des cellules de cancer du sein. Mes résultats ont montré que la surexpression de erbB-2 des BT474 est associée à des altérations du phosphoprotéome global. Ces perturbations du phosphoprotéome se manifestent non seulement à l'état basal, mais également dans les phosphorylations induites ou inhibées par l'AR. Elles corrèlent avec un dysfonctionnement des effets non-génomiques de l'AR de même qu'avec un état de phosphorylation altéré de plusieurs kinases, facteurs de transcription et protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. De plus, en effectuant la première caractérisation des sites de phosphorylation de la protéine RARα endogène par spectrométrie de masse, j'ai identifié deux nouveaux sites de phosphorylation, S36 et S74, et j'ai mis en évidence un important défaut de phosphorylation de RARα au niveau de S74 et S77 en réponse à l'AR dans les BT474. Dans ces cellules, un recrutement inefficace du récepteur au niveau du promoteur de ses gènes cibles a été observé, en association avec un défaut de l'activité transcriptionnelle de RARα. Bien que mes analyses ne reposent à ce stade que sur des corrélations, mes résultats soutiennent l'hypothèse d'un rôle crucial des mécanismes de phosphorylations dans la régulation transcriptionnelle RARα-dépendante.

Le laboratoire a également suggéré que RARα serait dégradé par le protéasome à la fin du signal transcriptionnel. Mes données semblent confirmer le rôle de la dégradation à titre de signal d'arrêt de la transcription. En effet, dans les cellules BT474 où RARα n'est pas phosphorylé en réponse à l'AR, ne se lie pas sur l'ADN et n'est pas ou peu transcriptionnellement actif, RARα n'est

pas dégradé. Ces données semblent donc lier la phosphorylation du récepteur, sa fixation sur l'ADN et son activité transcriptionnelle à sa dégradation. De plus, j'ai montré que dans les cellules MCF7 où RARα est transcriptionnellement actif et dégradé en réponse à l'AR, le protéasome est recruté au niveau des promoteurs des gènes cibles de RARα en présence du récepteur. Ce recrutement du protéasome n'a pas lieu dans les cellules BT474. L'intervention du protéasome au niveau de l'ADN est donc en accord avec l'hypothèse d'une dégradation ciblant les récepteurs actifs au niveau transcriptionnel.

Finalement, mes travaux de thèse ont apporté des éclaircissements quant au mécanisme entourant la dégradation de RARα. J'ai montré que la dégradation de RARα est un processus ubiquitination-dépendant, faisant vraisemblablement intervenir l'action d'une E3 ubiquitine-ligase non identifiée à ce jour qui serait impliquée dans la polyubiquitination de RARα. Cette polyubiquitination permettrait la reconnaissance de RARα par le protéasome puis sa dégradation, mettant ainsi fin au signal transcriptionnel induit par l'AR et libérant les éléments de réponse qui redeviendraient disponibles en vue d'un éventuel nouveau cycle de transcription (Figure 50). De façon intéressante, mes travaux de thèse montrent pour la première fois un rôle de TRIM24 dans le processus de dégradation de RARα. Mes données montrent que comme le protéasome, TRIM24 est recruté sur les promoteurs des gènes cibles en présence de RARα dans les cellules MCF7 et non dans les BT474. Le mécanisme d'action de TRIM24 représente une des nouveautés majeures de mes travaux. En effet, mes données suggèrent que malgré son activité E3 ubiquitine-ligase, TRIM24 ne serait pas impliqué dans l'ubiquitination de RARα mais plutôt dans le recrutement de DUB (Figure 50). Celles-ci déubiquitineraient RARα (ou réguleraient sa dégradation par un autre mécanisme). En absence de TRIM24, l'action des DUB serait donc abrogée, empêchant la dégradation de RARα qui s'accumulerait sous des formes polyubiquitinées. Le mécanisme d'action d'éventuelles DUB recrutées par TRIM24 demeure cependant à éclaircir.

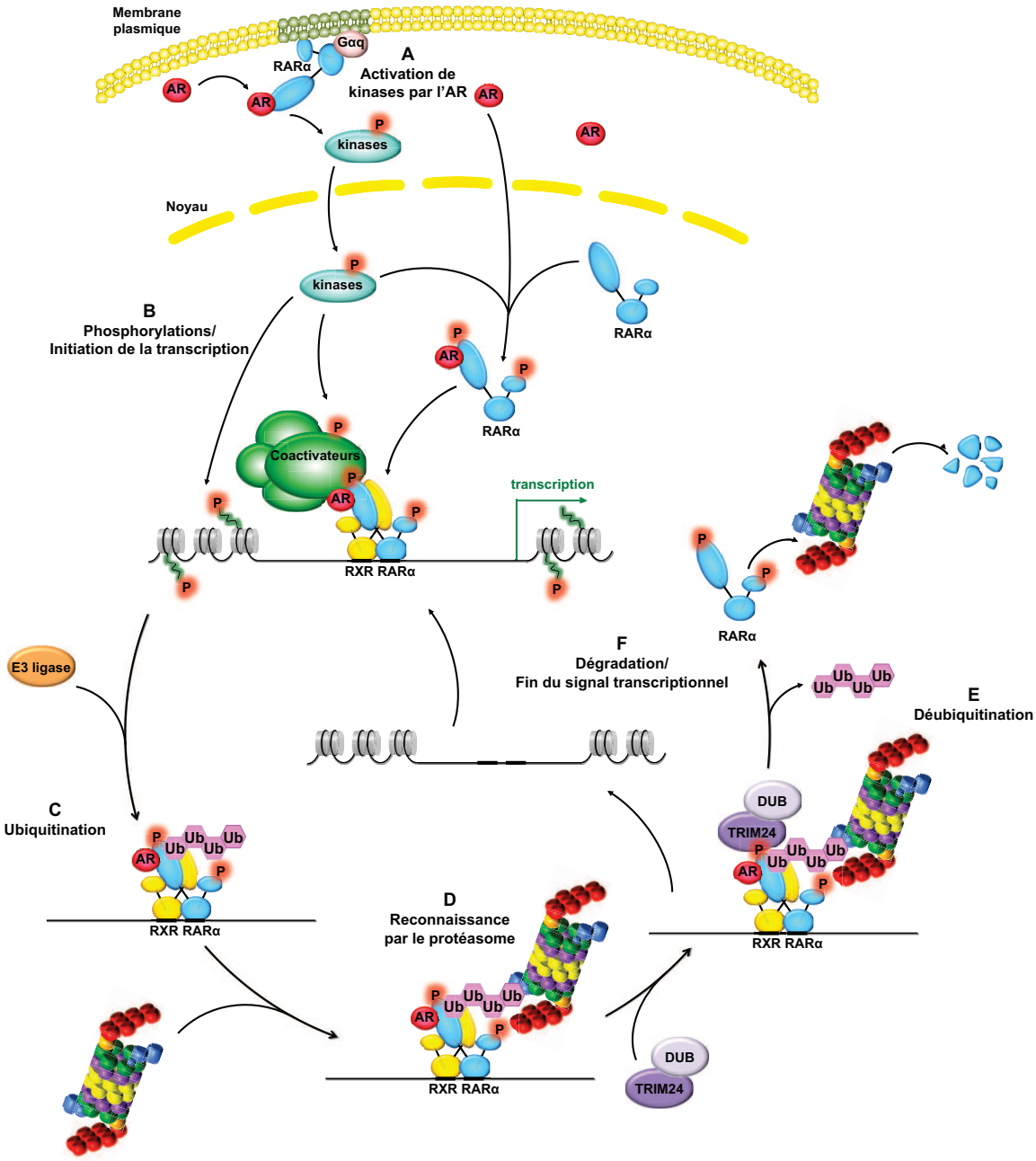


Figure 50: Modèle du mécanisme de la dégradation de RARα.

Via ses effets non-génomiques extranucléaires, l'AR active des kinases (A) qui migrent dans le noyau et phosphorylent RARα, de même que les corégulateurs et les histones (B). L'ensemble de ces phosphorylations convergent pour permettre la décompaction de la chromatine et le recrutement de RARα sur les éléments de réponse de ses gènes cibles afin d'initier la transcription. Une enzyme E3 ligase non identifiée à ce jour procède ensuite à l'ubiquitination de RARα (C), donnant le signal qui permet la reconnaissance de RARα par le protéasome (D). Le recrutement de TRIM24, *via* une association présumée avec une DUB, permet la déubiquitination RARα (E) et ainsi sa dégradation par le protéasome (F). Les éléments de réponse redeviennent ainsi libres en vue de l'initiation d'un nouveau cycle de transcription.

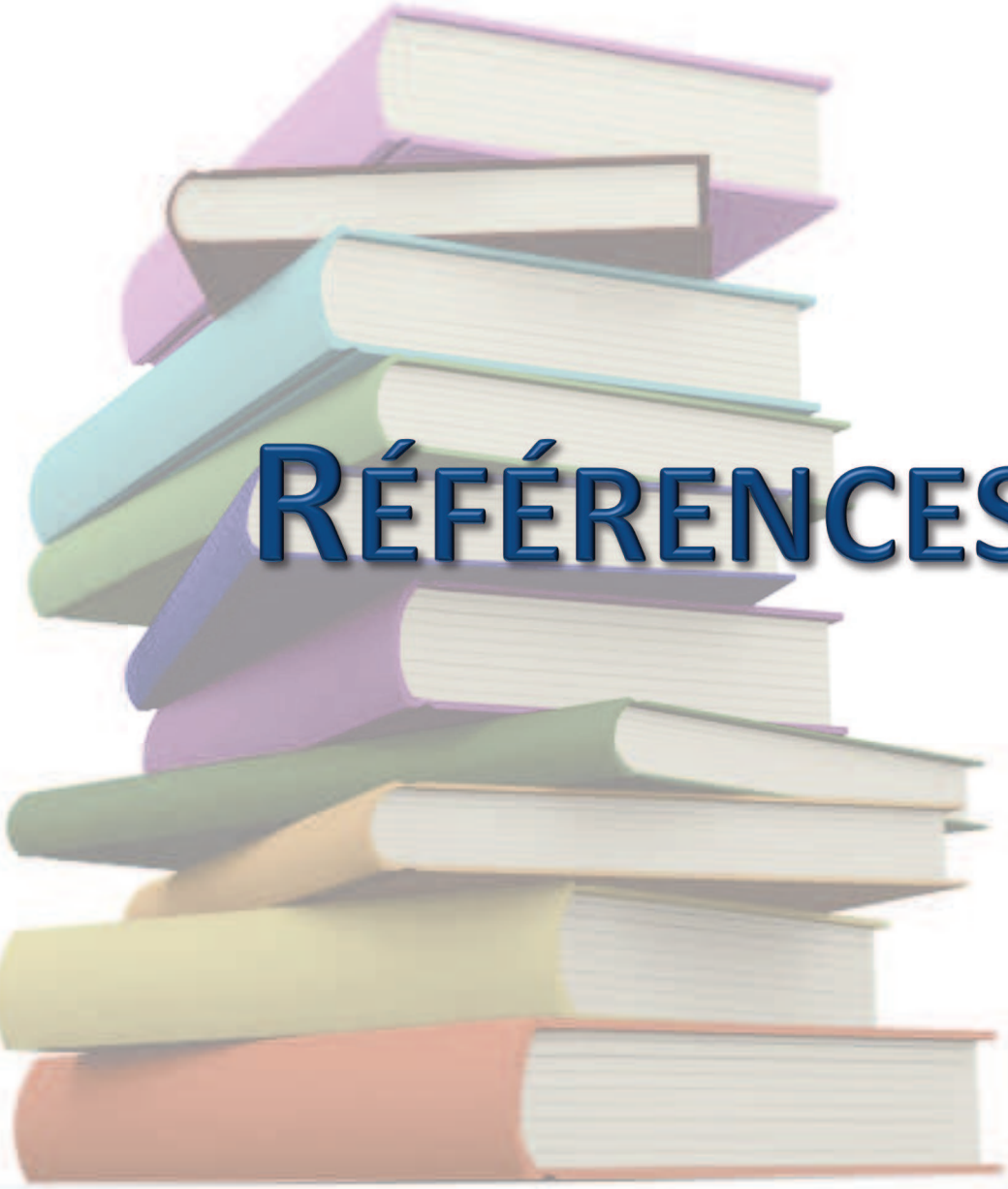
V. PERSPECTIVES

L'ensemble des résultats obtenus pendant ma thèse soulève de nombreuses questions. D'une part, j'ai identifié deux nouveau sites de phosphorylation de RARα: S36 et S74. Un travail de caractérisation sera nécessaire afin d'éclaircir leur fonction et d'identifier la kinase responsable de ces phosphorylations.

De plus, j'ai mis en évidence un rôle inattendu de TRIM24: d'une part, son rôle dans la dégradation de RARα, et d'autre part, son implication dans des activités déubiquitinases. Le rôle de TRIM24 dans la déubiquitination de RARα représente un nouveau concept ouvrant de nombreuses perspectives de recherches au sujet de la régulation de la dégradation des RAR. Bien que plusieurs de mes données suggèrent l'association de TRIM24 avec une ou plusieurs DUB, l'éventuelle DUB qui serait recrutée par TRIM24 et qui déubiquitinerait RARα en vue de sa dégradation demeure à identifier. Mes données préliminaires de spectrométrie de masse suggèrent que USP7 ou USP32 pourraient être des candidates intéressantes. Des expériences sont en cours afin de déterminer si elles pourraient jouer un rôle dans la déubiquitination et/ou la dégradation de RARα. Ces expériences visent à analyser l'effet de siRNA ciblant USP7 ou USP32, de même que l'effet d'un inhibiteur de USP7, le P22077, sur l'ubiquitination de RARα et sa dégradation (Altun *et al.*, 2011). Des expériences d'isolement du protéasome sont également prévues afin de déterminer si l'une ou l'autre de ces enzymes est associée au protéasome.

Dans l'éventualité où un rôle de USP7 et USP32 semblerait exclu, l'utilisation de banques de siRNA ciblant les différentes DUB, méthode à laquelle le laboratoire a déjà eu recours, pourrait être une bonne stratégie pour identifier la DUB impliquée dans la dégradation de RARα (Ferry et al., 2011). Une fois identifiée, il serait intéressant d'analyser l'expression et la fonction de cette DUB dans les lignées cellulaires où RARα n'est pas dégradé en réponse à l'AR afin de déterminer si l'absence de dégradation peut dans certains cas être due à un défaut de déubiquitination.

Finalement, l'identification de l'enzyme E3 ligase responsable de l'ubiquitination de RARα pourrait être effectuée par une méthode similaire. De même, le ou les résidus ciblés par l'ubiquitination restent à déterminer.



RÉFÉRENCES

Aasland, R., Gibson, T. J. et Stewart, A. F. (1995). The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci, 20*(2), 56-59.

Adam-Stitah, S., Penna, L., Chambon, P. et Rochette-Egly, C. (1999). Hyperphosphorylation of the retinoid X receptor alpha by activated c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem, 274*(27), 18932-18941.

Agricola, E., Randall, R. A., Gaarenstroom, T., Dupont, S. et Hill, C. S. (2011). Recruitment of TIF1gamma to chromatin via its PHD finger-bromodomain activates its ubiquitin ligase and transcriptional repressor activities. *Mol Cell, 43*(1), 85-96.

Al Tanoury, Z., Gaouar, S., Piskunov, A., Ye, T., Urban, S., Jost, B., Keime, C., Davidson, I., Dierich, A. et Rochette-Egly, C. (2014). Phosphorylation of the retinoic acid receptor RARgamma2 is crucial for the neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci, 127*(Pt 9), 2095-2105.

Al Tanoury, Z., Piskunov, A. et Rochette-Egly, C. (2013). Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. *J Lipid Res, 54*(7), 1761-1775.

Allton, K., Jain, A. K., Herz, H. M., Tsai, W. W., Jung, S. Y., Qin, J., Bergmann, A., Johnson, R. L. et Barton, M. C. (2009). Trim24 targets endogenous p53 for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A, 106*(28), 11612-11616.

Almasan, A., Mangelsdorf, D. J., Ong, E. S., Wahl, G. M. et Evans, R. M. (1994). Chromosomal localization of the human retinoid X receptors. *Genomics, 20*(3), 397-403.

Alsayed, Y., Uddin, S., Mahmud, N., Lekmine, F., Kalvakolanu, D. V., Minucci, S., Bokoch, G. et Platanias, L. C. (2001). Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to all-trans-retinoic acid. *J Biol Chem, 276*(6), 4012-4019.

Altucci, L. et Gronemeyer, H. (2001). The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer, 1*(3), 181-193.

Altun, M., Kramer, H. B., Willems, L. I., McDermott, J. L., Leach, C. A., Goldenberg, S. J., Kumar, K. G., Konietzny, R., Fischer, R., Kogan, E., Mackeen, M. M., McGouran, J., Khoronenkova, S. V., Parsons, J. L., Dianov, G. L., Nicholson, B. et Kessler, B. M. (2011). Activity-based chemical proteomics accelerates inhibitor development for deubiquitylating enzymes. *Chem Biol, 18*(11), 1401-1412.

Amerik, A. Y. et Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta, 1695*(1-3), 189-207.

Amin, D. N., Perkins, A. S. et Stern, D. F. (2004). Gene expression profiling of ErbB receptor and ligand-dependent transcription. *Oncogene, 23*(7), 1428-1438.

Anania, V. G., Pham, V. C., Huang, X., Masselot, A., Lill, J. R. et Kirkpatrick, D. S. (2014). Peptide level immunoaffinity enrichment enhances ubiquitination site identification on individual proteins. *Mol Cell Proteomics, 13*(1), 145-156.

Andersson, L. et Porath, J. (1986). Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe3+) affinity chromatography. *Anal Biochem, 154*(1), 250-254.

Andrau, J. C., van de Pasch, L., Lijnzaad, P., Bijma, T., Koerkamp, M. G., van de Peppel, J., Werner, M. et Holstege, F. C. (2006). Genome-wide location of the coactivator mediator: Binding without activation and transient Cdk8 interaction on DNA. *Mol Cell, 22*(2), 179-192.

Aoto, J., Nam, C. I., Poon, M. M., Ting, P. et Chen, L. (2008). Synaptic signaling by all-trans retinoic acid in homeostatic synaptic plasticity. *Neuron, 60*(2), 308-320.

Aranda, A. et Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev, 81*(3), 1269-1304.

Ardley, H. C. et Robinson, P. A. (2005). E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem, 41*, 15-30.

Ariazi, E. A., Kraus, R. J., Farrell, M. L., Jordan, V. C. et Mertz, J. E. (2007). Estrogen-related receptor alpha1 transcriptional activities are regulated in part via the ErbB2/HER2 signaling pathway. *Mol Cancer Res, 5*(1), 71-85.

Arteaga, C. L. et Engelman, J. A. (2014). ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell, 25*(3), 282-303.

Auld, K. L., Brown, C. R., Casolari, J. M., Komili, S. et Silver, P. A. (2006). Genomic association of the proteasome demonstrates overlapping gene regulatory activity with transcription factor substrates. *Mol Cell, 21*(6), 861-871.

Bai, X., Kim, J., Yang, Z., Jurynec, M. J., Akie, T. E., Lee, J., LeBlanc, J., Sessa, A., Jiang, H., DiBiase, A., Zhou, Y., Grunwald, D. J., Lin, S., Cantor, A. B., Orkin, S. H. et Zon, L. I. (2010). TIF1gamma controls erythroid cell fate by regulating transcription elongation. *Cell, 142*(1), 133-143.

Bain, D. L., Heneghan, A. F., Connaghan-Jones, K. D. et Miura, M. T. (2007). Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu Rev Physiol, 69*, 201-220.

Bajorek, M. et Glickman, M. H. (2004). Keepers at the final gates: regulatory complexes and gating of the proteasome channel. *Cell Mol Life Sci, 61*(13), 1579-1588.

Balmer, J. E. et 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*(5), 347-354.

Bao, L., Kimzey, A., Sauter, G., Sowadski, J. M., Lu, K. P. et Wang, D. G. (2004). Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers. *Am J Pathol, 164*(5), 1727-1737.

Barlow, P. N., Luisi, B., Milner, A., Elliott, M. et Everett, R. (1994). Structure of the C3HC4 domain by 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. A new structural class of zinc-finger. *J Mol Biol, 237*(2), 201-211.

Bastien, J., Adam-Stitah, S., Plassat, J. L., Chambon, P. et Rochette-Egly, C. (2002). The phosphorylation site located in the A region of retinoic X receptor alpha is required for the antiproliferative effect of retinoic acid (RA) and the activation of RA target genes in F9 cells. *J Biol Chem, 277*(32), 28683-28689.

Bastien, J., Adam-Stitah, S., Riedl, T., Egly, J. M., Chambon, P. et Rochette-Egly, C. (2000). TFIIH interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7. *J Biol Chem, 275*(29), 21896-21904.

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

Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. et Seemuller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell, 92*(3), 367-380.

Benaroudj, N. et Goldberg, A. L. (2000). PAN, the proteasome-activating nucleotidase from archaebacteria, is a protein-unfolding molecular chaperone. *Nat Cell Biol, 2*(11), 833-839.

Benbrook, D., Lernhardt, E. et Pfahl, M. (1988). A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma. *Nature, 333*(6174), 669-672.

Benbrook, D. M., Chambon, P., Rochette-Egly, C. et Asson-Batres, M. A. (2014). History of retinoic Acid receptors. *Subcell Biochem, 70*, 1-20.

Benedict, C. M., Ren, L. et Clawson, G. A. (1995). Nuclear multicatalytic proteinase alpha subunit RRC3: differential size, tyrosine phosphorylation, and susceptibility to antisense oligonucleotide treatment. *Biochemistry, 34*(29), 9587-9598.

Berndsen, C. E. et Wolberger, C. (2014). New insights into ubiquitin E3 ligase mechanism. *Nat Struct Mol Biol, 21*(4), 301-307.

Berry, D. C. et Noy, N. (2007). Is PPARbeta/delta a Retinoid Receptor? *PPAR Res, 2007*, 73256.

Biddie, S. C., John, S. et Hager, G. L. (2010). Genome-wide mechanisms of nuclear receptor action. *Trends Endocrinol Metab, 21*(1), 3-9.

Bielska, A. A. et Zondlo, N. J. (2006). Hyperphosphorylation of tau induces local polyproline II helix. *Biochemistry, 45*(17), 5527-5537.

Biesalski, H. K., Chichili, G. R., Frank, J., von Lintig, J. et Nohr, D. (2007). Conversion of beta-carotene to retinal pigment. *Vitam Horm, 75*, 117-130.

Bird, A. P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature, 321*(6067), 209-213.

Blomhoff, R. et Blomhoff, H. K. (2006). Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol, 66*(7), 606-630.

Blomhoff, R., Helgerud, P., Rasmussen, M., Berg, T. et Norum, K. R. (1982). In vivo uptake of chylomicron [3H]retinyl ester by rat liver: evidence for retinol transfer from parenchymal to nonparenchymal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A, 79*(23), 7326-7330.

Blume-Jensen, P. et Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature, 411*(6835), 355-365.

Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C. et Huber, R. (1999). The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct, 28*, 295-317.

Boehm, M. E., Seidler, J., Hahn, B. et Lehmann, W. D. (2012). Site-specific degree of phosphorylation in proteins measured by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Proteomics, 12*(13), 2167-2178.

Borden, K. L. (2000). RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol, 295*(5), 1103-1112.

Borden, K. L. et Freemont, P. S. (1996). The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr Opin Struct Biol, 6*(3), 395-401.

Borel, P., Lietz, G., Goncalves, A., Szabo de Edelenyi, F., Lecompte, S., Curtis, P., Goumidi, L., Caslake, M. J., Miles, E. A., Packard, C., Calder, P. C., Mathers, J. C., Minihane, A. M., Tourniaire, F., Kesse-Guyot, E., Galan, P., Hercberg, S., Breidenassel, C., Gonzalez Gross, M., Moussa, M., Meirhaeghe, A. et Reboul, E. (2013). CD36 and SR-BI are involved in cellular uptake of provitamin A carotenoids by Caco-2 and HEK cells, and some of their genetic variants are associated with plasma concentrations of these micronutrients in humans. *J Nutr, 143*(4), 448-456.

Borodovsky, A., Kessler, B. M., Casagrande, R., Overkleeft, H. S., Wilkinson, K. D. et Ploegh, H. L. (2001). A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14. *Embo j, 20*(18), 5187-5196.

Bose, S., Brooks, P., Mason, G. G. et Rivett, A. J. (2001). gamma-Interferon decreases the level of 26 S proteasomes and changes the pattern of phosphorylation. *Biochem J, 353*(Pt 2), 291-297.

Bose, S., Mason, G. G. et Rivett, A. J. (1999). Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells. *Mol Biol Rep, 26*(1-2), 11-14.

Bose, S., Stratford, F. L., Broadfoot, K. I., Mason, G. G. et Rivett, A. J. (2004). Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon. *Biochem J, 378*(Pt 1), 177-184.

Bour, G., Gaillard, E., Bruck, N., Lalevee, S., Plassat, J. L., Busso, D., Samama, J. P. et Rochette-Egly, C. (2005a). Cyclin H binding to the RARalpha activation function (AF)-2 domain directs phosphorylation of the AF-1 domain by cyclin-dependent kinase 7. *Proc Natl Acad Sci U S A, 102*(46), 16608-16613.

Bour, G., Lalevee, S. et Rochette-Egly, C. (2007). Protein kinases and the proteasome join in the combinatorial control of transcription by nuclear retinoic acid receptors. *Trends Cell Biol, 17*(6), 302-309.

Bour, G., Plassat, J. L., Bauer, A., Lalevee, S. et Rochette-Egly, C. (2005b). Vinexin beta interacts with the non-phosphorylated AF-1 domain of retinoid receptor gamma (RARgamma) and represses RARgamma-mediated transcription. *J Biol Chem, 280*(17), 17027-17037.

Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. et Moras, D. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature, 375*(6530), 377-382.

Bourguet, W., Vivat, V., Wurtz, J. M., Chambon, P., Gronemeyer, H. et Moras, D. (2000). Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. *Mol Cell, 5*(2), 289-298.

Brand, N., Petkovich, M., Krust, A., Chambon, P., de The, H., Marchio, A., Tiollais, P. et Dejean, A. (1988). Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature, 332*(6167), 850-853.

Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P. M., Finley, D. et Schmidt, M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol, 1*(4), 221-226.

Brelivet, Y., Kammerer, S., Rochel, N., Poch, O. et Moras, D. (2004). Signature of the oligomeric behaviour of nuclear receptors at the sequence and structural level. *EMBO Rep, 5*(4), 423-429.

Brewis, I. A. et Brennan, P. (2010). Proteomics technologies for the global identification and quantification of proteins. *Adv Protein Chem Struct Biol, 80*, 1-44.

Brondani, V., Schefer, Q., Hamy, F. et Klimkait, T. (2005). The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 regulates phospho-Ser77 retinoic acid receptor alpha stability. *Biochem Biophys Res Commun, 328*(1), 6-13.

Bruck, N., Vitoux, D., Ferry, C., Duong, V., Bauer, A., de The, H. et Rochette-Egly, C. (2009). A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RARalpha to target promoters. *Embo j, 28*(1), 34-47.

Budhu, A. S. et 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*(8), 2632-2641.

Bunch, H., Zheng, X., Burkholder, A., Dillon, S. T., Motola, S., Birrane, G., Ebmeier, C. C., Levine, S., Fargo, D., Hu, G., Taatjes, D. J. et Calderwood, S. K. (2014). TRIM28 regulates RNA polymerase II promoter-proximal pausing and pause release. *Nat Struct Mol Biol, 21*(10), 876-883.

Burska, U. L., Harle, V. J., Coffey, K., Darby, S., Ramsey, H., O'Neill, D., Logan, I. R., Gaughan, L. et Robson, C. N. (2013). Deubiquitinating enzyme Usp12 is a novel co-activator of the androgen receptor. *J Biol Chem, 288*(45), 32641-32650.

Bushue, N. et Wan, Y. J. (2010). Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev, 62*(13), 1285-1298.

Carracedo, A. et Pandolfi, P. P. (2008). The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene, 27*(41), 5527-5541.

Carrano, A. C., Eytan, E., Hershko, A. et Pagano, M. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol, 1*(4), 193-199.

Carthagena, L., Bergamaschi, A., Luna, J. M., David, A., Uchil, P. D., Margottin-Goguet, F., Mothes, W., Hazan, U., Transy, C., Pancino, G. et Nisole, S. (2009). Human TRIM gene expression in response to interferons. *PLoS One, 4*(3), e4894.

Chambon, M., Orsetti, B., Berthe, M. L., Bascoul-Mollevi, C., Rodriguez, C., Duong, V., Gleizes, M., Thenot, S., Bibeau, F., Theillet, C. et Cavailles, V. (2011). Prognostic significance of TRIM24/TIF-1alpha gene expression in breast cancer. *Am J Pathol, 178*(4), 1461-1469.

Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J, 10*(9), 940-954.

Chatagnon, A., Veber, P., Morin, V., Bedo, J., Triqueneaux, G., Semon, M., Laudet, V., d'Alche-Buc, F. et Benoit, G. (2015). RAR/RXR binding dynamics distinguish pluripotency from differentiation associated cis-regulatory elements. *Nucleic Acids Res, 43*(10), 4833-4854.

Chaube, R. (2014). Absolute quantitation of post-translational modifications. *Front Chem, 2*, 58.

Chebaro, Y., Amal, I., Rochel, N., Rochette-Egly, C., Stote, R. H. et Dejaegere, A. (2013). Phosphorylation of the retinoic acid receptor alpha induces a mechanical allosteric regulation and changes in internal dynamics. *PLoS Comput Biol, 9*(4), e1003012.

Chen, J. D. et Evans, R. M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature, 377*(6548), 454-457.

Chen, J. D., Umesono, K. et Evans, R. M. (1996a). SMRT isoforms mediate repression and anti-repression of nuclear receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A, 93*(15), 7567-7571.

Chen, N. et Napoli, J. L. (2008). All-trans-retinoic acid stimulates translation and induces spine formation in hippocampal neurons through a membrane-associated RARalpha. *FASEB J, 22*(1), 236-245.

Chen, P. et Hochstrasser, M. (1996). Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell, 86*(6), 961-972.

Chen, P. H., Shih, C. M., Chang, W. C., Cheng, C. H., Lin, C. W., Ho, K. H., Su, P. C. et Chen, K. C. (2014). MicroRNA-302b-inhibited E2F3 transcription factor is related to all trans retinoic acid-induced glioma cell apoptosis. *J Neurochem, 131*(6), 731-742.

Chen, Z., Tong, J. H., Dong, S., Zhu, J., Wang, Z. Y. et Chen, S. J. (1996b). Retinoic acid regulatory pathways, chromosomal translocations, and acute promyelocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer, 15*(3), 147-156.

Choudhary, C. et Mann, M. (2010). Decoding signalling networks by mass spectrometry-based proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol, 11*(6), 427-439.

Ciechanover, A. et Stanhill, A. (2014). The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome. *Biochim Biophys Acta, 1843*(1), 86-96.

Clagett-Dame, M. et DeLuca, H. F. (2002). The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annu Rev Nutr, 22*, 347-381.

Clagett-Dame, M. et Knutson, D. (2011). Vitamin A in reproduction and development. *Nutrients, 3*(4), 385-428.

Clark, A. S., West, K., Streicher, S. et Dennis, P. A. (2002). Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther, 1*(9), 707-717.

Clarke, N., Germain, P., Altucci, L. et Gronemeyer, H. (2004). Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. *Expert Rev Mol Med, 6*(25), 1-23.

Cohen, R. N., Brzostek, S., Kim, B., Chorev, M., Wondisford, F. E. et Hollenberg, A. N. (2001). The specificity of interactions between nuclear hormone receptors and corepressors is mediated by distinct amino acid sequences within the interacting domains. *Mol Endocrinol, 15*(7), 1049-1061.

Cohen, R. N., Putney, A., Wondisford, F. E. et Hollenberg, A. N. (2000). The nuclear corepressors recognize distinct nuclear receptor complexes. *Mol Endocrinol, 14*(6), 900-914.

Collins, G. A. et Tansey, W. P. (2006). The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr Opin Genet Dev, 16*(2), 197-202.

Cosgrove, M. S., Boeke, J. D. et Wolberger, C. (2004). Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol, 11*(11), 1037-1043.

Costessi, A., Mahrour, N., Tijchon, E., Stunnenberg, R., Stoel, M. A., Jansen, P. W., Sela, D., Martin-Brown, S., Washburn, M. P., Florens, L., Conaway, J. W., Conaway, R. C. et Stunnenberg, H. G. (2011). The tumour antigen PRAME is a subunit of a Cul2 ubiquitin ligase and associates with active NFY promoters. *Embo j, 30*(18), 3786-3798.

Coux, O., Tanaka, K. et Goldberg, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem, 65*, 801-847.

Coyle, K., Sultan, M., Thomas, M., Vaghar-Kashani, A. et Marcato, P. (2013). Retinoid Signaling in Cancer and Its Promise for Therapy. *J Carcinog Mutagen S, 7*, 16-18.

Cui, Z., Cao, W., Li, J., Song, X., Mao, L. et Chen, W. (2013). TRIM24 overexpression is common in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma and correlates with aggressive malignant phenotypes. *PLoS One, 8*(5), e63887.

D'Ambrosio, D. N., Clugston, R. D. et Blaner, W. S. (2011). Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients, 3*(1), 63-103.

David, Y., Ziv, T., Admon, A. et Navon, A. (2010). The E2 ubiquitin-conjugating enzymes direct polyubiquitination to preferred lysines. *J Biol Chem, 285*(12), 8595-8604.

Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell, 103*(2), 239-252.

Day, S. M., Divald, A., Wang, P., Davis, F., Bartolone, S., Jones, R. et Powell, S. R. (2013). Impaired assembly and post-translational regulation of 26S proteasome in human end-stage heart failure. *Circ Heart Fail, 6*(3), 544-549.

de Lera, A. R., Bourguet, W., Altucci, L. et Gronemeyer, H. (2007). Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. *Nat Rev Drug Discov, 6*(10), 811-820.

de The, H., Marchio, A., Tiollais, P. et Dejean, A. (1987). A novel steroid thyroid hormone receptor-related gene inappropriately expressed in human hepatocellular carcinoma. *Nature, 330*(6149), 667-670.

de The, H., Vivanco-Ruiz, M. M., Tiollais, P., Stunnenberg, H. et Dejean, A. (1990). Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. *Nature, 343*(6254), 177-180.

Decensi, A., Bonanni, B., Guerrieri-Gonzaga, A., Torrisi, R., Manetti, L., Robertson, C., De Palo, G., Formelli, F., Costa, A. et Veronesi, U. (2000). Chemoprevention of breast cancer: the Italian experience. *J Cell Biochem Suppl, 34*, 84-96.

Deininger, M. W., Goldman, J. M. et Melo, J. V. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood, 96*(10), 3343-3356.

Delacroix, L., Moutier, E., Altobelli, G., Legras, S., Poch, O., Choukrallah, M. A., Bertin, I., Jost, B. et Davidson, I. (2010). Cell-specific interaction of retinoic acid receptors with target genes in mouse embryonic fibroblasts and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol, 30*(1), 231-244.

Delcuve, G. P., Khan, D. H. et Davie, J. R. (2012). Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clin Epigenetics, 4*(1), 5.

Delescluse, C., Cavey, M. T., Martin, B., Bernard, B. A., Reichert, U., Maignan, J., Darmon, M. et Shroot, B. (1991). Selective high affinity retinoic acid receptor alpha or beta-gamma ligands. *Mol Pharmacol, 40*(4), 556-562.

Delmotte, M. H., Tahayato, A., Formstecher, P. et Lefebvre, P. (1999). Serine 157, a retinoic acid receptor alpha residue phosphorylated by protein kinase C in vitro, is involved in RXR.RARalpha heterodimerization and transcriptional activity. *J Biol Chem, 274*(53), 38225-38231.

Delva, L., Bastie, J. N., Rochette-Egly, C., Kraiba, R., Balitrand, N., Despouy, G., Chambon, P. et 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*(10), 7158-7167.

Demasi, M. et Laurindo, F. R. (2012). Physiological and pathological role of the ubiquitin-proteasome system in the vascular smooth muscle cell. *Cardiovasc Res, 95*(2), 183-193.

Dennis, A. P. et O'Malley, B. W. (2005). Rush hour at the promoter: how the ubiquitin-proteasome pathway polices the traffic flow of nuclear receptor-dependent transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol, 93*(2-5), 139-151.

Dent, P., Yacoub, A., Contessa, J., Caron, R., Amorino, G., Valerie, K., Hagan, M. P., Grant, S. et Schmidt-Ullrich, R. (2003). Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiat Res, 159*(3), 283-300.

Deshaies, R. J. et Joazeiro, C. A. (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem, 78*, 399-434.

Despouy, G., Bastie, J. N., Deshaies, S., Balitrand, N., Mazharian, A., Rochette-Egly, C., Chomienne, C. et Delva, L. (2003). Cyclin D3 is a cofactor of retinoic acid receptors, modulating their activity in the presence of cellular retinoic acid-binding protein II. *J Biol Chem, 278*(8), 6355-6362.

Dew, S. E. et Ong, D. E. (1994). Specificity of the retinol transporter of the rat small intestine brush border. *Biochemistry, 33*(40), 12340-12345.

Dey, N., De, P. K., Wang, M., Zhang, H., Dobrota, E. A., Robertson, K. A. et Durden, D. L. (2007). CSK controls retinoic acid receptor (RAR) signaling: a RAR-c-SRC signaling axis is required for neuritogenic differentiation. *Mol Cell Biol, 27*(11), 4179-4197.

di Masi, A., Leboffe, L., De Marinis, E., Pagano, F., Cicconi, L., Rochette-Egly, C., Lo-Coco, F., Ascenzi, P. et Nervi, C. (2015). Retinoic acid receptors: From molecular mechanisms to cancer therapy. *Mol Aspects Med, 41c*, 1-115.

Dilworth, F. J. et Chambon, P. (2001). Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene, 20*(24), 3047-3054.

Dilworth, F. J., Fromental-Ramain, C., Yamamoto, K. et Chambon, P. (2000). ATP-driven chromatin remodeling activity and histone acetyltransferases act sequentially during transactivation by RAR/RXR In vitro. *Mol Cell, 6*(5), 1049-1058.

Dong, D., Ruuska, S. E., Levinthal, D. J. et Noy, N. (1999). Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. *J Biol Chem, 274*(34), 23695-23698.

Doyle, B., Fudenberg, G., Imakaev, M. et Mirny, L. A. (2014). Chromatin loops as allosteric modulators of enhancer-promoter interactions. *PLoS Comput Biol, 10*(10), e1003867.

Drobic, B., Perez-Cadahia, B., Yu, J., Kung, S. K. et Davie, J. R. (2010). Promoter chromatin remodeling of immediate-early genes is mediated through H3 phosphorylation at either serine 28 or 10 by the MSK1 multi-protein complex. *Nucleic Acids Res, 38*(10), 3196-3208.

Duester, G. (2000). Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem, 267*(14), 4315-4324.

Duong, V. et Rochette-Egly, C. (2011). The molecular physiology of nuclear retinoic acid receptors. From health to disease. *Biochim Biophys Acta, 1812*(8), 1023-1031.

Dupe, V., Davenne, M., Brocard, J., Dolle, P., Mark, M., Dierich, A., Chambon, P. et Rijli, F. M. (1997). In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development, 124*(2), 399-410.

Durand, B., Saunders, M., Leroy, P., Leid, M. et Chambon, P. (1992). All-trans and 9-cis retinoic acid induction of CRABPII transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs. *Cell, 71*(1), 73-85.

Dyson, H. J. et Wright, P. E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol, 6*(3), 197-208.

Egly, J. M. (2001). The 14th Datta Lecture. TFIIH: from transcription to clinic. *FEBS Lett, 498*(2-3), 124-128.

Eletr, Z. M. et Wilkinson, K. D. (2014). Regulation of proteolysis by human deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta, 1843*(1), 114-128.

Elmlund, H., Baraznenok, V., Lindahl, M., Samuelsen, C. O., Koeck, P. J., Holmberg, S., Hebert, H. et Gustafsson, C. M. (2006). The cyclin-dependent kinase 8 module sterically blocks Mediator interactions with RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A, 103*(43), 15788-15793.

Elsasser, S. et Finley, D. (2005). Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines. *Nat Cell Biol, 7*(8), 742-749.

Epping, M. T. et Bernards, R. (2006). A causal role for the human tumor antigen preferentially expressed antigen of melanoma in cancer. *Cancer Res, 66*(22), 10639-10642.

Epping, M. T., Wang, L., Edel, M. J., Carlee, L., Hernandez, M. et Bernards, R. (2005). The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell, 122*(6), 835-847.

Eroglu, A., Hruszkewycz, D. P., dela Sena, C., Narayanasamy, S., Riedl, K. M., Kopec, R. E., Schwartz, S. J., Curley, R. W., Jr. et Harrison, E. H. (2012). Naturally occurring eccentric cleavage products of provitamin A beta-carotene function as antagonists of retinoic acid receptors. *J Biol Chem, 287*(19), 15886-15895.

Eto, M. (2009). Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PP1) by phosphorylation of the CPI-17 family, C-kinase-activated PP1 inhibitors. *J Biol Chem, 284*(51), 35273-35277.

Ezhkova, E. et Tansey, W. P. (2004). Proteasomal ATPases link ubiquitylation of histone H2B to methylation of histone H3. *Mol Cell, 13*(3), 435-442.

Farboud, B., Hauksdottir, H., Wu, Y. et Privalsky, M. L. (2003). Isotype-restricted corepressor recruitment: a constitutively closed helix 12 conformation in retinoic acid receptors beta and gamma interferes with corepressor recruitment and prevents transcriptional repression. *Mol Cell Biol, 23*(8), 2844-2858.

Farboud, B. et Privalsky, M. L. (2004). Retinoic acid receptor-alpha is stabilized in a repressive state by its C-terminal, isotype-specific F domain. *Mol Endocrinol, 18*(12), 2839-2853.

Ferry, C., Gaouar, S., Fischer, B., Boeglin, M., Paul, N., Samarut, E., Piskunov, A., Pankotai-Bodo, G., Brino, L. et Rochette-Egly, C. (2011). Cullin 3 mediates SRC-3 ubiquitination and degradation to control the retinoic acid response. *Proc Natl Acad Sci U S A, 108*(51), 20603-20608.

Ferry, C., Gianni, M., Lalevee, S., Bruck, N., Plassat, J. L., Raska, I., Jr., Garattini, E. et Rochette-Egly, C. (2009). SUG-1 plays proteolytic and non-proteolytic roles in the control of retinoic acid target genes via its interaction with SRC-3. *J Biol Chem, 284*(12), 8127-8135.

Finley, D. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem, 78*, 477-513.

Fraser, P. D. et Bramley, P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res, 43*(3), 228-265.

Fraser, R. A., Heard, D. J., Adam, S., Lavigne, A. C., Le Douarin, B., Tora, L., Losson, R., Rochette-Egly, C. et Chambon, P. (1998). The putative cofactor TIF1alpha is a protein kinase that is hyperphosphorylated upon interaction with liganded nuclear receptors. *J Biol Chem, 273*(26), 16199-16204.

Freemont, P. S. (1993). The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. *Ann N Y Acad Sci, 684*, 174-192.

Freemont, P. S. (2000). RING for destruction? *Curr Biol, 10*(2), R84-87.

Fu, H., Sadis, S., Rubin, D. M., Glickman, M., van Nocker, S., Finley, D. et Vierstra, R. D. (1998). Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26 S proteasome subunit Mcb1. *J Biol Chem, 273*(4), 1970-1981.

Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., Ito, H., Takada, I., Roeder, R. G., Kitagawa, H. et Kato, S. (2009). GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis. *Nature, 459*(7245), 455-459.

Fujimoto, Y., Shiraki, T., Horiuchi, Y., Waku, T., Shigenaga, A., Otaka, A., Ikura, T., Igarashi, K., Aimoto, S., Tate, S. et Morikawa, K. (2010). Proline cis/trans-isomerase Pin1 regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity through the direct binding to the activation function-1 domain. *J Biol Chem, 285*(5), 3126-3132.

Fushman, D. et Walker, O. (2010). Exploring the linkage dependence of polyubiquitin conformations using molecular modeling. *J Mol Biol, 395*(4), 803-814.

Gaillard, E., Bruck, N., Brelivet, Y., Bour, G., Lalevee, S., Bauer, A., Poch, O., Moras, D. et Rochette-Egly, C. (2006). Phosphorylation by PKA potentiates retinoic acid receptor alpha activity by means of increasing interaction with and phosphorylation by cyclin H/cdk7. *Proc Natl Acad Sci U S A, 103*(25), 9548-9553.

Galvez-Contreras, A. Y., Quinones-Hinojosa, A. et Gonzalez-Perez, O. (2013). The role of EGFR and ErbB family related proteins in the oligodendrocyte specification in germinal niches of the adult mammalian brain. *Front Cell Neurosci, 7*, 258.

Gan, C. S., Chong, P. K., Pham, T. K. et Wright, P. C. (2007). Technical, experimental, and biological variations in isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ). *J Proteome Res, 6*(2), 821-827.

Ganoth, D., Bornstein, G., Ko, T. K., Larsen, B., Tyers, M., Pagano, M. et Hershko, A. (2001). The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27. *Nat Cell Biol, 3*(3), 321-324.

Gao, S. M., Yang, J., Chen, C., Zhang, S., Xing, C. Y., Li, H., Wu, J. et Jiang, L. (2011). miR-15a/16-1 enhances retinoic acid-mediated differentiation of leukemic cells and is up-regulated by retinoic acid. *Leuk Lymphoma, 52*(12), 2365-2371.

Garzon, R., Pichiorri, F., Palumbo, T., Visentini, M., Aqeilan, R., Cimmino, A., Wang, H., Sun, H., Volinia, S., Alder, H., Calin, G. A., Liu, C. G., Andreeff, M. et Croce, C. M. (2007). MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia. *Oncogene, 26*(28), 4148-4157.

Gehani, S. S., Agrawal-Singh, S., Dietrich, N., Christophersen, N. S., Helin, K. et Hansen, K. (2010). Polycomb group protein displacement and gene activation through MSK-dependent H3K27me3S28 phosphorylation. *Mol Cell, 39*(6), 886-900.

Gehin, M., Vivat, V., Wurtz, J. M., Losson, R., Chambon, P., Moras, D. et Gronemeyer, H. (1999). Structural basis for engineering of retinoic acid receptor isotype-selective agonists and antagonists. *Chem Biol, 6*(8), 519-529.

Germain, P., Chambon, P., Eichele, G., Evans, R. M., Lazar, M. A., Leid, M., De Lera, A. R., Lotan, R., Mangelsdorf, D. J. et Gronemeyer, H. (2006). International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev, 58*(4), 760-772.

Gianni, M., Bauer, A., Garattini, E., Chambon, P. et Rochette-Egly, C. (2002a). Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR gamma degradation and transactivation. *Embo j, 21*(14), 3760-3769.

Gianni, M., Boldetti, A., Guarnaccia, V., Rambaldi, A., Parrella, E., Raska, I., Jr., Rochette-Egly, C., Del Sal, G., Rustighi, A., Terao, M. et Garattini, E. (2009). Inhibition of the peptidyl-prolyl-isomerase Pin1 enhances the responses of acute myeloid leukemia cells to retinoic acid via stabilization of RARalpha and PML-RARalpha. *Cancer Res, 69*(3), 1016-1026.

Gianni, M., Kopf, E., Bastien, J., Oulad-Abdelghani, M., Garattini, E., Chambon, P. et Rochette-Egly, C. (2002b). Down-regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is involved in retinoic acid-induced phosphorylation, degradation, and transcriptional activity of retinoic acid receptor gamma 2. *J Biol Chem, 277*(28), 24859-24862.

Gianni, M., Parrella, E., Raska, I., Jr., Gaillard, E., Nigro, E. A., Gaudon, C., Garattini, E. et Rochette-Egly, C. (2006). P38MAPK-dependent phosphorylation and degradation of SRC-3/AIB1 and RARalpha-mediated transcription. *Embo j, 25*(4), 739-751.

Giguere, V., Ong, E. S., Segui, P. et Evans, R. M. (1987). Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature, 330*(6149), 624-629.

Giguere, V., Shago, M., Zirngibl, R., Tate, P., Rossant, J. et Varmuza, S. (1990). Identification of a novel isoform of the retinoic acid receptor gamma expressed in the mouse embryo. *Mol Cell Biol, 10*(5), 2335-2340.

Gillespie, R. F. et Gudas, L. J. (2007a). Retinoic acid receptor isotype specificity in F9 teratocarcinoma stem cells results from the differential recruitment of coregulators to retinoic response elements. *J Biol Chem, 282*(46), 33421-33434.

Gillespie, R. F. et Gudas, L. J. (2007b). Retinoid regulated association of transcriptional co-regulators and the polycomb group protein SUZ12 with the retinoic acid response elements of Hoxa1, RARbeta(2), and Cyp26A1 in F9 embryonal carcinoma cells. *J Mol Biol, 372*(2), 298-316.

Gillette, T. G., Gonzalez, F., Delahodde, A., Johnston, S. A. et Kodadek, T. (2004). Physical and functional association of RNA polymerase II and the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A, 101*(16), 5904-5909.

Glickman, M. H. et Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev, 82*(2), 373-428.

Glickman, M. H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V. A. et Finley, D. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell, 94*(5), 615-623.

Goodlett, D. R. et Yi, E. C. (2003). Stable isotopic labeling and mass spectrometry as a means to determine differences in protein expression. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, 22*(5), 282-290.

Goodman, D. W., Huang, H. S. et Shiratori, T. (1965). TISSUE DISTRIBUTION AND METABOLISM OF NEWLY ABSORBED VITAMIN A IN THE RAT. *J Lipid Res, 6*, 390-396.

Gregory, R. C., Taniguchi, T. et D'Andrea, A. D. (2003). Regulation of the Fanconi anemia pathway by monoubiquitination. *Semin Cancer Biol, 13*(1), 77-82.

Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H. et Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol, 7*(11), 1062-1067.

Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D. et Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 A resolution. *Nature, 386*(6624), 463-471.

Gronemeyer, H. et Bourguet, W. (2009). Allosteric effects govern nuclear receptor action: DNA appears as a player. *Sci Signal, 2*(73), pe34.

Grzmil, M. et Hemmings, B. A. (2012). Translation regulation as a therapeutic target in cancer. *Cancer Res, 72*(16), 3891-3900.

Gudas, L. J. et Wagner, J. A. (2011). Retinoids regulate stem cell differentiation. *J Cell Physiol, 226*(2), 322-330.

Gurevich, I., Flores, A. M. et Aneskievich, B. J. (2007). Corepressors of agonist-bound nuclear receptors. *Toxicol Appl Pharmacol, 223*(3), 288-298.

Guterman, A. et Glickman, M. H. (2004a). Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome. *J Biol Chem, 279*(3), 1729-1738.

Guterman, A. et Glickman, M. H. (2004b). Deubiquitinating enzymes are IN/(trinsic to proteasome function). *Curr Protein Pept Sci, 5*(3), 201-211.

Guyot, R., Vincent, S., Bertin, J., Samarut, J. et Ravel-Chapuis, P. (2010). The transforming acidic coiled coil (TACC1) protein modulates the transcriptional activity of the nuclear receptors TR and RAR. *BMC Mol Biol, 11*, 3.

Ha, B. H. et Kim, E. E. (2008). Structures of proteases for ubiqutin and ubiquitin-like modifiers. *BMB Rep, 41*(6), 435-443.

Han, L., Yang, J., Wang, X., Wu, Q., Yin, S., Li, Z., Zhang, J., Xing, Y., Chen, Z., Tsun, A., Li, D., Piccioni, M., Zhang, Y., Guo, Q., Jiang, L., Bao, L., Lv, L. et Li, B. (2014). The E3 deubiquitinase USP17 is a positive regulator of retinoic acid-related orphan nuclear receptor gammat (RORgammat) in Th17 cells. *J Biol Chem, 289*(37), 25546-25555.

Han, Y. H., Zhou, H., Kim, J. H., Yan, T. D., Lee, K. H., Wu, H., Lin, F., Lu, N., Liu, J., Zeng, J. Z. et Zhang, X. K. (2009). A unique cytoplasmic localization of retinoic acid receptor-gamma and its regulations. *J Biol Chem, 284*(27), 18503-18514.

Harrison, E. H. (2005). Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annu Rev Nutr, 25*, 87-103.

Harrison, E. H., dela Sena, C., Eroglu, A. et Fleshman, M. K. (2012). The formation, occurrence, and function of beta-apocarotenoids: beta-carotene metabolites that may modulate nuclear receptor signaling. *Am J Clin Nutr, 96*(5), 1189s-1192s.

Haskell, M. J. (2012). The challenge to reach nutritional adequacy for vitamin A: beta-carotene bioavailability and conversion--evidence in humans. *Am J Clin Nutr, 96*(5), 1193s-1203s.

Hauksdottir, H., Farboud, B. et Privalsky, M. L. (2003). Retinoic acid receptors beta and gamma do not repress, but instead activate target gene transcription in both the absence and presence of hormone ligand. *Mol Endocrinol, 17*(3), 373-385.

Heery, D. M., Hoare, S., Hussain, S., Parker, M. G. et Sheppard, H. (2001). Core LXXLL motif sequences in CREB-binding protein, SRC1, and RIP140 define affinity and selectivity for steroid and retinoid receptors. *J Biol Chem, 276*(9), 6695-6702.

Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U. et Wolf, D. H. (1997). The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem, 272*(40), 25200-25209.

Heinemeyer, W., Trondle, N., Albrecht, G. et Wolf, D. H. (1994). PRE5 and PRE6, the last missing genes encoding 20S proteasome subunits from yeast? Indication for a set of 14 different subunits in the eukaryotic proteasome core. *Biochemistry, 33*(40), 12229-12237.

Heinrich, R., Neel, B. G. et Rapoport, T. A. (2002). Mathematical models of protein kinase signal transduction. *Mol Cell, 9*(5), 957-970.

Herquel, B., Ouararhni, K. et Davidson, I. (2011a). The TIF1alpha-related TRIM cofactors couple chromatin modifications to transcriptional regulation, signaling and tumor suppression. *Transcription, 2*(5), 231-236.

Herquel, B., Ouararhni, K., Khetchoumian, K., Ignat, M., Teletin, M., Mark, M., Bechade, G., Van Dorsselaer, A., Sanglier-Cianferani, S., Hamiche, A., Cammas, F., Davidson, I. et Losson, R. (2011b). Transcription cofactors TRIM24, TRIM28, and TRIM33 associate to form regulatory complexes that suppress murine hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A, 108*(20), 8212-8217.

Herr, F. M. et Ong, D. E. (1992). Differential interaction of lecithin-retinol acyltransferase with cellular retinol binding proteins. *Biochemistry, 31*(29), 6748-6755.

Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., Stein, R. B., Eichele, G., Evans, R. M. et Thaller, C. (1992). 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell, 68*(2), 397-406.

Hicke, L. et Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol, 19*, 141-172.

Hilt, W. et Wolf, D. H. (1996). Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem Sci, 21*(3), 96-102.

Hiyama, H., Yokoi, M., Masutani, C., Sugasawa, K., Maekawa, T., Tanaka, K., Hoeijmakers, J. H. et Hanaoka, F. (1999). Interaction of hHR23 with S5a. The ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of 26 S proteasome. *J Biol Chem, 274*(39), 28019-28025.

Hochstrasser, M. et Varshavsky, A. (1990). In vivo degradation of a transcriptional regulator: the yeast alpha 2 repressor. *Cell, 61*(4), 697-708.

Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G. et Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature, 419*(6903), 135-141.

Hoekstra, E., Peppelenbosch, M. P. et Fuhler, G. M. (2012). The role of protein tyrosine phosphatases in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta, 1826*(1), 179-188.

Holmbeck, S. M., Dyson, H. J. et Wright, P. E. (1998a). DNA-induced conformational changes are the basis for cooperative dimerization by the DNA binding domain of the retinoid X receptor. *J Mol Biol, 284*(3), 533-539.

Holmbeck, S. M., Foster, M. P., Casimiro, D. R., Sem, D. S., Dyson, H. J. et Wright, P. E. (1998b). High-resolution solution structure of the retinoid X receptor DNA-binding domain. *J Mol Biol, 281*(2), 271-284.

Holoch, D. et Moazed, D. (2015). RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nat Rev Genet, 16*(2), 71-84.

Holzl, H., Kapelari, B., Kellermann, J., Seemuller, E., Sumegi, M., Udvardy, A., Medalia, O., Sperling, J., Muller, S. A., Engel, A. et Baumeister, W. (2000). The regulatory complex of Drosophila melanogaster 26S proteasomes. Subunit composition and localization of a deubiquitylating enzyme. *J Cell Biol, 150*(1), 119-130.

Hopkins, F. G. (1912). Feeding experiments illustrating the importance of accessory factors in normal dietaries. *J Physiol, 44*(5-6), 425-460.

Hoppe, T. (2005). Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci, 30*(4), 183-187.

Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzel, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K. et et al. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature, 377*(6548), 397-404.

Hornberg, J. J., Bruggeman, F. J., Binder, B., Geest, C. R., de Vaate, A. J., Lankelma, J., Heinrich, R. et Westerhoff, H. V. (2005). Principles behind the multifarious control of signal transduction. ERK phosphorylation and kinase/phosphatase control. *Febs j, 272*(1), 244-258.

Hu, X. et Lazar, M. A. (1999). The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature, 402*(6757), 93-96.

Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S. et Howley, P. M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A, 92*(7), 2563-2567.

Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell, 80*(2), 225-236.

Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K. J., Finley, D. et Dikic, I. (2008). Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature, 453*(7194), 481-488.

Ignat, M., Teletin, M., Tisserand, J., Khetchoumian, K., Dennefeld, C., Chambon, P., Losson, R. et Mark, M. (2008). Arterial calcifications and increased expression of vitamin D receptor targets in mice lacking TIF1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A, 105*(7), 2598-2603.

Inobe, T. et Matouschek, A. (2014). Paradigms of protein degradation by the proteasome. *Curr Opin Struct Biol, 24*, 156-164.

International Union of Pure and Applied Chemistry - International Union of Biochemistry (IUPAC-IUB). (1982). Nomenclature of retinoids. Recommendations 1981. *Eur J Biochem, 129*(1), 1-5.

Ishikawa, T., Umesono, K., Mangelsdorf, D. J., Aburatani, H., Stanger, B. Z., Shibasaki, Y., Imawari, M., Evans, R. M. et Takaku, F. (1990). A functional retinoic acid receptor encoded by the gene on human chromosome 12. *Mol Endocrinol, 4*(6), 837-844.

Ivanov, A. V., Peng, H., Yurchenko, V., Yap, K. L., Negorev, D. G., Schultz, D. C., Psulkowski, E., Fredericks, W. J., White, D. E., Maul, G. G., Sadofsky, M. J., Zhou, M. M. et Rauscher, F. J., 3rd. (2007). PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing. *Mol Cell, 28*(5), 823-837.

Jain, A. K., Allton, K., Duncan, A. D. et Barton, M. C. (2014). TRIM24 is a p53-induced E3-ubiquitin ligase that undergoes ATM-mediated phosphorylation and autodegradation during DNA damage. *Mol Cell Biol, 34*(14), 2695-2709.

Jain, A. K. et Barton, M. C. (2009). Regulation of p53: TRIM24 enters the RING. *Cell Cycle, 8*(22), 3668-3674.

Jeanmougin, F., Wurtz, J. M., Le Douarin, B., Chambon, P. et Losson, R. (1997). The bromodomain revisited. *Trends Biochem Sci, 22*(5), 151-153.

Jian, P., Li, Z. W., Fang, T. Y., Jian, W., Zhuan, Z., Mei, L. X., Yan, W. S. et Jian, N. (2011). Retinoic acid induces HL-60 cell differentiation via the upregulation of miR-663. *J Hematol Oncol, 4*, 20.

Joazeiro, C. A. et Weissman, A. M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell, 102*(5), 549-552.

Johnson, A. T., Wang, L., Standeven, A. M., Escobar, M. et Chandraratna, R. A. (1999). Synthesis and biological activity of high-affinity retinoic acid receptor antagonists. *Bioorg Med Chem, 7*(7), 1321-1338.

Johnson, E. S., Gonda, D. K. et Varshavsky, A. (1990). cis-trans recognition and subunit-specific degradation of short-lived proteins. *Nature, 346*(6281), 287-291.

Jonas, B. A., Varlakhanova, N., Hayakawa, F., Goodson, M. et Privalsky, M. L. (2007). Response of SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) and N-CoR (nuclear receptor corepressor) corepressors to mitogen-activated protein kinase kinase kinase cascades is determined by alternative mRNA splicing. *Mol Endocrinol, 21*(8), 1924-1939.

Kambhampati, S., Li, Y., Verma, A., Sassano, A., Majchrzak, B., Deb, D. K., Parmar, S., Giafis, N., Kalvakolanu, D. V., Rahman, A., Uddin, S., Minucci, S., Tallman, M. S., Fish, E. N. et Platanias, L. C. (2003). Activation of protein kinase C delta by all-trans-retinoic acid. *J Biol Chem, 278*(35), 32544-32551.

Karrer, P., Morf, R. et Schöpp, K. (1931). Zur Kenntnis des Vitamins-A aus Fischtranen. *Helvetica Chimica Acta, 14*(5), 1036-1040.

Kastner, P., Krust, A., Mendelsohn, C., Garnier, J. M., Zelent, A., Leroy, P., Staub, A. et Chambon, P. (1990). Murine isoforms of retinoic acid receptor gamma with specific patterns of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A, 87*(7), 2700-2704.

Kastner, P., Perez, A., Lutz, Y., Rochette-Egly, C., Gaub, M. P., Durand, B., Lanotte, M., Berger, R. et Chambon, P. (1992). Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor alpha fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins. *Embo j, 11*(2), 629-642.

Kay, B. K., Williamson, M. P. et Sudol, M. (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J, 14*(2), 231-241.

Keriel, A., Stary, A., Sarasin, A., Rochette-Egly, C. et Egly, J. M. (2002). XPD mutations prevent TFIIH-dependent transactivation by nuclear receptors and phosphorylation of RARalpha. *Cell, 109*(1), 125-135.

Khetchoumian, K., Teletin, M., Tisserand, J., Herquel, B., Ouararhni, K. et Losson, R. (2008). Trim24 (Tif1 alpha): an essential 'brake' for retinoic acid-induced transcription to prevent liver cancer. *Cell Cycle, 7*(23), 3647-3652.

Kiefer, C., Hessel, S., Lampert, J. M., Vogt, K., Lederer, M. O., Breithaupt, D. E. et von Lintig, J. (2001). Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J Biol Chem, 276*(17), 14110-14116.

Kikuchi, M., Okumura, F., Tsukiyama, T., Watanabe, M., Miyajima, N., Tanaka, J., Imamura, M. et Hatakeyama, S. (2009). TRIM24 mediates ligand-dependent activation of androgen receptor and is

repressed by a bromodomain-containing protein, BRD7, in prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta, 1793*(12), 1828-1836.

Kim, W., Bennett, E. J., Huttlin, E. L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M. E., Rad, R., Rush, J., Comb, M. J., Harper, J. W. et Gygi, S. P. (2011). Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol Cell, 44*(2), 325-340.

Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E. et Koike, T. (2009). Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nat Protoc, 4*(10), 1513-1521.

Kirkpatrick, D. S., Denison, C. et Gygi, S. P. (2005). Weighing in on ubiquitin: the expanding role of mass-spectrometry-based proteomics. *Nat Cell Biol, 7*(8), 750-757.

Kisselev, A. F., Akopian, T. N., Woo, K. M. et Goldberg, A. L. (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem, 274*(6), 3363-3371.

Kisselev, A. F., Callard, A. et Goldberg, A. L. (2006). Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem, 281*(13), 8582-8590.

Klaholz, B. P., Mitschler, A. et Moras, D. (2000). Structural basis for isotype selectivity of the human retinoic acid nuclear receptor. *J Mol Biol, 302*(1), 155-170.

Klaholz, B. P., Renaud, J. P., Mitschler, A., Zusi, C., Chambon, P., Gronemeyer, H. et Moras, D. (1998). Conformational adaptation of agonists to the human nuclear receptor RAR gamma. *Nat Struct Biol, 5*(3), 199-202.

Knegtel, R. M., Katahira, M., Schilthuis, J. G., Bonvin, A. M., Boelens, R., Eib, D., van der Saag, P. T. et Kaptein, R. (1993). The solution structure of the human retinoic acid receptor-beta DNA-binding domain. *J Biomol NMR, 3*(1), 1-17.

Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U. et Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell, 96*(5), 635-644.

Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans, 37*(Pt 5), 937-953.

Komander, D. et Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem, 81*, 203-229.

Kono, N. et Arai, H. (2015). Intracellular transport of fat-soluble vitamins a and e. *Traffic, 16*(1), 19-34.

Konstantinova, I. M., Tsimokha, A. S. et Mittenberg, A. G. (2008). Role of proteasomes in cellular regulation. *Int Rev Cell Mol Biol, 267*, 59-124.

Koonin, E. V., Zhou, S. et Lucchesi, J. C. (1995). The chromo superfamily: new members, duplication of the chromo domain and possible role in delivering transcription regulators to chromatin. *Nucleic Acids Res, 23*(21), 4229-4233.

Kopf, E., Plassat, J. L., Vivat, V., de The, H., Chambon, P. et 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*(43), 33280-33288.

Kosarev, P., Mayer, K. F. et Hardtke, C. S. (2002). Evaluation and classification of RING-finger domains encoded by the Arabidopsis genome. *Genome Biol, 3*(4), Research0016.

Kravtsova-Ivantsiv, Y. et Ciechanover, A. (2012). Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation. *J Cell Sci, 125*(Pt 3), 539-548.

Kruse, S. W., Suino-Powell, K., Zhou, X. E., Kretschman, J. E., Reynolds, R., Vonrhein, C., Xu, Y., Wang, L., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. et Xu, H. E. (2008). Identification of COUP-TFII orphan nuclear receptor as a retinoic acid-activated receptor. *PLoS Biol, 6*(9), e227.

Krust, A., Kastner, P., Petkovich, M., Zelent, A. et Chambon, P. (1989). A third human retinoic acid receptor, hRAR-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A, 86*(14), 5310-5314.

Kwon, S. H. et Workman, J. L. (2008). The heterochromatin protein 1 (HP1) family: put away a bias toward HP1. *Mol Cells, 26*(3), 217-227.

Lalevee, S., Anno, Y. N., Chatagnon, A., Samarut, E., Poch, O., Laudet, V., Benoit, G., Lecompte, O. et Rochette-Egly, C. (2011). Genome-wide in silico identification of new conserved and functional retinoic acid receptor response elements (direct repeats separated by 5 bp). *J Biol Chem, 286*(38), 33322-33334.

Lalevee, S., Bour, G., Quinternet, M., Samarut, E., Kessler, P., Vitorino, M., Bruck, N., Delsuc, M. A., Vonesch, J. L., Kieffer, B. et Rochette-Egly, C. (2010). Vinexinss, an atypical "sensor" of retinoic acid receptor gamma signaling: union and sequestration, separation, and phosphorylation. *FASEB J, 24*(11), 4523-4534.

Lam, Y. A., DeMartino, G. N., Pickart, C. M. et Cohen, R. E. (1997). Specificity of the ubiquitin isopeptidase in the PA700 regulatory complex of 26 S proteasomes. *J Biol Chem, 272*(45), 28438-28446.

Lan, F., Collins, R. E., De Cegli, R., Alpatov, R., Horton, J. R., Shi, X., Gozani, O., Cheng, X. et Shi, Y. (2007). Recognition of unmethylated histone H3 lysine 4 links BHC80 to LSD1-mediated gene repression. *Nature, 448*(7154), 718-722.

Lanska, D. J. (2010). Chapter 29: historical aspects of the major neurological vitamin deficiency disorders: overview and fat-soluble vitamin A. *Handbook of clinical neurology, 95*, 435-444.

Le Douarin, B., Nielsen, A. L., Garnier, J. M., Ichinose, H., Jeanmougin, F., Losson, R. et Chambon, P. (1996). A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *Embo j, 15*(23), 6701-6715.

Le Douarin, B., Zechel, C., Garnier, J. M., Lutz, Y., Tora, L., Pierrat, P., Heery, D., Gronemeyer, H., Chambon, P. et Losson, R. (1995). The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *Embo j, 14*(9), 2020-2033.

Le, X. F., Arachchige-Don, A. S., Mao, W., Horne, M. C. et Bast, R. C., Jr. (2007). Roles of human epidermal growth factor receptor 2, c-jun NH2-terminal kinase, phosphoinositide 3-kinase, and p70 S6 kinase pathways in regulation of cyclin G2 expression in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther, 6*(11), 2843-2857.

Lee, D., Ezhkova, E., Li, B., Pattenden, S. G., Tansey, W. P. et Workman, J. L. (2005). The proteasome regulatory particle alters the SAGA coactivator to enhance its interactions with transcriptional activators. *Cell, 123*(3), 423-436.

Lee, H. Y., Suh, Y. A., Robinson, M. J., Clifford, J. L., Hong, W. K., Woodgett, J. R., Cobb, M. H., Mangelsdorf, D. J. et Kurie, J. M. (2000). Stress pathway activation induces phosphorylation of retinoid X receptor. *J Biol Chem, 275*(41), 32193-32199.

Lee, K. W., Cho, J. G., Kim, C. M., Kang, A. Y., Kim, M., Ahn, B. Y., Chung, S. S., Lim, K. H., Baek, K. H., Sung, J. H., Park, K. S. et Park, S. G. (2013a). Herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease (HAUSP) modulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) stability through its deubiquitinating activity. *J Biol Chem, 288*(46), 32886-32896.

Lee, M. G., Villa, R., Trojer, P., Norman, J., Yan, K. P., Reinberg, D., Di Croce, L. et Shiekhattar, R. (2007). Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. *Science, 318*(5849), 447-450.

Lee, M. S., Kliewer, S. A., Provencal, J., Wright, P. E. et Evans, R. M. (1993). Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding. *Science, 260*(5111), 1117-1121.

Lee, P. C., Dodart, J. C., Aron, L., Finley, L. W., Bronson, R. T., Haigis, M. C., Yankner, B. A. et Harper, J. W. (2013b). Altered social behavior and neuronal development in mice lacking the Uba6-Use1 ubiquitin transfer system. *Mol Cell, 50*(2), 172-184.

Lefebvre, P., Martin, P. J., Flajollet, S., Dedieu, S., Billaut, X. et Lefebvre, B. (2005). Transcriptional activities of retinoic acid receptors. *Vitam Horm, 70*, 199-264.

Lefstin, J. A. et Yamamoto, K. R. (1998). Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature, 392*(6679), 885-888.

Leggett, D. S., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R. T., Walz, T., Ploegh, H. et Finley, D. (2002). Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. *Mol Cell, 10*(3), 495-507.

Leid, M., Kastner, P., Lyons, R., Nakshatri, H., Saunders, M., Zacharewski, T., Chen, J. Y., Staub, A., Garnier, J. M., Mader, S. et et al. (1992). Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell, 68*(2), 377-395.

Leroy, P., Krust, A., Zelent, A., Mendelsohn, C., Garnier, J. M., Kastner, P., Dierich, A. et Chambon, P. (1991). Multiple isoforms of the mouse retinoic acid receptor alpha are generated by alternative splicing and differential induction by retinoic acid. *Embo j, 10*(1), 59-69.

Levin, A. A., Sturzenbecker, L. J., Kazmer, S., Bosakowski, T., Huselton, C., Allenby, G., Speck, J., Kratzeisen, C., Rosenberger, M., Lovey, A. et et al. (1992). 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature, 355*(6358), 359-361.

Li, H., Sun, L., Tang, Z., Fu, L., Xu, Y., Li, Z., Luo, W., Qiu, X. et Wang, E. (2012). Overexpression of TRIM24 correlates with tumor progression in non-small cell lung cancer. *PLoS One, 7*(5), e37657.

Li, T., Naqvi, N. I., Yang, H. et Teo, T. S. (2000). Identification of a 26S proteasome-associated UCH in fission yeast. *Biochem Biophys Res Commun, 272*(1), 270-275.

Li, X., Amazit, L., Long, W., Lonard, D. M., Monaco, J. J. et O'Malley, B. W. (2007). Ubiquitin- and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REGgamma-proteasome pathway. *Mol Cell, 26*(6), 831-842.

Li, Y., Wongsiriroj, N. et Blaner, W. S. (2014). The multifaceted nature of retinoid transport and metabolism. *Hepatobiliary Surg Nutr, 3*(3), 126-139.

Liao, Y. et Hung, M. C. (2003). Regulation of the activity of p38 mitogen-activated protein kinase by Akt in cancer and adenoviral protein E1A-mediated sensitization to apoptosis. *Mol Cell Biol, 23*(19), 6836-6848.

Lill, J. (2003). Proteomic tools for quantitation by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev, 22*(3), 182-194.

Lin, H. K., Wang, L., Hu, Y. C., Altuwaijri, S. et Chang, C. (2002). Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *Embo j, 21*(15), 4037-4048.

Lin, L., DeMartino, G. N. et Greene, W. C. (1998). Cotranslational biogenesis of NF-kappaB p50 by the 26S proteasome. *Cell, 92*(6), 819-828.

Lipford, J. R. et Deshaies, R. J. (2003). Diverse roles for ubiquitin-dependent proteolysis in transcriptional activation. *Nat Cell Biol, 5*(10), 845-850.

Lombardi, M., Castoria, G., Migliaccio, A., Barone, M. V., Di Stasio, R., Ciociola, A., Bottero, D., Yamaguchi, H., Appella, E. et Auricchio, F. (2008). Hormone-dependent nuclear export of estradiol receptor and DNA synthesis in breast cancer cells. *J Cell Biol, 182*(2), 327-340.

Lonard, D. M. et O'Malley, B. W. (2009). Emerging roles of the ubiquitin proteasome system in nuclear hormone receptor signaling. *Prog Mol Biol Transl Sci, 87*, 117-135.

Longva, K. E., Pedersen, N. M., Haslekas, C., Stang, E. et Madshus, I. H. (2005). Herceptin-induced inhibition of ErbB2 signaling involves reduced phosphorylation of Akt but not endocytic down-regulation of ErbB2. *Int J Cancer, 116*(3), 359-367.

Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S. et Weissman, A. M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A, 96*(20), 11364-11369.

Loudig, O., Babichuk, C., White, J., Abu-Abed, S., Mueller, C. et 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*(9), 1483-1497.

Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. et Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon T. acidophilum at 3.4 A resolution. *Science, 268*(5210), 533-539.

Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R. et Sigler, P. B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature, 352*(6335), 497-505.

Macias, M. J., Wiesner, S. et Sudol, M. (2002). WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett, 513*(1), 30-37.

Maghsoodi, B., Poon, M. M., Nam, C. I., Aoto, J., Ting, P. et Chen, L. (2008). Retinoic acid regulates RARalpha-mediated control of translation in dendritic RNA granules during homeostatic synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A, 105*(41), 16015-16020.

Mahony, S., Mazzoni, E. O., McCuine, S., Young, R. A., Wichterle, H. et Gifford, D. K. (2011). Ligand-dependent dynamics of retinoic acid receptor binding during early neurogenesis. *Genome Biol, 12*(1), R2.

Malik, S. et Roeder, R. G. (2000). Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem Sci, 25*(6), 277-283.

Mangelsdorf, D. J., Borgmeyer, U., Heyman, R. A., Zhou, J. Y., Ong, E. S., Oro, A. E., Kakizuka, A. et Evans, R. M. (1992). Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev, 6*(3), 329-344.

Mangelsdorf, D. J., Ong, E. S., Dyck, J. A. et Evans, R. M. (1990). Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature, 345*(6272), 224-229.

Mangelsdorf, D. J., Umesono, K., Kliewer, S. A., Borgmeyer, U., Ong, E. S. et Evans, R. M. (1991). A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell, 66*(3), 555-561.

Mann, K. K., Padovani, A. M., Guo, Q., Colosimo, A. L., Lee, H. Y., Kurie, J. M. et Miller, W. H., Jr. (2005). Arsenic trioxide inhibits nuclear receptor function via SEK1/JNK-mediated RXRalpha phosphorylation. *J Clin Invest, 115*(10), 2924-2933.

Mark, M., Ghyselinck, N. B. et Chambon, P. (2009). Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nucl Recept Signal, 7*, e002.

Martinez-Zapien, D., Delsuc, M. A., Trave, G., Lutzing, R., Rochette-Egly, C. et Kieffer, B. (2014). Production and characterization of a retinoic acid receptor RARgamma construction encompassing the DNA binding domain and the disordered N-terminal proline rich domain. *Protein Expr Purif, 95*, 113-120.

Masia, S., Alvarez, S., de Lera, A. R. et Barettino, D. (2007). Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Mol Endocrinol, 21*(10), 2391-2402.

Matsui, T., Leung, D., Miyashita, H., Maksakova, I. A., Miyachi, H., Kimura, H., Tachibana, M., Lorincz, M. C. et Shinkai, Y. (2010). Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature, 464*(7290), 927-931.

Matsushima-Nishiwaki, R., Okuno, M., Adachi, S., Sano, T., Akita, K., Moriwaki, H., Friedman, S. L. et Kojima, S. (2001). Phosphorylation of retinoid X receptor alpha at serine 260 impairs its metabolism and function in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res, 61*(20), 7675-7682.

Mattei, M. G., Riviere, M., Krust, A., Ingvarsson, S., Vennstrom, B., Islam, M. Q., Levan, G., Kautner, P., Zelent, A., Chambon, P. et et al. (1991). Chromosomal assignment of retinoic acid receptor (RAR) genes in the human, mouse, and rat genomes. *Genomics, 10*(4), 1061-1069.

Mattick, J. S. et Makunin, I. V. (2005). Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet, 14 Spec No 1*, R121-132.

Maytal-Kivity, V., Reis, N., Hofmann, K. et Glickman, M. H. (2002). MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. *BMC Biochem, 3*, 28.

McDowell, G. S., Kucerova, R. et Philpott, A. (2010). Non-canonical ubiquitylation of the proneural protein Ngn2 occurs in both Xenopus embryos and mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun, 400*(4), 655-660.

Mellor, J. (2006). It takes a PHD to read the histone code. *Cell, 126*(1), 22-24.

Melnick, A. et Licht, J. D. (1999). Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood, 93*(10), 3167-3215.

Menges, C. W., Sementino, E., Talarchek, J., Xu, J., Chernoff, J., Peterson, J. R. et Testa, J. R. (2012). Group I p21-activated kinases (PAKs) promote tumor cell proliferation and survival through the AKT1 and Raf-MAPK pathways. *Mol Cancer Res, 10*(9), 1178-1188.

Metivier, R., Penot, G., Hubner, M. R., Reid, G., Brand, H., Kos, M. et Gannon, F. (2003). Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell, 115*(6), 751-763.

Miao, Z. F., Wang, Z. N., Zhao, T. T., Xu, Y. Y., Wu, J. H., Liu, X. Y., Xu, H., You, Y. et Xu, H. M. (2015). TRIM24 is upregulated in human gastric cancer and promotes gastric cancer cell growth and chemoresistance. *Virchows Arch*.

Micel, L. N., Tentler, J. J., Smith, P. G. et Eckhardt, G. S. (2013). Role of ubiquitin ligases and the proteasome in oncogenesis: novel targets for anticancer therapies. *J Clin Oncol, 31*(9), 1231-1238.

Miller, J. et Gordon, C. (2005). The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins. *FEBS Lett, 579*(15), 3224-3230.

Montemurro, F. et Scaltriti, M. (2014). Biomarkers of drugs targeting HER-family signalling in cancer. *J Pathol, 232*(2), 219-229.

Moras, D. et Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol, 10*(3), 384-391.

Moutier, E., Ye, T., Choukrallah, M. A., Urban, S., Osz, J., Chatagnon, A., Delacroix, L., Langer, D., Rochel, N., Moras, D., Benoit, G. et Davidson, I. (2012). Retinoic acid receptors recognize the mouse genome through binding elements with diverse spacing and topology. *J Biol Chem, 287*(31), 26328-26341.

Murata, S., Yashiroda, H. et Tanaka, K. (2009). Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol, 10*(2), 104-115.

Muratani, M. et Tansey, W. P. (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol, 4*(3), 192-201.

Na, C. H. et Peng, J. (2012). Analysis of ubiquitinated proteome by quantitative mass spectrometry. *Methods Mol Biol, 893*, 417-429.

Nagpal, S., Friant, S., Nakshatri, H. et Chambon, P. (1993). RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *Embo j, 12*(6), 2349-2360.

Nagpal, S., Saunders, M., Kastner, P., Durand, B., Nakshatri, H. et Chambon, P. (1992a). Promoter context- and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. *Cell, 70*(6), 1007-1019.

Nagpal, S., Zelent, A. et Chambon, P. (1992b). RAR-beta 4, a retinoic acid receptor isoform is generated from RAR-beta 2 by alternative splicing and usage of a CUG initiator codon. *Proc Natl Acad Sci U S A, 89*(7), 2718-2722.

Nagy, L., Kao, H. Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., Schreiber, S. L. et Evans, R. M. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell, 89*(3), 373-380.

Nahnsen, S., Bielow, C., Reinert, K. et Kohlbacher, O. (2013). Tools for label-free peptide quantification. *Mol Cell Proteomics, 12*(3), 549-556.

Nalepa, G., Rolfe, M. et Harper, J. W. (2006). Drug discovery in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Drug Discov, 5*(7), 596-613.

Napolitano, L. M., Jaffray, E. G., Hay, R. T. et Meroni, G. (2011). Functional interactions between ubiquitin E2 enzymes and TRIM proteins. *Biochem J, 434*(2), 309-319.

Nawaz, Z. et O'Malley, B. W. (2004). Urban renewal in the nucleus: is protein turnover by proteasomes absolutely required for nuclear receptor-regulated transcription? *Mol Endocrinol, 18*(3), 493-499.

Neri, L. M., Borgatti, P., Tazzari, P. L., Bortul, R., Cappellini, A., Tabellini, G., Bellacosa, A., Capitani, S. et Martelli, A. M. (2003). The phosphoinositide 3-kinase/AKT1 pathway involvement in drug and all-trans-retinoic acid resistance of leukemia cells. *Mol Cancer Res, 1*(3), 234-246.

Newell, G. R. et Hong, W. K. (2012). *The Biology and Prevention of Aerodigestive Tract Cancers* : Springer US.

Nielsen, A. L., Ortiz, J. A., You, J., Oulad-Abdelghani, M., Khechumian, R., Gansmuller, A., Chambon, P. et Losson, R. (1999). Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *Embo j, 18*(22), 6385-6395.

Nisole, S., Stoye, J. P. et Saib, A. (2005). TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol, 3*(10), 799-808.

Niu, G., Cai, W. et Chen, X. (2008). Molecular imaging of human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2) expression. *Front Biosci, 13*, 790-805.

NRNC. (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell, 97*(2), 161-163.

Nussbaum, A. K., Dick, T. P., Keilholz, W., Schirle, M., Stevanovic, S., Dietz, K., Heinemeyer, W., Groll, M., Wolf, D. H., Huber, R., Rammensee, H. G. et Schild, H. (1998). Cleavage motifs of the

yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A, 95*(21), 12504-12509.

Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A. et Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics, 1*(5), 376-386.

Orlowski, M. et Wilk, S. (2003). Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys, 415*(1), 1-5.

Orphanides, G., Lagrange, T. et Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev, 10*(21), 2657-2683.

Ostman, A., Hellberg, C. et Bohmer, F. D. (2006). Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat Rev Cancer, 6*(4), 307-320.

Paik, J., During, A., Harrison, E. H., Mendelsohn, C. L., Lai, K. et Blaner, W. S. (2001). Expression and characterization of a murine enzyme able to cleave beta-carotene. The formation of retinoids. *J Biol Chem, 276*(34), 32160-32168.

Papa, F. R., Amerik, A. Y. et Hochstrasser, M. (1999). Interaction of the Doa4 deubiquitinating enzyme with the yeast 26S proteasome. *Mol Biol Cell, 10*(3), 741-756.

Paroni, G., Fratelli, M., Gardini, G., Bassano, C., Flora, M., Zanetti, A., Guarnaccia, V., Ubezio, P., Centritto, F., Terao, M. et Garattini, E. (2012). Synergistic antitumor activity of lapatinib and retinoids on a novel subtype of breast cancer with coamplification of ERBB2 and RARA. *Oncogene, 31*(29), 3431-3443.

Patterson, S. D. et Aebersold, R. H. (2003). Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet, 33 Suppl*, 311-323.

Pavri, R., Lewis, B., Kim, T. K., Dilworth, F. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., de Murcia, G., Evans, R., Chambon, P. et Reinberg, D. (2005). PARP-1 determines specificity in a retinoid signaling pathway via direct modulation of mediator. *Mol Cell, 18*(1), 83-96.

Pelosi, A., Careccia, S., Lulli, V., Romania, P., Marziali, G., Testa, U., Lavorgna, S., Lo-Coco, F., Petti, M. C., Calabretta, B., Levrero, M., Piaggio, G. et Rizzo, M. G. (2013). miRNA let-7c promotes granulocytic differentiation in acute myeloid leukemia. *Oncogene, 32*(31), 3648-3654.

Peng, H., Begg, G. E., Schultz, D. C., Friedman, J. R., Jensen, D. E., Speicher, D. W. et Rauscher, F. J., 3rd. (2000). Reconstitution of the KRAB-KAP-1 repressor complex: a model system for defining the molecular anatomy of RING-B box-coiled-coil domain-mediated protein-protein interactions. *J Mol Biol, 295*(5), 1139-1162.

Peng, H., Feldman, I. et Rauscher, F. J., 3rd. (2002). Hetero-oligomerization among the TIF family of RBCC/TRIM domain-containing nuclear cofactors: a potential mechanism for regulating the switch between coactivation and corepression. *J Mol Biol, 320*(3), 629-644.

Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D. et Gygi, S. P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol, 21*(8), 921-926.

Perissi, V., Aggarwal, A., Glass, C. K., Rose, D. W. et Rosenfeld, M. G. (2004). A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell, 116*(4), 511-526.

Perissi, V., Jepsen, K., Glass, C. K. et Rosenfeld, M. G. (2010). Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nat Rev Genet, 11*(2), 109-123.

Perissi, V. et Rosenfeld, M. G. (2005). Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol, 6*(7), 542-554.

Perissi, V., Scafoglio, C., Zhang, J., Ohgi, K. A., Rose, D. W., Glass, C. K. et Rosenfeld, M. G. (2008). TBL1 and TBLR1 phosphorylation on regulated gene promoters overcomes dual CtBP and NCoR/SMRT transcriptional repression checkpoints. *Mol Cell, 29*(6), 755-766.

Perissi, V., Staszewski, L. M., McInerney, E. M., Kurokawa, R., Krones, A., Rose, D. W., Lambert, M. H., Milburn, M. V., Glass, C. K. et Rosenfeld, M. G. (1999). Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev, 13*(24), 3198-3208.

Perrett, C. A., Lin, D. Y. et Zhou, D. (2011). Interactions of bacterial proteins with host eukaryotic ubiquitin pathways. *Front Microbiol, 2*, 143.

Perusek, L. et Maeda, T. (2013). Vitamin A derivatives as treatment options for retinal degenerative diseases. *Nutrients, 5*(7), 2646-2666.

Petkovich, M., Brand, N. J., Krust, A. et Chambon, P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature, 330*(6147), 444-450.

Petty, W. J., Li, N., Biddle, A., Bounds, R., Nitkin, C., Ma, Y., Dragnev, K. H., Freemantle, S. J. et Dmitrovsky, E. (2005). A novel retinoic acid receptor beta isoform and retinoid resistance in lung carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst, 97*(22), 1645-1651.

Pino-Lagos, K., Guo, Y. et Noelle, R. J. (2010). Retinoic acid: a key player in immunity. *Biofactors, 36*(6), 430-436.

Piro, A., Tagarelli, G., Lagonia, P., Tagarelli, A. et Quattrone, A. (2010). Casimir Funk: his discovery of the vitamins and their deficiency disorders. *Ann Nutr Metab, 57*(2), 85-88.

Piskunov, A. et Rochette-Egly, C. (2011). MSK1 and Nuclear Receptors Signaling. In A. JSCS (Ed.), *MSKs* (pp. 85-97). Austin, TX.

Piskunov, A. et Rochette-Egly, C. (2012). A retinoic acid receptor RARalpha pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein alphaQ to activate p38MAPK. *Oncogene, 31*(28), 3333-3345.

Pogenberg, V., Guichou, J. F., Vivat-Hannah, V., Kammerer, S., Perez, E., Germain, P., de Lera, A. R., Gronemeyer, H., Royer, C. A. et Bourguet, W. (2005). Characterization of the interaction between retinoic acid receptor/retinoid X receptor (RAR/RXR) heterodimers and transcriptional coactivators through structural and fluorescence anisotropy studies. *J Biol Chem, 280*(2), 1625-1633.

Polge, C., Attaix, D. et Taillandier, D. (2015). Role of E2-Ub-conjugating enzymes during skeletal muscle atrophy. *Front Physiol, 6*, 59.

Poon, M. M. et Chen, L. (2008). Retinoic acid-gated sequence-specific translational control by RARalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A, 105*(51), 20303-20308.

Posewitz, M. C. et Tempst, P. (1999). Immobilized gallium(III) affinity chromatography of phosphopeptides. *Anal Chem, 71*(14), 2883-2892.

Prakash, S., Tian, L., Ratliff, K. S., Lehotzky, R. E. et Matouschek, A. (2004). An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation. *Nat Struct Mol Biol, 11*(9), 830-837.

Proud, C. G. (2007). Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem J, 403*(2), 217-234.

Puntoni, M. et Decensi, A. (2009). The rationale and potential of cancer chemoprevention with special emphasis on breast cancer. *Eur J Cancer, 45 Suppl 1*, 346-354.

Rajbhandari, P., Schalper, K. A., Solodin, N. M., Ellison-Zelski, S. J., Ping Lu, K., Rimm, D. L. et Alarid, E. T. (2014). Pin1 modulates ERalpha levels in breast cancer through inhibition of phosphorylation-dependent ubiquitination and degradation. *Oncogene, 33*(11), 1438-1447.

Rastinejad, F., Wagner, T., Zhao, Q. et Khorasanizadeh, S. (2000). Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. *Embo j, 19*(5), 1045-1054.

Ravid, T. et Hochstrasser, M. (2008). Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol, 9*(9), 679-690.

Remboutsika, E., Lutz, Y., Gansmuller, A., Vonesch, J. L., Losson, R. et Chambon, P. (1999). The putative nuclear receptor mediator TIF1alpha is tightly associated with euchromatin. *J Cell Sci, 112 (Pt 11)*, 1671-1683.

Renaud, J. P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H. et Moras, D. (1995). Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature, 378*(6558), 681-689.

Resing, K. A. et Ahn, N. G. (1997). Protein phosphorylation analysis by electrospray ionization-mass spectrometry. *Methods Enzymol, 283*, 29-44.

Reyes-Turcu, F. E., Ventii, K. H. et Wilkinson, K. D. (2009). Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem, 78*, 363-397.

Roberts, T. C., Morris, K. V. et Weinberg, M. S. (2014). Perspectives on the mechanism of transcriptional regulation by long non-coding RNAs. *Epigenetics, 9*(1), 13-20.

Rochel, N., Ciesielski, F., Godet, J., Moman, E., Roessle, M., Peluso-Iltis, C., Moulin, M., Haertlein, M., Callow, P., Mely, Y., Svergun, D. I. et Moras, D. (2011). Common architecture of nuclear receptor heterodimers on DNA direct repeat elements with different spacings. *Nat Struct Mol Biol, 18*(5), 564-570.

Rochette-Egly, C. (2003). Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal, 15*(4), 355-366.

Rochette-Egly, C. (2015). Retinoic acid signaling and mouse embryonic stem cell differentiation: Cross talk between genomic and non-genomic effects of RA. *Biochim Biophys Acta, 1851*(1), 66-75.

Rochette-Egly, C., Adam, S., Rossignol, M., Egly, J. M. et Chambon, P. (1997). Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIIH and phosphorylation by CDK7. *Cell, 90*(1), 97-107.

Rochette-Egly, C. et Chambon, P. (2001). F9 embryocarcinoma cells: a cell autonomous model to study the functional selectivity of RARs and RXRs in retinoid signaling. *Histol Histopathol, 16*(3), 909-922.

Rochette-Egly, C. et Germain, P. (2009). Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal, 7*, e005.

Rochette-Egly, C., Oulad-Abdelghani, M., Staub, A., Pfister, V., Scheuer, I., Chambon, P. et Gaub, M. P. (1995). Phosphorylation of the retinoic acid receptor-alpha by protein kinase A. *Mol Endocrinol, 9*(7), 860-871.

Rogers, L. D. et Foster, L. J. (2009). Phosphoproteomics--finally fulfilling the promise? *Mol Biosyst, 5*(10), 1122-1129.

Roskoski, R., Jr. (2005). Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun, 331*(1), 1-14.

Rousselot, P., Hardas, B., Patel, A., Guidez, F., Gaken, J., Castaigne, S., Dejean, A., de The, H., Degos, L., Farzaneh, F. et et al. (1994). The PML-RAR alpha gene product of the t(15;17) translocation inhibits retinoic acid-induced granulocytic differentiation and mediated transactivation in human myeloid cells. *Oncogene, 9*(2), 545-551.

Ruhl, R., Krzyzosiak, A., Niewiadomska-Cimicka, A., Rochel, N., Szeles, L., Vaz, B., Wietrzych-Schindler, M., Alvarez, S., Szklenar, M., Nagy, L., de Lera, A. R. et Krezel, W. (2015). 9-cis-13,14-Dihydroretinoic Acid Is an Endogenous Retinoid Acting as RXR Ligand in Mice. *PLoS Genet, 11*(6), e1005213.

Ruiz, F. X., Porte, S., Pares, X. et Farres, J. (2012). Biological role of aldo-keto reductases in retinoic Acid biosynthesis and signaling. *Front Pharmacol, 3*, 58.

Ruthenburg, A. J., Li, H., Patel, D. J. et Allis, C. D. (2007). Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol, 8*(12), 983-994.

Saeki, Y., Kudo, T., Sone, T., Kikuchi, Y., Yokosawa, H., Toh-e, A. et Tanaka, K. (2009). Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *Embo j, 28*(4), 359-371.

Sakata, E., Saeki, Y. et Tanaka, K. (2009). The proteasome's crown for destruction. *Mol Cell, 34*(5), 519-520.

Samarut, E., Amal, I., Markov, G. V., Stote, R., Dejaegere, A., Laudet, V. et Rochette-Egly, C. (2011). Evolution of nuclear retinoic acid receptor alpha (RARalpha) phosphorylation sites. Serine gain provides fine-tuned regulation. *Mol Biol Evol, 28*(7), 2125-2137.

Samarut, E. et Rochette-Egly, C. (2012). Nuclear retinoic acid receptors: conductors of the retinoic acid symphony during development. *Mol Cell Endocrinol, 348*(2), 348-360.

Sande, S. et Privalsky, M. L. (1996). Identification of TRACs (T3 receptor-associating cofactors), a family of cofactors that associate with, and modulate the activity of, nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol, 10*(7), 813-825.

Santos, N. C. et Kim, K. H. (2010). Activity of retinoic acid receptor-alpha is directly regulated at its protein kinase A sites in response to follicle-stimulating hormone signaling. *Endocrinology, 151*(5), 2361-2372.

Saurin, A. J., Borden, K. L., Boddy, M. N. et Freemont, P. S. (1996). Does this have a familiar RING? *Trends Biochem Sci, 21*(6), 208-214.

Scheffner, M. et Kumar, S. (2014). Mammalian HECT ubiquitin-protein ligases: biological and pathophysiological aspects. *Biochim Biophys Acta, 1843*(1), 61-74.

Schreiber, R., Taschler, U., Preiss-Landl, K., Wongsiriroj, N., Zimmermann, R. et Lass, A. (2012). Retinyl ester hydrolases and their roles in vitamin A homeostasis. *Biochim Biophys Acta, 1821*(1), 113-123.

Schultz, D. C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G. G. et Rauscher, F. J., 3rd. (2002). SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev, 16*(8), 919-932.

Schultz, D. C., Friedman, J. R. et Rauscher, F. J., 3rd. (2001). Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD. *Genes Dev, 15*(4), 428-443.

Schwabe, J. W., Chapman, L., Finch, J. T. et Rhodes, D. (1993). The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell, 75*(3), 567-578.

Schwanhausser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W. et Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature, 473*(7347), 337-342.

Segre, C. V. et Chiocca, S. (2011). Regulating the regulators: the post-translational code of class I HDAC1 and HDAC2. *J Biomed Biotechnol, 2011*, 690848.

Semba, R. D. (2012). On the 'discovery' of vitamin A. *Ann Nutr Metab, 61*(3), 192-198.

Seshacharyulu, P., Pandey, P., Datta, K. et Batra, S. K. (2013). Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer Lett, 335*(1), 9-18.

Shaw, N., Elholm, M. et Noy, N. (2003). Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Biol Chem, 278*(43), 41589-41592.

She, Q. B., Chandarlapaty, S., Ye, Q., Lobo, J., Haskell, K. M., Leander, K. R., DeFeo-Jones, D., Huber, H. E. et Rosen, N. (2008). Breast tumor cells with PI3K mutation or HER2 amplification are selectively addicted to Akt signaling. *PLoS One, 3*(8), e3065.

Shete, V. et Quadro, L. (2013). Mammalian metabolism of beta-carotene: gaps in knowledge. *Nutrients, 5*(12), 4849-4868.

Shih, M. Y., Kane, M. A., Zhou, P., Yen, C. L., Streeper, R. S., Napoli, J. L. et Farese, R. V., Jr. (2009). Retinol Esterification by DGAT1 Is Essential for Retinoid Homeostasis in Murine Skin. *J Biol Chem, 284*(7), 4292-4299.

Si, J. et Collins, S. J. (2008). Activated Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase IIgamma is a critical regulator of myeloid leukemia cell proliferation. *Cancer Res, 68*(10), 3733-3742.

Si, J., Mueller, L. et Collins, S. J. (2007). CaMKII regulates retinoic acid receptor transcriptional activity and the differentiation of myeloid leukemia cells. *J Clin Invest, 117*(5), 1412-1421.

Sickmann, A. et Meyer, H. E. (2001). Phosphoamino acid analysis. *Proteomics, 1*(2), 200-206.

Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A. et McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science, 235*(4785), 177-182.

Smith, D. M., Chang, S. C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y. et Goldberg, A. L. (2007). Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. *Mol Cell, 27*(5), 731-744.

Smith, W. C., Nakshatri, H., Leroy, P., Rees, J. et Chambon, P. (1991). A retinoic acid response element is present in the mouse cellular retinol binding protein I (mCRBPI) promoter. *Embo j, 10*(8), 2223-2230.

Sorokin, A. V., Kim, E. R. et Ovchinnikov, L. P. (2009). Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry (Mosc), 74*(13), 1411-1442.

Spinella, M. J. et Dmitrovsky, E. (2000). Aberrant retinoid signaling and breast cancer: the view from outside the nucleus. *J Natl Cancer Inst, 92*(6), 438-440.

Srinivas, H., Juroske, D. M., Kalyankrishna, S., Cody, D. D., Price, R. E., Xu, X. C., Narayanan, R., Weigel, N. L. et Kurie, J. M. (2005). c-Jun N-terminal kinase contributes to aberrant retinoid signaling in lung cancer cells by phosphorylating and inducing proteasomal degradation of retinoic acid receptor alpha. *Mol Cell Biol, 25*(3), 1054-1069.

Srinivas, H., Xia, D., Moore, N. L., Uray, I. P., Kim, H., Ma, L., Weigel, N. L., Brown, P. H. et Kurie, J. M. (2006). Akt phosphorylates and suppresses the transactivation of retinoic acid receptor alpha. *Biochem J, 395*(3), 653-662.

Sripathy, S. P., Stevens, J. et Schultz, D. C. (2006). The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of de novo HP1-demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol, 26*(22), 8623-8638.

Stadtmueller, B. M. et Hill, C. P. (2011). Proteasome activators. *Mol Cell, 41*(1), 8-19.

Stanisic, V., Malovannaya, A., Qin, J., Lonard, D. M. et O'Malley, B. W. (2009). OTU Domain-containing ubiquitin aldehyde-binding protein 1 (OTUB1) deubiquitinates estrogen receptor (ER) alpha and affects ERalpha transcriptional activity. *J Biol Chem, 284*(24), 16135-16145.

Stavridis, M. P., Collins, B. J. et Storey, K. G. (2010). Retinoic acid orchestrates fibroblast growth factor signalling to drive embryonic stem cell differentiation. *Development, 137*(6), 881-890.

Stehlin-Gaon, C., Willmann, D., Zeyer, D., Sanglier, S., Van Dorsselaer, A., Renaud, J. P., Moras, D. et Schule, R. (2003). All-trans retinoic acid is a ligand for the orphan nuclear receptor ROR beta. *Nat Struct Biol, 10*(10), 820-825.

Stewart, M. D. et Wong, J. (2009). Nuclear receptor repression: regulatory mechanisms and physiological implications. *Prog Mol Biol Transl Sci, 87*, 235-259.

Striebel, F., Kress, W. et Weber-Ban, E. (2009). Controlled destruction: AAA+ ATPases in protein degradation from bacteria to eukaryotes. *Curr Opin Struct Biol, 19*(2), 209-217.

Sudol, M., Chen, H. I., Bougeret, C., Einbond, A. et Bork, P. (1995). Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain. *FEBS Lett, 369*(1), 67-71.

Sudol, M., Sliwa, K. et Russo, T. (2001). Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS Lett, 490*(3), 190-195.

Sun, K., Montana, V., Chellappa, K., Brelivet, Y., Moras, D., Maeda, Y., Parpura, V., Paschal, B. M. et Sladek, F. M. (2007). Phosphorylation of a conserved serine in the deoxyribonucleic acid binding domain of nuclear receptors alters intracellular localization. *Mol Endocrinol, 21*(6), 1297-1311.

Sun, S. Y. et Lotan, R. (2002). Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol, 41*(1), 41-55.

Tait, S. W., de Vries, E., Maas, C., Keller, A. M., D'Santos, C. S. et Borst, J. (2007). Apoptosis induction by Bid requires unconventional ubiquitination and degradation of its N-terminal fragment. *J Cell Biol, 179*(7), 1453-1466.

Takahashi, H., Kanno, T., Nakayamada, S., Hirahara, K., Sciume, G., Muljo, S. A., Kuchen, S., Casellas, R., Wei, L., Kanno, Y. et O'Shea, J. J. (2012). TGF-beta and retinoic acid induce the microRNA miR-10a, which targets Bcl-6 and constrains the plasticity of helper T cells. *Nat Immunol, 13*(6), 587-595.

Tanaka, K., Yoshimura, T., Tamura, T., Fujiwara, T., Kumatori, A. et Ichihara, A. (1990). Possible mechanism of nuclear translocation of proteasomes. *FEBS Lett, 271*(1-2), 41-46.

Tanaka, T., Rodriguez de la Concepcion, M. L. et De Luca, L. M. (2001). Involvement of all-trans-retinoic acid in the breakdown of retinoic acid receptors alpha and gamma through proteasomes in MCF-7 human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol, 61*(11), 1347-1355.

Taneja, R., Rochette-Egly, C., Plassat, J. L., Penna, L., Gaub, M. P. et Chambon, P. (1997). Phosphorylation of activation functions AF-1 and AF-2 of RAR alpha and RAR gamma is indispensable for differentiation of F9 cells upon retinoic acid and cAMP treatment. *Embo j, 16*(21), 6452-6465.

Tang, G. et Russell, R. (2009). Carotenoids as Provitamin A. In G. Britton, H. Pfander, & S. Liaaen-Jensen (Eds.), *Carotenoids* (Vol. 5, pp. 149-172): Birkhäuser Basel.

Tansey, W. P. (2001). Transcriptional activation: risky business. *Genes Dev, 15*(9), 1045-1050.

Tari, A. M., Lim, S. J., Hung, M. C., Esteva, F. J. et Lopez-Berestein, G. (2002). Her2/neu induces all-trans retinoic acid (ATRA) resistance in breast cancer cells. *Oncogene, 21*(34), 5224-5232.

Tatham, M. H., Rodriguez, M. S., Xirodimas, D. P. et Hay, R. T. (2009). Detection of protein SUMOylation in vivo. *Nat Protoc, 4*(9), 1363-1371.

Temporini, C., Calleri, E., Massolini, G. et Caccialanza, G. (2008). Integrated analytical strategies for the study of phosphorylation and glycosylation in proteins. *Mass Spectrom Rev, 27*(3), 207-236.

Thatcher, J. E. et Isoherranen, N. (2009). The role of CYP26 enzymes in retinoic acid clearance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol, 5*(8), 875-886.

Thenot, S., Henriquet, C., Rochefort, H. et Cavailles, V. (1997). Differential interaction of nuclear receptors with the putative human transcriptional coactivator hTIF1. *J Biol Chem, 272*(18), 12062-12068.

Theodosiou, M., Laudet, V. et Schubert, M. (2010). From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell Mol Life Sci, 67*(9), 1423-1445.

Thiede, B., Lamer, S., Mattow, J., Siejak, F., Dimmler, C., Rudel, T. et Jungblut, P. R. (2000). Analysis of missed cleavage sites, tryptophan oxidation and N-terminal pyroglutamylation after in-gel tryptic digestion. *Rapid Commun Mass Spectrom, 14*(6), 496-502.

Thompson, A., Schafer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., Johnstone, R., Mohammed, A. K. et Hamon, C. (2003). Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal Chem, 75*(8), 1895-1904.

Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. et Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo j, 19*(1), 94-102.

Tisserand, J., Khetchoumian, K., Thibault, C., Dembele, D., Chambon, P. et Losson, R. (2011). Tripartite motif 24 (Trim24/Tif1alpha) tumor suppressor protein is a novel negative regulator of interferon (IFN)/signal transducers and activators of transcription (STAT) signaling pathway acting through retinoic acid receptor alpha (Raralpha) inhibition. *J Biol Chem, 286*(38), 33369-33379.

Tofaris, G. K., Layfield, R. et Spillantini, M. G. (2001). alpha-synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *FEBS Lett, 509*(1), 22-26.

Tonks, N. K. (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol, 7*(11), 833-846.

Tsai, W. W., Wang, Z., Yiu, T. T., Akdemir, K. C., Xia, W., Winter, S., Tsai, C. Y., Shi, X., Schwarzer, D., Plunkett, W., Aronow, B., Gozani, O., Fischle, W., Hung, M. C., Patel, D. J. et Barton, M. C. (2010). TRIM24 links a non-canonical histone signature to breast cancer. *Nature, 468*(7326), 927-932.

Udeshi, N. D., Mertins, P., Svinkina, T. et Carr, S. A. (2013). Large-scale identification of ubiquitination sites by mass spectrometry. *Nat Protoc, 8*(10), 1950-1960.

Underhill, C., Qutob, M. S., Yee, S. P. et Torchia, J. (2000). A novel nuclear receptor corepressor complex, N-CoR, contains components of the mammalian SWI/SNF complex and the corepressor KAP-1. *J Biol Chem, 275*(51), 40463-40470.

Unno, M., Mizushima, T., Morimoto, Y., Tomisugi, Y., Tanaka, K., Yasuoka, N. et Tsukihara, T. (2002). The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 A resolution. *Structure, 10*(5), 609-618.

Valacchi, G., Sticozzi, C., Lim, Y. et Pecorelli, A. (2011). Scavenger receptor class B type I: a multifunctional receptor. *Ann N Y Acad Sci, 1229*, E1-7.

Van Loo-Bouwman, C. A., Naber, T. H. et Schaafsma, G. (2014). A review of vitamin A equivalency of beta-carotene in various food matrices for human consumption. *Br J Nutr, 111*(12), 2153-2166.

van Wijk, S. J. et Timmers, H. T. (2010). The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *FASEB J, 24*(4), 981-993.

Vandermarliere, E., Mueller, M. et Martens, L. (2013). Getting intimate with trypsin, the leading protease in proteomics. *Mass Spectrom Rev, 32*(6), 453-465.

Varlakhanova, N., Hahm, J. B. et Privalsky, M. L. (2011). Regulation of SMRT corepressor dimerization and composition by MAP kinase phosphorylation. *Mol Cell Endocrinol, 332*(1-2), 180-188.

Venturini, L., You, J., Stadler, M., Galien, R., Lallemand, V., Koken, M. H., Mattei, M. G., Ganser, A., Chambon, P., Losson, R. et de The, H. (1999). TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene, 18*(5), 1209-1217.

Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, J. R., 3rd, Koonin, E. V. et Deshaies, R. J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science, 298*(5593), 611-615.

Verma, R., McDonald, H., Yates, J. R., 3rd et Deshaies, R. J. (2001). Selective degradation of ubiquitinated Sic1 by purified 26S proteasome yields active S phase cyclin-Cdk. *Mol Cell, 8*(2), 439-448.

Vogel, W., Lammers, R., Huang, J. et Ullrich, A. (1993). Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science, 259*(5101), 1611-1614.

vom Baur, E., Zechel, C., Heery, D., Heine, M. J., Garnier, J. M., Vivat, V., Le Douarin, B., Gronemeyer, H., Chambon, P. et Losson, R. (1996). Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *Embo j, 15*(1), 110-124.

Vosper, J. M., McDowell, G. S., Hindley, C. J., Fiore-Heriche, C. S., Kucerova, R., Horan, I. et Philpott, A. (2009). Ubiquitylation on canonical and non-canonical sites targets the transcription factor neurogenin for ubiquitin-mediated proteolysis. *J Biol Chem, 284*(23), 15458-15468.

Wald, G. (1968). Molecular basis of visual excitation. *Science, 162*(3850), 230-239.

Wang, H. et Hanash, S. (2005). Intact-protein based sample preparation strategies for proteome analysis in combination with mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev, 24*(3), 413-426.

Wang, H. R., Kania, M., Baumeister, W. et Nederlof, P. M. (1997). Import of human and Thermoplasma 20S proteasomes into nuclei of HeLa cells requires functional NLS sequences. *Eur J Cell Biol, 73*(2), 105-113.

Wang, J., Zhu, J., Dong, M., Yu, H., Dai, X. et Li, K. (2014). Knockdown of tripartite motif containing 24 by lentivirus suppresses cell growth and induces apoptosis in human colorectal cancer cells. *Oncol Res, 22*(1), 39-45.

Wang, T., Simbulan-Rosenthal, C. M., Smulson, M. E., Chock, P. B. et Yang, D. C. (2008). Polyubiquitylation of PARP-1 through ubiquitin K48 is modulated by activated DNA, NAD+, and dipeptides. *J Cell Biochem, 104*(1), 318-328.

Wang, X. D., Russell, R. M., Liu, C., Stickel, F., Smith, D. E. et Krinsky, N. I. (1996). Beta-oxidation in rabbit liver in vitro and in the perfused ferret liver contributes to retinoic acid biosynthesis from beta-apocarotenoic acids. *J Biol Chem, 271*(43), 26490-26498.

Warnmark, A., Treuter, E., Wright, A. P. et Gustafsson, J. A. (2003). Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol, 17*(10), 1901-1909.

Warrell, R. P., Jr. (1993). Retinoid resistance in acute promyelocytic leukemia: new mechanisms, strategies, and implications. *Blood, 82*(7), 1949-1953.

Wassenegger, M. (2005). The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell, 122*(1), 13-16.

Wei, L. N., Hu, X., Chandra, D., Seto, E. et Farooqui, M. (2000). Receptor-interacting protein 140 directly recruits histone deacetylases for gene silencing. *J Biol Chem, 275*(52), 40782-40787.

Weigel, N. L. et Moore, N. L. (2007). Kinases and protein phosphorylation as regulators of steroid hormone action. *Nucl Recept Signal, 5*, e005.

Wilson, K. S., Roberts, H., Leek, R., Harris, A. L. et Geradts, J. (2002). Differential gene expression patterns in HER2/neu-positive and -negative breast cancer cell lines and tissues. *Am J Pathol, 161*(4), 1171-1185.

Winter, D., Kugelstadt, D., Seidler, J., Kappes, B. et Lehmann, W. D. (2009). Protein phosphorylation influences proteolytic cleavage and kinase substrate properties exemplified by analysis of in vitro phosphorylated Plasmodium falciparum glideosome-associated protein 45 by nano-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Biochem, 393*(1), 41-47.

Woychik, N. A. et Hampsey, M. (2002). The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function. *Cell, 108*(4), 453-463.

Wright, P. E. et Dyson, H. J. (2015). Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol, 16*(1), 18-29.

Wu, C. J., Conze, D. B., Li, T., Srinivasula, S. M. et Ashwell, J. D. (2006). Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation [corrected]. *Nat Cell Biol, 8*(4), 398-406.

Wu, H. Y. et Liao, P. C. (2008). Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry. *Chang Gung Med J, 31*(3), 217-227.

Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T. A., Kwon, S. Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A. J., Chait, B. T., Badenhorst, P., Wu, C. et Allis, C. D. (2006). A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature, 442*(7098), 86-90.

Xu, P., Duong, D. M., Seyfried, N. T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D. et Peng, J. (2009). Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell, 137*(1), 133-145.

Xue, D., Zhang, X., Zhang, X., Liu, J., Li, N., Liu, C., Liu, Y. et Wang, P. (2015). Clinical significance and biological roles of TRIM24 in human bladder carcinoma. *Tumour Biol*.

Yao, T. et Cohen, R. E. (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature, 419*(6905), 403-407.

Yarden, Y. et Pines, G. (2012). The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer, 12*(8), 553-563.

Yarden, Y. et Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol, 2*(2), 127-137.

Yeum, K. J. et Russell, R. M. (2002). Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annu Rev Nutr, 22*, 483-504.

Yin, B. (2011). PRAME: from diagnostic marker and tumor antigen to promising target of RNAi therapy in leukemic cells. *Leuk Res, 35*(9), 1159-1160.

Yu, H., Chen, J. K., Feng, S., Dalgarno, D. C., Brauer, A. W. et Schreiber, S. L. (1994). Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell, 76*(5), 933-945.

Yu, V. C., Delsert, C., Andersen, B., Holloway, J. M., Devary, O. V., Naar, A. M., Kim, S. Y., Boutin, J. M., Glass, C. K. et Rosenfeld, M. G. (1991). RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell, 67*(6), 1251-1266.

Zaman, M. M., Nomura, T., Takagi, T., Okamura, T., Jin, W., Shinagawa, T., Tanaka, Y. et Ishii, S. (2013). Ubiquitination-deubiquitination by the TRIM27-USP7 complex regulates tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Mol Cell Biol, 33*(24), 4971-4984.

Zanotto-Filho, A., Cammarota, M., Gelain, D. P., Oliveira, R. B., Delgado-Canedo, A., Dalmolin, R. J., Pasquali, M. A. et Moreira, J. C. (2008). Retinoic acid induces apoptosis by a non-classical mechanism of ERK1/2 activation. *Toxicol In Vitro, 22*(5), 1205-1212.

Zardo, G., Ciolfi, A., Vian, L., Billi, M., Racanicchi, S., Grignani, F. et Nervi, C. (2012a). Transcriptional targeting by microRNA-polycomb complexes: a novel route in cell fate determination. *Cell Cycle, 11*(19), 3543-3549.

Zardo, G., Ciolfi, A., Vian, L., Starnes, L. M., Billi, M., Racanicchi, S., Maresca, C., Fazi, F., Travaglini, L., Noguera, N., Mancini, M., Nanni, M., Cimino, G., Lo-Coco, F., Grignani, F. et Nervi, C. (2012b). Polycombs and microRNA-223 regulate human granulopoiesis by transcriptional control of target gene expression. *Blood, 119*(17), 4034-4046.

Zarrinpar, A. et Lim, W. A. (2000). Converging on proline: the mechanism of WW domain peptide recognition. *Nat Struct Biol, 7*(8), 611-613.

Zechel, C., Shen, X. Q., Chambon, P. et Gronemeyer, H. (1994a). Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements. *Embo j, 13*(6), 1414-1424.

Zechel, C., Shen, X. Q., Chen, J. Y., Chen, Z. P., Chambon, P. et Gronemeyer, H. (1994b). The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *Embo j, 13*(6), 1425-1433.

Zelent, A., Krust, A., Petkovich, M., Kastner, P. et Chambon, P. (1989). Cloning of murine alpha and beta retinoic acid receptors and a novel receptor gamma predominantly expressed in skin. *Nature, 339*(6227), 714-717.

Zelent, A., Mendelsohn, C., Kastner, P., Krust, A., Garnier, J. M., Ruffenach, F., Leroy, P. et Chambon, P. (1991). Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor beta generated by usage of two promoters and alternative splicing. *Embo j, 10*(1), 71-81.

Zeng, L., Yap, K. L., Ivanov, A. V., Wang, X., Mujtaba, S., Plotnikova, O., Rauscher, F. J., 3rd et Zhou, M. M. (2008). Structural insights into human KAP1 PHD finger-bromodomain and its role in gene silencing. *Nat Struct Mol Biol, 15*(6), 626-633.

Zeng, L. et Zhou, M. M. (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett, 513*(1), 124-128.

Zhan, Q., Ge, Q., Ohira, T., Van Dyke, T. et Badwey, J. A. (2003). p21-activated kinase 2 in neutrophils can be regulated by phosphorylation at multiple sites and by a variety of protein phosphatases. *J Immunol, 171*(7), 3785-3793.

Zhang, J. W., Wang, J. Y., Chen, S. J. et Chen, Z. (2000). Mechanisms of all-trans retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *J Biosci, 25*(3), 275-284.

Zhang, L. H., Yin, A. A., Cheng, J. X., Huang, H. Y., Li, X. M., Zhang, Y. Q., Han, N. et Zhang, X. (2015). TRIM24 promotes glioma progression and enhances chemoresistance through activation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncogene, 34*(5), 600-610.

Zhang, Z., Lv, X., Yin, W. C., Zhang, X., Feng, J., Wu, W., Hui, C. C., Zhang, L. et Zhao, Y. (2013). Ter94 ATPase complex targets k11-linked ubiquitinated ci to proteasomes for partial degradation. *Dev Cell, 25*(6), 636-644.

Zhao, Y., Lang, G., Ito, S., Bonnet, J., Metzger, E., Sawatsubashi, S., Suzuki, E., Le Guezennec, X., Stunnenberg, H. G., Krasnov, A., Georgieva, S. G., Schule, R., Takeyama, K., Kato, S., Tora, L. et Devys, D. (2008). A TFTC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. *Mol Cell, 29*(1), 92-101.

Zheng, B., Han, M., Bernier, M. et Wen, J. K. (2009). Nuclear actin and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *Febs j, 276*(10), 2669-2685.

Zheng, B., Han, M., Shu, Y. N., Li, Y. J., Miao, S. B., Zhang, X. H., Shi, H. J., Zhang, T. et Wen, J. K. (2011). HDAC2 phosphorylation-dependent Klf5 deacetylation and RARalpha acetylation induced by RAR agonist switch the transcription regulatory programs of p21 in VSMCs. *Cell Res, 21*(10), 1487-1508.

Zhong, M., Kawaguchi, R., Kassai, M. et Sun, H. (2012). Retina, retinol, retinal and the natural history of vitamin A as a light sensor. *Nutrients, 4*(12), 2069-2096.

Zhou, X. E., Suino-Powell, K. M., Xu, Y., Chan, C. W., Tanabe, O., Kruse, S. W., Reynolds, R., Engel, J. D. et Xu, H. E. (2011). The orphan nuclear receptor TR4 is a vitamin A-activated nuclear receptor. *J Biol Chem, 286*(4), 2877-2885.

Zhu, J., Gianni, M., Kopf, E., Honore, N., Chelbi-Alix, M., Koken, M., Quignon, F., Rochette-Egly, C. et de The, H. (1999). Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid

receptor alpha (RARalpha) and oncogenic RARalpha fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A, 96*(26), 14807-14812.

Zimmermann, S. et Moelling, K. (1999). Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science, 286*(5445), 1741-1744.

Zong, C., Gomes, A. V., Drews, O., Li, X., Young, G. W., Berhane, B., Qiao, X., French, S. W., Bardag-Gorce, F. et Ping, P. (2006). Regulation of murine cardiac 20S proteasomes: role of associating partners. *Circ Res, 99*(4), 372-380.

Zwickl, P., Voges, D. et Baumeister, W. (1999). The proteasome: a macromolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 354*(1389), 1501-1511.

ANNEXES

PUBLICATION 1

5

CONTROL OF GENE EXPRESSION BY NUCLEAR RETINOIC ACID RECEPTORS: POST-TRANSLATIONAL AND EPIGENETIC REGULATORY MECHANISMS

Marilyn Carrier and Cécile Rochette-Egly

Functional Genomics and Cancer Department, (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire IGBMC), Université de Strasbourg, Illkirch, France

I. INTRODUCTION

The nuclear retinoic acid receptors (RARα, β, γ, also called NR1B1, NR1B2, NR1B3) are ligand-dependent regulators of transcription, which mediate the effects of all-*trans*-retinoic acid, the active endogenous metabolite of vitamin A. *In vivo*, RARs transduce the retinoic acid (RA) signal as heterodimers with RXRs and regulate the expression of various genes involved in cell growth and in development, such as members of the homeobox (Hox) gene clusters (Samarut and Rochette-Egly, 2012). The description of the crystallographic structures of RARs (le Maire *et al.*, 2010), the characterization of the polymorphic response elements (RAREs) of their target genes (Moutier *et al.,* 2012), the identification of the multiprotein complexes involved in their transcriptional activity (Lefebvre *et al.,* 2005; and, more recently, the description of the architecture of the heterodimers on response elements (Rochel *et al.,* 2011; Brelivet *et al.,* 2012), provided a wealth of information on their mechanism of action (see also chapters 6–9).

In addition to this scenario, recent studies based on the combination of chromatin immunoprecipitation with microarrays or high throughput DNA sequencing indicated that the expression of RAR-target genes in different RA-responsive cell models such as mouse embryonal carcinoma cells and mouse embryonic stem cells, relies not only on the occupancy of their promoters by RARs but also on the organization

The Retinoids: Biology, Biochemistry, and Disease, First Edition. Edited by Pascal Dollé and Karen Niederreither.
© 2015 John Wiley & Sons, Inc. Published 2015 by John Wiley & Sons, Inc.

0002212773.indd 93 1/23/2015 6:36:25 PM

of their epigenetic landscape and, thus, on the state of chromatin (Gillespie and Gudas, 2007b; Gudas and Wagner, 2011; Kashyap *et al.,* 2011; Mahony *et al.,* 2011; Mendoza-Parra *et al.,* 2011) (Chapter 12).

The basic unit of chromatin is represented by nucleosomes, which consist of 147 base pairs (bp) of DNA wrapped around a histone octamer consisting of two copies of the H2A, H2B, H3 and H4 histones. All histones have an unstructured N-terminal tail, which is a target for post-translational modifications (PTMs) such as methylation of arginine (R), methylation, acetylation, ubiquitination and sumoylation of lysine (K), and phosphorylation of serine (S) and threonine (T) residues. The epigenetic mechanisms include PTMs of histones, DNA methylation, ATP-dependent chromatin remodeling, and nonprotein coding RNA pathways (Rosenfeld *et al.,* 2006; Kouzarides, 2007; Kato *et al.,* 2011; Tollervey and Lunyak, 2012). The combinatorial patterns of these mechanisms define different chromatin states that regulate several aspects of gene transcription (Ruthenburg *et al.,* 2007).

However, this scenario became more complicated subsequent to the discovery that RARs also have extra nuclear effects and activate signaling pathways (Bruck *et al.,* 2009; Piskunov and Rochette-Egly, 2012), which generate an additional PTM code.

In this chapter, the canonical nuclear mechanisms of regulation of transcription by RARs are reviewed, focusing on recent advances in their epigenetic effects. Also described are the extra nuclear nontranscriptional effects of RA and how they are integrated in the nucleus via a post-translational code for RARs and its coregulators.

II. THE BASICS OF RAR STRUCTURE

RARs have a well-defined domain organization and structure consisting of a variable N-terminal domain (NTD) and two well-structured and highly conserved domains, a central DNA-binding domain (DBD) and a C-terminal ligand-binding domain (LBD) (Bastien and Rochette-Egly 2004; Rochette-Egly and Germain 2009)(Figure 5.1). The DBD is composed mainly of two zinc-nucleated modules and two alpha helices, which cross at right angles and fold into a single globular domain. The LBD is more complex as it is involved in ligand binding, dimerization and interaction with multiple coregulators. Briefly, it is formed by 12 conserved alpha-helices and a beta-turn, which are separated by loops and folded into a three-layered and parallel helical sandwich (Chapter 7).

The C-terminal helix, H12, is more flexible and adopts conformations that differ from one RAR to the other and after ligand binding. At the molecular point of view, changes in the orientation of H12 contribute to the formation of different interaction surfaces for coregulators. Indeed, in the unliganded form of RARα, H12 is in an open conformation and unmasks a hydrophobic groove generated by helices H3 and H4 (le Maire *et al.,* 2010). This interface can specifically bind the extended alpha helix box with an LxxI/HIxxxI/L motif found in corepressors (Perissi *et al.,* 1999). In contrast, subsequent to ligand binding there is a repositioning of H11 in the continuity of H10 and the concomitant swinging of H12 that moves in a mousetrap model and tightly packs against H3 and H4. Consequently, a new hydrophobic cleft is formed between H3, H4 and H12, with a charge clamp between a conserved glutamate residue in H12 and a lysine in H3. This charge clamp specifically grips the ends of the helix specified by the LxxLL motif of the p160 coactivators (Perissi and Rosenfeld, 2005).

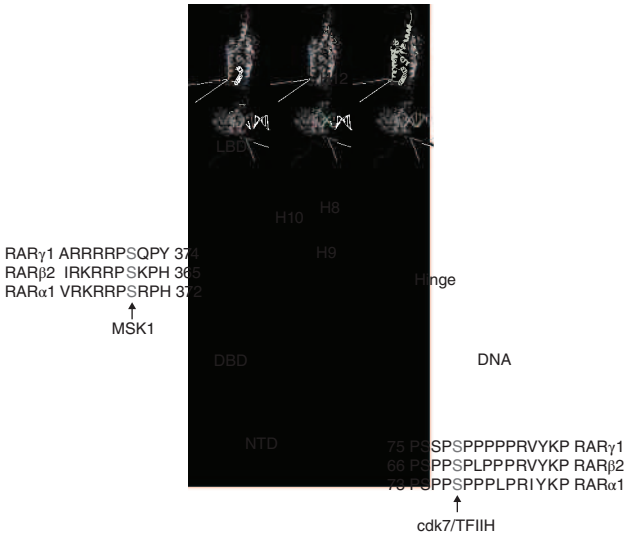


Figure 5.1. RAR domains and phosphorylation sites. RARs share a domain organization with an unstructured N-terminal domain (NTD) and two well-structured domains: a central DNA binding domain (DBD) and a C-terminal ligand-binding domain (LBD). The phosphorylation sites located in the NTD and the LBD are shown. For color detail, please see color plate section.

In contrast to the DBD and LBD, the NTD is not conserved between RARs and RXRs and even between the different subtypes and isoforms of a given receptor.[1] Moreover, there are still no high-resolution structures available for this domain. However, it contains phosphorylation sites, which are conserved between RARs (Rochette-Egly, 2003).

III. REPRESSIVE EPIGENETIC LANDSCAPE OF RAR TARGET GENES IN THE ABSENCE OF RETINOIC ACID

A. Histone Deacetylation by the Corepressor Complexes

According to the canonical model of gene regulation by RARs (Dilworth and Chambon, 2001), in the absence of a ligand and in the context of chromatin where the RAREs are accessible, the RARα subtype binds DNA and represses target gene expression through the recruitment of corepressors, such as NCoR (nuclear receptor corepressor) or SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor), which are genetic paralogs (Perissi *et al.,* 2010). There are multiple NCoR and SMRT protein variants produced by alternative splicing and differing in their tissue expression pattern and in their preference for specific nuclear receptor partners (Mengeling *et al.,* 2012).

[1] By definition RAR isotypes (or subtypes) refer to the three receptors (RARα or NR1B1, RARβ or NR1B2, RARγ or NR1B3) encoded by the cognate genes *Rara*, *Rarb*, *Rarg*. The RXR isotypes are: RXRα or NR2B1, RXRβ or NR2B2, RXRγ or NR2B3, encoded by the *Rxra*, *Rxrb*, and *Rxrg* genes. Isoforms of a given receptor are N-terminal variants generated by alternative promoter usage and/or splicing.

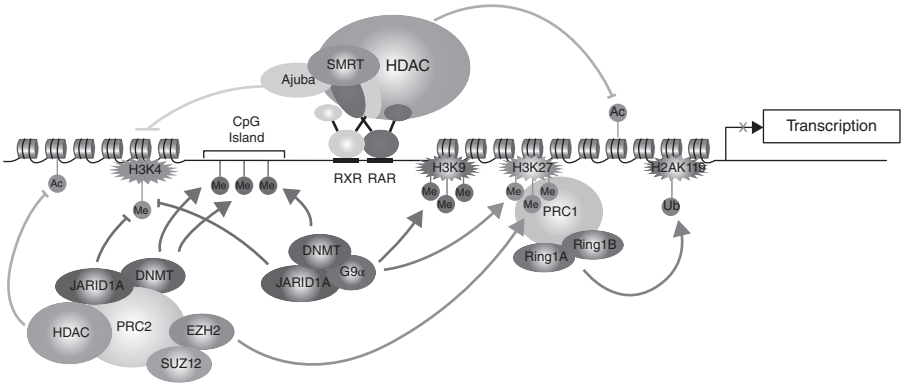


Figure 5.2. Repressive epigenetic landscape in the absence of RA. In the absence of a ligand, DNA-bound RARα maintains chromatin in a compacted repressive state through the recruitment of Ajuba or SMRT, which functions as a platform for the recruitment of several subcomplexes with histone deacetylase activity (HDACs). Histones are also trimethylated at H3K9 and H3K27 and ubiquitinated at H2AK119, which are repressive marks. Methylation of H3K9 is written by G9α. H3K27me3 is written by both G9α and the EZH2 subunit of PRC2. It is also read by the PRC1 complex, which then ubiquitinates H2AK119. Both G9α and PRC2 are associated with JARID1A, which erases the activating H3K4me3 mark. They are also associated with DNMTs, which methylate DNA at CpG islands. For color detail, please see color plate section.

Accordingly, though both NCoRs and SMRTs can bind RARα, numerous studies suggested that RARα preferentially recruits SMRTs (Cohen *et al.,* 2001).

SMRTs and NCoRs do not harbor intrinsic enzymatic activities but serve as adaptors, recruiting high molecular weight complexes endowed with enzymatic activities such as histone deacetylase activity (HDACs) (Perissi *et al.,* 2010) (Figure 5.2). In general, removal of acetyl groups from histone tails is one of the most important epigenetic process that induces chromatin condensation and prevents gene transcription (Kouzarides, 2007). HDACs are a large protein family, which contains 11 members that have been subdivided into 3 subclasses. Class I deacetylases (HDAC1–HDAC3) have been identified in a number of corepressor complexes associated with RARα.

It must be pointed out that DNA binding of the other RAR subtypes RARγ and RARβ, in the absence of ligand, is generally not related to repression. Indeed, in contrast to RARα, RARγ and RARβ poorly interact with corepressors and it has been proposed that in these receptors H12 interacts with H3 even in the absence of ligand, thus occluding the corepressor docking site (Farboud *et al.,* 2003; Hauksdottir *et al.,* 2003).

Finally, transcription repression in the absence of RA also involves other corepressors, such as the multiple LIM domain-containing protein Ajuba (Hou *et al.,* 2010). The LIM domains of Ajuba contain putative nuclear receptor binding motifs that interact strongly with RARs. Ajuba has been found at the RAREs of endogenous RAR-target genes but the mechanism of its repressive activity remains to be determined.

B. Other Repressive Histone Marks

Other repressive histone marks, such as methylation of histone tails, especially bi and trimethylation of histone 3 at lysine 27 (H3K27me3) and at lysine 9 (H3K9me3) have been detected at the promoters of several RAR-target genes (Kashyap *et al.,*

2011; Le May *et al.,* 2012; Yuan *et al.,* 2012) (Figure 5.2). In the majority of cells, the methylation of H3K9 involves the methyltransferase G9α (Allis *et al.,* 2007). Methylation of H3K27 involves mainly EZH2, which belongs with SUZ12 to the Polycomb group protein complex PRC2 that has been found associated with the CpG islands of several RA-target gene promoters in the absence of RA (Gillespie and Gudas, 2007a, 2007b) (Chapter 12 gives information on Polycomb group proteins in stem cell differentiation). However, according to recent studies, G9α would also contribute to H3K27 methylation (Wu *et al.,* 2011). How these methyltransferases are activated is still unclear, but recent studies performed with the canonical RA-target gene *Cyp26a1* indicated that the recruitment and the activity of PRC2 would be regulated by the density/compaction state of the neighboring nucleosomes (Yuan *et al.,* 2012).

Another repressive mark is monoubiquitination of H2AK119, which is deposited by the polycomb group protein complex PRC1, through the E3 ubiquitin ligase activity of its Ring1A and Ring1B subunits (Lee *et al.,* 2007). PRC1 is recruited through recognition of the PRC2-mediated H3K27me3 mark but several recent studies evidenced a PRC2-independent mechanism (Barrero and Izpisua Belmonte, 2013; He *et al.,* 2013).

Remarkably, at several gene promoters, the PRC complexes recruit HDACs that cooperate for repression (Sparmann and van Lohuizen, 2006). In addition, G9α and PRC2 are associated with the demethylase JARID1A, which specifically erases the H3K4me3 activating mark (Chaturvedi *et al.,* 2012). Thus, the cooperation between PRC2 and JARID1A is an elegant mechanism for transcription repression by the coordinated regulation of repressive and activating epigenetic marks.

In conclusion, the combination of H3K27 trimethylation, H2AK119 ubiquitination, and H3K4 demethylation, defines a repressed chromatin state at RAR target genes according to the histone code.

C. DNA Methylation

It is not only histone modifications but also DNA modifications such as DNA methylation that represent an important level of epigenetic regulation (Tollervey and Lunyak, 2012). DNA methylation mainly occurs on cytosines in CpG islands and is directed by DNA methyltransferases (DNMTs). Generally, methylation of CpG islands near gene promoters is associated with gene repression. Indeed, the methyl groups interfere with binding of transcription factors to their cognate response elements and exclude the enzymes that confer active modifications, such as H3K4me3, and H3 or H4 acetylation (Hu and Rosenfeld, 2012).

It is worth noting that most CpG islands are embedded in Alu repeats, which contain the majority of the motifs recognized by RARs and are located adjacent to known RA target genes (Laperriere *et al.,* 2007). Moreover, the Alu-located RAREs are specific to primates and it is thought that during evolution they arose from the specific deamination of the methylated CpG dinucleotide within the 3'AGTTCG motif. Therefore, it has been suggested that the inhibition of the RA responsiveness observed in diseases with increased CpG methylation may be correlated with an impairment of RAR binding at their response elements.

Finally DNMTs have been found to be associated with HDACs, PRC2, and G9α, suggesting that the complexes involved in DNA methylation and in the formation of

the histone repressive marks would cooperate in maintaining a repressed chromatin conformation (Hu and Rosenfeld, 2012).

IV. REORGANIZATION OF THE EPIGENETIC LANDSCAPE AFTER RETINOIC ACID ADDITION

A. The Coactivator Complexes and Generation of Activating Histone Marks

According to the classical model, RA binding to RARs induces conformational changes that promote the dissociation of the corepressors and create a new interaction surface for coactivators, which include essentially the p160 subfamily of steroid receptor coactivators (SRCs), namely SRC-1 (also referred to as NCoA-1), SRC-2 (TIF-2, GRIP-1), and SRC-3 (pCIP, ACTR, AIB1, TRAM1, RAC3) (Lefebvre *et al.,* 2005; Rosenfeld *et al.,* 2006) (all events described in this section are illustrated in Figure 5.3).

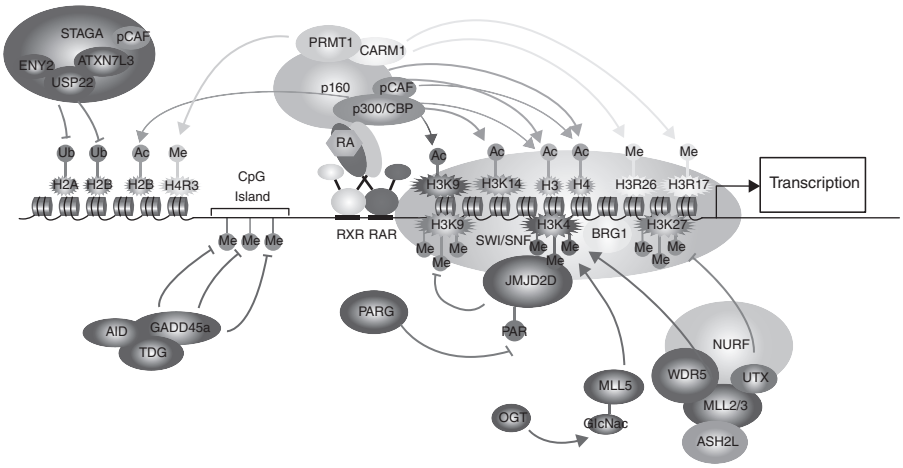


Figure 5.3. Reorganization of the epigenetic landscape after RA addition. Upon RA binding, RARs bind the p160 coactivators associated with several proteins, exemplified by pCAF, p300/CBP, CARM1, and PRMT1, which deposit activating histone marks. P160s, pCAF and p300/CBP acetylate lysines in H3 (H3K14, H3K9), H4 and H2B. PRMT1 methylates H4R3 and CARM1 methylates H3R26 and H3R17. These modifications decompact chromatin and create marks for the recruitment of the nucleosome remodeling SWI/SNF complex through BRG1. pCAF also belongs to the STAGA complex which removes ubiquitin from H2A and H2B. RARs also bind MLL5, which after GlcNacylation by OGT, trimethylates H3K4. This creates an activating mark, which is recognized by JMJD2D that erases the H3K9me3 repressive mark. This step requires prior dePARsylation of JMJD2D by PARG. H3K4 is also trimethylated by the MLL2/3 complex, a multisubunit complex where UTX erases the repressive H3K27me3 mark and WDR5 recruits the chromatin remodeling complex NURF. Finally, AID, TDG and GADD45a promote DNA demethylation. All these events converge towards chromatin decompaction and remodeling. For color detail, please see color plate section.

The p160 coactivators have an intrinsic histone acetyltransferase (HAT) activity and acetylate several lysine residues in H3 and H4 (Allis *et al.,* 2007). According to recent structural studies (Brelivet *et al.,* 2012; Osz *et al.,* 2012), one coactivator molecule is recruited by the heterodimer through the RAR partner and the architecture of the DNA bound receptors complexes orients the coactivator on one side of the DNA so that it can reach its targets, the histone tails.

The p160 coactivators are also platforms that coordinate the dynamic recruitment of other proteins endowed with HAT or histone methyltransferase (HMT) activities (Figure 5.3). Acetylation and methylation weaken histone DNA contacts, and thus promote access to DNA. These modifications also create marks, which form a "histone code" for the recruitment of additional HATs or HMTs to histones for further chromatin decompaction (Cosgrove *et al.,* 2004; Ruthenburg *et al.,* 2007). They also orchestrate the recruitment of ATP-dependent nucleosome remodeling complexes, such as the SWI/SNF complex through the bromodomain of the central ATPase, BRG1. These complexes use the energy of ATP hydrolysis to reposition nucleosomes through sliding them in *cis* or displacing them in *trans*, allowing the formation of nucleosome-free or nucleosome-spaced regions at the promoter.

The p160 coactivators recruit p300/CBP (CREB binding protein) and pCAF (p300/CBP-associated factor), which acetylate lysine residues in H2B, H3, and H4 (Rosenfeld *et al.,* 2006; Allis *et al.,* 2007; Berndsen and Denu, 2008). The recruitment of the p160 coactivators, p300/CBP and pCAF with RARs at the RAREs of several RA-target genes has been correlated with the acetylation of H3K9 and H3K14 (Gillespie and Gudas, 2007a, 2007b; Kashyap and Gudas, 2010). pCAF also belongs to the multisubunit STAGA complex which contains a module of three subunits (ATXN7L3, USP22, and ENY2) that specifically removes the ubiquitin moiety from monoubiquitinated H2A and H2B, counteracting the chomatin silencing mediated by the PRC1 complex (Zhao *et al.,* 2008). This module has been shown to act as a positive cofactor for activation of nuclear receptors *in vivo*. The p160 coactivators also recruit histone arginine methyltransferases (HMTs), such as CARM1 (coactivator-associated arginine methyltransferase 1) or PRMT1 (protein-arginine methyltransferase 1) (Rosenfeld *et al.,* 2006). The former methylates H3R17 and H3R26, while the latter rather methylates H4R3 (Kato *et al.,* 2011).

Remarkably, complexes with lysine methyltransferase activity have been observed at the promoters of RA-target genes. They belong to the SET/MLL (mixed-lineage leukemia) histone methyltransferase family and deposit active methylation marks such as trimethylation of H3K4 (H3K4me3). Among these complexes there is MLL5, which interacts with the RARα subtype and has been identified in HL60 cells differentiated in response to RA (Fujiki *et al.,* 2009). Interestingly, the methylase activity of MLL5 depends on its prior GlcNacylation by an associated O-GlcNac transferase (OGT). There is also MLL2/3, which has been observed at the promoters of the *HOXA1-3* and *HOXB1-3* genes in RA-treated human embryonic cells (Lee *et al.,* 2007) and which requires the core subunits ASH2L and WDR5 for HMT activity. Note that WDR5, a WD repeat domain protein, also recruits HATs and nucleosome remodeling factor complexes such as NURF (Wysocka *et al.,* 2006) or CHD8 (Thompson *et al.,* 2008). Thus, H3K4 methylation is also associated with nucleosome remodeling.

MLL complexes also participate in the elimination of repressive marks. Indeed, MLL1/2 contains UTX (Lee *et al.,* 2007), a Jumonji C (JMJC) domain-containing protein that erases the H3K27me3 repressive mark (Klose *et al.,* 2006). Moreover, the H3K4me3 mark deposited by MLL is recognized by JMJD2D, another Jumonji domain-containing protein, which erases the H3K9me3 repressive mark. According to a recent study, this step requires the dePARsylation of JMJD2D by PARG, a poly (ADP-Ribose) glycohydrolase, which is corecruited at the RAR-dependent promoters in response to RA (Le May *et al.,* 2012). Thus, due to their varied composition, the MLL complexes provide an elegant mechanism to reorganize chromatin through writing activating histone marks (H3K4me3), erasing repressive marks (H3K9me3 and H3K27me3), and remodeling nucleosomes.

It is important to note that the genes transcriptionally activated by RA in a rapid manner commonly reside in bivalent chromatin regions that are rich in both activating and repressive marks (Pan *et al.,* 2007). Thus, they are in a poised state and their induction by RA has been associated with an increase in the activating/repression ratio (Chapter 12).

Finally, optimal histone modifications (H3K4 methylation, H3K9 demethylation and H3K9/14 acetylation) at RAR target genes were recently found to require the recruitment of nucleotide excision repair (NER) proteins (XPC, XPA, and XPG, XPF/ERCC1/Gadd45 (Le May *et al.,* 2010). Thus, the NER factors can be part of transcription complexes that are distinct from the repair ones, increasing the complexity of the transcription processes.

B. DNA Demethylation in Response to Retinoic Acid

The fact that DNA methylation at CpG sites is generally associated with gene repression raises the possibility that the activation of RA target genes would require DNA demethylation. Interestingly, a recent study revealed that RAR–RXR heterodimers bound at their response elements can promote active DNA demethylation via the recruitment of the DNA repair enzyme thymine DNA glycosylase (TDG), together with the damage response protein GADD45a and the activation-induced cytidine deaminase (AID) (Cortellino *et al.,* 2011) (Figure 5.3). The authors suggested a two-step mechanism whereby 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine are first deaminated by AID to thymine and 5-hydroxymethyluracil, respectively, followed by TDG-mediated thymine and 5-hydroxymethyluracil excision repair.

V. NONCODING RNAs IN THE REGULATION OF THE EPIGENETIC LANDSCAPE

New evidence indicates that there is a dynamic interplay of chromatin modifying and DNA methylation components with nonprotein coding RNAs (ncRNAs). The ncRNAs include microRNAs (miRNAs), long noncoding RNAs (lnRNAs), PIWI RNAs (piRNAs), short heterochromatic RNAs (shRNAs), and endogenous short interfering RNAs (endo-siRNAs) (Mattick and Makunin 2005).

Usually ncRNAs target mRNAs for translational inhibition or destruction by RNA-Induced Silencing Complex (RISC)-mediated cleavage. Accordingly, a number

of recent publications highlighted that RA induces the expression of several miRNAs, which participate in the RA-induced modifications of the epigenetic landscape through their potential to degrade mRNAs encoding coregulators. As an example, RA has been shown to increase miR-10a, which targets SMRT and HDACs (Takahashi *et al.,* 2012). RA also induces miR-214, which inhibits the translation of EZH2 with an impact on the repressive marks controlled by PRC2 (Juan *et al.,* 2009).

However, according to other reports, ncRNAs may also contribute to transcriptional control via the epigenetic regulation of chromatin structure (Wassenegger, 2005). This is exemplified by miR-223, which is markedly increased upon RA-induced granulocytic differentiation of hematopoietic progenitors (Zardo *et al.,* 2012a, 2012b). miR-223 binds complementary sequences located in gene promoters, such as the NFI-A gene promoter, and drives the recruitment of the PRC1 and PRC2 repressor complexes. The final effect is an increase in H3K27 methylation and in DNA hypermethylation. Consequently, the cells progress towards myeloid differentiation and the erythroid lineage is blocked. It is also exemplified by the let-7 miRNA, which is upregulated by RA in myeloid hematopoietic cells. This miRNA increases the repressive H3K27me3 marks at target genes and, thus, contributes to granulocytic differentiation (Pelosi *et al.,* 2012).

Remarkably, the genes that are repressed by ncRNAs play a crucial role in cell fate determination. They are not direct RAR targets but their transcription start site is characterized by the presence of bivalent domains with the simultaneous presence of the activating (H3K4me3) and repressive (H3K27me3) marks (Tollervey and Lunyak, 2012). It has been proposed that the RA-induced ncRNAs would contribute to the repression of their epigenetic landscape as guides or scaffolds for chromatin remodeling/modifying complexes (Khalil *et al.,* 2009; Tollervey and Lunyak, 2012).This reveals a novel mechanism of action of RA and opens promising avenues in the regulation of genes involved in regulatory circuits.

VI. BACK TO A REPRESSIVE EPIGENETIC LANDSCAPE WHEN TRANSCRIPTION TURNS "OFF"

Eventually after the "ON" switch, transcription of the RA target genes has to be terminated. Several scenarios have been proposed but it is still unclear whether these mechanisms function mainly according to a gene or cell type specificity. One scenario is based on the recruitment by liganded RARs of unconventional coregulators with LxxLL motifs, which, in contrast to the classical p160 SRCs, inhibit the transcription activity of RARs. These coregulators include the 140kDa Receptor Interacting Protein (RIP140/NRIP1) (Wei *et al.,* 2000), Transcription Intermediary Factor-1 alpha (TIF1α/TRIM24) (Le Douarin *et al.,* 1995), Preferentially Expressed Antigen in MElanoma (PRAME) (Epping *et al.,* 2005), and SUG-1 (vom Baur *et al.,* 1996).

The repressive activities of RIP140 have been attributed to the recruitment of HDACs, which deacetylate and recompact histones (Wei *et al.,* 2000; Fernandes *et al.,* 2003). TIF1α also interacts with HDACs (Nielsen *et al.,* 1999) but according to recent studies it would also act as a coactivator (Herquel *et al.,* 2011) and would have an E3 ubiquitin ligase activity (Jain and Barton, 2009), enlarging the potential functions of this coregulator. Concerning SUG-1, it is one of the six AAA ATPases

of the 19S regulatory complex of the 26S proteasome, and our laboratory showed that it recognizes RARs and the coactivator SRC-3 for their proteasomal degradation (Gianni *et al.,* 2002; Ferry *et al.,* 2009). In contrast, PRAME would exert its repressive function by recruiting the EZH2 subunit of the PCR2 complex (Epping *et al.,* 2005). In fact, given that it is expressed essentially in cancers, PRAME would not be involved in the termination of transcription but rather in the RA resistance of such cancers.

VII. PHOSPHORYLATION: ANOTHER POST-TRANSLATIONAL MODIFICATION CODE INDUCED BY RETINOIC ACID

A. Retinoic Acid Activates Kinase Cascades Integrated in the Nucleus

Today, it is admitted that RARs have a number of extranuclear effects. In line with this concept, the RARα subtype has been recently found in lipid rafts isolated from the membranes of several cell types (Masia *et al.,* 2007; Piskunov and Rochette-Egly, 2012). This unexpected extranuclear localization has been correlated to the rapid and transient activation of kinase cascades observed in response to RA (Figure 5.4).

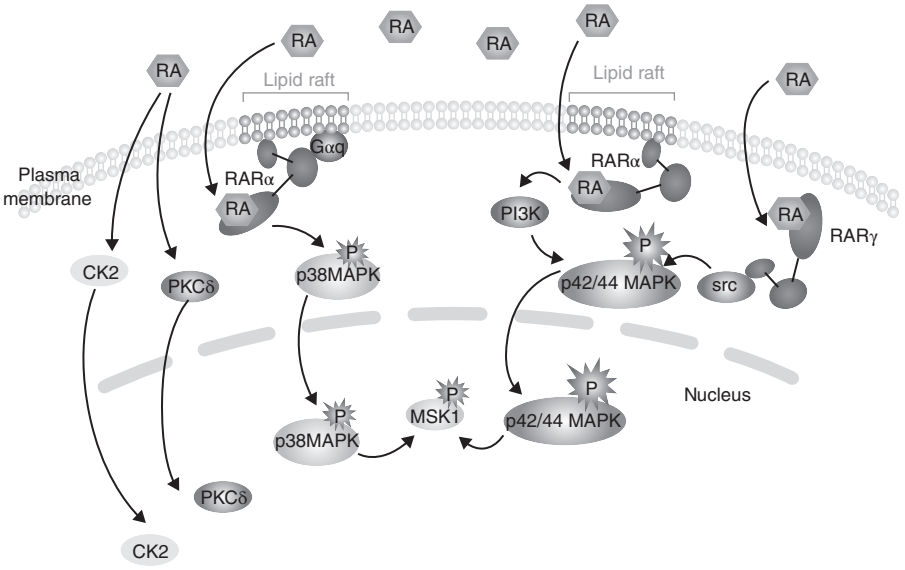


Figure 5.4. Activation of kinase cascades by RA. In response to RA, a subpopulation of RARα present in membrane lipid rafts activates kinase cascades. In various epithelial and fibroblast cells, RA activates p38MAPK, via the interaction of RARα with Gαq. In neuronal cells RA activates p42/44 via RARα and PI3K. RA also activates p42/44MAPK via RARγ and Src. The activated p38 and p42/44 MAP kinases translocate to the nucleus where they phosphorylate MSK1. In other cell types, RA can activate PKCδ or CK2.

Indeed, in fibroblasts, mouse embryonal carcinoma cells, mammary breast tumor cells, and leukemia cells, RA activates the p38MAPK pathway (Alsayed *et al.,* 2001; Gianni *et al.,* 2002; Bruck *et al.,* 2009) via the formation of complexes between RARα and Gαq proteins in lipid rafts (Piskunov and Rochette-Egly, 2012). In contrast, in neuronal, Sertoli and embryonic stem cells, RA rather activates p42/44 MAPKs (ERKs) via PI3K or the Src kinase (Dey *et al.,* 2007; Chen and Napoli 2008; Stavridis *et al.,* 2010). Finally, in other cell types, RA has been shown to activate PKCδ (Kambhampati *et al.,* 2003) and casein kinase (CK) 2 (Zheng *et al.,* 2011). Altogether these results indicate that, depending on the cell type, the extranuclear effects of RA involve different mechanisms and kinase cascades.

Then the RA-activated kinases translocate to the nucleus where they phosphorylate several targets (Figure 5.4). One of these targets is MSK1 (mitogen- and stress-activated protein kinase), which can be activated through both p38MAPK and ERKs (Piskunov and Rochette-Egly, 2011). Remarkably, several other nuclear proteins involved in the transcription of the RA target genes integrate MAPK and MSK1 signaling and become phosphorylated in response to RA.

B. Phosphorylation of Histones and RAR Coregulators

Signaling pathways including MAPKs are considered as integrators dispensing decisions to the downstream cellular and transcription machineries that coordinately manage major cellular fates. Accordingly, RA-activated MSK1 is recruited at RAR target promoters and phosphorylates H3S10 (Bruck *et al.,* 2009)(Figure 5.5). This mark has been correlated to the acetylation of H3K14 and the recruitment of the SWI/SNF ATP-dependent chromatin-remodeling complex (Bruck *et al.,* 2009; Piskunov and Rochette-Egly, 2011). MSK1 also phosphorylates S28 on H3 tails that are methylated at K27 by PRC2 at RA target genes. This phosphorylation induces the displacement of PRC2 and the activation of the corresponding genes (Gehani *et al.,* 2010).

Remarkably, not only MSK1 but also the upstream kinases, p38MAPK as well as ERKs, phosphorylate several actors of RA signaling including corepressors and coactivators. The important point is that phosphorylations alter protein structure, protein–protein interactions, and protein activity, thus constituting an important cellular integration mechanism.

As an example, the phosphorylation of the corepressor SMRT by MAPKs has been shown to release SMRT from RARα (Jonas *et al.,* 2007) and to disrupt its interaction with HDACs and other proteins of the corepressor complexes, such as TBL1 (Transducin β-like 1) and TBLR1 (TBL1-related protein 1) (Varlakhanova *et al.,* 2011). Consequently, the architecture, composition and function of the corepressor complexes are disrupted. TBLR1 is also phosphorylated within minutes at RAR target promoters (Perissi *et al.,* 2008). The current model is that phosphorylation of this adaptor mediates the recruitment of the ubiquitin proteasome system for the ubiquitination and degradation of NCoR, SMRT, and HDACs. Finally, HDAC2 has been shown to be phosphorylated by CK2 in response to RA and this phosphorylation promotes its dissociation from RARα (Zheng *et al.,* 2011). It has been proposed that the phosphorylation-dependent dissociation and degradation of components of the corepressor complexes would mediate the exchange of corepressor for activator complexes.

Coactivators are also phosphorylated in response to RA (Gianni *et al.,* 2006). For instance, the p160 coactivator SRC-3 is phosphorylated by p38MAPK at a serine residue located in the vicinity of the RAR-binding domain. Phosphorylation of this residue results in the dissociation of SRC-3 from RARα. It also marks SRC-3 for ubiquitination and degradation by the proteasome (Ferry *et al.,* 2011). It has been proposed that this phosphorylation–ubiquitination–degradation process would facilitate the dynamics of RARs-mediated transcription by allowing other coregulators to bind. The other components of the coactivator complexes, such as p300/CBP, can be also phosphorylated by several kinases in response to various signaling pathways (Perissi and Rosenfeld, 2005; Perissi *et al.,* 2008), but whether they are phosphorylated in response to RA would require further investigation. Nevertheless, it must be kept in mind that, overall, coregulators can integrate several signals that fine-tune their exchanges and, thus, their ability to modulate RAR transcriptional activity.

C. Phosphorylation of RARs

For several years, RARs have been known to be phosphoproteins and several phosphorylation sites have been identified (Rochette-Egly, 2003; Srinivas *et al.,* 2005). Our laboratory has shown that in response to RA, RARs become phosphorylated at two main serine residues (Bruck *et al.,* 2009)(Figure 5.1). One serine is located in the LBD (S369 in RARα), in the loop between H9 and H10. It belongs to an arginine–lysine-rich motif and is phosphorylated by MSK1 (Bruck *et al.,* 2009). The other serine belongs to a proline-rich motif located in the NTD (S77 in RARα) and is phosphorylated by the cdk7/cyclin H/MAT1 subcomplex of the general transcription factor TFIIH (Rochette-Egly *et al.,* 1997). The striking point is that the correct positioning of the cdk7 kinase and, thereby, the efficiency of the NTD phosphorylation relies on the docking of cyclin H at a specific site of the LBD located in loop L8–9 (Bour *et al.,* 2005a) and on the phosphorylation of S369, located at a 30 Å distance, in loop L9–10 (Gaillard *et al.,* 2006; Bruck *et al.,* 2009). Molecular dynamics simulations of the RARα LBD showed that phosphorylation of S369 by MSK1 leads to changes in the structural dynamics of loop L8–9, which has been correlated with an increase in cyclin H binding and, therefore, in phosphorylation of the NTD at S77 by cdk7 (Samarut *et al.,* 2011; Chebaro *et al.,* 2013).

Most importantly, these two residues are conserved between mammalian RARs and the RARγ subtype is also phosphorylated at these residues (Rochette-Egly *et al.,* 1995; Bastien *et al.,* 2000; Lalevee *et al.,* 2010) via a similar cascade (our unpublished observations). Moreover, the serine located in the NTD has been conserved during the evolution of chordates (Samarut *et al.,* 2011), indicating that its phosphorylation would play a robust role in RAR activity. Indeed, in Xeroderma Pigmentosum patients with mutations affecting subunits of the core of TFIIH, the NTD of RARα is not efficiently phosphorylated by cdk7, with downstream consequences on the expression of RAR-target genes (Keriel *et al.,* 2002) which have been correlated to the clinical and developmental abnormalities of the patients.

A number of studies from our laboratory performed with mouse embryonal carcinoma cells (F9 cell line) and embryonic stem (ES) cells expressing RARγ phosphomutants in a RARγ-null background, indicated that phosphorylation of the N-terminal serine is required for their differentiation into primitive endoderm (Taneja *et al.,* 1997) and neurons (Al Tanoury *et al.,* 2014), respectively. These experiments also demonstrated that phosphorylation of this serine controls the expression of several RAR target genes (Taneja *et al.,* 1997; Gianni *et al.,* 2002; Bruck *et al.,* 2009) and promotes the recruitment of RARs to canonical DR5 RAREs (Bruck *et al.,* 2009).

How does phosphorylation affect these regulatory events? A striking point is that the N-terminal serine belongs to a proline-rich motif (PRM), which is in the vicinity of the DBD. PRMs are known to bind proteins with SH3 (Src-homology-3) or WW (tryptophan–tryptophan) domains, with phosphorylation preventing or favoring the interaction (Macias *et al.,* 2002). Our laboratory has identified a new partner of the PRM of the RARγ subtype, vinexinβ (Bour *et al.,* 2005b), which is an adaptor characterized by the presence of three SH3 domains, the third one interacting with the PRM of RARγ. This interaction concerns the nonphosphorylated form of RARγ and represses RARγ-mediated transcription via the sequestration of the receptor out of chromatin (Lalevee *et al.,* 2010). Recently, the combination of NMR, circular dichroism, small-angle X-ray scattering (SAXS), and molecular dynamics simulations revealed that phosphorylation of the serine residue located in the PRM of RARγ decreases the propensity of the PRM to bind SH3 domains (Kieffer, Dejaegere and Rochette-Egly, unpublished results); thereby, vinexinβ dissociates from RARγ, allowing the binding of the receptor to DNA (Lalevee *et al.,* 2010).

Finally, at the end of the transcription process, phosphorylation of the NTD promotes the degradation of RARγ by the ubiquitin–proteasome system (Kopf *et al.,* 2000; Gianni *et al.,* 2002). RARα is also degraded (Kopf *et al.,* 2000; Ferry *et al.,* 2009) and this process has been correlated to the binding of the proline isomerase Pin1 (Protein interacting with NIMA [never in mitosis A]) (Brondani *et al.,* 2005; Gianni *et al.,* 2009), a WW domain-containing protein that induces *cis–trans* isomerization of the proline residues that follow phosphorylated serines in order to create new specific recognition sites for interacting factors (Wulf *et al.,* 2005).

D. Phosphorylation of Other Transcription Factors

The RA-activated kinases can also phosphorylate other factors involved in the regulation of genes that are not RAR targets, thus expanding the spectrum of their biological activities. As an example, in RA-treated P19 cells, the activated ERKs phosphorylate TR2 (Testicular nuclear receptor 2), which then becomes a repressor of the *Oct4* (octamer-binding transcription factor 4) gene, thus facilitating the differentiation program that is expected to take place in response to RA (Gupta *et al.,* 2008).

VIII. TWO MODELS FOR THE ACTIVATION OF RAR TARGET GENES VIA A SEA OF POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS AND EPIGENETIC CHANGES

A. When Promoters are Occupied by RARs in the Absence of RA: From Repression to Activation

This model is illustrated in Figure 5.5A. When RARs are constitutively bound to their DNA targets, ligand binding is the crucial molecular event that switches transcription from repression to activation. This switch relies on conformational changes in the LBD, which dictate the exchange of coregulators. Consequently, the epigenetic landscape at the promoters is reorganized, with a less condensed, transcriptionally permissive chromatin, which paves the way for the recruitment of the transcription machinery (Dilworth and Chambon 2001; Rosenfeld *et al.,* 2006), including RNA polymerase II and the general transcription factors.

However, today it is clear that the RA-activated kinase pathways provide additional layers of regulation of this switch through a phosphorylation code. This is exemplified by the phosphorylation of the corepressors and coactivators, which promotes their dissociation from RARs and their degradation by the proteasome. Such a code facilitates the exchange of coregulator complexes and the reorganization of the epigenetic landscape. The kinases also phosphorylate histones, introducing additional marks for the subsequent recruitment of activating complexes and the dissociation of the repressive ones. Finally, the phosphorylation of RARs signals their degradation by the ubiquitin proteasome system in order to stop the transcriptional process (Bour *et al.,* 2007).

B. When Promoters are not Accessible to RARs in the Absence of RA

According to recent ChIP-seq profiles, only a small subset of sites are constitutively occupied by RARs and an additional set of sites becomes occupied only in the presence of RA (Bruck *et al.,* 2009; Delacroix *et al.,* 2010; Mahony *et al.,* 2011; Moutier *et al.,* 2012). This raises the question of how RARs are recruited to DNA. Some of the molecular events that can explain such a recruitment are schematized in Figure 5.5B.

One possibility is that in the absence of RA, the binding sites are not accessible due to a compact epigenetic landscape. This implies that a prerequisite to RAR binding would be rapid epigenetic modifications of chromatin and DNA in order to alleviate compaction. Candidates for triggering this chromatin reorganization might be the RA-activated kinases, which phosphorylate histones as well as several protein complexes involved in activating chromatin modifications. Indeed, histone phosphorylation occurs rapidly (within minutes) at RAR target promoters in response to RA, and is a mark for the recruitment of HATs and remodeling complexes. Histone phosphorylation also induces the displacement of the complexes involved in chromatin compaction, such as PRC2 (Gillespie and Gudas, 2007a, 2007b; Gehani *et al.,* 2010).

Another possibility is that in the absence of RA, RARs are sequestrated out of DNA due to their interaction with coregulators. In line with such a hypothesis is

our recent work showing that, in the absence of RA, the interaction of the PRM of RARγ with vinexinβ impedes DNA binding. The interesting point is that the rapid phosphorylation of the serine residue located in the PRM of RARγ induces the dissociation of vinexinβ and DNA binding of the receptor (Lalevee *et al.,* 2010).

Finally, when RARs are recruited to DNA it is evident that phosphorylation would also facilitate the dynamics of the association–dissociation of the different coactivators for further chromatin decompaction and recruitment of the transcription machinery.

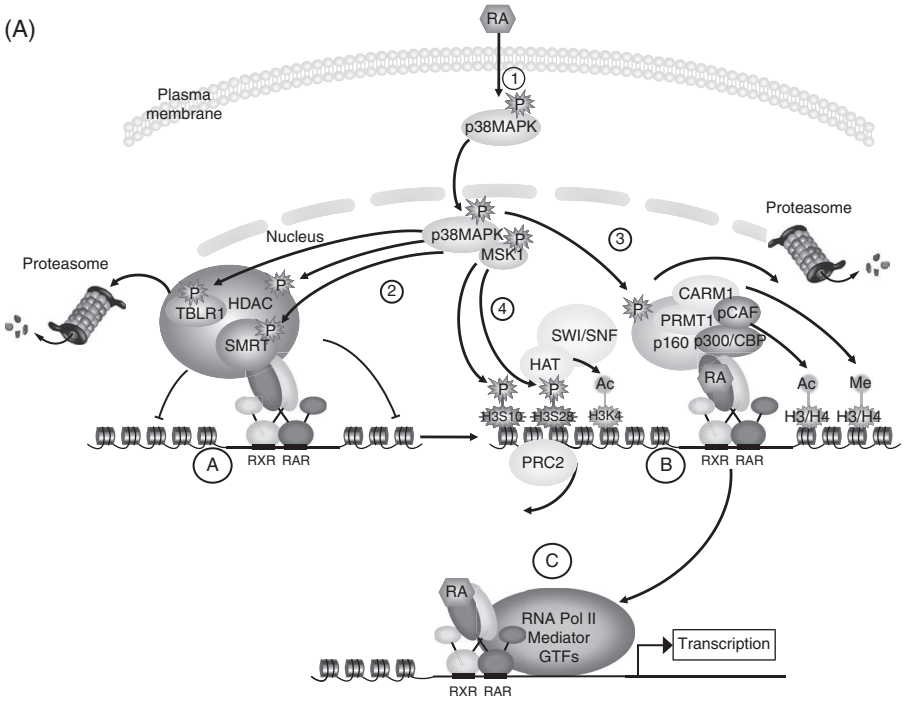


Figure 5.5. Two models for the activation of RA target genes. (A) First model. Promoters occupied by RARs in the absence of RA. In the absence of RA (left side, circled A), RA response elements are occupied by RARs, which are associated with corepressors and maintain chromatin in a repressive state. RA induces conformational changes in RARs, which promote the dissociation of corepressors and the recruitment of coactivator complexes, which acetylate and methylate histones and decompact chromatin (B). RA also activates MAPKs and MSK1. The phosphorylation of SMRT, HDACs, and other components of the corepressor complexes (2) promotes their dissociation and their degradation by the proteasome. The phosphorylation of p160 coactivators (3) also promotes their dissociation and degradation, allowing the recruitment of other coregulators. The phosphorylation of histones (4) induces the dissociation of the repressive PRC2 complex and the recruitment of HATs and remodeling complexes. *In fine*, these events cooperate to decompact chromatin at the promoters and pave the way for the recruitment of the transcription machinery (C). (GTFs, general transcription factors.). For color detail, please see color plate section.

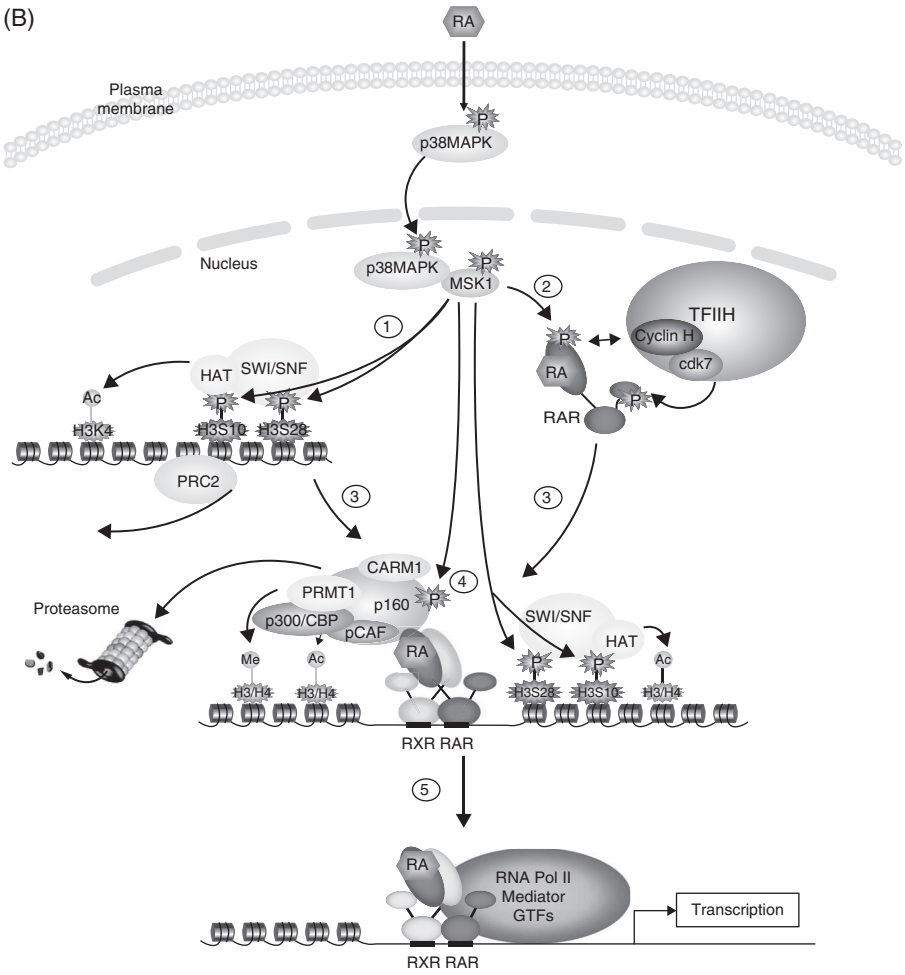


Figure 5.5. (*Continued*) (B) Second model. Promoters not accessible to RARs in the absence of RA. In the absence of RA, most RA response elements are not accessible in compacted chromatin and are not occupied by RARs. RA activates the MAPK/MSK1 signaling pathway, which targets histones (1) and the LBD of RARs (2). Histone phosphorylation induces the departure of PRC2 and creates marks for the recruitment of complexes with HAT and ATPase activities, which decompact and remodel chromatin. Phosphorylation of RARs in their LBD induces conformational changes that allow the docking of cyclin H/cdk7 and the phosphorylation of the NTD. Thus, histone and RAR phosphorylation converge to facilitate the recruitment of RARs at their response elements (3). Next, liganded and DNA-bound RARs recruit coactivator complexes, which decompact and further remodel chromatin. Coactivator phosphorylation (4) leads to their dissociation and degradation by the proteasome, thus facilitating the dynamics of coregulators exchange. *In fine*, all these events decompact chromatin at the promoters, allowing recruitment of the transcription machinery (5). For color detail, please see color plate section.

IX. ABERRANT EPIGENICS IN CANCER: CONSEQUENCES ON THE RETINOIC ACID RESPONSE

From the data reviewed above, it appears that the integrity of the epigenetic landscape and of the signaling pathways or "kinome" are required for the proper activity of RARs, and for the proper control of cell proliferation versus differentiation. Consequently, it can be speculated that their deregulation would have deleterious downstream effects.

Accordingly, a gain in repressive marks is a common theme in several cancers and is implicated in the block of cell differentiation and in hyperproliferation (Mills, 2010). Retinoic acid (as well as synthetic retinoids) is currently used in the treatment of several cancers to alleviate the repressive marks and restore normalcy (Altucci *et al.,* 2007).

The best example is acute promyelocytic leukemia (APL), in which maturation of the granulocytic lineage arrests at the level of the promyelocyte. In most cases, APL results from the production of an oncogenic PML–RARα protein due to a chromosomal t(15;17) translocation. At the molecular level, PML–RARα has gained an expanded capacity to bind DNA and to recruit HDACs (Altucci and Gronemeyer, 2001), DNA methyltransferases complexes (Di Croce *et al.,* 2002), and PRC2 (Villa *et al.,* 2007), resulting in aberrant repressive marks at DNA and histones. Remarkably, in contrast to RARα, PML–RARα is insensitive to physiological concentrations of RA and requires higher pharmacological concentrations to overcome the transcription block (Altucci and Gronemeyer, 2001) and induce large-scale activating epigenetic changes at thousands of gene loci (Martens *et al.,* 2010). Importantly, these changes are not triggered by the release of the repressive complexes from PML–RARα but by the rapid loss of the fusion protein at the DNA-binding sites and the subsequent recruitment of RARα with activating complexes (Martens *et al.,* 2010; Cassinat *et al.,* 2011).

As in many cancers, HDACs, DNA methyltransferases, and the components of the PRC2 complex are overexpressed, therapeutic combinations associating RA with epigenetic drugs have been developed and found to be more effective than RA alone. Indeed, RA has been synergized with HDAC inhibitors (trichostatin A, valproic acid) or DNA methyltransferase inhibitors (5-Aza-dC) to promote cell differentiation and arrest the growth of several cancer types (Altucci *et al.,* 2007; Tang *et al.,* 2009). Novel drugs targeting EZH2 are currently being developed (Knutson *et al.,* 2012).

Finally, not only the epigenetic landscape but also the kinome proved to be affected in several diseases and cancers, leading to defects in the RA response. Thus, it can be postulated that restoring aberrant signaling to normalcy would be another approach to cancer therapy. One example is that of RA-resistant APL cells, which undergo differentiation when RA or other retinoids are combined with agents raising cAMP-dependent protein kinase activity (Parrella *et al.,* 2004; Altucci *et al.,* 2005) or with G-CSF that activates the MAPK pathway (Cassinat *et al.,* 2011). The former observation has been correlated with the dissociation of corepressor complexes and the latter with the phosphorylation of histones. On the contrary, other RA-resistant cancers characterized by aberrant kinase activities regained RA sensitivity in the presence of specific kinase inhibitors (Duong and Rochette-Egly, 2011). In conclusion, it appears that, depending on the cancer type, different types of drugs can synergize for restoring the proper differentiation and proliferation of the cells.

X. CONCLUSION AND FUTURE PROSPECTS

Recent research has highlighted that RA controls an ever-growing number of interrelated epigenetic mechanisms. Indeed, in addition to its ability to regulate transcription via the "classical" changes in RAR conformation and coregulator association/dissociation, RA has been found to activate kinase signaling pathways via extranuclear and nontranscriptional mechanisms. Through the phosphorylation of histones, RARs and their coregulators, these kinases control the dynamics of the coregulator's assembly and pave the way for a multitude of additional epigenetic changes. A number of histone PTMs marking RAR-target genes have already been identified, but novel PTMs occurring in the globular domain of core histones continue to be discovered (Tan *et al.,* 2011; Tropberger *et al.,* 2013). These should open new avenues in the mechanisms of regulation of RA-target gene expression. Finally, RA also induces noncoding RNAs, which modulate the epigenome of an increasing number of genes involved in cell fate determination.

Future investigations of the epigenetic landscape will be needed to decipher the mechanisms of stem cells pluripotency and lineage commitment after RA addition (see also Chapter 12). Given that aberrant epigenetic landscapes contribute to malignancy, new visions of the regulatory networks should provide new clues into cancer pathogenesis and should generate novel approaches to cancer treatment.

REFERENCES

Allis CD, Berger SL, Cote J, *et al*. 2007. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* **131**:633–636.

Alsayed Y, Uddin S, Mahmud N, *et al*. 2001. Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to all-*trans*-retinoic acid. *J Biol Chem* **276**:4012–4019.

Al Tanoury Z, Gaouar S, Piskunov A, *et al*. 2014. Phosphorylation of the retinoic acid receptor RARγ2 is crucial for the neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci* **127**:2095–2105.

Altucci L, Gronemeyer H. 2001. The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer* **1**:181–193.

Altucci L, Rossin A, Hirsch O, *et al*. 2005. Rexinoid-triggered differentiation and tumor-selective apoptosis of acute myeloid leukemia by protein kinase A-mediated desubordination of retinoid X receptor. *Cancer Res* **65**:8754–8765.

Altucci L, Leibowitz MD, Ogilvie KM, *et al*. 2007. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nat Rev Drug Discov* **6**:793–810.

Barrero MJ, Izpisua Belmonte JC. 2013. Polycomb complex recruitment in pluripotent stem cells. *Nat Cell Biol* **15**:348–350.

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

Bastien J, Adam-Stitah S, Riedl T, *et al*. 2000. TFIIH interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7. *J Biol Chem* **275**: 21896–21904.

vom Baur E, Zechel C, Heery D, *et al*. 1996. Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *EMBO J* **15**:110–124.

Berndsen CE, Denu JM. 2008. Catalysis and substrate selection by histone/protein lysine acetyltransferases. *Curr Opin Struct Biol* **18**:682–689.

Bour G, Gaillard E, Bruck N, *et al*. 2005a. Cyclin H binding to the RARalpha activation function (AF)-2 domain directs phosphorylation of the AF-1 domain by cyclin-dependent kinase 7. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:16608–16613.

Bour G, Plassat JL, Bauer A, *et al*. 2005b. Vinexin beta interacts with the non-phosphorylated AF-1 domain of retinoid receptor gamma (RARg) and represses RARg-mediated transcription. *J Biol Chem* **280**:17027–17037.

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

Brelivet Y, Rochel N, Moras D. 2012. Structural analysis of nuclear receptors: from isolated domains to integral proteins. *Mol Cell Endocrinol* **348**:466–473.

Brondani V, Schefer Q, Hamy F, Klimkait T. 2005. The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 regulates phospho-Ser77 retinoic acid receptor alpha stability. *Biochem Biophys Res Commun* **328**:6–13.

Bruck N, Vitoux D, Ferry C, *et al*. 2009. A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RARalpha to target promoters. *EMBO J* **28**:34–47.

Cassinat B, Zassadowski F, Ferry C, *et al*. 2011. New role for granulocyte colony-stimulating factor-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 in histone modification and retinoic acid receptor alpha recruitment to gene promoters: relevance to acute promyelocytic leukemia cell differentiation. *Mol Cell Biol* **31**:1409–1418.

Chaturvedi CP, Somasundaram B, Singh K, *et al*. 2012. Maintenance of gene silencing by the coordinate action of the H3K9 methyltransferase G9a/KMT1C and the H3K4 demethylase Jarid1a/KDM5A. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**:18845–18850.

Chebaro Y, Amal I, Rochel N, *et al*. 2013. Phosphorylation of the Retinoic Acid Receptor alpha induces a mechanical allosteric regulation and changes in internal dynamics. *PLoS Comput Biol* **9**:e1003012.

Chen N, Napoli JL. 2008. All-*trans*-retinoic acid stimulates translation and induces spine formation in hippocampal neurons through a membrane-associated RARalpha. *FASEB J* **22**:236–245.

Cohen RN, Brzostek S, Kim B, *et al*. 2001. The specificity of interactions between nuclear hormone receptors and corepressors is mediated by distinct amino acid sequences within the interacting domains. *Mol Endocrinol* **15**:1049–1061.

Cortellino S, Xu J, Sannai M, *et al*. 2011. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell* **146**:67–79.

Cosgrove MS, Boeke JD, Wolberger C. 2004. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol* **11**:1037–1043.

Delacroix L, Moutier E, Altobelli G, *et al*. 2010. Cell-specific interaction of retinoic acid receptors with target genes in mouse embryonic fibroblasts and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* **30**:231–244.

Dey N, De PK, Wang M, *et al*. 2007. CSK controls retinoic acid receptor (RAR) signaling: a RAR-c-SRC signaling axis is required for neuritogenic differentiation. *Mol Cell Biol* **27**: 4179–4197.

Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, *et al*. 2002. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* **295**: 1079–1082.

Dilworth FJ, Chambon P. 2001. Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene* **20**:3047–3054.

Duong V, Rochette-Egly C. 2011. The molecular physiology of nuclear retinoic acid receptors. From health to disease. *Biochim Biophys Acta* **1812**:1023–1031.

Epping MT, Wang L, Edel MJ, *et al*. 2005. The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell* **122**:835–847.

Farboud B, Hauksdottir H, Wu Y, Privalsky ML. 2003. Isotype-restricted corepressor recruitment: a constitutively closed helix 12 conformation in retinoic acid receptors beta and gamma interferes with corepressor recruitment and prevents transcriptional repression. *Mol Cell Biol* **23**:2844–2858.

Fernandes I, Bastien Y, Wai T, *et al*. 2003. Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell* **11**:139–150.

Ferry C, Gianni M, Lalevee S, *et al*. 2009. SUG-1 plays proteolytic and non-proteolytic roles in the control of retinoic acid target genes via its interaction with SRC-3. *J Biol Chem* **284**:8127–8135.

Ferry C, Gaouar S, Fischer B, *et al*. 2011. Cullin 3 mediates SRC-3 ubiquitination and degradation to control the retinoic acid response. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**:20603–20608.

Fujiki R, Chikanishi T, Hashiba W, *et al*. 2009. GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis. *Nature* **459**:455–459.

Gaillard E, Bruck N, Brelivet Y, *et al*. 2006. Phosphorylation by PKA potentiates retinoic acid receptor alpha activity by means of increasing interaction with and phosphorylation by cyclin H/cdk7. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:9548–9553.

Gehani SS, Agrawal-Singh S, Dietrich N, *et al*. 2010. Polycomb group protein displacement and gene activation through MSK-dependent H3K27me3S28 phosphorylation. *Mol Cell* **39**:886–900.

Gianni M, Bauer A, Garattini E, *et al*. 2002. Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RARγ degradation and transactivation. *EMBO J* **21**:3760–3769.

Gianni M, Parrella E, Raska I, *et al*. 2006. P38MAPK-dependent phosphorylation and degradation of SRC-3/AIB1 and RARalpha-mediated transcription. *EMBO J* **25**:739–751.

Gianni M, Boldetti A, Guarnaccia V, *et al*. 2009. Inhibition of the peptidyl-prolyl-isomerase Pin1 enhances the responses of acute myeloid leukemia cells to retinoic acid via stabilization of RARalpha and PML-RARalpha. *Cancer Res* **69**:1016–1026.

Gillespie RF, Gudas LJ. 2007a. Retinoic acid receptor isotype specificity in F9 teratocarcinoma stem cells results from the differential recruitment of coregulators to retinoic response elements. *J Biol Chem* **282**:33421–33434.

Gillespie RF, Gudas LJ. 2007b. Retinoid regulated association of transcriptional co-regulators and the polycomb group protein SUZ12 with the retinoic acid response elements of Hoxa1, RARbeta(2), and Cyp26A1 in F9 embryonal carcinoma cells. *J Mol Biol* **372**:298–316.

Gudas LJ, Wagner JA. 2011. Retinoids regulate stem cell differentiation. *J Cell Physiol* **226**: 322–330.

Gupta P, Ho PC, Huq MM, *et al*. 2008. Retinoic acid-stimulated sequential phosphorylation, PML recruitment, and SUMOylation of nuclear receptor TR2 to suppress Oct4 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**:11424–11429.

Hauksdottir H, Farboud B, Privalsky ML. 2003. Retinoic acid receptors beta and gamma do not repress, but instead activate target gene transcription in both the absence and presence of hormone ligand. *Mol Endocrinol* **17**:373–385.

He J, Shen L, Wan M, *et al*. 2013. Kdm2b maintains murine embryonic stem cell status by recruiting PRC1 complex to CpG islands of developmental genes. *Nat Cell Biol* **15**:373–384.

Herquel B, Ouararhni K, Davidson I. 2011. The TIF1alpha-related TRIM cofactors couple chromatin modifications to transcriptional regulation, signaling and tumor suppression. *Transcription* **2**:231–236.

Hou Z, Peng H, White DE, *et al*. 2010. LIM protein Ajuba functions as a nuclear receptor corepressor and negatively regulates retinoic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**:2938–2943.

Hu Q, Rosenfeld MG. 2012. Epigenetic regulation of human embryonic stem cells. *Front Genet* **3**:238.

Jain AK, Barton MC. 2009. Regulation of p53: TRIM24 enters the RING. *Cell Cycle* **8**: 3668–3674.

Jonas BA, Varlakhanova N, Hayakawa F, *et al*. 2007. Response of SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) and N-CoR (nuclear receptor corepressor) corepressors to mitogen-activated protein kinase kinase kinase cascades is determined by alternative mRNA splicing. *Mol Endocrinol* **21**:1924–1939.

Juan AH, Kumar RM, Marx JG, *et al*. 2009. Mir-214-dependent regulation of the polycomb protein Ezh2 in skeletal muscle and embryonic stem cells. *Mol Cell* **36**:61–74.

Kambhampati S, Li Y, Verma A, *et al*. 2003. Activation of protein kinase C delta by all-trans-retinoic acid. *J Biol Chem* **278**:32544–32551.

Kashyap V, Gudas LJ. 2010. Epigenetic regulatory mechanisms distinguish retinoic acid-mediated transcriptional responses in stem cells and fibroblasts. *J Biol Chem* **285**:14534–14548.

Kashyap V, Gudas LJ, Brenet F, *et al*. 2011. Epigenomic reorganization of the clustered Hox genes in embryonic stem cells induced by retinoic acid. *J Biol Chem* **286**:3250–3260.

Kato S, Yokoyama A, Fujiki R. 2011. Nuclear receptor coregulators merge transcriptional coregulation with epigenetic regulation. *Trends Biochem Sci* **36**:272–281.

Keriel A, Stary A, Sarasin A, *et al*. 2002. XPD mutations prevent TFIIH-dependent transactivation by nuclear receptors and phosphorylation of RARalpha. *Cell* **109**:125–135.

Khalil AM, Guttman M, Huarte M, *et al*. 2009. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**:11667–11672.

Klose RJ, Kallin EM, Zhang Y. 2006. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* **7**:715–727.

Knutson SK, Wigle TJ, Warholic NM, *et al*. 2012. A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. *Nat Chem Biol* **8**:890–896.

Kopf E, Plassat JL, Vivat V, *et al*. 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.

Kouzarides T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**:693–705.

Lalevee S, Bour G, Quinternet M, *et al*. 2010. Vinexinss, an atypical "sensor" of retinoic acid receptor gamma signaling: union and sequestration, separation, and phosphorylation. *FASEB J* **24**:4523–4534.

Laperriere D, Wang TT, White JH, Mader S. 2007. Widespread Alu repeat-driven expansion of consensus DR2 retinoic acid response elements during primate evolution. *BMC Genomics* **8**:23.

Le Douarin B, Zechel C, Garnier JM, *et al*. 1995. The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J* **14**:2020–2033.

Le May N, Mota-Fernandes D, Velez-Cruz R, *et al*. 2010. NER factors are recruited to active promoters and facilitate chromatin modification for transcription in the absence of exogenous genotoxic attack. *Mol Cell* **38**:54–66.

Le May N, Iltis I, Amé J, *et al*. 2012. Poly (ADP-ribose) glycohydrolase regulates retinoic acid receptor-mediated gene expression. *Mol Cell* **48**:785–798.

Lee MG, Villa R, Trojer P, *et al*. 2007. Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. *Science* **318**:447–450.

Lefebvre P, Martin PJ, Flajollet S, *et al*. 2005. Transcriptional activities of retinoic acid receptors. *Vitam Horm* **70**:199–264.

Macias MJ, Wiesner S, Sudol M. 2002. WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett* **513**:30–37.

Mahony S, Mazzoni EO, McCuine S, *et al*. 2011. Ligand-dependent dynamics of retinoic acid receptor binding during early neurogenesis. *Genome Biol* **12**:R2.

le Maire A, Teyssier C, Erb C, *et al*. 2010. A unique secondary-structure switch controls constitutive gene repression by retinoic acid receptor. *Nat Struct Mol Biol* **17**:801–807.

Martens JH, Brinkman AB, Simmer F, *et al*. 2010. PML-RARalpha/RXR alters the epigenetic landscape in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Cell* **17**:173–185.

Masia S, Alvarez S, de Lera AR, Barettino D. 2007. Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic Acid receptor. *Mol Endocrinol* **21**:2391–2402.

Mattick JS, Makunin IV. 2005. Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet* **14**(Spec No 1):R121–132.

Mendoza-Parra MA, Walia M, Sankar M, Gronemeyer H. 2011. Dissecting the retinoid-induced differentiation of F9 embryonal stem cells by integrative genomics. *Mol Syst Biol* **7**:538.

Mengeling BJ, Goodson ML, Bourguet W, Privalsky ML. 2012. SMRTepsilon, a corepressor variant, interacts with a restricted subset of nuclear receptors, including the retinoic acid receptors alpha and beta. *Mol Cell Endocrinol* **351**:306–316.

Mills AA. 2010. Throwing the cancer switch: reciprocal roles of polycomb and trithorax proteins. *Nat Rev Cancer* **10**:669–682.

Moutier E, Ye T, Choukrallah MA, *et al*. 2012. Retinoic acid receptors recognise the mouse genome through binding elements with diverse spacing and topology. *J Biol Chem* **287**: 26328–26341.

Nielsen AL, Ortiz JA, You J, *et al*. 1999. Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J* **18**:6385–6395.

Osz J, Brelivet Y, Peluso-Iltis C, *et al*. 2012. Structural basis for a molecular allosteric control mechanism of cofactor binding to nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: E588–594.

Pan G, Tian S, Nie J, *et al*. 2007. Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **1**:299–312.

Parrella E, Gianni M, Cecconi V, *et al*. 2004. Phosphodiesterase IV inhibition by piclamilast potentiates the cytodifferentiating action of retinoids in myeloid leukemia cells. Cross-talk between the cAMP and the retinoic acid signaling pathways. *J Biol Chem* **279**:42026–42040.

Pelosi A, Careccia S, Lulli V, *et al*. 2012. miRNA let-7c promotes granulocytic differentiation in acute myeloid leukemia. *Oncogene* **32**:3648–3654.

Perissi V, Rosenfeld MG. 2005. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:542–554.

Perissi V, Staszewski LM, McInerney EM, *et al*. 1999. Molecular determinants of nuclear receptor–corepressor interaction. *Genes Dev* **13**:3198–3208.

Perissi V, Scafoglio C, Zhang J, *et al*. 2008. TBL1 and TBLR1 phosphorylation on regulated gene promoters overcomes dual CtBP and NCoR/SMRT transcriptional repression checkpoints. *Mol Cell* **29**:755–766.

Perissi V, Jepsen K, Glass CK, Rosenfeld MG. 2010. Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nat Rev Genet* **11**:109–123.

Piskunov A, Rochette-Egly C. 2011. MSK1 and nuclear receptor signaling. In: Arthur JSCS (ed.) *MSKs*. Austin, TX: Landes Biosciences. pp. 85–97.

Piskunov A, Rochette-Egly C. 2012. A retinoic acid receptor RARalpha pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein alphaQ to activate p38MAPK. *Oncogene* **31**:3333–3345.

Rochel N, Ciesielski F, Godet J, *et al*. 2011. Common architecture of nuclear receptor heterodimers on DNA direct repeat elements with different spacings. *Nat Struct Mol Biol* **18**:564–570.

Rochette-Egly C. 2003. Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal* **15**:355–366.

Rochette-Egly C, Germain P. 2009. Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors. *Nucl Recept Signal* **7**:e005.

Rochette-Egly C, Oulad-Abdelghani M, Staub A, *et al*. 1995. Phosphorylation of the retinoic acid receptor-alpha by protein kinase A. *Mol Endocrinol* **9**:860–871.

Rochette-Egly C, Adam S, Rossignol M, *et al*. 1997. Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIIH and phosphorylation by CDK7. *Cell* **90**:97–107.

Rosenfeld MG, Lunyak VV, Glass CK. 2006. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* **20**:1405–1428.

Ruthenburg AJ, Li H, Patel DJ, Allis CD. 2007. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:983–994.

Samarut E, Rochette-Egly C. 2012. Nuclear retinoic acid receptors: conductors of the retinoic acid symphony during development. *Mol Cell Endocrinol* **348**:348–360.

Samarut E, Amal I, Markov G, *et al*. 2011. Evolution of nuclear retinoic acid receptors alpha (RARα) phosphorylation sites. Serine gain provides fine-tuned regulation. *Mol Biol Evol* **28**:2125–2137.

Sparmann A, van Lohuizen M. 2006. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**:846–856.

Srinivas H, Juroske DM, Kalyankrishna S, *et al*. 2005. c-Jun N-terminal kinase contributes to aberrant retinoid signaling in lung cancer cells by phosphorylating and inducing proteasomal degradation of retinoic acid receptor alpha. *Mol Cell Biol* **25**:1054–1069.

Stavridis MP, Collins BJ, Storey KG. 2010. Retinoic acid orchestrates fibroblast growth factor signalling to drive embryonic stem cell differentiation. *Development* **137**:881–890.

Takahashi H, Kanno T, Nakayamada S, *et al*. 2012. TGF-beta and retinoic acid induce the microRNA miR-10a, which targets Bcl-6 and constrains the plasticity of helper T cells. *Nat Immunol* **13**:587–595.

Tan M, Luo H, Lee S, *et al*. 2011. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* **146**:1016–1028.

Taneja R, Rochette-Egly C, Plassat JL, *et al*. 1997. Phosphorylation of activation functions AF-1 and AF-2 of RAR alpha and RAR gamma is indispensable for differentiation of F9 cells upon retinoic acid and cAMP treatment. *EMBO J* **16**:6452–6465.

Tang XH, Albert M, Scognamiglio T, Gudas LJ. 2009. A DNA methyltransferase inhibitor and all-trans retinoic acid reduce oral cavity carcinogenesis induced by the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Prev Res* **2**:1100–1110.

Thompson BA, Tremblay V, Lin G, Bochar DA. 2008. CHD8 is an ATP-dependent chromatin remodeling factor that regulates beta-catenin target genes. *Mol Cell Biol* **28**:3894–3904.

Tollervey JR, Lunyak VV. 2012. Epigenetics: judge, jury and executioner of stem cell fate. *Epigenetics* **7**:823–840.

Tropberger P, Pott S, Keller C, *et al*. 2013. Regulation of transcription through acetylation of H3K122 on the lateral surface of the histone octamer. *Cell* **152**:859–872.

Varlakhanova N, Hahm JB, Privalsky ML. 2011. Regulation of SMRT corepressor dimerization and composition by MAP kinase phosphorylation. *Mol Cell Endocrinol* **332**:180–188.

Villa R, Pasini D, Gutierrez A, *et al*. 2007. Role of the polycomb repressive complex 2 in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Cell* **11**:513–525.

Wassenegger M. 2005. The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell* **122**:13–16.

Wei LN, Hu X, Chandra D, *et al*. 2000. Receptor-interacting protein 140 directly recruits histone deacetylases for gene silencing. *J Biol Chem* **275**:40782–40787.

Wu H, Chen X, Xiong J, *et al*. 2011. Histone methyltransferase G9α contributes to H3K27 methylation *in vivo*. *Cell Res* **21**:365–367.

Wulf G, Finn G, Suizu F, Lu KP. 2005. Phosphorylation-specific prolyl isomerization: is there an underlying theme? *Nat Cell Biol* **7**:435–441.

Wysocka J, Swigut T, Xiao H, *et al* 2006. A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* **442**:86–90.

Yuan W, Wu T, Fu H, *et al*. 2012. Dense chromatin activates Polycomb repressive complex 2 to regulate H3 lysine 27 methylation. *Science* **337**:971–975.

Zardo G, Ciolfi A, Vian L, *et al*. 2012a. Transcriptional targeting by microRNA-polycomb complexes: a novel route in cell fate determination. *Cell Cycle* **11**:3543–3549.

Zardo G, Ciolfi A, Vian L, *et al*. 2012b. Polycombs and microRNA-223 regulate human granulopoiesis by transcriptional control of target gene expression. *Blood* **119**:4034–4046.

Zhao Y, Lang G, Ito S, *et al*. 2008. A TFTC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. *Mol Cell* **29**:92–101.

Zheng B, Han M, Shu YN, *et al*. 2011. HDAC2 phosphorylation-dependent Klf5 deacetylation and RARalpha acetylation induced by RAR agonist switch the transcription regulatory programs of p21 in VSMCs. *Cell Res* **21**:1487–1508.

PUBLICATION 2

Abstract

Retinoic acid (RA), the main active vitamin A metabolite, controls multiple biological processes such as cell proliferation and differentiation through genomic programs and kinase cascades activation. Several breast cancer cells respond to the antiproliferative effects of RA, but others are RA-resistant. In several cases resistance has been correlated to the amplification of the erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 (ERBB2) gene, but the overall signaling and transcriptional pathways that are altered in such cells have not been elucidated. Here we compared two human breast cancer cell lines, the MCF7 cell line, which responds to the antiproliferative action of RA and the BT474 cell line, which is RA-resistant subsequent to ERBB2 amplification in a large-scale analysis of the phosphoproteins and in a genome-wide analysis of the RA-regulated genes. Using high-resolution nano-LC-LTQ-Orbitrap mass spectrometry associated to phosphopeptide enrichment, we found that several proteins involved in signaling and in transcription, are differentially phosphorylated after RA addition. The paradigm of these proteins is the RA receptor α (RARα), which was phosphorylated in MCF7 cells but not in BT474 cells. The panel of the RA-regulated genes was also different. Overall our results indicate that ERBB2 amplification interferes with the ability of RA to activate kinases with consequences on the phosphorylation of several proteins involved in transcription and thus on gene expression.

Introduction

Retinoic Acid (RA), the major active derivative of vitamin A, is essential for all steps of life, from the embryo to the adult, through the regulation of the expression of a battery of target genes involved in cell differentiation, proliferation, adhesion, migration, death or survival (1, 2). These effects of RA are mediated by nuclear receptors, RAR (α, β and γ), which are ligand-dependent regulators of transcription and bind specific response elements located in the promoters of their target genes (1, 3). Recently, genome-wide highthroughput sequencing and chromatin immunoprecipitation coupled with deep sequencing expanded the repertoire of the RA-target genes in several cell lines (3-7). However, today it is clear that RA also has non-transcriptional effects and activates kinase cascades (8, 9). These kinases phosphorylate several targets in the cytosol and translocate into the nucleus where they phosphorylate RARs themselves as well as other proteins (8, 10). Phosphorylation is a widely used mechanism of post-translational modification that controls protein activity, stability, turnover, and interaction with DNA or partner proteins (11).

Cancer with aberrant cell growth and differentiation blockage often results from alterations of the RA pathway and reciprocally, RA has proven anti-cancer capacity due to its ability to restore differentiation and to induce growth arrest and cell death (12). Acute Promyelocytic Leukemia (APL) represents the paradigm for RA-induced differentiation therapy of cancer. In addition, a vast literature reports that several breast cancer cells are sensitive to the antiproliferative activity of RA while others are resistant. In several cases, resistance has been correlated to the amplification of the erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 (ERBB2) gene and to the subsequent alterations of the downstream signaling pathways. However the overall phosphorylation events and transcriptional pathways that are altered in such RA-resistant cells have not been the object of systematic studies. In fact, most of the RA-induced phosphorylation events are still unknown, making their large-scale analysis instrumental in understanding the complex signaling events initiated by RA.

Here we compared two human breast cancer cell lines, the MCF7 cell line, which responds to the antiproliferative action of RA and the BT474 cell line, which is RA-resistant subsequent to ERBB2 amplification in a large-scale analysis of the phosphorylated proteins, using high-resolution nano-LC-LTQ-Orbitrap mass spectrometry (13, 14) associated to

phosphopeptide enrichment (15, 16). We also compared these two cell lines in a genome-wide analysis of the RA-regulated genes. This study revealed major differences after RA addition, indicating that ERBB2 amplification interferes with both the genomic and the non-genomic effects of RA with consequences on the RA response.

Materials and methods

Cell culture

MCF7 and BT474 human breast cancer cells were cultured as monolayers under standard conditions as previously described (9, 17). When 80-90 % confluent, cells were treated for 30 min (MS analysis) or for 4 h (RNA-seq) with *all-trans* RA (10^{-6} M) (Sigma Aldrich) or vehicle (0.1% ethanol), after 24h in low (1%) serum medium conditions, without insulin and phenol red. Then the cells were scrapped for RNA extraction or for cytosolic and nuclear extracts preparation.

For the analysis of RARα phosphorylation, large-scale culture conditions were required and MCF7 and BT474 cells were grown in suspension in 3 L culture medium. Then the cells were treated with RA or vehicle, centrifuged and proceeded for the preparation of whole cell extracts and RARα immunoprecipitation.

Extracts preparation and digestion

Cytosolic extracts were obtained by lysis in hypotonic buffer (10 mM HEPES-KOH pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA and 0.5 % Igepal CA-630). Nuclear extracts were obtained by incubating the remaining pellet in extraction buffer (20 mM HEPES-KOH pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 420 mM NaCl, 1 mM EDTA and 25 % glycerol). Purity of the extracts was assessed by immunoblotting with antibodies against β-tubulin (IGBMC facility) and lamin A/C (Santa Cruz Biotechnology), which are present exclusively in the cytosol and in the nucleus respectively. All buffers were ice-cold and supplemented with 1 mM PMSF, 50 µM NaF, 5 mM Na_3VO_4 (Sigma Aldrich), complete protease inhibitor cocktail (PIC) and PhosSTOP (Roche Diagnostics).

The extracts (350 µg protein) were TCA-precipitated (12h at 4°C) and centrifuged (14000 rpm, 30 min, 4°C). Pellets were washed twice with 500 µL cold acetone, centrifuged (14000 rpm, 10 min, 4°C), urea-denatured (8M urea in Tris-HCl 0.1 mM), reduced with 5 mM Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP, Hampton research) for 30 min, and then alkylated with 10 mM iodoacetamide (30 min in the dark). Reduction and alkylation were performed at room temperature under agitation (850 rpm).

Then the samples were divided in two. One half (175 µg) was digested at 37°C with endoproteinase Lys-C (Wako chemicals) in 8 M urea for 6h, followed by an overnight

digestion with modified Trypsin (Promega) in 2 M urea. The other half was digested overnight with Chymotrypsin (Promega) in 1 M urea at 25°C. All enzymes were diluted 1:100 (w/w). The resulting peptides were desalted on C18 spin-columns (Harvard apparatus) and dried (Speed-Vacuum). An aliquot (10 µg) of the Lys-C/Trypsin digest was kept for direct analysis, and the other samples were submitted to phospho-enrichment.

RARα immunoprecipitation and digestion

Whole cell extracts were prepared by suspending the cells in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 % glycerol and 0.5 % Igepal CA-630) supplemented with 1 mM PMSF, 50 µM NaF, 5 mM Na_3VO_4, 125 nM okadaic acid (Calbiochem), complete PIC and PhosSTOP. After centrifugation, the supernatants (100 mg proteins) were incubated with 2 monoclonal antibodies raised against RARα, one recognizing the C-terminal region [Ab9α (F)] and the other one the N-terminal region [Ab10α (A1)] (18), bound to Dynabeads Protein G (Invitrogen). These antibodies raised in house were purified from ascitic fluid on protein G sepharose and were excellent for the immunoprecipitation of RARα and its detection by MS. Elution was performed in Protein LoBind Tubes (Eppendorf) with 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8 containing 2% SDS, 10% glycerol and 3% β-mercaptoethanol, followed by pH neutralization with Tris-HCl pH 9. The eluates were reduced and alkylated (see above) and digested with Thermolysin (Promega) (1:5 w/w), in 50 mM Tris-HCl, 0.5 mM $CaCl_2$ (75°C, overnight).

Phosphopeptide enrichment

Samples were suspended in loading buffer [50% acetonitrile (ACN), 0.1 % trifluoroacetic acid (TFA)], incubated with PHOS-Select iron affinity beads (Sigma Aldrich) at a ratio 1/2.5 (beads volume µL/peptide mixture µg) for 30 min and loaded into a 200 µL Gel-Loader tip (Costar). After washing with the binding and washing (20 % ACN, 1% TFA) buffers, phosphopeptides were eluted with 4% ammonium hydroxide, desalted on Graphite spin-column (Pierce-Thermo Fisher Scientific) and dried (Speed-vacuum).

LC-MS/MS analysis

Samples were analyzed using an Ultimate 3000 nano-RSLC (Thermo Scientific, San Jose California) coupled in line with an LTQ-Orbitrap ELITE mass spectrometer *via* a nano-electrospray ionization source (Thermo Scientific, San Jose California).

Peptides were loaded on a C18 Acclaim PepMap100 trap-column (75 µm ID x 2 cm, 3 µm, 100Å, Thermo Fisher Scientific) for 3.5 minutes at 5 µL/min with 2 % ACN, 0.1 % formic acid (FA) in H_2O and then separated on a C18 Accucore nano-column (75 µm ID x 50 cm, 2.6 µm, 150Å, Thermo Fisher Scientific) with a 480 minutes linear gradient from 5% to 50% buffer B (A: 0.1 % FA in H_2O / B: 80 % ACN, 0.08 % FA in H_2O). The total duration was set to 520 minutes at a flow rate of 200 nL/min and at 40°C.

The mass spectrometer was operated in data-dependent mode with survey scans from m/z 300-1600 acquired in the Orbitrap at a resolution of 120,000 at m/z 400. The 15 most intense peaks from survey scans were selected for further fragmentation in the LTQ with an isolation window of 2.0 Da and were fragmented by CID with a normalized collision energy of 35 %. Unassigned and single charged states were rejected. To enhance phosphorylation detection, Multi-Stage Activation was enabled and the corresponding neutral loss masses were 32.66; 49.00; 65.33 and 98.00.

The Ion Target Value for the survey scans in the Orbitrap and the MS2 mode in the LTQ were set to 1E6 and 5E4 respectively and the maximum injection time was set to 100 ms for both scan modes. Dynamic exclusion was used. Exclusion duration was set to 30 s, repeat count was set to 1 and exclusion mass width was ± 10 ppm.

Proteins were identified by database searching using SequestHT with Proteome Discoverer 1.4 software (Thermo Fisher Scientific) against the Human Swissprot database (2013–06 release, 11305913 entries). Precursor and fragment mass tolerance were set at 7 ppm and 0.5 Da respectively, and up to 2 missed cleavages were allowed. Oxidation (M) and Phosphorylation (S, T, and Y) were set as variable modification, and Carbamidomethylation (C) as fixed modification. Peptides were filtered with a 1% FDR (false discovery rate) and rank 1. RARα phosphopeptides were filtered with a score versus charge state (1.5 z_1, 2.5 z_2, 3 z_3 and 3.2 $z_{\geq 4}$) and rank 1. Proteins were identified with at least 2 different peptides. Phosphorylation sites were validated using the PhosphoRS 3.0 node, with at least 99% phospho-site probability. Exported phosphopeptides were then processed using ProteinModificationToolkit, with a cutoff value at 99%, and automatically sent to Motif-x

with the following parameters: Occurrences 20 / Significance P < 10^{-6} / Background IPI Human Proteome. RARα phosphorylation sites were manually validated.

High throughput mRNA sequencing (RNA-seq)

Total RNA was extracted from MCF7 and BT474 cells treated or not with RA for 4h. The libraries of template molecules suitable for high throughput DNA sequencing were prepared following the Illumina protocol as previously described (19). Sequence Reads were mapped onto the mm9 assembly of the mouse genome by using Tophat v1.4.1 (20) and the bowtie v0.12.7 aligner. Gene expression was quantified using HTSeq v0.5.3p3 (21) and gene annotations from Ensembl release 66. Data normalization and comparisons of interest were performed using the statistical method proposed by Anders and Huber (21) implemented in the DESeq v.1.6.1 Bioconductor package. P-values were adjusted for multiple testing by using the Benjamini and Hochberg (22) method. Only genes with |log2 fold-change| > 1 or <-1 and adjusted p-value < 0.05 were considered. Functional analyses of these genes were performed using the Manteia program (23).

RT-qPCR and **Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) experiments** were performed as described previously (24). Primer sequences are available upon request

Results

Comparison of the phosphorylated proteins in MCF7 and BT474 cells

First we investigated whether the global phosphoproteome is affected in the RA-resistant BT474 cells, compared to the RA responsive MCF7 cells, in a large-scale nano-LC-LTQ-Orbitrap MS approach (Fig 1A). As the effects of RA on the signaling pathways are very rapid (9, 25), the cells were treated with RA or the solvent for a short time (30 min).

Nuclear and cytosolic extracts were prepared and divided in two for different proteolytic digestions. One half was digested with trypsin in combination with Lys-C, which both cleave peptides carboxyterminal of the amino acids Lys and Arg. Such a combination reduces missed cleavages due to inhibition of trypsin under the denaturing conditions required for digestion of tightly folded proteins. The other half was digested with chymotrypsin, which cleaves peptides carboxy terminal of aromatic (Tyr, Trp, Phe) or hydrophobic (Leu) amino acids. Combined data obtained from two different proteolytic digests with different cleavage patterns increase sequence coverage (26). This is important especially when localization of a modification is desired rather than simple protein identification. Finally, we analyzed a total of 16 samples treated or not with RA.

An aliquot of the trypsin/Lys-C digested samples was submitted directly, without phosphopeptide enrichment, to nano-LC-LTQ-Orbitrap MS, in order to analyze the overall protein composition of the extracts. For each cell line, we selected only the proteins identified with at least two peptides with high confidence in both the vehicle- and RA-treated extracts. Using this strategy, 2212 and 2285 proteins were identified in the cytosolic extracts of the MCF7 and BT474 cell lines respectively. Concerning the nuclear extracts, 1545 proteins were identified in MCF7 cells and 1645 in BT474 cells (Table S1).

Then the remaining trypsin/Lys-C-digested samples and the chymotrypsin-digested ones were submitted to phosphopeptide enrichment and analyzed. The scores of the two digestion protocols were combined and the phosphopeptides corresponding to the proteins selected above without phosphoenrichment (Table S1) were considered. Only proteins with at least one phosphorylated peptide with high confidence were considered.

Global identification of phosphopeptides

In untreated MCF7 cells, a total of 1637 unique phosphopeptides (1631 phosphosites) belonging to 640 phosphorylated proteins were scored in the cytosol. In the nuclear extracts, 1749 unique phosphopeptides (1750 phosphosites) belonging to 572 phosphorylated proteins were scored (Tables S1 and S2 and Fig 2A). This indicates that, in MCF7 cells, around 29% of the cytosolic proteins and 37% of the nuclear proteins are phosphorylated (Fig 2B). In contrast, unexpectedly, in BT474 cells, the number of unique phosphopeptides, phosphosites and phosphorylated proteins was around 20% lower than in MCF7 cells (Fig 2A and 2B).

Next, patterns among the identified phosphorylation sites were examined (see materials and methods) and were found to be very similar in both cell lines. Similar to other studies (27, 28), we observed mostly Ser phosphorylation (80%), followed by Thr (7%) and Tyr (0,3%) (Fig 2C). The number of phosphorylated residues within each phosphopeptide was also analyzed. The majority of the phosphopeptides contained 1 site (50%) or 2 sites (40%) (Fig 2D). Only 10% contained 3 phosphorylated sites. We then examined the number of phosphorylated sites within each phosphoprotein and we observed that 60% of the phosphoproteins are phosphorylated at 2 or more residues (Fig 2E, F). Only a few proteins (2%) carried more than 10 sites. As an example, the serine/arginine repetitive matrix proteins 1 and 2 (SRRM1 and SRRM2) were phosphorylated at 36 and 89 sites respectively in the nucleus (Table S2). Then, the motifs of the phosphopeptides were examined and proline-directed (SP) and acidic sites (SD and SE) were found to be the most common (Fig 3). Several phosphoproteins exemplified by SRRM1 and SRRM2 contain the two types of sites (Table S2).

Comparison of the MCF7 and BT474 phosphoproteins profiles

First, the global protein profiles of the two cell lines were compared. The Venn diagrams in Fig 4A show that around 20% of the proteins identified in MCF7 cells (treated or not with RA) were not detected in BT474 cells and reciprocally. Note that these differential proteins depicted low abundance. Therefore only the proteins detected in both cell lines were considered for phosphorylation analysis. In untreated MCF7 cells, 473 phosphorylated proteins were identified in the cytoplasmic and nuclear extracts (Fig 4A). In untreated

BT474 cells, 408 and 410 phosphoproteins were identified in the cytosolic and nuclear extracts respectively (Fig 4A).

Then the phosphorylated proteins were assigned to functional groups, according to enriched Gene Ontology (GO), using the Manteia program (http://manteia.igbmc.fr) (23). This analysis identified in the cytosol of both cell lines, proteins involved in signal transduction including regulators of small GTPases (RABL6, RBP1, ES8L1) and regulatory subunits of cyclic AMP-dependent protein kinases (KAP2, KAP0). It also identified chaperones and proteins of the translation and transport/export systems. In contrast, the nuclear phosphorylated proteins were enriched in DNA damage and repair, mRNA processing (splicing factors), histone modifications, transcription, nuclear export, RNA binding and phospho-transfer. The major phosphoproteins grouped according to physiological processes are shown in Tables 1 and 2.

Next the cytosolic and nuclear phosphoproteins identified in untreated MCF7 cells were crossed with those of BT474 cells. Most interestingly 90% of the phosphoproteins identified in MCF7 cells, were also identified in BT474 cells (Fig 4B and Table S3). Only a few proteins exemplified by the cytosolic proteins IF5 and PEX14 and the nuclear proteins SAS10, SENP3 and NOP56 were phosphorylated in MCF7 cells and not in BT474 cells. In contrast, the number of phosphopeptides corresponding to erbB-2 was 70 fold higher in BT474 cells than in MCF7 cells (Tables S1 and S2), validating our approach.

Comparison of the RA-regulated phosphoprotein profiles

In both cell lines, RA treatment affected neither the preference for Ser phosphorylation (Fig 2C) nor the percentage of mono- and bi-phosphorylated peptides (Fig 2D).

In MCF7 cells cytosolic extracts, RA treatment affected only midly the % of phosphoproteins, the number of unique phosphopeptides and the number of phosphosites per protein (Fig. 2A, 2B, 2E and Fig 4A). Moreover, 90% of the cytosolic phosphoproteins were identified in both the control and RA-treated samples (Fig 4C, left). However, among these common phosphoproteins, around 10% were up- (ratio PSM RA/C > 2), or down- (ratio PSM RA/C ≤ 0.5) regulated (Table 1 and Table S3). As an example, the phosphorylation of translation factors (HNRL2 and HNRL1) was decreased, while that of proteins involved in lipid metabolism (MORC2, PCYT1A) was increased in response to RA

An increase in phosphorylation also concerned kinases such as PAK2, a downstream effector of the small GTPases that activates the MAPK pathways, corroborating that RA can activate this pathway.

Strikingly, in the MCF7 nuclear extracts, RA induced a 20% decrease in the number of phosphoproteins, phosphopeptides and phosphosites (Fig 2A, 2B and Fig 4A, 4C right). Moreover, 18% of the nuclear phosphoproteins identified both in the absence and presence of RA, depicted a decrease in their phosphorylation status in response to RA (Table S3 and Table 2). These down-regulated phosphoproteins are involved in DNA damage and repair (MASH6), mRNA processing (FIP1, SRS11 and DHX16), or are histone modifyers (P66B) (Table 2). Note that the differential phosphorylation of these proteins does not reflect changes in their abundance (Table S1).

Remarkably, in BT474 cells, RA had different effects. Indeed, the number of phosphopeptides, phosphosites and phosphoproteines increased by 20% in both the cytosolic and nuclear extracts after RA treatment (Fig. 2A and 2F). As an example, the cytosolic proteins IF5 and PEX14, and the nuclear proteins NOP56 and SAS10, which were not phosphorylated in the untreated cells, became phosphorylated upon RA addition (Tables 1 and 2, Table S3). Moreover, 24% of the proteins that were already phosphorylated in the untreated cells showed a marked increase in their phosphorylation status after RA addition. As an exemple, in the cytosol (Table 1), this increase concerned essentially proteins involved in the Akt pathway (AKTS1). In the nucleus (Table 2), it concerned histones modifiers (HDAC1, HDAC2, LRWD1, SUZ12 and RRP8), transcription factors (LEO1) and proteins involved in RNA splicing (TRA2B, SF3B2). Note that these proteins were not regulated in MCF7 cells. Reciprocally, the proteins up- or down-regulated in MCF7 cells, were not affected in BT474 cells. Altogether, these results indicate that RA differentially impacts the phosphoproteome of MCF7 and BT474 cells. The major differences concern proteins involved in signal transduction and in transcription.

Comparison of RARα phosphorylation after RA addition to MCF7 and BT474 cells

Both MCF7 and BT474 cells express the RARα subtype. However RARα could not be detected in the above nano-LC-LTQ-Orbitrap MS approach, indicating that its abundance is too low for detection in these conditions. Therefore, to determine the changes in RARα

phosphorylation patterns upon RA treatment of MCF7 and BT474 cells, we performed a large-scale culture of the cells. Two independent biological replicates were performed for each cell line with and without RA treatment (30 min). Then RARα was enriched by immunoprecipitation with antibodies raised and purified in house (see materials and methods) before proteolytic digestion and nano-LC-LTQ-Orbitrap MS analysis (Fig 1B).

It must be noted that in the context of RARα, trypsin digestion was not convenient. Indeed, it generated multiple peptides outside of the detectable size range (14-20 amino acids) and thus led to only ~ 50 % of sequence coverage. Moreover, after phosphopeptide enrichment, no or very few RARα phosphopeptides were detected, suggesting that the potential phosphorylation sites were mainly located in the non-covered sequence. Therefore we searched for better enzymes and we selected thermolysin, which cleaves at the N-terminus of the hydrophobic residues Leu, Phe, Val, Ile, Ala and Met. This enzyme led to higher sequence coverage, especially in the N-terminal domain (NTD) of RARα, and generated properly sized peptides embedding the phosphorylation sites. Finally, the phosphopeptides obtained after thermolysin digestion were enriched on PHOS-Select beads and analyzed by nano-LC-LTQ-Orbitrap MS (Table S4).

In the two cell lines, in the absence of RA, we identified peptides mono-phosphorylated at different Ser residues located in the NTD (S36, S77) and in the C-terminal domain (S445) (Fig 5A). S77 and S445 were already found to be phosphorylated in a previous study (29). However, S36 is a novel N-terminal proline-directed phosphorylation site. The MS-MS spectra of the peptides phosphorylated at these residues are shown in Fig. 5B. In both cell lines, the number of these phosphopeptides did not change significantly after RA addition (Fig 5C).

Remarkably, peptides bi-phosphorylated at S77 and S74 (Table S4) were also identified. After RA addition to MCF7 cells, the number of these bi-phosphorylated peptides increased markedly (Fig 5C). The novelty of this study is that not only the phosphorylation of S77 (25) but also that of S74 increases in response to RA. Note that S74 phosphorylation was never detected in the absence of S77 phosphorylation. According to our previous study combining mutagenesis and phosphopeptide mapping (29), the substitution of S77 with an alanine induced the disappearance of the phosphopeptide while the substitution of S74 did not, indicating that phosphorylation of S74 depends on that of S77.

In contrast, in BT474 cells, the number of peptides bi-phosphorylated at S74 and S77 was not increased upon RA addition (Fig 5C). Collectively, these results indicate that the phosphorylation status of RARα increases in response to RA in RA-sensitive cells and not in RA-resistant ERBB2- positive cells.

Genome-wide comparison of the RA-regulated genes in MCF7 and BT474 cells.

In previous studies, we reported that the phosphorylation of several factors, including the phosphorylation of RARα at S77, is required for the RA-induced activation of canonical RA targets genes (17, 25, 29). Therefore the MCF7 and BT474 cells were compared for their repertoire of RA-regulated genes (RA-treated versus untreated), in high throughput sequencing experiments (Table S5). For each cell line, a list of up- and down-regulated genes was generated. Several of these RA-regulated genes depict RA-response elements that bind RARs (3, 24, 25).

Interestingly, MCF7 cells depicted 40% more RA-regulated genes than BT474 cells (Fig 6). Moreover, 80% of the genes that were regulated by RA in MCF7 cells were not regulated in BT474 cells (Fig 6). These genes are related to water and ions transportation (*AQP1, SCNN1A*), morphogenesis (*HOXA9, HOXB6, HOXA5*) and in signaling such as genes encoding Rho guanine nucleotide exchange factors (*ARHGEF33*), G proteins coupled receptors (*GPR 109A, GPR109B, GPR81, GPR37L1*), members of the Tumor necrosis factors pathway (*TNFAIP2, TNFSF15*) and protein kinases (*PTK2B*).

The remaining 20% of the RA-regulated genes in MCF7 cells were also RA-regulated in BT474 cells (Fig 6) but differentially. As an exemple, the *HoxD1* (Homeobox D1) gene was up-regulated in MCF7 cells, but down-regulated in BT474 cells. Reciprocally, genes encoding proteins involved in the splicesosome (*RNU1* genes) were down-regulated in MCF7 cells but up-regulated in BT474 cells. Other canonical RA-target genes such as *Cyp26a1* (cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1), *Dhrs3* (dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3), *Stra6* (Stimulated by retinoic acid gene 6 homolog), *Sox9* (SRY (sex determining region Y)-box 9), *Btg2* (BTG family, member 2) were up-regulated in both cell lines but less efficiently in BT474 cells.

Altogether these results suggest that RA resistance would reflect a deregulation of most of the RA-target genes. It can be proposed that the deregulation observed in BT474 cells

reflects the absence of phosphorylation of RARα and/or other factors involved in transcription, subsequent to the deregulation of the signaling pathways.

In RA-resistant BT474 cells, RARα is less efficiently recruited to gene promoters

The expression of the RA-target genes is controlled by the RA-induced recruitment of RARα to specific response elements (RAREs) located in the promoters of the target genes. As this recruitment requires the phosphorylation of S77/74 (24, 25), we investigated whether this recruitment is affected in BT474 in line with the deficient phosphorylation of the receptor. We analyzed the recruitment of RARα to the promoters of the canonical *Cyp26a1* and *Btg2* genes, which are downregulated in BT474 cells compared to MCF7 cells as corroborated in RT-qPCR experiments (Fig 7A and 7B). ChIP-qPCR experiments were performed and showed that in MCF7 cells, RARα was rapidly recruited to the RARE located in the promoter of the *Btg2* gene (Fig 7B) and to both the proximal (R1) and distal (R2) RAREs located in the promoter of the *Cyp26A1* gene (Fig 7A). However RARα recruitment to these elements was markedly decreased in BT474 cells (Fig 7A and 7B). Collectively, these results indicate that the differential gene regulation observed in the RA-resistant BT474 cells might be correlated at least in part to a deficient phosphorylation and DNA recruitment of RARα.

Discussion

The human breast cancer cell lines MCF7 and BT474, which are responsive and resistant to RA respectively, are models of choice to analyze the panels of genes and phosphoproteins that are regulated by RA as well as the consequences of a deregulated kinome downstream of the erbB-2 tyrosine kinase (30, 31) on the RA response. We compared the two cell lines in a large-scale analysis of the phosphorylated proteins and in a genomewide analysis of the RA-regulated genes.

We took advantage of the recent Orbitrap technology combined to phosphopeptides enrichment, to perform the first MS study of the overall phosphorylation events induced by RA and of RARα phosphorylation. We succeeded in analyzing the phosphorylation sites of RARα after several technical developments. Indeed we had to take into account that RARα is a low abundance protein and that its phosphosites are missed out upon trypsin digestion. We successfully produced antibodies, which efficiently enriched RARα by immunoprecipitation. We also selected thermolysin, which led to high sequence coverage and generated properly sized peptides embedding the phosphorylation sites.

The interesting point of this study is the observation that RA does not have the same effects on the phosphoprotein profiles of the MCF7 and BT474 cells. Indeed, in MCF7 cells, RA increased the phosphorylation of components of kinase pathways, confirming that RA activates kinase cascades (9, 25). In contrast, in BT474 cells, RA did not affect these kinase pathways but activated other pathways such as the Akt pathway, which blocks the MAPK pathway. Such results indicate that ERBB2 amplification blocks the ability of RA to activate kinase cascades. That the MAPK pathway is not RA-activated in BT474 cells has been cooroborated in an other study (9, 17).

Consequently, the phosphorylation profile of several nuclear proteins involved in transcription differed in the two cell lines after RA addition. Indeed the phosphorylation of RARα markedly increased in MCF7 cells but not in BT474 cells. Moreover, the phosphorylation of histone modifyers involved in chromatin silencing (SUZ12, RRP8, LRWD1, HDAC1 and HDAC2) was increased or induced in BT474 cells but was not affected in MCF7 cells.

Finally our genomewide analysis of the RA-regulated genes indicated that most of the genes that are regulated in MCF7 cells are not in BT474 cells. These genes encode essentially kinases and other proteins involved in signaling. One can speculate that, in the RA-resistant BT474 cells, the absence of regulation of certain genes by RA might be correlated at least in part to the deficient phosphorylation of RARα, which is required for the recruitment of the receptor to specific promoter elements. It might be also correlated to the phosphorylation of other factors, resulting in the maintenance of chromatin silencing. Studying the role of these factors in the expression of the RARα-target genes and how the deregulation of their phosphorylation leads to RA resistance is out of the scope of this manuscript. Nevertheless our results indicate that ERBB2 amplification interferes with the non-genomic effects of RA with consequences on the phosphorylation of RARα and several other nuclear proteins involved in transcription and thus on gene expression. Considering that phosphorylation processes control either positively or negatively DNA binding and protein-protein interactions and are part of RA action (24, 25, 32), this study opens new avenues in the understanding of the deregulation of the RA response in cancer or other diseases.

Acknowledgements

We are grateful to Betty Heller, the IGBMC cell culture facility and Samia Gaouar for help. We also thank Celine Keime and Bernard Jost from the deep sequencing platform. This work was supported by funds from CNRS, INSERM, the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-09-BLAN-0297-01), the Association pour la recherche sur le Cancer (PJA20141201746), the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, DEQ20090515423) and the Institut National du Cancer (PL09-194). It was also supported by ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the ANR under the frame programme Investissements d'Avenir labeled ANR-10-IDEX-0002-02. ARC supported the acquisition of the Orbitrap mass spectrometer. The Canceropole Grand Est supported MJ. The Ligue nationale contre le cancer supported MC.

References

1. Rochette-Egly C, Germain P. Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors. Nuclear Receptor Signaling. 2009;7:e005.

2. Samarut E, Rochette-Egly C. Nuclear retinoic acid receptors: conductors of the retinoic acid symphony during development. Mol Cell Endocrinol. 2012;348(2):348-60.

3. Moutier E, Ye T, Choukrallah MA, Urban S, Osz J, Chatagnon A, et al. Retinoic acid receptors recognise the mouse genome through binding elements with diverse spacing and topology. J Biol Chem. 2012;287(31):26328-41.

4. Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR, Eeckhoute J, et al. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. Nat Genet. 2006;38(11):1289-97.

5. Hua S, Kittler R, White KP. Genomic antagonism between retinoic acid and estrogen signaling in breast cancer. Cell. 2009;137(7):1259-71.

6. Mahony S, Mazzoni EO, McCuine S, Young RA, Wichterle H, Gifford DK. Ligand-dependent dynamics of retinoic acid receptor binding during early neurogenesis. Genome Biol. 2011;12(1):R2.

7. Mendoza-Parra MA, Walia M, Sankar M, Gronemeyer H. Dissecting the retinoid-induced differentiation of F9 embryonal stem cells by integrative genomics. Mol Syst Biol. 2011;7:538.

8. Al Tanoury Z, Piskunov A, Rochette-Egly C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects: Thematic Review Series: Fat-Soluble Vitamins: Vitamin A. J Lipid Res. 2013;54(7):1761-75.

9. Piskunov A, Rochette-Egly C. A retinoic acid receptor RARalpha pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein alphaQ to activate p38MAPK. Oncogene. 2012;31(28):3333-45.

10. Piskunov A, Al Tanoury Z, Rochette-Egly C. Nuclear and extra-nuclear effects of retinoid acid receptors: how they are interconnected. Subcell Biochem. 2014;70:103-27.

11. Lalevee S, Ferry C, Rochette-Egly C. Phosphorylation control of nuclear receptors. Methods Mol Biol. 2010;647:251-66.

12. Duong V, Rochette-Egly C. The molecular physiology of nuclear retinoic acid receptors. From health to disease. Biochim Biophys Acta. 2011;1812(8):1023-31.

13. Jones KA, Kim PD, Patel BB, Kelsen SG, Braverman A, Swinton DJ, et al. Immunodepletion plasma proteomics by tripleTOF 5600 and Orbitrap elite/LTQ-Orbitrap Velos/Q exactive mass spectrometers. J Proteome Res. 2013;12(10):4351-65.

14. Kalli A, Smith GT, Sweredoski MJ, Hess S. Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent acquisition mode: focus on LTQ-Orbitrap mass analyzers. J Proteome Res. 2013;12(7):3071-86.

15. Engholm-Keller K, Larsen MR. Titanium dioxide as chemo-affinity chromatographic sorbent of biomolecular compounds--applications in acidic modification-specific proteomics. J Proteomics. 2011;75(2):317-28.

16. Leitner A, Sturm M, Lindner W. Tools for analyzing the phosphoproteome and other phosphorylated biomolecules: a review. Anal Chim Acta. 2011;703(1):19-30.

17. Ferry C, Gaouar S, Fischer B, Boeglin M, Paul N, Samarut E, et al. Cullin 3 mediates SRC-3 ubiquitination and degradation to control the retinoic acid response. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(51):20603-8.

18. Gaub MP, Rochette-Egly C, Lutz Y, Ali S, Matthes H, Scheuer I, et al. Immunodetection of multiple species of retinoic acid receptor alpha: evidence for phosphorylation. Exp Cell Res. 1992;201(2):335-46.

19. Al Tanoury Z, Piskunov A, Andriamoratsiresy D, Gaouar S, Lutzing R, Ye T, et al. Genes involved in cell adhesion and signaling: a new repertoire of retinoic acid receptor target genes in mouse embryonic fibroblasts. J Cell Sci. 2014;127(Pt 3):521-33.

20. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. Bioinformatics. 2009;25(9):1105-11.

21. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol. 2010;11(10):R106.

22. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society Series. 1995;57(B):289-300.

23. Tassy O, Pourquie O. Manteia, a predictive data mining system for vertebrate genes and its applications to human genetic diseases. Nucleic Acids Res. 2014;42(Database issue):D882-91.

24. Al Tanoury Z, Gaouar S, Piskunov A, Ye T, Urban S, Jost B, et al. Phosphorylation of the retinoic acid receptor RARg2 is crucial for the neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. Journal of cell science. 2014;147:2095-105.

25. Bruck N, Vitoux D, Ferry C, Duong V, Bauer A, de The H, et al. A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RARalpha to target promoters. Embo J. 2009;28(1):34-47.

26. Dickhut C, Feldmann I, Lambert J, Zahedi RP. Impact of digestion conditions on phosphoproteomics. J Proteome Res. 2014;13(6):2761-70.

27. Huttlin EL, Jedrychowski MP, Elias JE, Goswami T, Rad R, Beausoleil SA, et al. A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. Cell. 2010;143(7):1174-89.

28. Olsen JV, Blagoev B, Gnad F, Macek B, Kumar C, Mortensen P, et al. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. Cell. 2006;127(3):635-48.

29. Rochette-Egly C, Adam S, Rossignol M, Egly JM, Chambon P. Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIIH and phosphorylation by CDK7. Cell. 1997;90(1):97-107.

30. Ali NA, Wu J, Hochgrafe F, Chan H, Nair R, Ye S, et al. Profiling the tyrosine phosphoproteome of different mouse mammary tumour models reveals distinct, model-specific signalling networks and conserved oncogenic pathways. Breast Cancer Res. 2014;16(5):437.

31. She QB, Chandarlapaty S, Ye Q, Lobo J, Haskell KM, Leander KR, et al. Breast tumor cells with PI3K mutation or HER2 amplification are selectively addicted to Akt signaling. PLoS One. 2008;3(8):e3065.

32. Bour G, Lalevee S, Rochette-Egly C. Protein kinases and the proteasome join in the combinatorial control of transcription by nuclear retinoic acid receptors. Trends Cell Biol. 2007;17(6):302-9.

Figure legends

Fig 1: Workflow for the phosphoproteomics strategy.

(A) Global phosphoproteome. Nuclear and cytoplasmic extracts were prepared and divided in two: one half was digested with trypsin/Lys-C and the other half with chymotrypsin. A small fraction of the trypsin/Lys-C digests was analyzed directly without further purification. The remaining digests were subjected to phosphopeptide enrichment and MS analysis. (B) RARα phosphorylation. Whole cell extracts were prepared from MCF7 and BT474 cells with and without a 30 min RA treatment. RARα was immunoprecipitated and the eluates were thermolysin-digested. Phosphopeptides were enriched and analyzed by nano-LC-LTQ-Orbitrap MS.

Fig 2: Overview of phosphorylation in MCF7 and BT474 cells.

(A) Numbers of unique phosphopeptides, phosphosites and phosphoproteins in the cytosolic and nuclear extracts of MCF7 and BT474 cells with and without RA treatment. (B) Percentage of phosphorylated proteins. (C) Relative phosphorylation of Ser, Thr and Tyr residues (Ag: ambiguous). (D) Relative frequency of mono-, bi- and tri- phosphorylated peptides. (E-F) Numbers of phosphosites per protein, in MCF7 (E) and in BT 474 cells (F).
C: cytosolic extracts, N: nuclear extracts.

Fig 3: Phosphorylation motifs

Twenty-five motifs were significantly represented in the cytosol of the vehicle-treated MCF7 cells, using the Motif-X algorithm. (A) Distribution of the different motifs in the dataset. Three percent of the phosphorylation sites did not lead to any motif attribution according to the defined significance criteria. (B) Sequence logos of the various motifs. (C) The motifs are shown with their respective score and their occurrence in the dataset (Foreground Matches) and in the IPI Human Proteome (Background Matches). The relative enrichment of the motifs in the dataset compared to the IPI Human Proteome is also shown (Fold Increase). Similar results were obtained for the other cytosolic or nuclear samples.

Fig 4: Overlaps among proteins and phosphoproteins in the nuclear and cytosolic extracts of MCF7 and BT474 cells.

(A) Proteins present in both the treated and untreated extracts of MCF7 cells were crossed with those of BT474 cells. Only the proteins present in the two cell lines were considered for phosphorylation analysis in B and C. (B) Phosphoproteins identified in the cytosolic and nuclear extracts of untreated MCF7 cells were crossed with those of BT474 cells. (C) For each cell line, the cytosolic and nuclear phosphoproteins identified in the absence of treatment were crossed with those identified after RA addition.

Fig 4: Comparison of the RARα phosphorylation sites in MCF7 and BT474 cells

(A) Schematic representation of the RARα domains with the S36, S74, S77 and S445 phosphosites. (B) MS-MS fragmentation spectra of the phosphorylated peptides. (C) Relative abundance of the RARα phosphopeptides in MCF7 (left) and BT474 cells (right) with and without RA treatment. Peptides numbers were normalized to the protein content of the immunoprecipitation eluates. The values are the average of two individual experiments.

Fig 6: Venn diagram comparing the genes that are regulated by RA in MCF7 and BT474 cells

Fig 7: RT-qPCR and ChIP-qPCR analysis of the *Cy26a1* (A) and *Btg2* (B) genes in MCF7 and BT474 cells.

Table 1: Cytosolic phosphoproteins in MCF7 and BT474 cells.
This table lists the most abundant phosphoproteins that were detected in the cytosolic extracts of both cell lines, grouped per biological function. For each protein, the phosphopeptides were analyzed manually. The site classes are assigned as acidic (A) or proline-directed (P). Most peptides are bi or tri phosphorylated. The effect of RA treatment is shown.

Accession	Protein name	Description	Site	Class	Regulation by RA	
					MCF7	BT474
Signal transduction						
P04626	ERBB2	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2	S1078, S1083	A	-	-
			S1054	Other	-	-
Q3YEC7	RABL6	Rab-like protein 6	S596, S599, S640, S641	A	-	-
Q8TE68	ES8L1	Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8-like protein	S182, T187	P	-	-
Q15311	RBP1	RalA-binding protein 1	S48	P	-	-
P13861	KAP2	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	S78, S80	A	-	-
P10644	KAP0	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	S83	P	-	-
P50502	F10A1	Hsc70-interacting protein	S75, S76, S79	A	-	-
P41236	IPP2	Protein phosphatase inhibitor 2	S121, S122	A	-	-
Q15435	PP1R7	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	S24, S27	A	-	-
P20020	AT2B1	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 1	S1193, T1203	A	-	-
			S1215, S1216, S1220	P	-	-
			S62, S92, S93	A	-	-
Q7Z406	MYH14	Myosin-14	S1969	A	-	-
			S1983, S1989	P	-	-
Q9Y6X9	MORC2	MORC family CW-type zinc finger protein 2	S743, S777	A	**up**	-
Q04726	TLE3	Transducin-like enhancer protein 3	S263, S267	A	**up**	-
P49585	PCY1A	Choline-phosphate cytidylyltransferase A	S315, S319	P	**up**	-
Q36B36	AKTS1	Proline-rich AKT1 substrate 1	S202, S203	A	-	**up**
			S88, S92	P	-	-
Q13177	PAK2	Serine/threonine-protein kinase PAK 2	S141	P	**up**	-
Nuclear export						
P06748	NPM	Nucleophosmin	S70	P	-	-
			S125	A	-	-
Translation						
P24534	EF1B	Elongation factor 1-beta	S106	A	-	-
P29692	EF1D	Elongation factor 1-delta	S133, T147	P	-	-
			S162	A	-	-
P05387	RLA2	60S acidic ribosomal protein P2	S102, S105	A	-	**up**
O60841	IF2P	Eukaryotic translation initiation factor 5B	S113, S137, S164, S214	A	-	-
Q9NXG2	THUM1	THUMP domain-containing protein 1	S86, S88	A	-	-
Q8NE71	ABCF1	ATP-binding cassette sub-family F member 1	S105, T108, S109, S140, S228	A	-	-
Q08J23	NSUN2	tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase	S743, S751	P	-	**up**
Q1KMD3	HNRL2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	S161	A	**down**	-
Q9BUJ2	HNRL1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	S194	P	**down**	-
P55010	IF5	Eukaryotic translation initiation factor 5	S389, S390	A	-	**up**
Protein transport						
O75381	PEX14	Peroxisomal membrane protein PEX14	S335	A	-	**up**
O15027	SC16A	Protein transport protein Sec16A	S414, T415, S417	P	-	-
Chaperone						
P27824	CALX	Calnexin	S554, S564	A	-	-
P07900	HS90A	Heat shock protein HSP 90-alpha	S263	A	-	-

Table 2: Nuclear Phosphoproteins in MCF7 and BT474 cells.

Accession	Protein name	Description	Site	Class	Regulation by RA	
					MCF7	BT474
DNA damage and repair						
Q02880	TOP2B	DNA topoisomerase 2-beta	S1400	P	-	-
			S1413, S1466, S1522, S1524, S1526, S1550, S1552	A	-	-
Q14676	MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1	S329, S331, S376, T378, T449, S453, S455	A	-	-
Q01831	XPC	DNA repair protein complementing XP-C cells	S94, S883, S884	A	-	-
P52701	MSH6	DNA mismatch repair protein Msh6	S252, S256, S261	A	down	-
			S219, S227	A	-	-
P11388	TOP2A	DNA topoisomerase 2-alpha	S1106, S1247, T1343, S1351, S1354	A	-	-
P18887	XRCC1	DNA repair protein XRCC1	T453, T452	A	-	-
			S461	P	-	-
mRNA processing						
Q9UQ35	SRRM2	Serine/arginine repetitive matrix protein 2	>90 phosphosites	P	-	-
Q8IYB3	SRRM1	Serine/arginine repetitive matrix protein 1	40 phosphosites	P	-	-
Q96ST2	IWS1	Protein IWS1 homolog	S398, S400, S287, S289, S157, S159	A	-	-
			S235, S237, S261, S263, S196, S198			
			(6 biP-peptides)			
Q15459	SF3A1	Splicing factor 3A subunit 1	S329, S359	A	-	-
Q6UN15	FIP1	Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1	S85, S87, S89 (triP-peptide)	A	down	-
			S492, S496, S500	A	-	-
Q05519	SRS11	Serine/arginine-rich splicing factor 11	S434, S483	A	down	-
O60231	DHX16	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX16	S103	A	down	-
Q13435	SF3B2	Splicing factor 3B subunit 2	S431, S435, S436	A	-	-
Q15637	SF01	Splicing factor 1	S80, S83	P	-	-
Q01130	SRSF2	Serine/arginine-rich splicing factor 2	S206, S208, S212	P	-	-
Q5VTL8	PR38B	Pre-mRNA-splicing factor 38B	S527, S529	A	-	-
Q9NQZ2	SAS10	Something about silencing protein 10	S365, S368	A	-	up
P62995	TRA2B	Transformer-2 protein homolog beta	S99	P	-	up
Histones modifications						
Q92769	HDAC2	Histone deacetylase 2	S394	A	-	-
			S422, S424 (biP-peptide)	A	-	up
Q13547	HDAC1	Histone deacetylase 1	S393	A	-	-
			S421, S423 (biP-peptide)	A	-	up
Q9UFC0	LRWD1	Leucine-rich repeat and WD repeat-containing protein 1	S251, S259 (biP-peptide)	P	-	up
O43159	RRP8	Ribosomal RNA-processing protein 8	S62, S64 (biP-peptide)	A	-	up
Q15022	SUZ12	Polycomb protein SUZ12	S546, S583	A	-	up
Q8TAQ2	SMRC2	SWI/SNF complex subunit SMARCC2	S347, S302, S304, S283, S286	P	-	-
Q92922	SMRC1	SWI/SNF complex subunit SMARCC1	S328, S330	P	-	-
O60341	KDM1A	Lysine-specific histone demethylase 1A	S166	A	-	-
Q9Y2K7	KDM2A	Lysine-specific demethylase 2A	S28; S869	A	-	-
Q9H7L9	SDS3	Sin3 histone deacetylase corepressor complex component SDS3	S45, T49, S53	A	-	-
Q96ST3	SIN3A	Paired amphipathic helix protein Sin3a	S832	A	-	-
Q8WXI9	P66B	Transcriptional repressor p66-beta	S129	A	down	-
Protein kinases						
Q9NYV4	CDK12	Cyclin-dependent kinase 12	S681, S685	A	-	-
			S274, S276	P	-	-
Q13523	PRP4B	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog	S23, S32, S36	A	-	-
Transcription factors						
Q8WVC0	LEO1	RNA polymerase-associated protein LEO1	T188, S197, S212, S220	A	-	-
			S294, S296 (biP-peptide)	A	down	up
			S229, S238 (biP-peptide)		-	up
Q12789	TF3C1	General transcription factor 3C polypeptide 1	S1068	A	-	-
Q6PD62	CTR9	RNA polymerase-associated protein CTR9 homolog	T925, S941, S943	A	-	-
RNA binding proteins						
Q14498	RBM39	RNA-binding protein 39	S136	P	-	-
Nuclear export						
P06748	NPM	Nucleophosmin	S70	P	-	-
			S125	A	-	-
Q9H4L4	SENP3	Sentrin-specific protease 3	S169, S181 (biP-peptide)	P	-	no P
Nucleole						
P19338	NUCL	Nucleolin	S145, S153	A	-	-
P78316	NOP14	Nucleolar protein 14	S146, S148	A	-	-
Q9Y2X3	NOP58	Nucleolar protein 58	S502	A	-	-
O00567	NOP56	Nucleolar protein 56	S520, S569, S570	A	-	up

Supporting Information

Table S1

List of the proteins and phosphoproteins identified in the nuclear and cytoplasmic extracts of MCF7 and BT474 cells with and without RA treatment. Only the proteins identified with at least two peptides with high confidence in both the control- and RA-treated extracts were selected.

Table S2

Description of the phosphorylated peptides and of the phosphosites grouped per protein.

Table S3

Lists of the phosphoproteins selected in the Venn diagrams shown in Fig 4B and 4C

Table S4

Description of the RARα phosphorylated peptides identified in MCF7 and BT474 cells. The presented data correspond to a representative experiment among two.

Table S5

List of the genes that are regulated by RA in MCF7 and BT474 cells. Ensembl IDs, gene names, descriptions and normalized expression values for transcripts that are induced or repressed by RA in the different cell lines are shown. The log2 change in expression and adjusted p value are also indicated

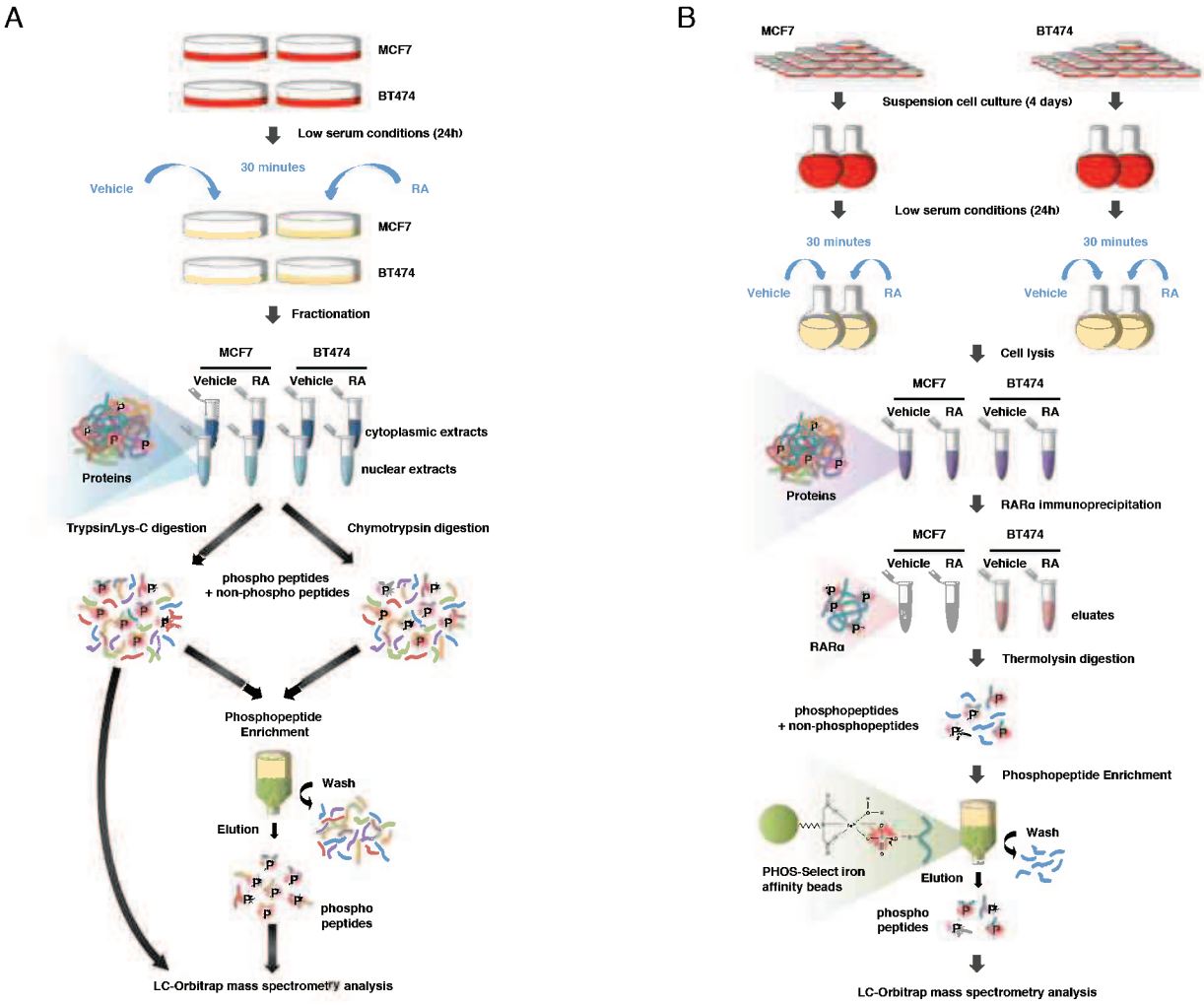

A
MCF7
BT474
Low serum conditions (24h)
30 minutes
Vehicle
RA
MCF7
BT474
Fractionation
MCF7
BT474
Vehicle
RA
Vehicle
RA
cytoplasmic extracts
nuclear extracts
Proteins
Trypsin/Lys-C digestion
Chymotrypsin digestion
phospho peptides
+ non-phospho peptides
Phosphopeptide
Enrichment
Wash
Elution
phospho
peptides
LC-Orbitrap mass spectrometry analysis
B
MCF7
BT474
Suspension cell culture (4 days)
Low serum conditions (24h)
30 minutes
30 minutes
Vehicle
RA
Vehicle
RA
Cell lysis
MCF7
BT474
Vehicle
RA
Vehicle
RA
Proteins
RARα immunoprecipitation
MCF7
BT474
Vehicle
RA
Vehicle
RA
eluates
RARα
Thermolysin digestion
phosphopeptides
+ non-phosphopeptides
Phosphopeptide Enrichment
Wash
PHOS-Select iron
affinity beads
Elution
phospho
peptides
LC-Orbitrap mass spectrometry analysis

Figure 1

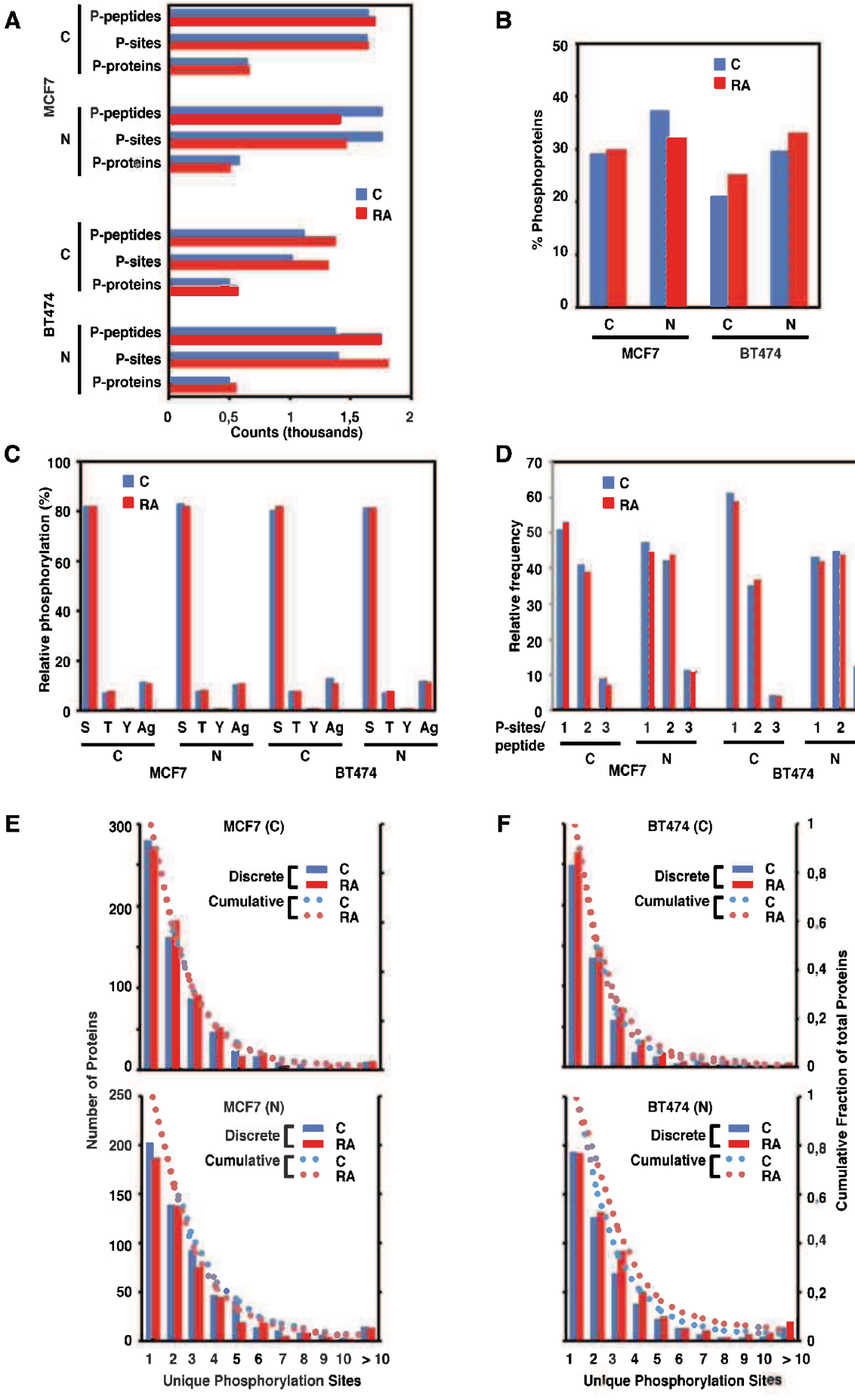
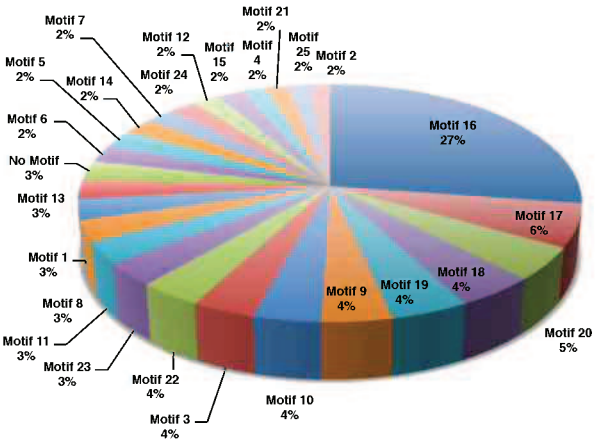
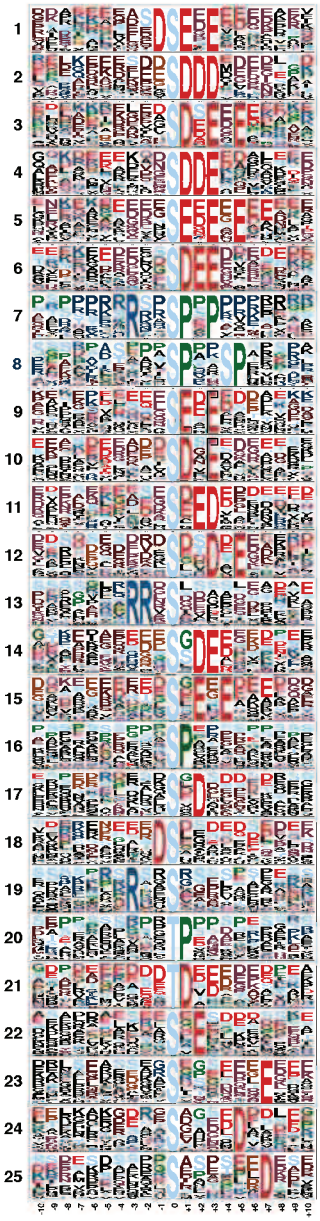

A
MCF7
BT474
C
N
P-peptides
P-sites
P-proteins
C
RA
0
0,5
1
1,5
2
Counts (thousands)
B
% Phosphoproteins
C
N
C
N
MCF7
BT474
C
Relative phosphorylation (%)
S T Y Ag
MCF7
BT474
D
Relative frequency
P-sites/ peptide
1 2 3
E
MCF7 (C)
MCF7 (N)
Discrete
Cumulative
Number of Proteins
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 > 10
Unique Phosphorylation Sites
F
BT474 (C)
BT474 (N)
Cumulative Fraction of total Proteins

Figure 2

A Motif Distribution



B Motif Logo



C Motif Details

Motif #	Motif	Motif Score	Foreground Matches	Background Matches	Fold increase
1	.....DSE.E.....	43.25	40	587	75.41
2	.....SDDD.....	40.56	22	278	109.33
3	.....SD.E.E.....	40.17	51	639	64.52
4	.....SDDE.....	39.52	24	310	96.84
5	.....SE.E.E.....	39.17	33	801	49.57
6	.....SDEE.....	38.88	35	496	81.58
7	.....R..SP.P.....	36.45	31	746	31.98
8	.....SP..SP.....	33.76	41	1565	20.59
9	.....SE.E.....	32	57	4931	14.89
10	.....SD.E.....	32	55	3273	23.93
11	.....S.ED.....	31.95	44	4432	15.27
12	.....S..D.E.....	28.67	28	3237	15.9
13	.....RR.S.....	28.2	38	4973	13.19
14	.....S.DE.....	27.93	32	2668	19.68
15	.....S.E.E.....	25.11	28	4432	12.2
16	.....SP.....	16	393	82637	3.99
17	.....S.D.....	16	85	43018	4.02
18	.....DS.....	16	64	43727	3.45
19	.....R..S.....	16	63	50401	3.34
20	.....TP.....	16	65	49545	7.42
21	.....TD.....	16	24	29778	8.9
22	.....S.E.....	13.66	51	46542	3.39
23	.....S.....E...	12.18	46	49808	3.32
24	.....S....D.....	9.12	29	32356	3.8
25	.....S.....D...	6.51	23	32773	3.4

Figure 3

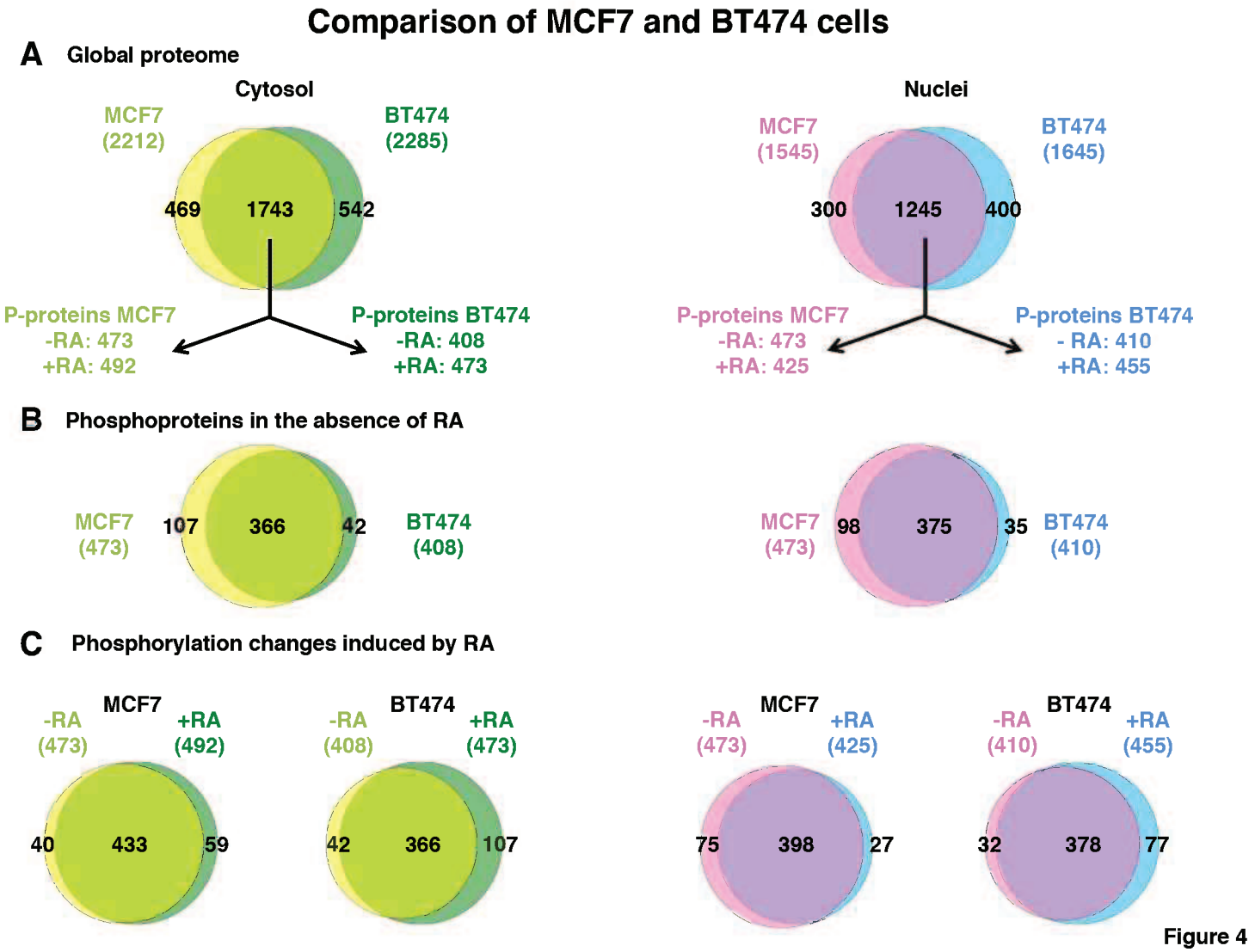

Comparison of MCF7 and BT474 cells
A Global proteome
Cytosol
MCF7 (2212)
BT474 (2285)
469
1743
542
P-proteins MCF7 -RA: 473 +RA: 492
P-proteins BT474 -RA: 408 +RA: 473
Nuclei
MCF7 (1545)
BT474 (1645)
300
1245
400
P-proteins MCF7 -RA: 473 +RA: 425
P-proteins BT474 - RA: 410 +RA: 455
B Phosphoproteins in the absence of RA
MCF7 (473)
107
366
42
BT474 (408)
MCF7 (473)
98
375
35
BT474 (410)
C Phosphorylation changes induced by RA
MCF7
-RA (473)
+RA (492)
40
433
59
BT474
-RA (408)
+RA (473)
42
366
107
MCF7
-RA (473)
+RA (425)
75
398
27
BT474
-RA (410)
+RA (455)
32
378
77

Figure 4

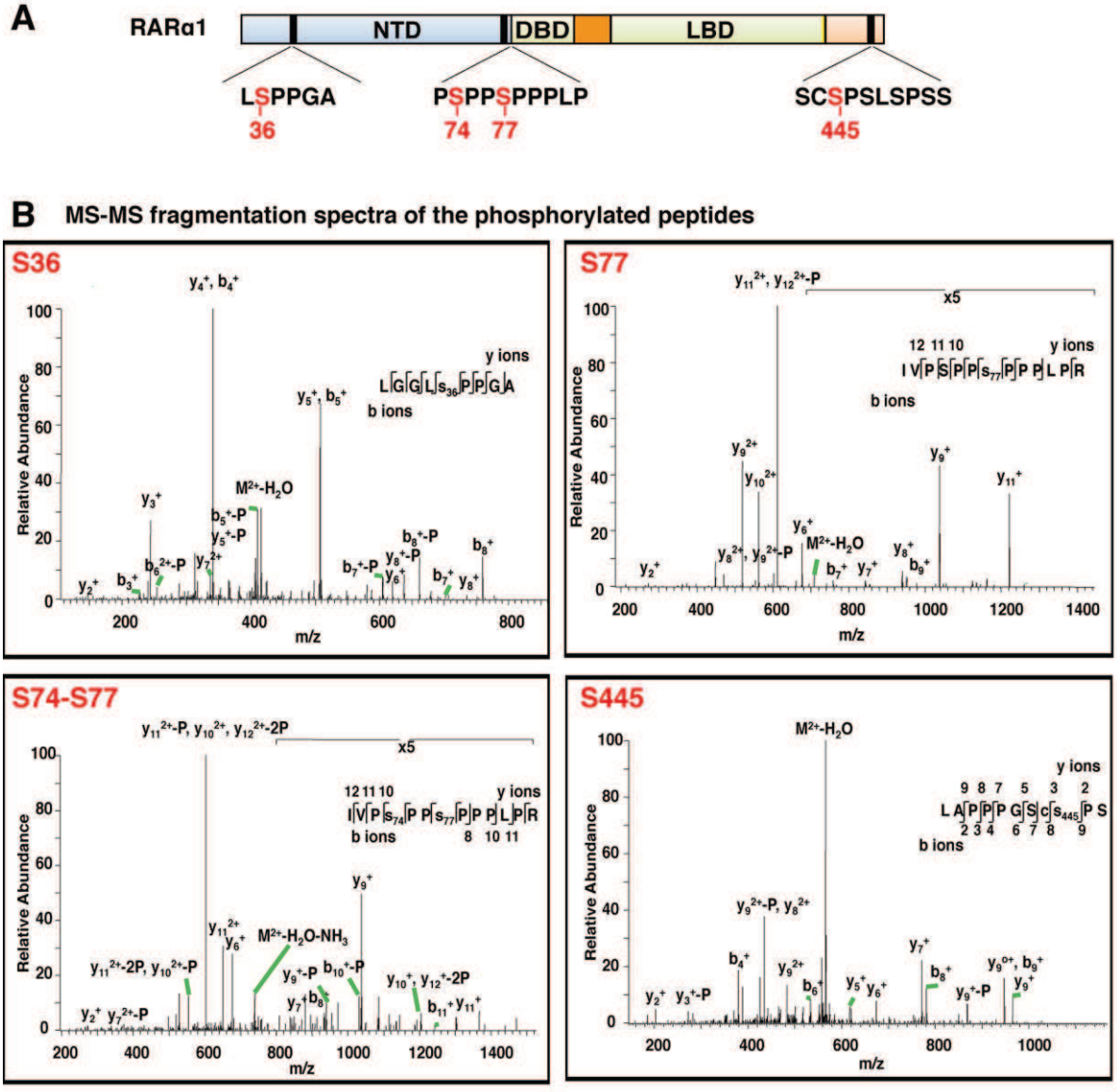

A
RARα1
NTD
DBD
LBD
LSPPGA
36
PSPPSPPPLP
74 77
SCSPSLSPSS
445
B MS-MS fragmentation spectra of the phosphorylated peptides
S36
S77
S74-S77
S445
Relative Abundance
m/z
y ions
b ions
C RARα phosphopeptides
MCF7 cells
BT474 cells
Relative abundance (arbitrary units)
C
RA
S36
S77
S74 + S77
S445
Phosphorylated peptides

Figure 3

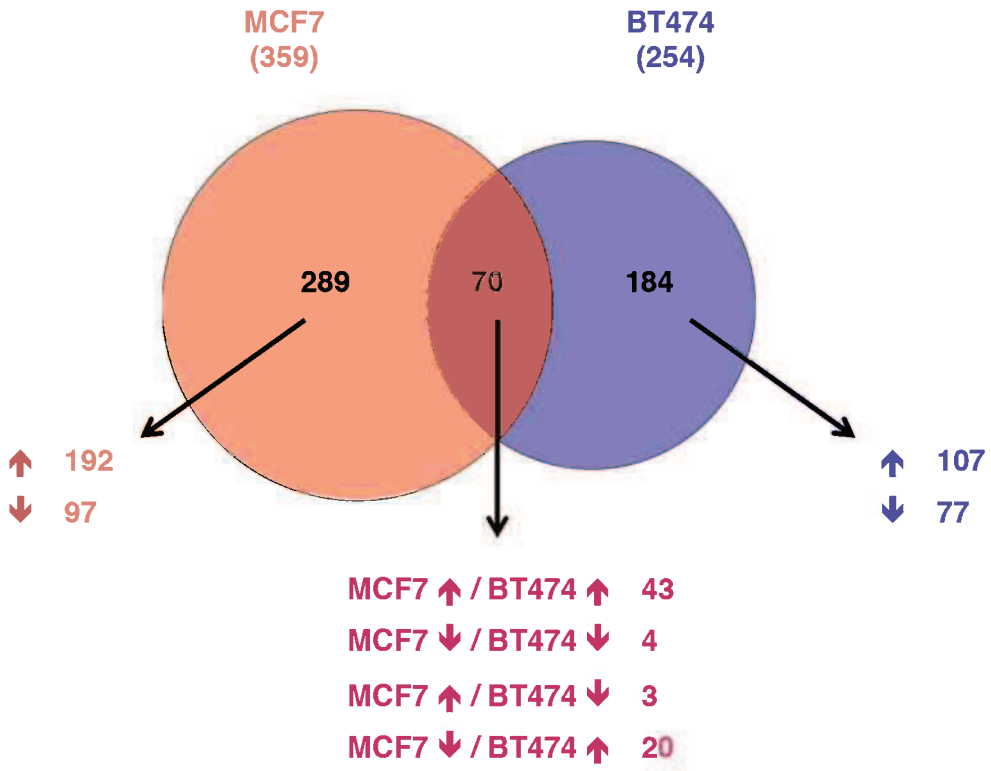

MCF7
(359)
BT474
(254)
289
70
184
192
97
107
77
MCF7 ↑ / BT474 ↑ 43
MCF7 ↓ / BT474 ↓ 4
MCF7 ↑ / BT474 ↓ 3
MCF7 ↓ / BT474 ↑ 20

Figure 6

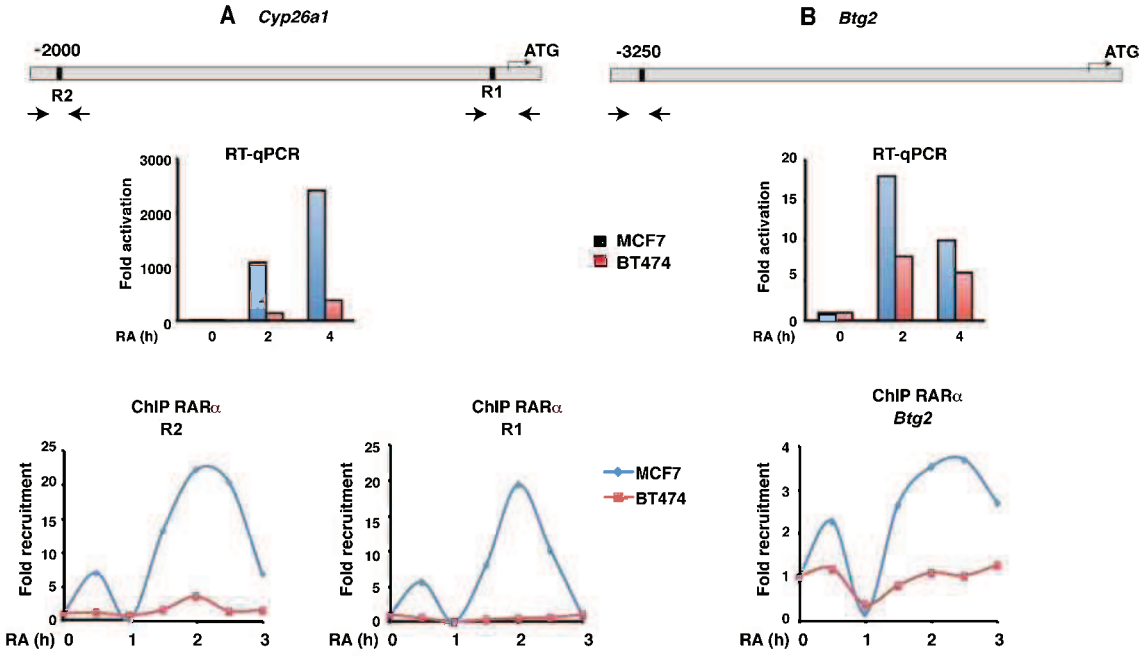

A Cyp26a1
-2000
ATG
R2
R1
RT-qPCR
Fold activation
3000
2000
1000
0
RA (h)
0
2
4
MCF7
BT474
B Btg2
-3250
ATG
RT-qPCR
Fold activation
20
15
10
5
0
RA (h)
0
2
4
ChIP RARα
R2
Fold recruitment
25
20
15
10
5
0
RA (h) 0 1 2 3
ChIP RARα
R1
Fold recruitment
25
20
15
10
5
0
RA (h) 0 1 2 3
MCF7
BT474
ChIP RARα
Btg2
Fold recruitment
4
3
2
1
0
RA (h) 0 1 2 3

Figure 7

PUBLICATION 3

MANUSCRIT EN PRÉPARATION

TRIM24: a novel function in the degradation of RARα by the ubiquitin-proteasome system

Marilyn Carrier[1], Regis Lutzing[1], Samia Gaouar[1], Mathilde Joint[2], Adeline Page[2] and Cécile Rochette-Egly[1,3]

IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), **INSERM**, U964; **CNRS**, UMR7104; **Université de Strasbourg**, 1 rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch Cedex, France.

[1] Department of Functional genomics and cancer

[2] Proteomics Platform, IGBMC, CNRS UMR 7104, Inserm U964, University of Strasbourg, Illkirch, France

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

Introduction

Nuclear receptors are ligand-dependent regulators of transcription, which regulate the expression of a battery of target genes via targeting response elements located in genes promoters and coordinating the formation of a large transcription initiation complex including coactivators, histone modifying enzymes, general transcription factors and RNA polymerase II. Today it is clear that NRs are subjected to a fine tuned code of post-translational modifications (PTMs) such as phosphorylations, acetylation, sumoylation and ubiquitination (Abdel-Hafiz and Horwitz, 2014; Al Tanoury et al., 2013; Coffey and Robson, 2012). NRs phosphorylation has been studied by several teams and its main function is to regulate positively or negatively the interactions of NRs with their coregulators (Lalevee et al., 2010), NRs binding to DNA (Al Tanoury et al., 2014a; Bruck et al., 2009) and NRs turnover (Bour et al., 2007; Dennis and O'Malley, 2005; Rochette-Egly, 2005).

Besides being targeted by protein kinases, NRs are also substrates for E3 ubiquitin ligases (Bour et al., 2007; Chymkowitch et al., 2011; Kopf et al., 2000), then enabling their degradation by the 26S proteasome. Ubiquitination involves the ubiquitin-activating enzyme E1, an ubiquitin-conjugating enzyme E2 and finally an ubiquitin ligase E3 that mediates the transfer of ubiquitin from E2 to the substrate (Hochstrasser, 2009; Weissman, 2001). Polyubiquitylated substrates are recognized by the 19S regulatory complex of the proteasome and then are concomitantly deubiquitinated, unfolded and translocated through a gated channel into the 20S complex (Sorokin et al., 2009). Substrate unfolding and gate opening are ATP-requiring processes catalyzed by the ATPases that form the base of the 19S regulatory complex. Deubiquitination is also catalyzed by the 19S, which possesses intrinsic deubiquitinating activity (Verma et al., 2002) and is associated to several deubiquitinating enzymes (DUBs) (Guterman and Glickman, 2004; Peth et al., 2009). The current idea is that proteasomal degradation of NRs would provide an efficient way to limit NRs functions and/or to facilitate multiple rounds of transcription initiation (Bour et al., 2007).

Among the large family of nuclear receptors, retinoic acid receptors (RARα, β and γ), are degraded by the ubiquitin proteasome system (UPS) after addition of the ligand, retinoic acid (RA) (Gianni et al., 2002; Kopf et al., 2000). However the underlying mechanism of RARs ubiquitylation/degradation is still unclear. In the present study we

showed that the tripartite motif protein TRIM24 is involved in the RA-induced degradation of the RARα subtype. TRIM 24 belongs to the large family of TRIM/RBCC proteins and possesses several domains, which dictate its functions as an histone code reader (PHD and bromodomain), coregulator of nuclear receptors (LXXLL motif), and cointeracting partner of a variety of proteins (coiled-coil domain) (Herquel et al., 2011). TRIM24 was originally identified as transcriptional intermediary factor 1α (TIF-1α), and as a ligand-dependent corepressor of RARα (vom Baur et al., 1996). However, TRIM24 is also characterized by the presence of a RING (Really Interesting New Gene) domain (Meroni and Diez-Roux, 2005) and recent studies highlighted that it functions as an E3 ubiquitin ligase for the subsequent degradation of substrates (Jain et al., 2014). In fact our results indicate that TRIM24 does not mediate the ubiquitylation of RARα, but is required for the recognition of ubiquitinated RARα by the proteasome via forming a complex with ubiquitin specific proteases (USPs).

Materials and Methods

Plasmids, Antibodies and Reagents

The pSG5-based expression vector for human RARα was previously described (Gaub et al., 1992). The pIRESpuro2-6xHis-Ub vector was a kind gift from Dr. Catherine Dargemont (Paris, France). Rabbit polyclonal antibodies RARα [RPα(F)] were purified on sulfolink gel columns (Pierce Chemical, Rockford, IL, USA) coupled to the corresponding immunizing peptide (Al Tanoury et al., 2014b; Buchanan et al., 2011). The mouse monoclonal antibodies against SUG1 (Gianni et al., 2002) and TRIM24 (Ab5T1E8) (Le Douarin et al., 1995) were previously described. Monoclonal antibodies Ab5T1E8 were purified from ascitic fluid on protein G sepharose. Polyclonal antibodies against RARα (ChIP grade) and the 20S Proteasome β5 subunit (PSMB5) (C-19) were from Santa Cruz Biotechnology. Rabbit antibodies against the 19S proteasome Rpn2/S1 (PSMD1) subunit were purchased from Abcam. Mouse monoclonal antibodies against ubiquitin were from Enzo Life Sciences. Those against GAPDH were from Millipore SAS. Alexa-Fluor™ 488- or 594- conjugated secondary antibodies were from Invitrogen. All-*trans*-retinoic acid (RA) was purchased from Sigma-Aldrich. MG132 and PYR-41 were from Calbiochem. Complete protease inhibitor cocktail (PIC) and PhosSTOP were from Roche Diagnostics.

Cell lines, extracts preparation and immunoblotting

MCF7, BT474, MDA-MB-361 and HeLa cells as well as mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were cultured according to standard procedures. MEFs TRIM24-/- were described in Khetchounian et al. (Khetchoumian et al., 2007). HeLa cells stably expressing 6xHis-tagged ubiquitin (HeLa His-Ub) were kindly given by C. Dargemont. HeLa cells were transfected using the X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's protocol. When 80-90 % confluent, cells were treated with *all-trans* RA or vehicle (0.1% ethanol), after 24h in low (1%) serum medium conditions, without insulin and phenol red.

Cells were harvested and whole cell extracts were prepared in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 % glycerol and 0.5 % Igepal CA-630). Nuclear extracts were prepared by lyzing first the cells in hypotonic buffer (10 mM HEPES-KOH pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1 mM EDTA and 0.5 % Igepal CA-630). Then after centrifugation,

the pellet was extracted in 20 mM HEPES-KOH pH 7.9 containing 1.5 mM $MgCl_2$, 420 mM NaCl, 1 mM EDTA and 25 % glycerol. All buffers were ice-cold and supplemented with 1 mM PMSF, 50 µM NaF, PIC and PhosSTOP. The extracts were proceeded for immunoblotting as previously described (Bour et al., 2005).

Immunoprecipitation

Immunoprecipitation was performed with mouse monoclonal antibodies immobilized on Dynabeads Protein G (Invitrogen). After washing, the immunoprecipitated proteins were eluted with SDS-sample loading buffer, boiled, subjected to SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting or by nanoLC-MS/MS, after excision of the bands.

NanoLC-MS/MS

The gels were stained using the SilverQuest™ staining kit (Life Technologies) and the protein bands of interest were excised, subjected to automatic in-gel reduction, alkylation and tryptic digestion (EVO100 Robot, Tecan, Männedorf, Switzerland). After washing in 50 mM NH_4HCO_3/acetonitrile (ACN)(50/50-v/v) and dehydratation with ACN, they were dried (Eppendorf SpeedVac 5301 Concentrator), reduced with 10 mM DTT in 100 mM NH_4HCO_3 (1 h at 57°C), alkylated with 55 mM iodoacetamide in 100 mM NH_4HCO_3 (45 min in the dark at room temperature), washed in 25 mM NH_4HCO_3, dehydrated with ACN and dried in a speed-vac. Then the gel pieces were rehydrated with trypsin (12.5 ng/µL in 50 mM NH_4HCO_3, overnight at 37°C) and the peptides were extracted twice with ACN/water/formic acid (FA) (45/45/10-v/v/v) followed by a final extraction with ACN/FA (95/05-v/v). Finally, the samples were dried in a speed-vac and resuspended in 0.1% FA (2 µL).

Samples were analyzed using an Ultimate 3000 nano-RSLC (Thermo Scientific, San Jose California) coupled in line with a LTQ-Orbitrap ELITE mass spectrometer via a nano-electrospray ionization source (Thermo Scientific, San Jose California). Peptide mixtures were loaded on a C18 Acclaim PepMap100 trap-column (75 µm x 2 cm, 3 µm, 100Å, Thermo Fisher Scientific) for 3.5 min at 5 µL/min with 2% ACN, 0.1% FA in H_2O and then separated on a C18 Accucore nano-column (75 µm x 15 cm, 2 µm, 100Å, Thermo Fisher Scientific) with a 210 min linear gradient from 2% to 60% buffer B (A: 0.1% FA in H_2O / B:

80% ACN, 0.08% FA in H_2O). The total duration was set to 240 min at a flow rate of 300 nL/min. The oven temperature was kept constant at 35°C. The mass spectrometer was operated in data-dependent mode with survey scans from m/z 300-1650 acquired in the Orbitrap at a resolution of 240,000 at m/z 400. The 20 most intense peaks from survey scans were selected for further fragmentation in the LTQ with an isolation window of 2.0 Da and were fragmented by CID with a normalized collision energy of 35%. Unassigned and single charged states were rejected. The Ion Target Value for the survey scans in the Orbitrap and the MS2 mode in the LTQ were set to 1E6 and 1E4 respectively and the maximum injection time was set to 100 ms for both scan modes. Dynamic exclusion was used. Exclusion duration was set to 30 s, repeat count was set to 1 and exclusion mass width was ± 10 ppm.

Proteome Discoverer 1.3 software (Thermo Fisher Scientific) with Sequest® search engine was used for spectra processing protein ID. The searches were conducted against the human Swissprot database (2012-07 release). Database searches were performed with the following fixed parameters: precursor mass tolerance of +/- 1 Da, product ion mass tolerance +/- 0.8 Da, and 2 missed cleavages, carbamidomethylation of cysteine as fixed modification and methionine oxidation as variable modification. Peptides were filtered with Xcorr versus charge state 1.5-1, 2.5-2, 3-3, 3.2-4 and proteins were filtered with 2 unique peptides.

Immunofluorescence

Cells were grown on Lab-Tek® glass chamber slides (Thermo Scientific), permeabilized and incubated with the different antibodies as previously described (Al Tanoury et al., 2014b).

Purification of ubiquitylated proteins

HeLa cells transformed with a plasmid encoding 6His-ubiquitin were lysed and proceeded for ubiquitylated protein purification based on the method described by Tatham *et al*. (Tatham et al., 2009). Briefly, cells were lysed in guanidinium lysis buffer (6 M guanidinium chloride, 100 mM NaPi pH 8, 10 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM β-mercaptoethanol and 20 mM imidazole). Purification was performed on Ni-NTA Agarose beads (Qiagen).

After washing with 8M urea in guanidinium lysis buffer containing 0.1% (v/v) Triton X-100, first at pH 8.0 and then at pH 6.3, ubiquitylated proteins were eluted with imidazole (200 mM Imidazole, 5 % SDS, 150 mM Tris-HCl pH 6.7, 30% (v/v) glycerol, 720 mM β-mercaptoethanol and bromophenol blue) and analyzed by immunoblotting. The transfer of heavily ubiquitylated proteins was improved by incubating the polyacrylamide gel in a reducing solution (2.3% SDS, 63 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% (v/v) β-mercaptoethanol) and by performing the transfer in the presence of 0.1 % SDS. Efficiency of the anti-ubiquitin antibody was enhanced by boiling the membrane in ultrapure water for 30 minutes prior blocking.

Ubiquitylated proteins were also analyzed by immunoblotting after enrichment with the UbiQapture®-Q kit (Enzo Life science) according to the manufacturer protocol

Proteasome isolation

Proteasome isolation was performed with the Proteasome Isolation Kit (Calbiochem) according to the manufacturer's instructions.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Cell were cross-linked with 1% formaldehyde at room temperature, scrapped, lyzed and sonicated at 4°C using a Bioruptor (Diagenode, Belgium). Samples were immunoprecipitated with antibodies at 4°C overnight and Dynabeads Protein A or Protein G were added and incubated at 4°C for 4h. After washing, the complexes were eluted and the cross-linking was heat-reversed. DNA fragments were purified using QIA quick PCR putification kit (QIAGEN) and analyzed by qPCR using sets of primers that are available upon request. Occupancy of the promoters was calculated by normalizing the PCR signals from the immunoprecipitated samples to the signals obtained from the input DNA.

Results

RARα is degraded by the ubiquitin proteasome system (UPS)

The nuclear retinoic acid receptor RARα was rapidly (within 2 to 3 hours) degraded in response to RA in several cell lines such a mouse embryonic fibroblasts (MEFs), human breast cancer cells (MCF7 cell line) and cervix cancer cells (HeLa cell line) (Figure 1A, lanes 8-14). MG132 prevented RARα degradation, confirming that proteasome mediates the degradation of the receptor (Figure 1B). Pretreatment of the cells with PYR-41, a small molecule chemical inhibitor of ubiquitin-activating enzymes E1 also abrogated the degradation of RARα observed after RA addition (Figure 1C), suggesting a role for ubiquitin-activating enzymes in this process.

Therefore we investigated whether RARα is ubiquitylated. RARα was overexpressed in HeLa cells transformed stably with a plasmid encoding 6His-ubiquitin. The cells were treated with RA in the absence or presence of MG132 for different times, followed by purification of ubiquitylated proteins with nickel NTA agarose and immunoblotting with RARα antibodies. The assay showed that RARα is polyubiquitinated and that polyubiquitylation increases in the presence of MG132 and RA (Figure 1D).

TRIM24 is involved in RARα degradation and is recruited with RARα to target genes promoters

Recently, TRIM24, a non-conventional coregulator that binds liganded RARs (vom Baur et al., 1996), was found to be an E3 ubiquitin ligase via its conserved RING domain (Jain et al., 2014). Therefore we investigated whether TRIM24 is involved in the RA-induced degradation of RARα. We compared the degradation of RARα in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) either WT or invalidated for TRIM24 (TRIM24-/- MEFs) (Khetchoumian et al., 2007). In WT MEFs, RARα was rapidly degraded in response to RA (Figure 2A, lanes 5, 6, 9, 10). In contrast, no degradation was observed in TRIM24-/- MEFs (Figure 2A-C).

These results prompted us to analyze the interaction of TRIM24 with RARα. First we found that both proteins colocalize in the nucleus of WT MEFs (Figure 2D). They also interacted with each other as assessed in coimmunoprecipitation experiments and this interaction increased within 1h following the addition of RA (Figure 2E).

Next we determined whether TRIM24 is recruited with RARα at the promoters of RA target genes. We thus studied the recruitment of both RARα and TRIM24 at the promoter of the canonical RA responsive gene *Cyp26a1* gene by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays followed by quantitative PCR. The *Cyp26a1* gene promoter contains two functional RA response elements (RAREs), a proximal one (R1) and a more distal one (R2), which work synergistically to provide a maximal response to RA (Bruck et al., 2009; Ferry et al., 2011; Loudig et al., 2005). After RA addition to WT MEFs, a rapid coordinated recruitment of RARα and TRIM24 was observed at both the R1 and R2 elements, which peaked at 2h and decreased by 3h (Figure 2F). A rapid coordinated recruitment of RARα and TRIM24 was also observed in MCF7 cells, at the R1 and R2 elements of the *Cyp26a1* gene (Figure 3 A2-3 and B2-3) and at the promoter of the *Btg2* gene (Figure 3A1 and B1), an other RA target genes that is induced by RA in breast cells (Donato et al., 2007; Ferry et al., 2011). The recruitment of TRIM24 was abolished upon siRNA-mediated knockdown of RARα (Figure 3 A1-3 and B1-3), indicating that it is mediated by RARα. No recruitment of TRIM24 was observed at the promoter regions of genes lacking RAREs exemplified by the *36B4* gene (data not shown).

ChIP assays next revealed that the presence of PSMD1, a regulatory subunit of the 19S proteasome, and the PSMB5 catalytic subunit of the 20S proteasome was concomitant to the presence of RARα and TRIM24 at the promoters (Figure 3 C1-3). The presence of these two proteasome subunits was abolished upon knockdown of RARα (Figure 3 C1-3), indicating that it is also mediated by RARα.

It is worth noting that in the context of human breast cancer cells that are resistant to RA exemplified by the BT474 cell line, RARα was not recruited at the promoters of the *Cyp26a1* and *Btg2* genes (Ferry et al., 2011) (Figure 3 D1-3). Consequently neither TRIM24 nor the proteasome subunits PSMB5 and PSMD1 were recruited. Remarkably, RARα was not degraded in this cell line (Figure 4). The same observation was made with another RA resistant breast cancer cell line, the MDA-MB-361 cell line (Figure 4).

Altogether these results suggest that there is a link between the degradation of RARα and its recruitment with TRIM24 and the proteasome machinery to target genes promoters.

TRIM24 regulates RARα degradation via a deubiquitylation activity.

Since TRIM24 is a multifunctional protein, which interacts with a variety of proteins and depicts an E3-ubiquitin ligase activity (Meroni and Diez-Roux, 2005; Tsai et al., 2010; vom Baur et al., 1996). Thus one can speculate that it might be an adapter linking RARα to the ubiquitination and/or proteasome machineries.

To determine whether both RARα and TRIM24 belong to a complex with the proteasome, pull down experiments of the proteasome were performed with WT MEFs treated with RA for different times. The presence of RARα and TRIM24 in the eluates was analyzed by immunoblotting using specific purified antibodies. Interestingly, RARα was detected but TRIM24 was not (Figure 5A, lanes 10-13). The same experiments performed with TRIM24-/- MEFs revealed that the interaction of RARα with the proteasome is not affected by the absence of TRIM24 (Figure 5A, lanes 15-18). It is worth noting that RARα was detected as two bands corresponding to the molecular weight of the ubiquitylated forms (see Figure 1D). Collectively, these results suggest that TRIM24 does not belong to a complex with the proteasome and is not involved in the recognition of RARα by the proteasome.

Next, we analyzed whether TRIM24 is involved in the ubiquitination of RARα, a process necessary for recognition by the proteasome. The ubiquitylated proteins were enriched from WT and TRIM24-/- MEFs treated with RA in the absence or presence of MG132 in an UbiCapture assay and the presence of RARα in the eluates was analyzed by immunoblotting. Unexpectedly, we observed a higher accumulation of ubiquitylated RARα in TRIM24-/- MEFs. Such results indicate that TRIM24 is not involved in the ubiquitylation of RARα. They rather suggest a role for TRIM24 in the efficiency of the degradation of ubiquitylated RARα by the proteasome.

Then to understand TRIM24 mechanism of action, TRIM24-interacting proteins were identified by immunoprecipitation, followed by SDS-PAGE. Several bands were excised and analyzed by mass spectrometry (Figure 5C). The 130kDa band contained TRIM24. Two upper bands contained UBP7 and UBP32 which are ubiquitin-specific proteases (Amerik and Hochstrasser, 2004).

Discussion

TRIM24 was initially identified as a ligand dependent corepressor of RARα (Le Douarin et al., 1996) and as an "attenuatuor" of an oncogenic function of RARα in hepatocytes (Khetchoumian et al., 2007). Here we describe a new role for TRIM24 in the RA-induced degradation of RARα.

Our current studies show that TRIM24 and the proteasome are recruited concomitantly with RARα to RA response elements located in the promoters of RARα target genes. The fact that RARα is not degraded when not recruited to promoters indicates that degradation concerns the receptors that have been engaged in a transcriptional process. This suggests that the degradation of the receptor is initiated at the promoters by TRIM24 and the proteasome associated to RARα at the promoter. Then the question is how TRIM24 participates to RARα degradation by the ubiquitin proteasome system.

TRIM24 contains a RING domain, two B-box domains and a coiledcoil domain, indicating E3 ubiquitin ligase potential as well as possible interactions with other proteins. Our first hypothesis was that TRIM24 could be an adapter linking RARα to the proteasome. However we were unable to detect TRIM24 in the RARα-proteasome complex. Our second hypothesis was that TRIM24 mediates the ubiquitination of RARα as reported for other substrates (Jain et al., 2014). Surprisingly, our results demonstrated that it is not the case. Indeed, in TRIM24-/- MEFs treated with RA and MG132, we observed an higher increase in the accumulation of ubiquitylated RARα than in WT MEFs. Such an observation is not compatible with an Ubiquitin ligase activity. Thus, the E3 ubiquitin ligase involved in RARα ubiquitylation still remains to be identified.

Most importantly, we found that TRIM24 is associated to deubiquitinating enzymes (USP7 and USP32), suggesting that a deubiquitylation step would be required for the degradation of RARα by the proteasome. It is worth noting that a recent study reported the association of USP7 with TRIM27, another protein of the TRIM family (Zaman et al., 2013). In this study, TRIM-bound USP7 deubiquitylated RIP1 but this function was not correlated to proteasomal degradation.

Then the question is whether USP7 (or USP32) modulate the ubiquitylation of RARα or controls the degradation of RARα independently of its deubiquitinating activity. It must be

mentioned that after recognition by the 19S regulatory complex of the proteasome, the ubiquitinated substrates need to be simultaneously deubiquitinated and unfolded to enter the gated channel of the 20S. Several studies demonstrated that deubiquitination is catalyzed by one subunit of the 19S regulatory complex of the proteasome (Verma et al., 2002), and by an associated DUB, Ubp6/USP14, which serve complementary roles (Guterman and Glickman, 2004). When bound to the ubiquitylated substrate Ubp6 has been shown to exert multiple and linked effects on proteasomal function. Indeed, in addition to removing the ubiquitin chain it also enhances gate opening (without deubiquitinating activity) in order to ensure efficient destruction of the substrate (Peth et al., 2009).

In the model above, USP14/Ubp6 bound to the ubiquitylated substrate is situated in the base of the 19S, in the vicinity of the gate-associated ATPases. In contrast, in the present case, the identified DUBs are distinct from USP14/Ubp6 and are associated to TRIM24. Given that TRIM24 binds a specific and structured domain of liganded RARα and is not associated to the proteasome, one can speculate that this event occurs before recognition and unfolding of ubiquitylated RARα by the proteasome. Then TRIM24 would transfer USP7 to ubiquitylated RARα and dissociate. USP7/32 bound to ubiquitylated RARα would stabilize the ubiquitylated form and enable its recognition by the proteasome, without deubiquitinating activity. Such a model is compatible with our observation that in the absence of TRIM24 (and/or USP7/32), ubiquitylated RARα accumulates and is not degraded. Then, when ubiquitylated RARα is bound to the proteasome, whether it is deubiquitinated by USP7/32 or by USP14/Ubp6 remains to be elucidated.

Acknowledgements

We are grateful to Catherine Dargemont for the gift of the HeLa cells expressing His-Ub
We thank Betty Heller and the IGBMC cell culture facility for help. This work was supported by funds from CNRS, INSERM, the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-05-BLAN-0390-02 and ANR-09-BLAN-0297-01), the Association pour la recherche sur le Cancer (SL220110603474 and PJA20141201746), the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, DEQ20090515423) and the Institut National du Cancer (INCa-PL09-194 and PL07-96099). It was also supported by the grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame programme Investissements d'Avenir labeled ANR-10-IDEX-0002-02. ARC supported the acquisition of the Orbitrap mass spectrometer. The Canceropole Grand Est supported MJ. The Ligue nationale contre le cancer supported MC.

References

Abdel-Hafiz, H.A., and Horwitz, K.B. (2014). Post-translational modifications of the progesterone receptors. J Steroid Biochem Mol Biol *140*, 80-89.

Al Tanoury, Z., Gaouar, S., Piskunov, A., Ye, T., Urban, S., Jost, B., Keime, C., Davidson, I., Dierich, A., and Rochette-Egly, C. (2014a). Phosphorylation of the retinoic acid receptor RARgamma2 is crucial for the neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. J Cell Sci *127*, 2095-2105.

Al Tanoury, Z., Piskunov, A., Andriamoratsiresy, D., Gaouar, S., Lutzing, R., Ye, T., Jost, B., Keime, C., and Rochette-Egly, C. (2014b). Genes involved in cell adhesion and signaling: a new repertoire of retinoic acid receptor target genes in mouse embryonic fibroblasts. J Cell Sci *127*, 521-533.

Al Tanoury, Z., Piskunov, A., and Rochette-Egly, C. (2013). Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. J Lipid Res *54*, 1761-1775.

Amerik, A.Y., and Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. Biochim Biophys Acta *1695*, 189-207.

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

Bour, G., Plassat, J.L., Bauer, A., Lalevee, S., and Rochette-Egly, C. (2005). Vinexin beta Interacts with the Non-phosphorylated AF-1 Domain of Retinoid Receptor gamma (RARg) and Represses RARg-mediated Transcription. J Biol Chem *280*, 17027-17037.

Bruck, N., Vitoux, D., Ferry, C., Duong, V., Bauer, A., de The, H., and Rochette-Egly, C. (2009). A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RARalpha to target promoters. EMBO J *28*, 34-47.

Buchanan, F.Q., Rochette-Egly, C., and Asson-Batres, M.A. (2011). Detection of variable levels of RARalpha and RARgamma proteins in pluripotent and differentiating mouse embryonal carcinoma and mouse embryonic stem cells. Cell Tissue Res *346*, 43-51.

Chymkowitch, P., Le May, N., Charneau, P., Compe, E., and Egly, J.M. (2011). The phosphorylation of the androgen receptor by TFIIH directs the ubiquitin/proteasome process. EMBO J *30*, 468-479.

Coffey, K., and Robson, C.N. (2012). Regulation of the androgen receptor by post-translational modifications. J Endocrinol *215*, 221-237.

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

Donato, L.J., Suh, J.H., and Noy, N. (2007). Suppression of mammary carcinoma cell growth by retinoic acid: the cell cycle control gene Btg2 is a direct target for retinoic acid receptor signaling. Cancer Res *67*, 609-615.

Ferry, C., Gaouar, S., Fischer, B., Boeglin, M., Paul, N., Samarut, E., Piskunov, A., Pankotai-Bodo, G., Brino, L., and Rochette-Egly, C. (2011). Cullin 3 mediates SRC-3 ubiquitination and degradation to control the retinoic acid response. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 20603-20608.

Gaub, M.P., Rochette-Egly, C., Lutz, Y., Ali, S., Matthes, H., Scheuer, I., and Chambon, P. (1992). Immunodetection of multiple species of retinoic acid receptor alpha: evidence for phosphorylation. Exp Cell Res *201*, 335-346.

Gianni, M., Bauer, A., Garattini, E., Chambon, P., and Rochette-Egly, C. (2002). Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-indced RARg degradation and transactivation. EMBO J *21*, 3760-3769.

Guterman, A., and Glickman, M.H. (2004). Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome. J Biol Chem *279*, 1729-1738.

Herquel, B., Ouararhni, K., and Davidson, I. (2011). The TIF1alpha-related TRIM cofactors couple chromatin modifications to transcriptional regulation, signaling and tumor suppression. Transcription *2*, 231-236.

Hochstrasser, M. (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins. Nature *458*, 422-429.

Jain, A.K., Allton, K., Duncan, A.D., and Barton, M.C. (2014). TRIM24 is a p53-induced E3-ubiquitin ligase that undergoes ATM-mediated phosphorylation and autodegradation during DNA damage. Mol Cell Biol *34*, 2695-2709.

Khetchoumian, K., Teletin, M., Tisserand, J., Mark, M., Herquel, B., Ignat, M., Zucman-Rossi, J., Cammas, F., Lerouge, T., Thibault, C.*, et al.* (2007). Loss of Trim24 (Tif1alpha) gene function confers oncogenic activity to retinoic acid receptor alpha. Nat Genet *39*, 1500-1506.

Kopf, E., Plassat, J.L., Vivat, V., de The, H., Chambon, P., and Rochette-Egly, C. (2000). Dimerization with retinoid X receptors and phosphorylation modulate the retinoic acid-induced degradation of retinoic acid receptors alpha and gamma through the ubiquitin-proteasome pathway. J Biol Chem *275*, 33280-33288.

Lalevee, S., Bour, G., Quinternet, M., Samarut, E., Kessler, P., Vitorino, M., Bruck, N., Delsuc, M.A., Vonesch, J.L., Kieffer, B.*, et al.* (2010). Vinexinss, an atypical "sensor" of retinoic acid receptor gamma signaling: union and sequestration, separation, and phosphorylation. FASEB J *24*, 4523-4534.

Le Douarin, B., Nielsen, A.L., Garnier, J.M., Ichinose, H., Jeanmougin, F., Losson, R., and Chambon, P. (1996). A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. EMBO J *15*, 6701-6715.

Le Douarin, B., Zechel, C., Garnier, J.M., Lutz, Y., Tora, L., Pierrat, P., Heery, D., Gronemeyer, H., Chambon, P., and Losson, R. (1995). The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. EMBO J *14*, 2020-2033.

Loudig, O., Maclean, G.A., Dore, N.L., Luu, L., and Petkovich, M. (2005). Transcriptional co-operativity between distant retinoic acid response elements in regulation of Cyp26A1 inducibility. Biochem J *392*, 241-248.

Meroni, G., and Diez-Roux, G. (2005). TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. Bioessays *27*, 1147-1157.

Peth, A., Besche, H.C., and Goldberg, A.L. (2009). Ubiquitinated proteins activate the proteasome by binding to Usp14/Ubp6, which causes 20S gate opening. Mol Cell *36*, 794-804.

Rochette-Egly, C. (2005). Dynamic combinatorial networks in nuclear receptor-mediated transcription. J Biol Chem *280*, 32565-32568.

Sorokin, A.V., Kim, E.R., and Ovchinnikov, L.P. (2009). Proteasome system of protein degradation and processing. Biochemistry (Mosc) *74*, 1411-1442.

Tatham, M.H., Rodriguez, M.S., Xirodimas, D.P., and Hay, R.T. (2009). Detection of protein SUMOylation in vivo. Nat Protoc *4*, 1363-1371.

Tsai, W.W., Wang, Z., Yiu, T.T., Akdemir, K.C., Xia, W., Winter, S., Tsai, C.Y., Shi, X., Schwarzer, D., Plunkett, W.*, et al.* (2010). TRIM24 links a non-canonical histone signature to breast cancer. Nature *468*, 927-932.

Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Koonin, E.V., and Deshaies, R.J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. Science *298*, 611-615.

vom Baur, E., Zechel, C., Heery, D., Heine, M.J., Garnier, J.M., Vivat, V., Le Douarin, B., Gronemeyer, H., Chambon, P., and Losson, R. (1996). Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. EMBO J *15*, 110-124.

Weissman, A.M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. Nat Rev Mol Cell Biol *2*, 169-178.

Zaman, M.M., Nomura, T., Takagi, T., Okamura, T., Jin, W., Shinagawa, T., Tanaka, Y., and Ishii, S. (2013). Ubiquitination-deubiquitination by the TRIM27-USP7 complex regulates tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. Mol Cell Biol *33*, 4971-4984.

Legends to Figures

Figure 1: RARα is degraded by the ubiquitin proteasome system after RA addition;
A. Kinetics of RARα degradation after RA addition to MCF7 cells, HeLa cells and MEFs by immunoblotting. **B**. The degradation of RARα is reversed upon treatment of the cells with MG132. C. Inhibition of the E1 activating enzyme with Pyr41 reverses the RA-induced degradation of RARα. **D**. RARα ubiquitylation is increased in response to RA. RARα was overexpressed in HeLa cells transformed with a plasmid encoding 6His-ubiquitin. Cells were RA-treated in the absence or presence of MG132 for 4 hours as indicated. Expression levels of RARα in whole cell lysates was verified by immunoblotting. (upper panel). Purified 6His-ubiquitin conjugates were examined by anti-RARα blotting. (Middle). Efficiency of 6His-ubiquitin purification was controlled using an anti-ubiquitin antibody.

Figure 2: RARα degradation involves the tripartite protein TRIM24
A. Kinetics experiments showing that RARα is degraded in WT MEFs but not in TRIM24-/- MEFs after RA addition. **B**. Immunoblots showing the absence of TRIM24 in the knockout cells. **C**. The presented results are the mean ±SD of two individual degradation experiments after quantification and normalization to GAPDH amounts. **D.** Immunofluorescence experiments showing that TRIM24 and RARα colocalize in the nuclei of MEFs. Cells were triple stained with DAPI (blue), RARα antibodies (green) and TRIM24 antibodies (red). The merge images overlapping the blue, red and green fluorescence are shown. **E.** Coimmunoprecipitation experiments showing that TRIM24 interacts with RARα. **F.** Kinetic ChIP expertiments performed with WT MEFs showing that RARα and TRIM24 are recruited concomitantly to the R1 and R2 elements of the *Cyp26a1* gene promoter. Values (% of the inputs) are the mean ±SD of triplicates performed on two separate chromatin preparations.

Figure 3: TRIM24 and the proteasome are recruited concomitantly with RARα to the Btg2 and Cyp26A1 gene promoters in response to RA.
Concomitant recruitment of RARα (**A1-A3**), TRIM24 (**B1-B3**), PSMD1 and PSMB5 (**C1-C3**) in MCF7cells. Knockdown of RARα inhibits these recruitments.
D. Control by immunoblotting of the the knockdown efficiency of RARα in MCF7 cells

E1-E3: In BT474 cells neither RARα, nor TRIM24 and the proteasome subunits are recruited to the promoters.

In all panels, data points show mean ±SD of tripicates from two to three individual experiments.

Figure 4: In RA resistant cells, RARα is not degraded in response to RA

A. Kinetics experiments showing that RARα is not degraded in BT474 and MDA-MB-361 cells treated with RA. **B**. immunoblots showing the expression of TRIM24 in the analyzed cell lines.

Figure 5: TRIM24 regulates RARα degradation via a deubiquitylation activity.

A. Proteasome pulldown assay performed with WT and TRIM24-/- MEFs. Immunoblotting of the eluates shows that RARα is associated to the proteasome, but bot TRIM24.

B. Analysis of RARα ubiquitylation in WT and TRIM24-/- MEFs as assessed by an UbiQapture assay. Immunoblotting of the eluates showing that knockout of TRIM24 increases the ubiquitylation of RARα

C. TRIM24 is associated with deubiquitinases. TRIM24 was purified from MCF7 cells by immunoprecipitation and analyzed by SDS-PAGE followed by silver staining. Mass spectrometry identified the three bands indicated by arrows as TRIM24, USP7 and USP32.

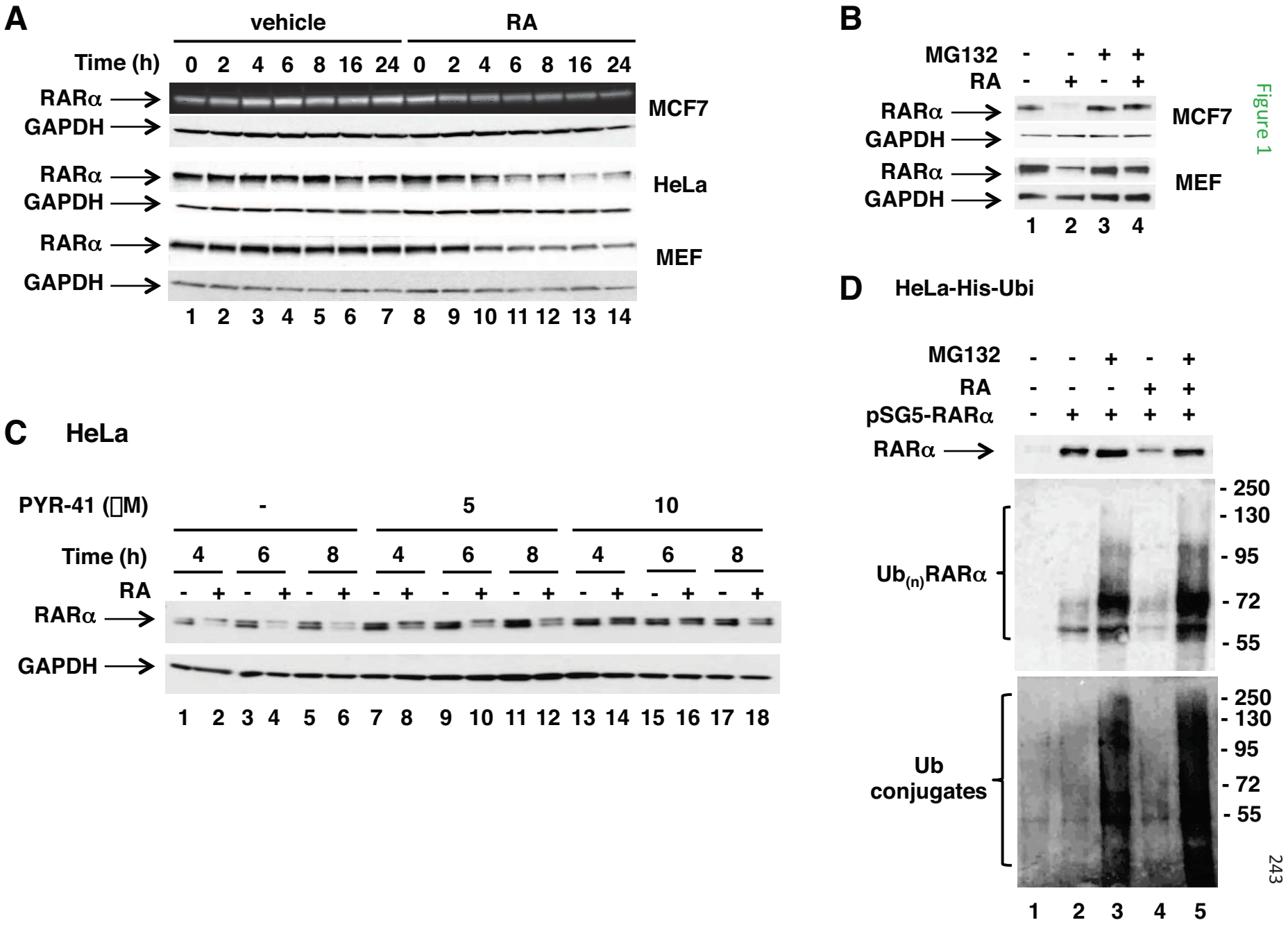
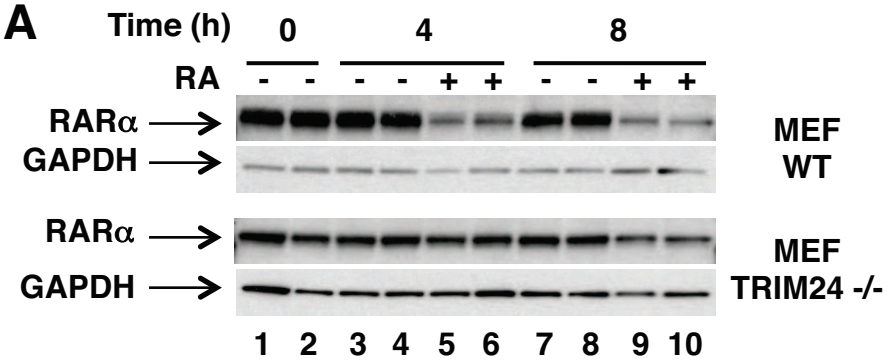
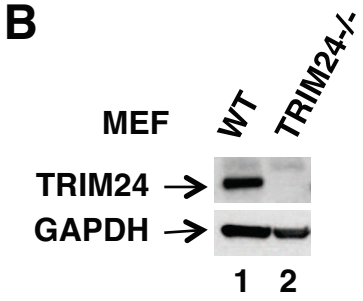
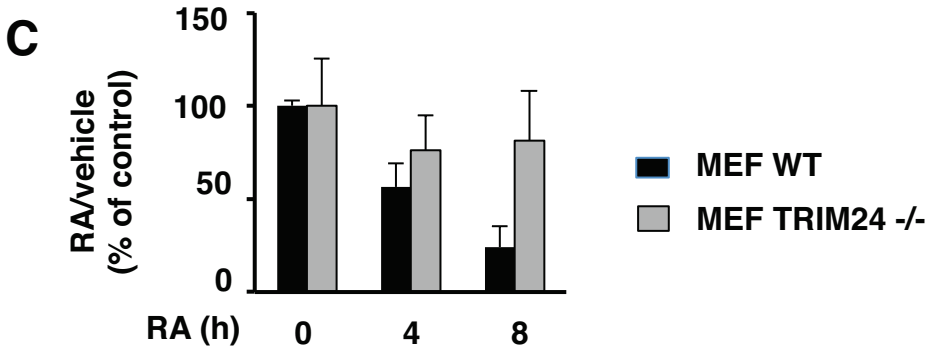

A
vehicle
RA
Time (h)
0 2 4 6 8 16 24 0 2 4 6 8 16 24
RARα
GAPDH
MCF7
HeLa
MEF
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
B
MG132 - - + +
RA - + - +
MCF7
MEF
1 2 3 4
C HeLa
PYR-41 (μM) - 5 10
Time (h) 4 6 8 4 6 8 4 6 8
RA
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
D HeLa-His-Ubi
MG132 - - + - +
RA - - - + +
pSG5-RARα - + + + +
Ub(n)RARα
Ub conjugates
250 130 95 72 55
1 2 3 4 5

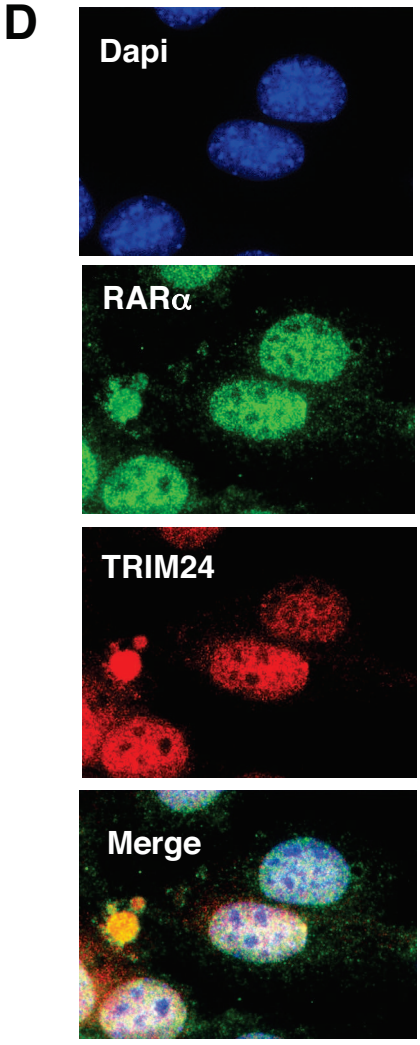
Figure 1

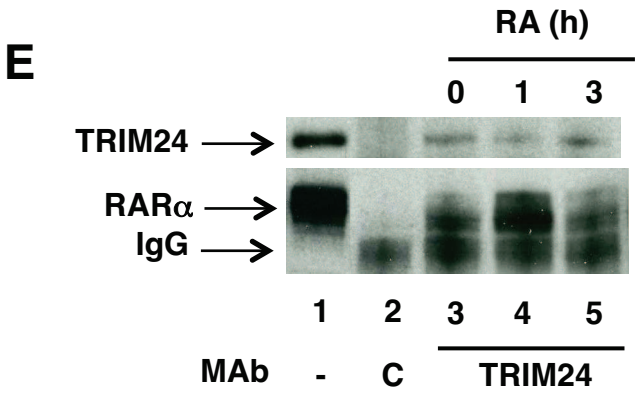
Figure 2

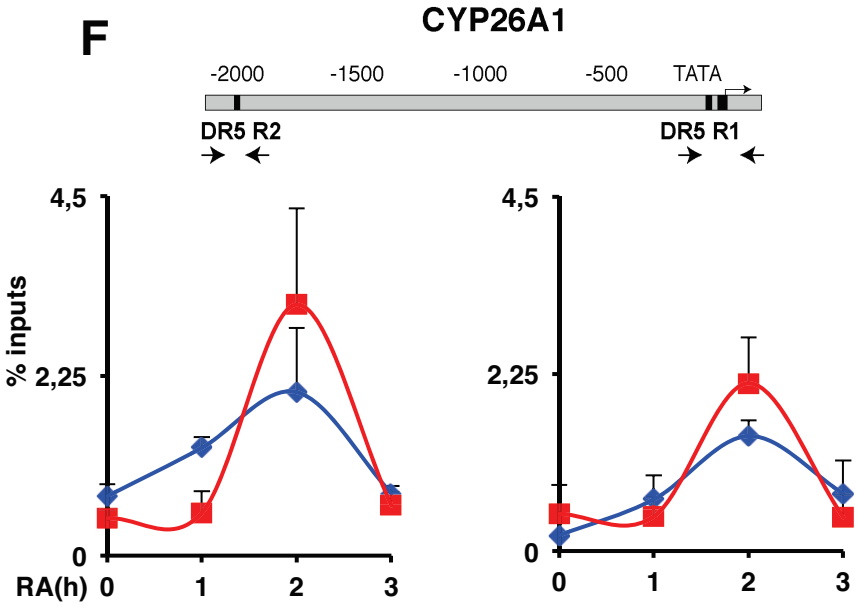

A
Time (h)
0
4
8
RA
- - - - + + - - + +
RARα
GAPDH
MEF WT
RARα
GAPDH
MEF TRIM24 -/-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

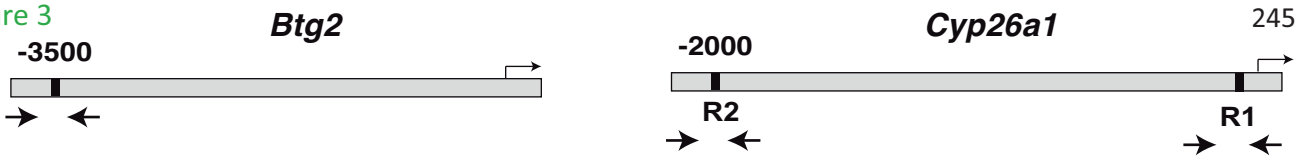

B
MEF
WT
TRIM24-/-
TRIM24
GAPDH
1 2


C
RA/vehicle (% of control)
150
100
50
0
RA (h)
0
4
8
MEF WT
MEF TRIM24 -/-

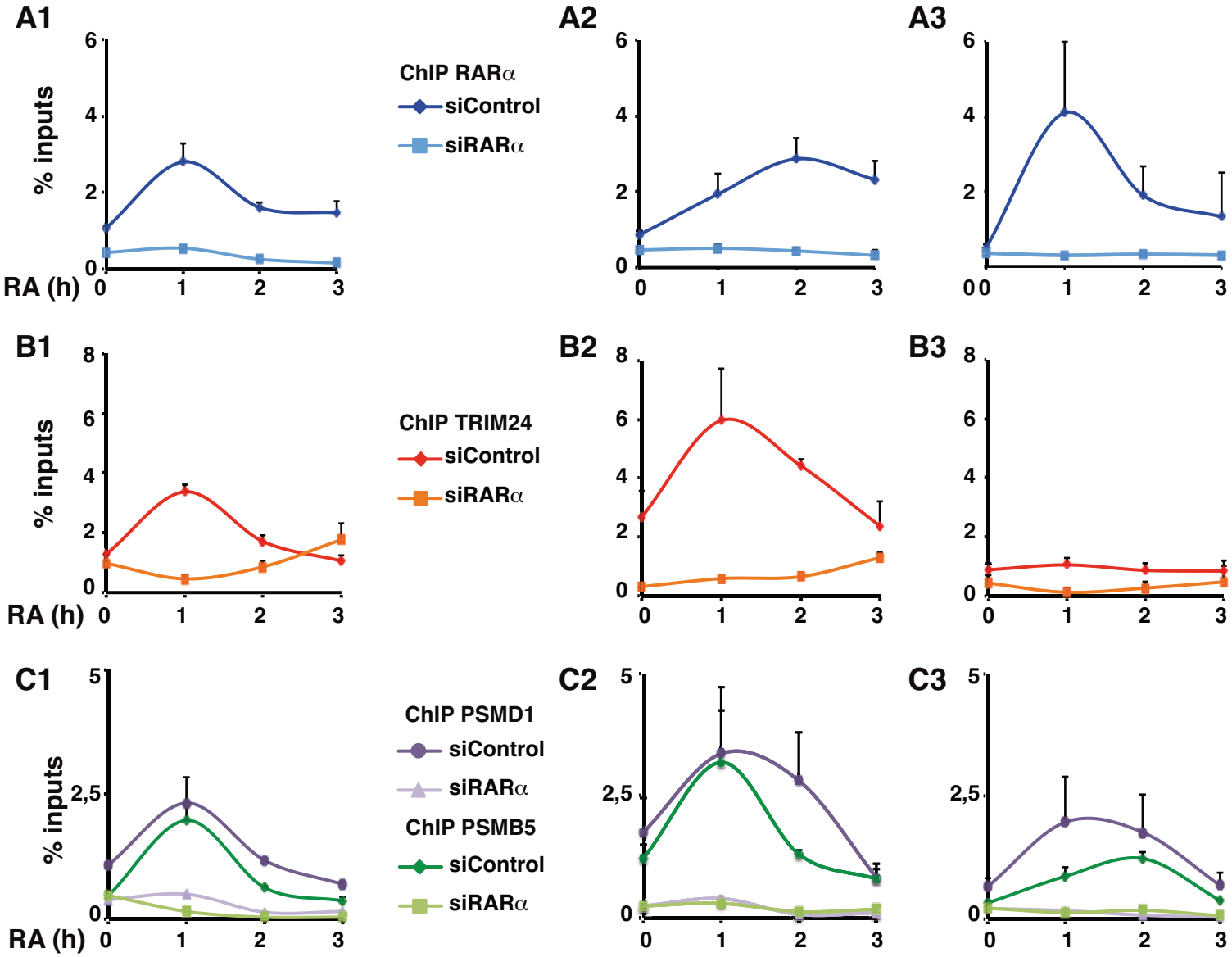

D
Dapi
RARα
TRIM24
Merge

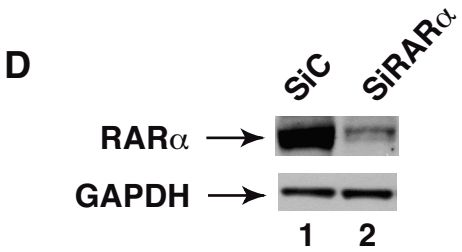

E
RA (h)
0 1 3
TRIM24
RARα
IgG
1 2 3 4 5
MAb - C TRIM24


F
CYP26A1
-2000 -1500 -1000 -500 TATA
DR5 R2
DR5 R1
4,5
2,25
0
% inputs
RA(h) 0 1 2 3
4,5
2,25
0
0 1 2 3



MCF7 cells





BT474 cells

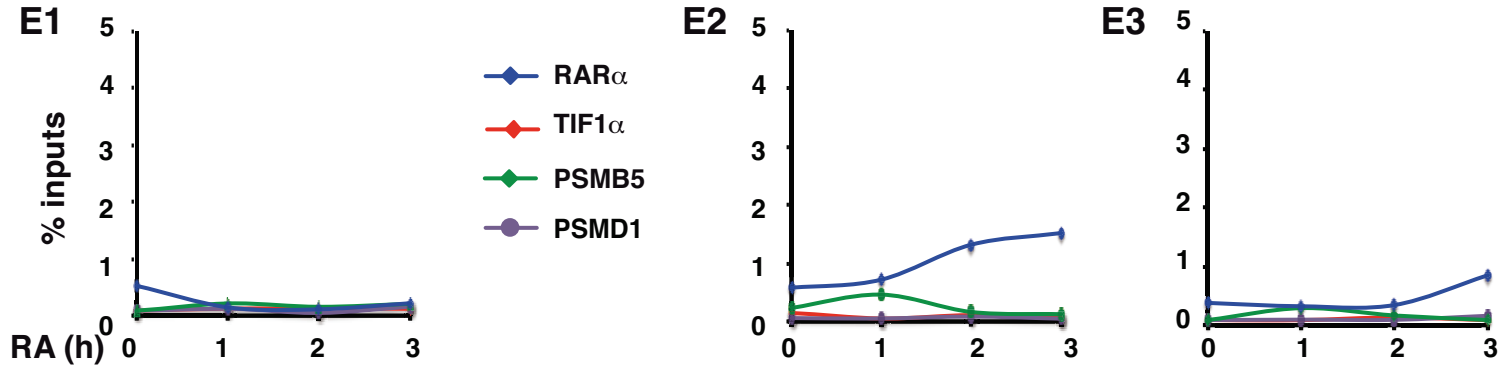
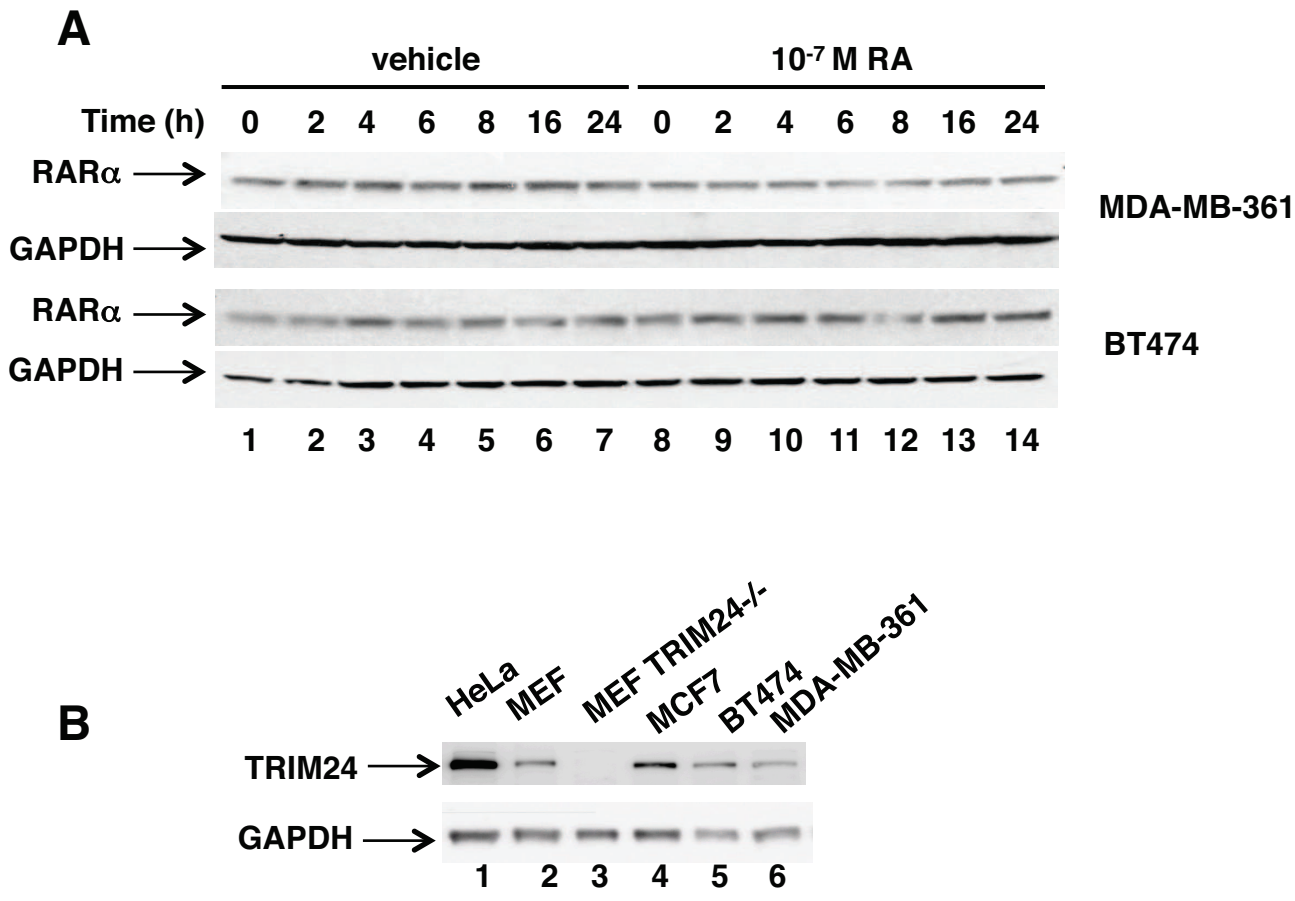
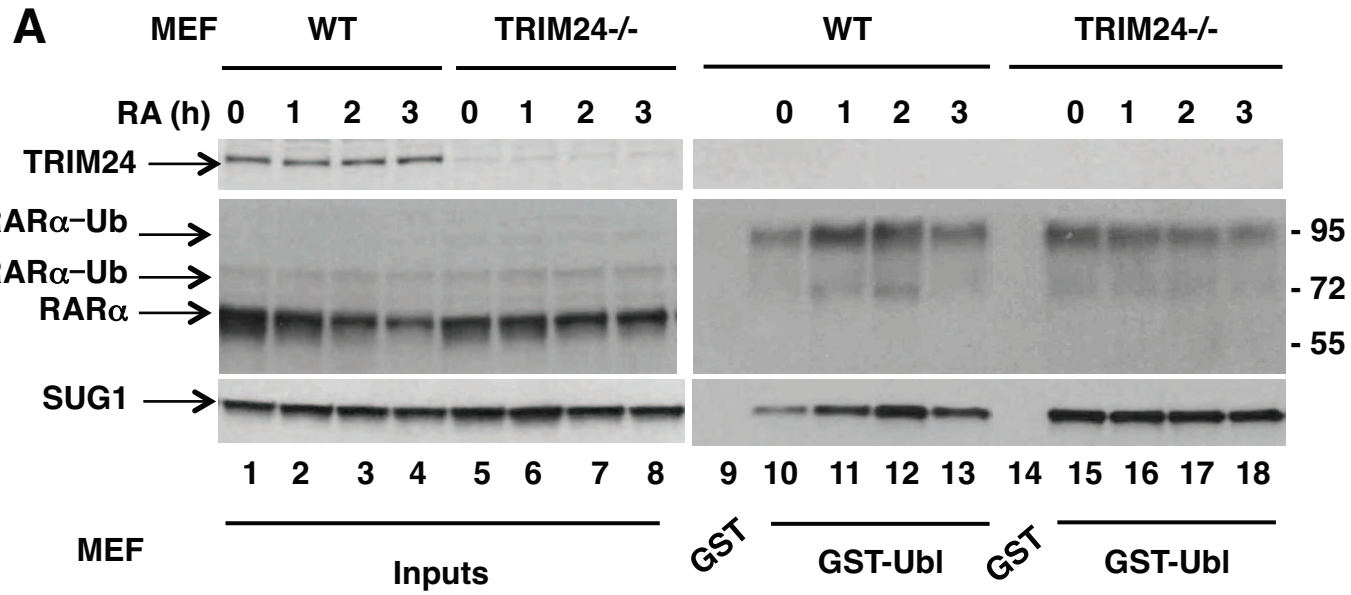
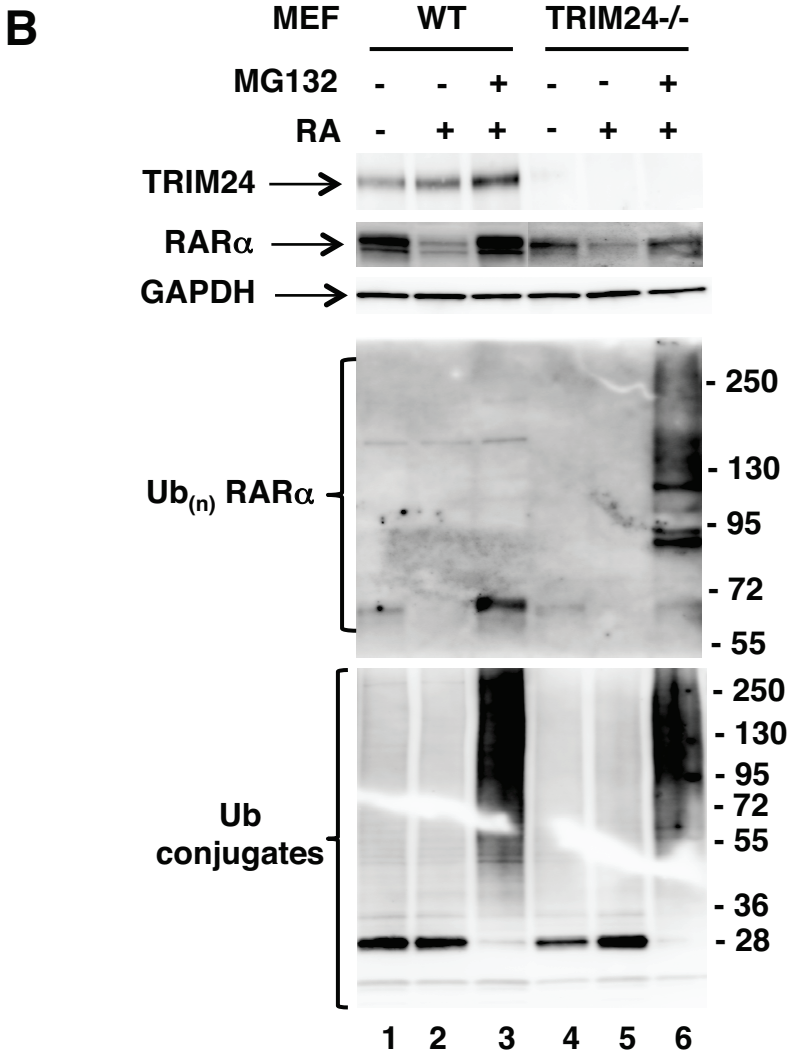
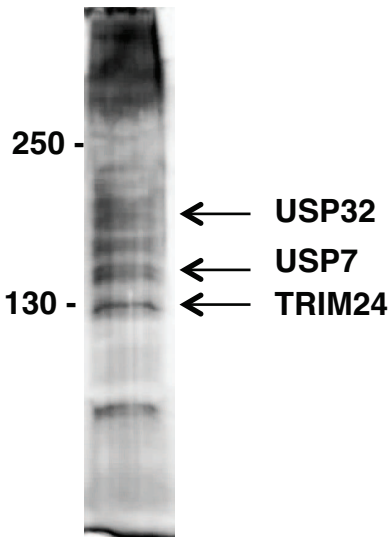


Figure 4


A
vehicle
10-7 M RA
Time (h)
0 2 4 6 8 16 24 0 2 4 6 8 16 24
RARα
GAPDH
MDA-MB-361
RARα
GAPDH
BT474
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
B
HeLa
MEF
MEF TRIM24-/-
MCF7
BT474
MDA-MB-361
TRIM24
GAPDH
1 2 3 4 5 6


A
MEF
WT
TRIM24-/-
WT
TRIM24-/-
RA (h) 0 1 2 3 0 1 2 3 0 1 2 3 0 1 2 3
TRIM24
RARα–Ub
RARα–Ub
RARα
SUG1
- 95
- 72
- 55
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
MEF
Inputs
GST
GST-Ubl
GST
GST-Ubl


B
MEF
WT
TRIM24-/-
MG132 - - + - - +
RA - + + - + +
TRIM24
RARα
GAPDH
Ub(n) RARα
- 250
- 130
- 95
- 72
- 55
Ub conjugates
- 250
- 130
- 95
- 72
- 55
- 36
- 28
1 2 3 4 5 6


C
250 -
130 -
USP32
USP7
TRIM24

ANNEXE 4

PUBLICATION SUPPLÉMENTAIRE

DNA-PK regulate retinoic acid receptor alpha-mediated gene expression via the repair of double-strands DNA breaks

Bodo-Pankotai G, Gaouar S, Carrier M, Andriamoratsiresy D, Lutzing R, Le May N, Egly JM and Rochette-Egly C¶

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

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

Abstract

The regulation of retinoic acid (RA) target genes expression is extremely complex and involves thousands of proteins that interact dynamically with the different domains of RA nuclear receptors (RARs). Here we report a novel molecular mechanism that underlies the transactivation of RARα target genes. We show that Topoisomerase II beta (TOPIIβ) est rapidly recruited to RA response elements concomitantly to RARα and creates transient DNA double strands breaks (DSBs) around these elements. The formation of such DSBs is a prerequisite for gene activation. We also demontrated that these DSBs are rapidly repaired by DNA-PK, which is recruited to the N-terminal proline-rich motif of RARa via its XRCC5 regulatory subunit. Together our studies reveal a linkage between the transcription and the DNA damage and repair machineries that is required for optimal expression of RA target genes.

Introduction

Retinoic acid (RA), the major active metabolite of vitamin A, plays a role in a multitude of biological processes, from embryonic development and organogenesis to homeostasis of the adult (Clagett-Dame and Knutson, 2011 ; Samarut and Rochette-Egly, 2012). RA exerts its effects through nuclear RA receptors, RARs (α, β and γ), which are ligand-regulated transcription factors. As most members of the nuclear receptors family, RARs depict a well-defined organisation and structure consisting of a variable N-terminal domain (NTD), and two well structured and conserved domains, a central DNA-binding domain (DBD) and a carboxy-terminal Ligand binding domain (LBD) (Bastien and Rochette-Egly, 2004 ; Rochette-Egly and Germain, 2009).

How do RARs regulate the transcription of their target genes ? According to the canonical model, after RA binding, RARs are rapidly recruited to specific DNA elements, named RAREs, located in the regulatory regions of their target genes. Then via the dynamic association and dissociation of coregulator complexes at the LBD, they pave the way for the recruitment of the transcriptional machinery (Al Tanoury et al., 2013; Rochette-Egly and Germain, 2009). The paradigm of the LBD coregulators are the p160 subfamily of steroid receptor coactivators (SRCs), which work in tandem with other coregulators by forming large multisubunit complexes also known as « complexome » (Dasgupta and O'Malley, 2014). However, this scenario became more complicated with the discovery that the NTD, though intrinsically disordered, can also bind coregulators and cooperates with the LBD for otimal gene expresion. The interesting feature of the NTD of RARs (but not of the other nuclear receptors) is the presence of a proline rich motif (PRM) which adopts a polyproline helix structure and which can bind proteins with SH3 or WW domains (Bour et al., 2005b; Gianni et al., 2009; Macias et al., 2002).

Here, we attempted to identify novel partners of the RARα PRM by tandem mass spectrometry and we investigated their implication in the transactivation of RARα-target genes. We found that the PRM of RARα can bind DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), which is a key player of repair processes following DNA Double Strand Breaks (DSBs). DNA-PK is recruited with RARα at the promoters of the target genes and repairs DNA DSBs that are created by TOP2β in response to RA. Finally, we highlighted a novel mechanism for the regulation of RARα target genes transcription, involving both DNA damage and repair.

Results

RARα interacts with the XRCC5 regulatory subunit of DNA-PK

The N-terminal domain (NTD) of RARα1 contains a proline rich motif (PRM) that represents a protein binding domain (Kay et al., 2000). In order to isolate and characterize the PRM-interacting proteins, we performed GST pulldown purification and mass spectrometry (MS) analysis. As a bait we used a GST chimera construct covering aminoacids 69 to 168, which encompass the PRM of RARα and the DNA binding domain (DBD) (GST-RARα69-168) (Figure 1A). The presence of the DBD is required to stabilize the conformation of the PRM (Martinez-Zapien et al., 2014) and thus favorizes the binding of the PRM partners. The PRM-interacting proteins were purified from nuclear extracts prepared from human MCF7 breast cancer cells, which are RA responsive. The eluates were analyzed by MS either directly (nanoLC-LTQ-Orbitrap MS) (supplemental Table 1) or after SDS-PAGE and excision of the bands (Figure 1B and supplemental Table 2). We reproducely detected two proteins of approximately 90 and 75 kDa, which perfectly matched with the X-ray repair cross-complementing protein 5 (XRCC5) also named Ku86 and the other X-ray repair cross-complementing protein 6 (XRCC6) also named Ku70. These proteins were also identified by MS in the eluates obtained from the BT474 breast cancer cell line, the HeLa cervix cancer cell line and the SH5H5Y neuroblastoma cell line (Supplemental Tables 1 and 2). XRCC5 and XRCC6 form the Ku heterodimer (Jette and Lees-Miller, 2014) and are the regulatory subunits of DNA-PK which is involved in the repair of DNA Double Strand Breaks (DSBs), via non-homologous end joining (NHEJ) (Davis and Chen, 2013; Gottlieb and Jackson, 1993 ; Smith and Jackson, 1999). XRCC5 and XRCC6 were further detected in the MCF7 cells eluates by immunoblotting (Figure 1C, lanes 3 and 7). Pretreatment of the extracts with DNAse I, demonstrated that XRCC5/6 specifically interact with the PRM and not indirectly through some DNA bound to the DBD of RARα (Figure 1C, lanes 3 and 4).

The interaction of XRCC5 and XRCC6 with RARα was also observed *in vivo* after immunoprecipitation of endogenous RARα. Indeed, nanoLC-LTQ-Orbitrap MS analysis of the eluates revealed the presence of XRCC5 and XRCC6. It also revealed the presence of DNA-PKcs, the catalytic subunit of DNA-PK. (Supplemental Table 3). Most interestingly, DNA Topoisomerase II beta (TOPIIβ), which is involved in the formation of DSBs, was also detected by MS. Finally, all three subunits of DNA-PK were detected in the eluates

by immunoblotting with specific antibodies (Figure 1D), indicating that they form a complex with RARα. Note that RA addition did not affect the interaction (Figure 1D, lanes 5-7).

Further *in vitro* experiments were performed with the recombinant XRCC5 and XRCC6 proteins fused to a FLAG tag. Remarkably, in GST-RARα pull down (Figure 1E, compare lanes 4 and 5) and RARα coimmunoprecipitation experiments (Figure 1F, lanes 7 and 8), we observed that only XRCC5 interacts with RARα, suggesting that this subunit anchors the ku heterodimer to RARα. Note that the C-terminal domain of XRCC5 depicts regions involved in protein-protein interactions (Zhang et al., 2004 ; Zhang et al., 2001), which are not shared by XRCC6 (Walker et al., 2001).

Finally, we corroborated that XRCC5 interacts with the PRM of RARα as it was abrogated by a synthetic peptide corresponding to the PRM (PI80) (Figure 1G). It is worth noting that all RAR subtypes depict a PRM in their NTD. However, the PRM of the RARγ subtype differs from that of RARα by the substitution of a leucine residue by a proline residue (Figure 1A), resulting in the formation of a polyproline II (PPII) helix (Wilhelm et al., 2014) and thus in the modification of the 3D structure of the PRM. We found that RARγ did not interact with XRCC5 as no signal was obtained when a GST-RARγ bait (covering aminoacids 71 to 170) was incubated with MCF7 cell extracts (Figure 1C, lane 8) or with the recombinant FLAG-XRCC5 or XRCC6 proteins (Figure 1E, lanes 7 and 8). Altogether these results indicate that XRCC5 anchors DNA-PK to the PRM of RARα.

DNA-PK is required for RA-target genes expression

Given that DNA-PK is well known to be involved in both DSBs repair and transcription (Maldonado et al., 1996; Mayeur et al., 2005; Wong et al., 2009), we investigated whether it is required for the activation of two canonical RA responsive genes, *Cyp26a1* and *Btg2*, which are involved in RA metabolism and cell proliferation respectively (Bruck et al., 2009; Donato et al., 2007). We found that knockdown of each of the three subunits of DNA-PK by small interfering RNA (siRNA) (Figure 2A) reduced the RA-induced expression of the *Btg2* and *Cyp26a1* genes (Figure 2B and 2C), underlining a role for DNA-PK in the expression of RA-target genes. Note that the siRNAs against the DNA-PK subunits were less efficient than the RARα siRNAs, most probably due to their less efficient ability to reduce the levels of the cognate protein (Figure 2A).

In the XRCC5 knock down cells, the expression of XRCC6 was also reduced and reciprocally (Figure 2A), in agreement with previous reports showing that each subunit of the heterodimer is required to stabilize the other (Mayeur et al., 2005).

DNA-PK is recruited to RA response elements (RAREs)

Next, we analyzed whether DNA-PK is recruited with RARα to the RA response elements (RAREs) located in the promoters of the *Btg2* and *Cyp26a1* genes (Bruck et al., 2009; Donato et al., 2007) (Figure 3) after RA addition. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments revealed that XRCC5 and DNA-PKcs are rapidly recruited to the *Btg2* RARE with a peak at 1h (Figure 3B1). This recruitment was coordinated with that of RARα (Figure 3A1). It was abolished upon siRNA-mediated knockdown of RARα (Figure 3B1), indicating that the recruitment of DNA-PK is mediated by RARα. A rapid coordinated recruitment of RARα and DNA-PK subunits was also observed at both the proximal R1 and the distal R2 RAREs of *Cyp26a1* (Loudig et al., 2005) (Figure A2, A3, B2 and B3), which are bridged by a loop (Bruck et al., 2009). No DNA-PK recruitment was observed at the promoter regions of genes lacking RAREs, such as the 36B4 gene (Supplemental Figure 1). In conclusion, all these data demonstrate that DNA-PK binds at RARα-regulated promoters and participates to the expression of RARα responsive genes.

DNA-PK repairs DNA DSBs induced by RA at RARα-regulated promoters.

Given that transient DNA breaks have been shown to be required for gene transcription (Ju et al., 2006; Le May et al., 2010; Puc et al., 2015; Wong et al., 2009), we hypothesized that DNA-PK is recruited at RAREs for the repair of DNA DSBs induced in response to RA.

Using a Bio-ChIP assay which measures the incorporation of biotinylated dUTP within broken DNA (Ju et al., 2006; Le May et al., 2012), we observed DNA breaks around the RARE of the *Btg2* promoter after RA addition (Figure 3C1). Breaks were also detected in the *Cyp26a1* promoter around the R2 element (Figure 3C2) but not at the R1 element (Figure 3C3). Most interestingly, these breaks peaked 1-2 hours after RA addition and disappeared at 3h indicating that they are rapidly repaired. Breaks were not observed upon knockdown of RARα (Figure 3C1, C2 and C3), indicating that they are induced subsequent to RARα recruitment at the promoters. Altogether, our results

strongly suggest that exposure to RA creates transient breaks around the RAREs of RARα responsive genes.

Next we investigated whether the promoter regions encompassing the RAREs might be sites for DNA repair by DNA-PK, by testing the phosphorylation of histone H2AX (γH2AX) a hallmark of DNA DSB sites (Ivashkevich et al., 2012; Pankotai and Soutoglou, 2013). ChIP experiments revealed the presence of γH2AX around the RARE of the *Btg2* gene promoter, concomitantly to the recruitment of DNA-PK (Figure 3D1). γH2AX disappeared at 3h concomitantly to the disappearance of the breaks, suggesting that they are repaired (Mariotti et al., 2013). No γH2AX was observed upon knockdown of DNA-PKcs indicating that it involves DNA-PK (Figure 3D1). In the case of the *Cyp26a1* gene promoter, γH2AX was observed only at the distal R2 element in line with the presence of breaks only at this element (Figures 3D2 and 3D3).

Finally the RA-induced formation of γH2AX foci was observed in immunofluorescence experiments. RA induced a transient increase in the mean number of γH2AX foci per cell with a maximum at 1-2 hours (Supplemental Figure 2).

DSBs are created by TOPIIβ recruited at RARα-regulated genes promoters

Then the question was how DSBs are formed in the RARα-target promoters. Most interestingly, TOPIIβ was found to coimmunoprecipitate with RARα (Supplemental Table 3) and is well known to associate with gene promoters and to generate transient DSBs (Ju et al., 2006; Wang, 2002; Wong et al., 2009). Treatment of MCF7 cells with the TOPIIβ inhibitor Merbarone (Ju et al., 2006), prevented the formation of DNA breaks around the RAREs of the *Btg2* and *Cyp26a1* promoters (Figure 3 C1-C3). Following Merbarone treatment, neither DNA-PK (Figure 3B1-B3) nor γH2AX (Figure 3D1-D3) were oberved at these elements. Finally, in Merbarone-treated cells, the *Btg2* and *Cyp26a1* genes were no more activated by RA (Figure 2D and 2E), indicating how crucial is TOPIIβ for the formation of DSBs and the transactivation of RA responsive genes.

Next, we found that TOPIIβ is recruited at the RARE of *Btg2* (Figure 3E1). TOPIIβ recruitment was abolished upon siRNA-mediated knockdown of RARα (Figure 3E1), indicating that it is also mediated by RARα. Surprinsingly, it was not recruited at the R2 element of Cyp26a1 where DSBs are created, but at the R1 element (Figure 3E2 and E3). Such results suggest that RARα recruited at the R1 element brings TOPIIβ, which induces the formation of transient DSBs at the other element R2. According to our

previous work, such a cooperativity between the two elements would result from the juxtaposition of R1 and R2 through the formation of a loop via RARα (Bruck et al., 2009). Altogether these results indicate that the creation of transient DSBs by TOPIIβ and their repair by DNA-PK are required for RA-induced expression of gene expression.

Discussion

Regulated gene expression has been a subject of intense investigations over the last decade. It involves cascades of events and thousands of proteins forming a transcription machinery. However the last years revealed that transcription is increasingly complex and requires other complexes such as the DNA damage/repair machinery.

Here, in an attempt to decipher further the mechanism of RARα transactivation, we found that RA induces transient DNA DSBs at RARα-target genes promoters. These DSBs are created by TOPIIβ, which is rapidly recruited with RARα to RARα binding elements. Moreover, the formation of such DSBs is crucial for the expression of the corresponding RARα-target genes. It is worth noting that DNA DSBs created by TOPIIβ were also found to be implicated in the transcription of other genes such as estrogen (Ju et al., 2006) and insulin target genes (Wong et al., 2009), suggesting that it would be a general mechanism to control transcription. It has been suggested that TOPIIβ-mediated DSBs formation would facilitate dynamic changes in chromatin organization in a localized fashion (Ju et al., 2006) in order to relax the negative supercoils and writhings that form during the process of RNA synthesis and that impede transcription (French et al., 2011; Ma and Wang, 2014; Pedersen et al., 2012). Remarkably, other types of DNA breaks involving nucleotide excision repair factors or TOP1 were also found to be required for optimal gene expression (Le May et al., 2012; Puc et al., 2015). Thus the present study corroborates the increasing evidence that the formation DNA breaks is essential for optimal expression of activated genes.

In fact, DSBs are the most toxic DNA lesions. They can lead to illegitimate recombination and generate genomic rearrangements, which are hallmarks of cancer (Haffner et al., 2010). Therefore, owing to the anti-growth and anti-cancer properties of RA signaling, the RA induced-DSBs need to be resolved shortly after induction, in order to maintain genomic integrity. Here we have shown that DNA-PK, with role in DNA DSBs repair, is also rapidly recruited to the promoters of the RARα-target genes. DNA-PK is recruited via the the XRCC5 subunit that interacts with the PRM of RARα. Thus, it is not a canonical RA-dependent mechanism through the LBD. Then, via non-homologous end joining (NHEJ), DNA-PK mediates an extensive set of histone modifications including the phosphorylation of H2AX at serine 139 (γH2AX) (Pankotai and Soutoglou, 2013) and

mediates the repair of DSBs. Finally, we highlighted that DNA-PK is involved in the regulation of RARα-target genes.

It is interesting to note that DNA-PK was also reported to interact with several other nuclear receptors such as ER (Medunjanin et al., 2010), FXR (Ohno et al., 2009), GR (Giffin et al., 1997), PR (Sartorius et al., 2000), AR (Mayeur et al., 2005), and LXR (Ohno et al., 2010), suggesting that DNA-PK might be a general coregulator of nuclear receptors. Moreover, the XRCC5 and XRCC6 proteins have emerged as a part of the transcriptional machinery (Bertinato et al., 2003; Giffin et al., 1996; Woodard et al., 1999) and have been found to be associated with the RNA pol II complex (Maldonado et al., 1996). All these studies, including ours, corroborate that DNA-PK is involved in transcription via its DNA DSBs repair activity.

In conclusion, the present study underlines the essential role of DNA DSBs created by TOPIIβ and their repair by DNA-PK for optimal expression of RA responsive genes. Further genome-wide investigations are needed to question the general role of TOPIIβ and DNA-PK. Nevertheless, we can propose a novel model of RA-mediated transcription with an interplay between the molecular machineries that are involved in the formation of DSBs, their repair and the transcriptional machinery (Figure 4). The other novelty is that this interplay is mediated by the NTD of RARα corroborating that this domain is essential for optimal transcription (Bour et al., 2007). In conclusion our work is in keeping with the growing evidence that the DNA damage/repair machineries do participate in transcriptional regulation.

Experimental Procedures

Reagents, plasmids and antibodies

The pSG5-based expression vectors for human RARα1 and RARγ1 have been previously described (Bour et al., 2005a; Bour et al., 2005b). The plasmids encoding the N-terminal regions of human RARα1 and RARγ1 fused to the glutathione S-transferase (GST) were constructed by inserting into the pGEX4T3 vector, aminoacids 69 to 168 of RARα or aminoacids 71-170 of RARγ obtained by amplification from the corresponding pSG5 construct. The pFLAG-CMV2-XRCC6 and pFLAG-CMV2-XRCC5 vectors were kindly provided by professor Masayoshi Imagawa (Ohno et al., 2009).

Rabbit polyclonal antibodies and mouse monoclonal antibodies raised against the F region of RARα, RPα(F) and Ab9α(F), respectively, were already described as well as the mouse monoclonal antibodies against the N-terminal region of RAR (Ab10α(A)) (Bruck et al., 2009). Rabbit polyclonal antibodies against the FLAG tag were from Sigma-Aldrich. Rabbit polyclonal antibodies against H2AX and γH2AX (ChIP grade) were from Millipore and Abcam, respectively. Mouse monoclonal antibodies against XRCC6 (MCA3127Z) were from AbD Serotec®. Rabbit polyclonal antibodies against XRCC5 (sc-9034) and DNA-PKcs (sc-9051) as well as the goat polyclonal antibodies against XRCC5 (sc-1485) used in the ChIP experiments were from Santa Cruz Biotechnology. Those against Topoisomerase IIβ were from Abcam.

ON-TARGETplus human XRCC5 (L-0104491-00), XRCC6 (L-005084-00), RARα (L-003437-00) and non targeting (D-001210-01-05) siRNA SMART pools were from Thermofisher Scientific. The ON-TARGETplus human DNA-PKcs (L-005030-00) siRNA SMART pool was grom Abgene LTD. All-trans Retinoic Acid and Merbarone were from Sigma-Aldrich. DNase I (RNase free), Protein A and protein G Dynabeads were from Thermo Fisher Scientific.

Cell lines, extracts preparation, immunoblotting and immunoflurescence

MCF7, BT474, HeLa, SH-SY-5Y and COS-1 cells were cultured according to standard procedures. COS-1 cells were transiently transfected using the X-treme GENE 9 (Roche Diagnostics) DNA transfection reagents according to the manufacturer's protocol. When 80–90% confluent, cells were treated with RA (10^{-7} M) after 12 h in a medium containing 1% delipidated fetal calf serum. Total and nuclear extracts were

prepared and immunoblotted as described (Lalevee et al., 2010).

GST pull down screening of the proteins interacting with the NTD of RARα

Equimolar amounts of GST and GST fusion proteins were expressed in Escherichia coli and purified on glutathione-Sepharose 4B beads (Amersham Biosciences) as described (Bour et al., 2005b). Then the beads were incubated (2 h at 4°C) with the different cell extracts (1mg) diluted in GST buffer (50 mMTris-HCl pH 8, 0.1mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40, 0.3 mM dithiothreitol, 5 mM MgCl2, 150 mM KCl, 5% glycerol) supplemented with a complete protease inhibitor cocktail and precleared on Gluthathione Sepharose beads. After several washings, the bound proteins were eluted in three sequential steps with the GST buffer containing reduced glutathione (20 µM). The eluate fractions were pooled and analyzed by nanoLC-MS/MS either directly or after SDS-PAGE and excision of the bands (see supplemental experimental procedures).

GST pull down assays

The immobilized GST and GST fusion proteins were incubated with the different cell extracts. After washing, the bound proteins were eluted with SDS sample loading buffer and analyzed by immunoblotting as already described (Bour et al., 2005b).

Immunoprecipitation experiments

FLAG-tagged XRCC5 and XRCC6 proteins were immunoprecipitated from transfected COS-1 cells total extracts by incubation with ANTI-FLAG M2 affinity gel (Sigma-Aldrich) for 2 h at 4 °C. After washing, specific elution was performed with a FLAG peptide (Sigma Aldrich). The elution fractions were pooled, concentrated by acetone precipitation, redissolved in 50 µl SDS sample loading buffer, boiled and analyzed by immunoblotting.

Endogenous RARα was immunoprecipited from MCF7 cell extracts with a mixture (1 :1) of the Ab9α(F) and Ab10α(A) antibodies immobilized on Dynabeads Protein G (Life Technologies). After washing, the immunoprecipitated proteins were eluted with SDS-sample loading buffer, boiled and both by immunoblotting and by nanoLC-MS/MS with an LTC-orbitrap ELITE mass spertrometer as above.

RNA isolation and quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated using the Sigma RNA extraction kit and subjected for qRT-PCR (QuantiTect SYBR Green RTPCR, Qiagen). The expression of target genes were normalized with the house-keeping gene, cyclophilin B. The primers sequence are available upon request.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Cell were cross-linked with 1% formaldehyde at room temperature, scrapped, lyzed and sonicated at 4°C using a Bioruptor (Diagenode, Belgium). Samples were immunoprecipitated with antibodies at 4°C overnight and Dynabeads Protein A or Protein G were added and incubated at 4°C for 4h. After washing, the complexes were eluted and the cross-linking was heat-reversed. DNA fragments were purified using QIA quick PCR putification kit (QIAGEN) and analyzed by qPCR using sets of primers that are available upon request. Occupancy of the promoters was calculated by normalizing the PCR signals from the immunoprecipitated samples to the signals obtained from the input DNA.

Transient DNA breaks at promoter regions were also detected in a ChIP assay after labelling with biotin. Briefly, the fixed cells were permeabilized with cytonin™ (Trevigen®), centrifuged and resuspended in TdT (terminal deoxynucleotide transferase) buffer. DNA breaks were labelled by incubation in the same buffer containing the rTdT enzyme (30U/µl), Biotin-16-dUTP and dATP. After stopping the reaction, the samples were lyzed, sonicated and immunoprecipitation was performed with anti-biotin antibodies (Santa Cruz biotechnologies).

Aknowledgements

We are grateful to Betty Heller and the IGBMC cell culture facility for help. We also thank mathilde Joint and Adeline page from the Proteomics platform This work was supported by funds from CNRS, INSERM, the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-05-BLAN-0390-02 and ANR-09-BLAN-0297-01), the Association pour la recherche sur le Cancer (ARC-07-1-3169 and SL220110603474), the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, DEQ20090515423) and the Institut National du Cancer (INCa-PL09-194 and PL07-96099). It was also supported by the grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame programme Investissements d'Avenir labelled ANR-10-IDEX-0002-02. The ARC supported GBP. The Ligue nationale contre le cancer supported MC.

.

.

References

Al Tanoury, Z., Gaouar, S., Piskunov, A., Ye, T., Urban, S., Jost, B., Keime, C., Davidson, I., Dierich, A., and Rochette-Egly, C. (2014). Phosphorylation of the retinoic acid receptor RARgamma2 is crucial for the neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. J Cell Sci *127*, 2095-2105.

Al Tanoury, Z., Piskunov, A., and Rochette-Egly, C. (2013). Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects: Thematic Review Series: Fat-Soluble Vitamins: Vitamin A. J Lipid Res *54*, 1761-1775.

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

Bertinato, J., Tomlinson, J.J., Schild-Poulter, C., and Hache, R.J. (2003). Evidence implicating Ku antigen as a structural factor in RNA polymerase II-mediated transcription. Gene *302*, 53-64.

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

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

Bour, G., Plassat, J.L., Bauer, A., Lalevee, S., and Rochette-Egly, C. (2005b). Vinexin beta Interacts with the Non-phosphorylated AF-1 Domain of Retinoid Receptor gamma (RARg) and Represses RARg-mediated Transcription. J Biol Chem *280*, 17027-17037.

Bruck, N., Vitoux, D., Ferry, C., Duong, V., Bauer, A., de The, H., and Rochette-Egly, C. (2009). A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RARalpha to target promoters. EMBO J *28*, 34-47.

Clagett-Dame, M., and Knutson, D. (2011). Vitamin A in reproduction and development. Nutrients *3*, 385-428.

Dasgupta, S., and O'Malley, B.W. (2014). Transcriptional coregulators: emerging roles of SRC family of coactivators in disease pathology. J Mol Endocrinol *53*, R47-59.

Davis, A.J., and Chen, D.J. (2013). DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. Transl Cancer Res *2*, 130-143.

Donato, L.J., Suh, J.H., and Noy, N. (2007). Suppression of mammary carcinoma cell growth by retinoic acid: the cell cycle control gene Btg2 is a direct target for retinoic acid receptor signaling. Cancer Res *67*, 609-615.

French, S.L., Sikes, M.L., Hontz, R.D., Osheim, Y.N., Lambert, T.E., El Hage, A., Smith, M.M., Tollervey, D., Smith, J.S., and Beyer, A.L. (2011). Distinguishing the roles of Topoisomerases I and II in relief of transcription-induced torsional stress in yeast rRNA genes. Mol Cell Biol *31*, 482-494.

Gianni, M., Boldetti, A., Guarnaccia, V., Rambaldi, A., Parrella, E., Raska, I., Jr., Rochette-Egly, C., Del Sal, G., Rustighi, A., Terao, M., *et al.* (2009). Inhibition of the peptidyl-prolyl-isomerase Pin1 enhances the responses of acute myeloid leukemia cells to retinoic acid via stabilization of RARalpha and PML-RARalpha. Cancer Res *69*, 1016-1026.

Giffin, W., Kwast-Welfeld, J., Rodda, D.J., Prefontaine, G.G., Traykova-Andonova, M., Zhang, Y., Weigel, N.L., Lefebvre, Y.A., and Hache, R.J. (1997). Sequence-specific DNA binding and transcription factor phosphorylation by Ku Autoantigen/DNA-dependent protein kinase. Phosphorylation of Ser-527 of the rat glucocorticoid receptor. J Biol Chem *272*, 5647-5658.

Giffin, W., Torrance, H., Rodda, D.J., Prefontaine, G.G., Pope, L., and Hache, R.J. (1996). Sequence-specific DNA binding by Ku autoantigen and its effects on transcription. Nature *380*, 265-268.

Gottlieb, T.M., and Jackson, S.P. (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. Cell *72*, 131-142.

Haffner, M.C., Aryee, M.J., Toubaji, A., Esopi, D.M., Albadine, R., Gurel, B., Isaacs, W.B., Bova, G.S., Liu, W., Xu, J., *et al.* (2010). Androgen-induced TOP2B-mediated double-strand breaks and prostate cancer gene rearrangements. Nat Genet *42*, 668-675.

Ivashkevich, A., Redon, C.E., Nakamura, A.J., Martin, R.F., and Martin, O.A. (2012). Use of the gamma-H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. Cancer Lett *327*, 123-133.

Jette, N., and Lees-Miller, S.P. (2014). The DNA-dependent protein kinase: A multifunctional protein kinase with roles in DNA double strand break repair and mitosis. Prog Biophys Mol Biol.

Ju, B.G., Lunyak, V.V., Perissi, V., Garcia-Bassets, I., Rose, D.W., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2006). A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. Science *312*, 1798-1802.

Kay, B.K., Williamson, M.P., and Sudol, M. (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. FASEB J *14*, 231-241.

Lalevee, S., Bour, G., Quinternet, M., Samarut, E., Kessler, P., Vitorino, M., Bruck, N., Delsuc, M.A., Vonesch, J.L., Kieffer, B., *et al.* (2010). Vinexinss, an atypical "sensor" of retinoic acid receptor gamma signaling: union and sequestration, separation, and phosphorylation. FASEB J *24*, 4523-4534.

Le May, N., Fradin, D., Iltis, I., Bougneres, P., and Egly, J.M. (2012). XPG and XPF endonucleases trigger chromatin looping and DNA demethylation for accurate expression of activated genes. Mol Cell *47*, 622-632.

Le May, N., Mota-Fernandes, D., Velez-Cruz, R., Iltis, I., Biard, D., and Egly, J.M. (2010). NER factors are recruited to active promoters and facilitate chromatin modification for transcription in the absence of exogenous genotoxic attack. Mol Cell *38*, 54-66.

Loudig, O., Maclean, G.A., Dore, N.L., Luu, L., and Petkovich, M. (2005). Transcriptional co-operativity between distant retinoic acid response elements in regulation of Cyp26A1 inducibility. Biochem J *392*, 241-248.

Ma, J., and Wang, M. (2014). Interplay between DNA supercoiling and transcription elongation. Transcription *5*, e28636.

Macias, M.J., Wiesner, S., and Sudol, M. (2002). WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. FEBS Lett *513*, 30-37.

Maldonado, E., Shiekhattar, R., Sheldon, M., Cho, H., Drapkin, R., Rickert, P., Lees, E., Anderson, C.W., Linn, S., and Reinberg, D. (1996). A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins. Nature *381*, 86-89.

Mariotti, L.G., Pirovano, G., Savage, K.I., Ghita, M., Ottolenghi, A., Prise, K.M., and Schettino, G. (2013). Use of the gamma-H2AX assay to investigate DNA repair dynamics following multiple radiation exposures. PLoS One *8*, e79541.

Martinez-Zapien, D., Delsuc, M.A., Trave, G., Lutzing, R., Rochette-Egly, C., and Kieffer, B. (2014). Production and characterization of a retinoic acid receptor RARgamma construction encompassing the DNA binding domain and the disordered N-terminal proline rich domain. Protein Expr Purif *95*, 113-120.

Mayeur, G.L., Kung, W.J., Martinez, A., Izumiya, C., Chen, D.J., and Kung, H.J. (2005). Ku is a novel transcriptional recycling coactivator of the androgen receptor in prostate cancer cells. J Biol Chem *280*, 10827-10833.

Medunjanin, S., Weinert, S., Schmeisser, A., Mayer, D., and Braun-Dullaeus, R.C. (2010). Interaction of the double-strand break repair kinase DNA-PK and estrogen receptor-alpha. Mol Biol Cell *21*, 1620-1628.

Ohno, M., Komakine, J., Suzuki, E., Nishizuka, M., Osada, S., and Imagawa, M. (2010). Repression of the promoter activity mediated by liver receptor homolog-1 through interaction with ku proteins. Biol Pharm Bull *33*, 784-791.

Ohno, M., Kunimoto, M., Nishizuka, M., Osada, S., and Imagawa, M. (2009). Ku proteins function as corepressors to regulate farnesoid X receptor-mediated gene expression. Biochem Biophys Res Commun *390*, 738-742.

Pankotai, T., and Soutoglou, E. (2013). Double strand breaks: hurdles for RNA polymerase II transcription? Transcription *4*, 34-38.

Pedersen, J.M., Fredsoe, J., Roedgaard, M., Andreasen, L., Mundbjerg, K., Kruhoffer, M., Brinch, M., Schierup, M.H., Bjergbaek, L., and Andersen, A.H. (2012). DNA Topoisomerases maintain promoters in a state competent for transcriptional activation in Saccharomyces cerevisiae. PLoS Genet *8*, e1003128.

Puc, J., Kozbial, P., Li, W., Tan, Y., Liu, Z., Suter, T., Ohgi, K.A., Zhang, J., Aggarwal, A.K., and Rosenfeld, M.G. (2015). Ligand-dependent enhancer activation regulated by topoisomerase-I activity. Cell *160*, 367-380.

Rochette-Egly, C., and Germain, P. (2009). Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors. Nuclear Receptor Signaling *7*, e005.

Samarut, E., and Rochette-Egly, C. (2012). Nuclear retinoic acid receptors: conductors of the retinoic acid symphony during development. Mol Cell Endocrinol *348*, 348-360.

Sartorius, C.A., Takimoto, G.S., Richer, J.K., Tung, L., and Horwitz, K.B. (2000). Association of the Ku autoantigen/DNA-dependent protein kinase holoenzyme and poly(ADP-ribose) polymerase with the DNA binding domain of progesterone receptors. J Mol Endocrinol *24*, 165-182.

Smith, G.C., and Jackson, S.P. (1999). The DNA-dependent protein kinase. Genes Dev *13*, 916-934.

Walker, J.R., Corpina, R.A., and Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. Nature *412*, 607-614.
Wang, J.C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. Nat Rev Mol Cell Biol *3*, 430-440.

Wilhelm, P., Lewandowski, B., Trapp, N., and Wennemers, H. (2014). A crystal structure of an oligoproline PPII-helix, at last. J Am Chem Soc *136*, 15829-15832.

Wong, R.H., Chang, I., Hudak, C.S., Hyun, S., Kwan, H.Y., and Sul, H.S. (2009). A role of DNA-PK for the metabolic gene regulation in response to insulin. Cell *136*, 1056-1072.

Woodard, R.L., Anderson, M.G., and Dynan, W.S. (1999). Nuclear extracts lacking DNA-dependent protein kinase are deficient in multiple round transcription. J Biol Chem *274*, 478-485.

Zhang, Z., Hu, W., Cano, L., Lee, T.D., Chen, D.J., and Chen, Y. (2004). Solution structure of the C-terminal domain of Ku80 suggests important sites for protein-protein interactions. Structure *12*, 495-502.

Zhang, Z., Zhu, L., Lin, D., Chen, F., Chen, D.J., and Chen, Y. (2001). The three-dimensional structure of the C-terminal DNA-binding domain of human Ku70. J Biol Chem *276*, 38231-38236.

Legends to Figures

Figure 1 : The XRCC5 and XRCC6 regulatory subunits of DNA-PK are novel partners of the N-terminal domain of RARα.

A. Schematic representation of the GST baits in which the RARα1 and RARγ1 N-terminal regions are fused to GST. Numbers indicate aminoacids. DBD (DNA binding domain), PRM (Proline-rich motif).

B. SDS-PAGE and silver staining analysis of RARα-associated proteins in pull down experiments performed with immobilised GST or GST-RARα(69-168) and MCF7 cells nuclear extracts .

C. Detection of XRCC5 and XRCC6 in the eluates by immunoblotting. Lane 4 shows that treatment of the extracts with DNAse I does not affect the interaction of XRCC5 and XRCC6 with RARα. Lane 8 shows that no interaction occurs with RARγ.

D. Coimmunoprecipitation of endogenous RARα and the DNA-PK complex. Nuclear extracts from MCF7 cells were incubated with Ab9α(F) and Ab10α(A) (1 :1) and protein G-sepharose beads. Eluates were immunoblotted with RPα(F), XRCC5, XRCC6 or DNA-PKcs antibodies.

E. GST pull downs performed with COS-1 cells extracts overexpressing FLAG-XRCC5 or FLAG-XRCC6 showing that XRCC5 and not XRCC6, interacts with RARα. Bound XRCC5 and XRCC6 were analyzed by immunoblotting with FLAG antibodies.

F. Coimmunoprecipitation experiments performed with nuclear extracts of COS-1 cells transfected with the full length RARα vector along with FLAG-XRCC5 or FLAG-XRCC6. Immunoprecipitation was performed with FLAG antibodies-bound protein A-Sepharose beads. Immunocomplexes were revealed by immunoblotting with RPα(F) and FLAG antibodies

G. Increasing amounts of the synthetic peptide PI80 corresponding to the PRM of RARα abrogates the intercation of FLAG-XRCC5 with GST-RARα(69-168).

Figure 2 : DNA-PK regulates the RA-induced expression of RARα-target genes.

A. Control by immunoblotting of the knock down efficiency of XRCC5, XRCC6, DNA-PKcs and RARα in MCF7 cells

B and C. Knock down of XRCC5, XRCC6, DNA-PKcs and RARα decreases the RA-induced expression of the *Btg2* and *Cyp26a1* genes as monitored by real time RT-PCR. Values are the mean ±s.d. of triplicates from three separate experiments

D and E. Inhibition of the enzymatic activity of TOPIIβ with Merbarone also inhibits the RA-induced expression of the *Cyp26a1 and Btg2* genes in RT-qPCR experiments

Figure 3 : DNA-PK occupies the *Btg2* and *Cyp26a1* gene promoters and repairs DNA-DSBs induced by TOPIIβ

A1-A3 and B1-B3. Concomitant recruitment of RARα, XRCC5 and DNA-PKcs. Knockdown of RARα inhibits this recruitment.

C1-C3. Formation of transient DNA DSBs as measured by incorporation of biotin 11-dUTP followed by ChIP analysis of biotin. Merbarone and knockdown of RARα decrease the formation of DSBs.

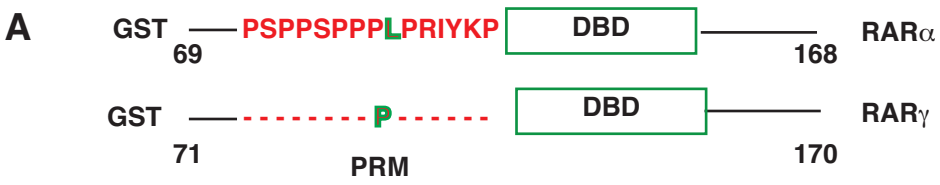
D1-D3. Phosphorylation of H2AX (γH2AX) is inhibited upon knockdown of DNA-PKcs and by Merbarone. γH2AX is detected only at the R2 element of *Cyp26a1* but not at the R1 element .

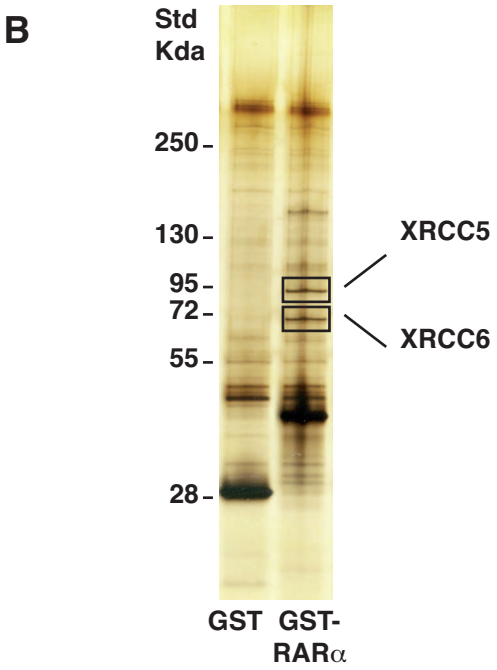
E1-E3. Recruitment of TOPIIβ. For the *Cyp26a1* gene promoter TOPIIβ is recruited only at the R1 element.

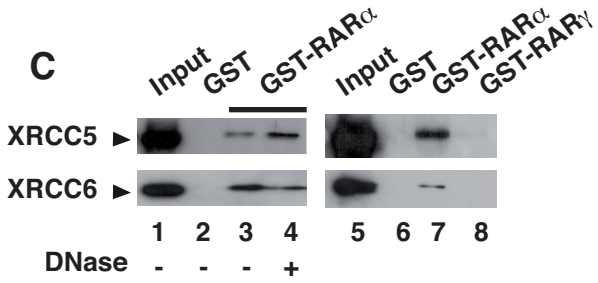
In all panels, data points show mean ±SD of tripicates from two to three individual experiments

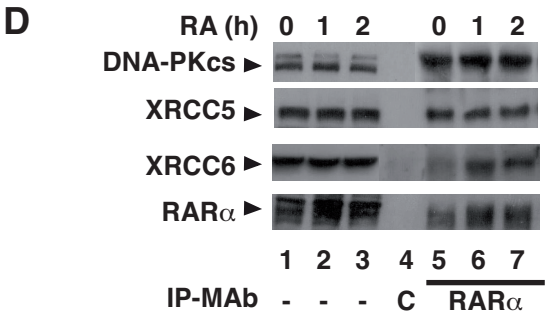
Figure 4 : Model for TOPIIβ and DNA-PK- mediated activation of the RARα-target genes.

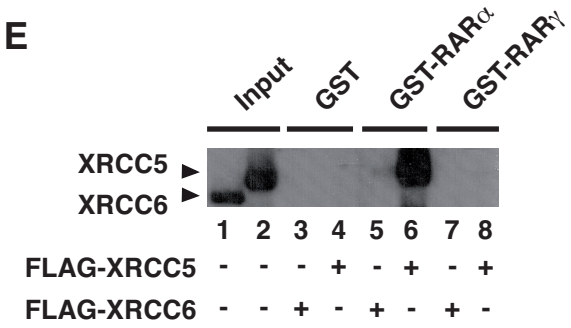
Following RA addition, RARα is recruited to RA response elements (RAREs) concomitantly with TOPIIβ, which creates DNA DSBs around the RAREs. Then DNA-PK is recruited to the N-terminal domain of RARα via the XRCC5 regulatory subunit. DNA-PK induces the phosphorylation of H2AX (γH2AX) and the repair of DSBs. Together these DNA damage/repair events favor optimal activation of RARα target genes

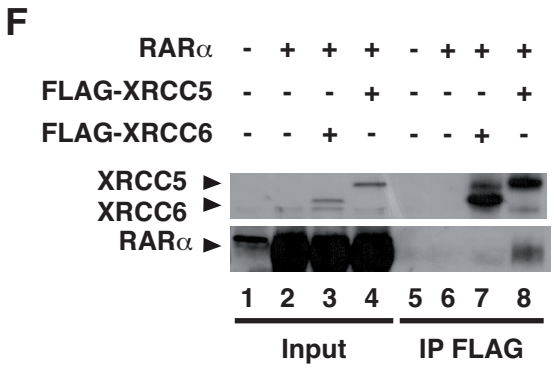

A
GST
69
PSPPSPPPLPRIYKP
DBD
168
RARα
GST
71
P
PRM
DBD
170
RARγ


B
Std
Kda
250
130
95
72
55
28
XRCC5
XRCC6
GST
GST-
RARα


C
Input
GST
GST-RARα
Input
GST
GST-RARα
GST-RARγ
XRCC5
XRCC6
1 2 3 4 5 6 7 8
DNase - - - +


D
RA (h) 0 1 2 0 1 2
DNA-PKcs
XRCC5
XRCC6
RARα
1 2 3 4 5 6 7
IP-MAb - - - C RARα


E
Input
GST
GST-RARα
GST-RARγ
XRCC5
XRCC6
1 2 3 4 5 6 7 8
FLAG-XRCC5 - - - + - + - +
FLAG-XRCC6 - - + - + - + -


F
RARα - + + + - + + +
FLAG-XRCC5 - - - + - - - +
FLAG-XRCC6 - - + - - - + -
XRCC5
XRCC6
RARα
1 2 3 4 5 6 7 8
Input
IP FLAG

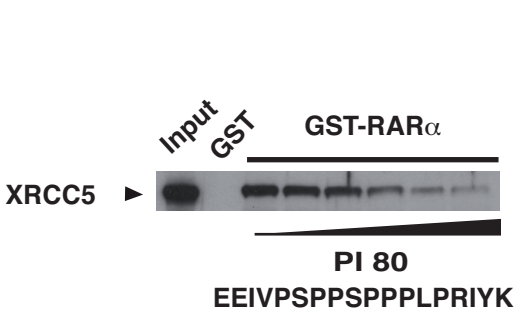

G
Input
GST
GST-RARα
XRCC5
PI 80
EEIVPSPPSPPPLPRIYK

Figure 1

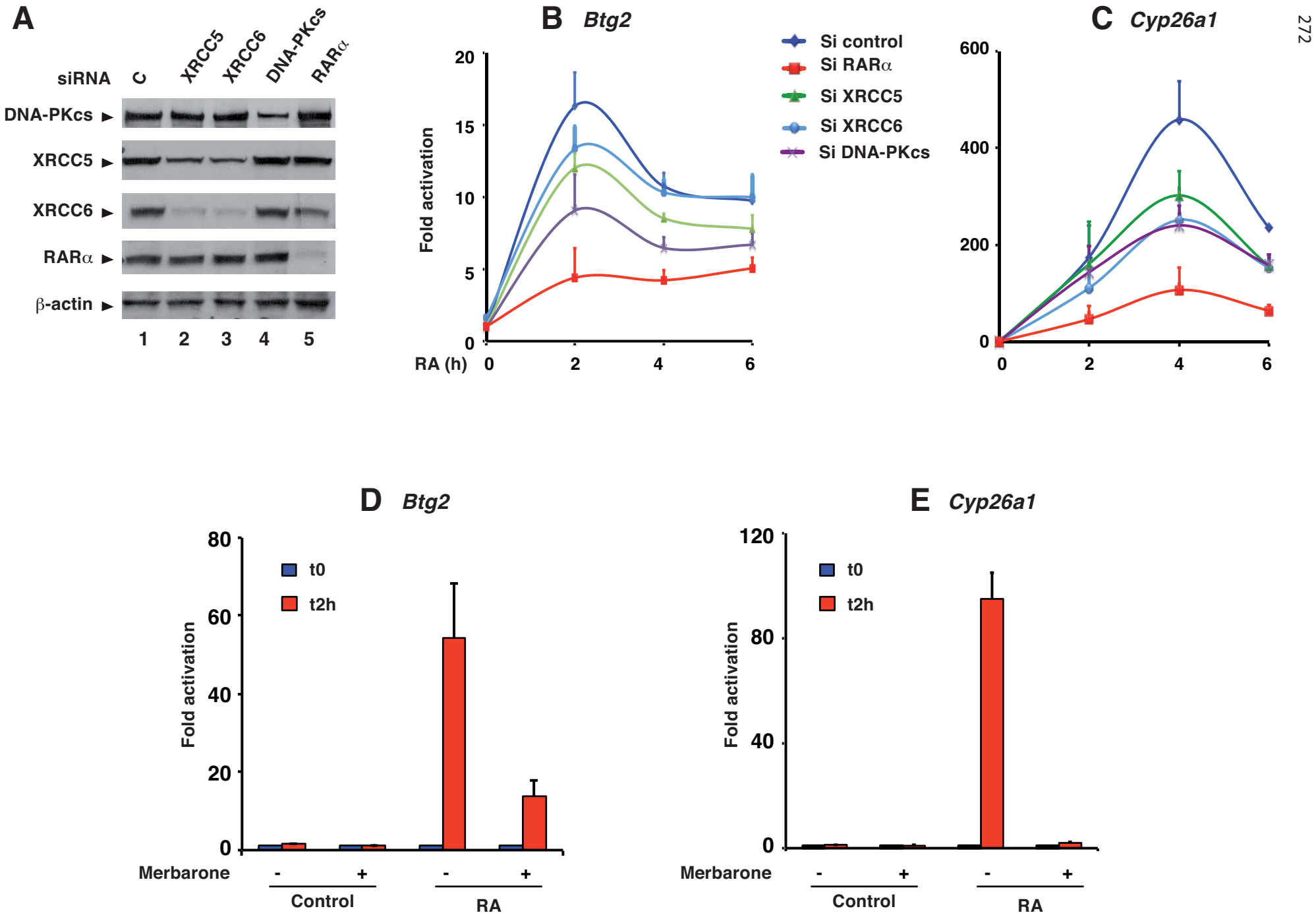

A
siRNA
C
XRCC5
XRCC6
DNA-PKcs
RARα
DNA-PKcs
XRCC5
XRCC6
RARα
β-actin
1 2 3 4 5
B Btg2
Fold activation
RA (h)
Si control
Si RARα
Si XRCC5
Si XRCC6
Si DNA-PKcs
C Cyp26a1
D Btg2
t0
t2h
Merbarone
Control
RA
E Cyp26a1

Figure 2

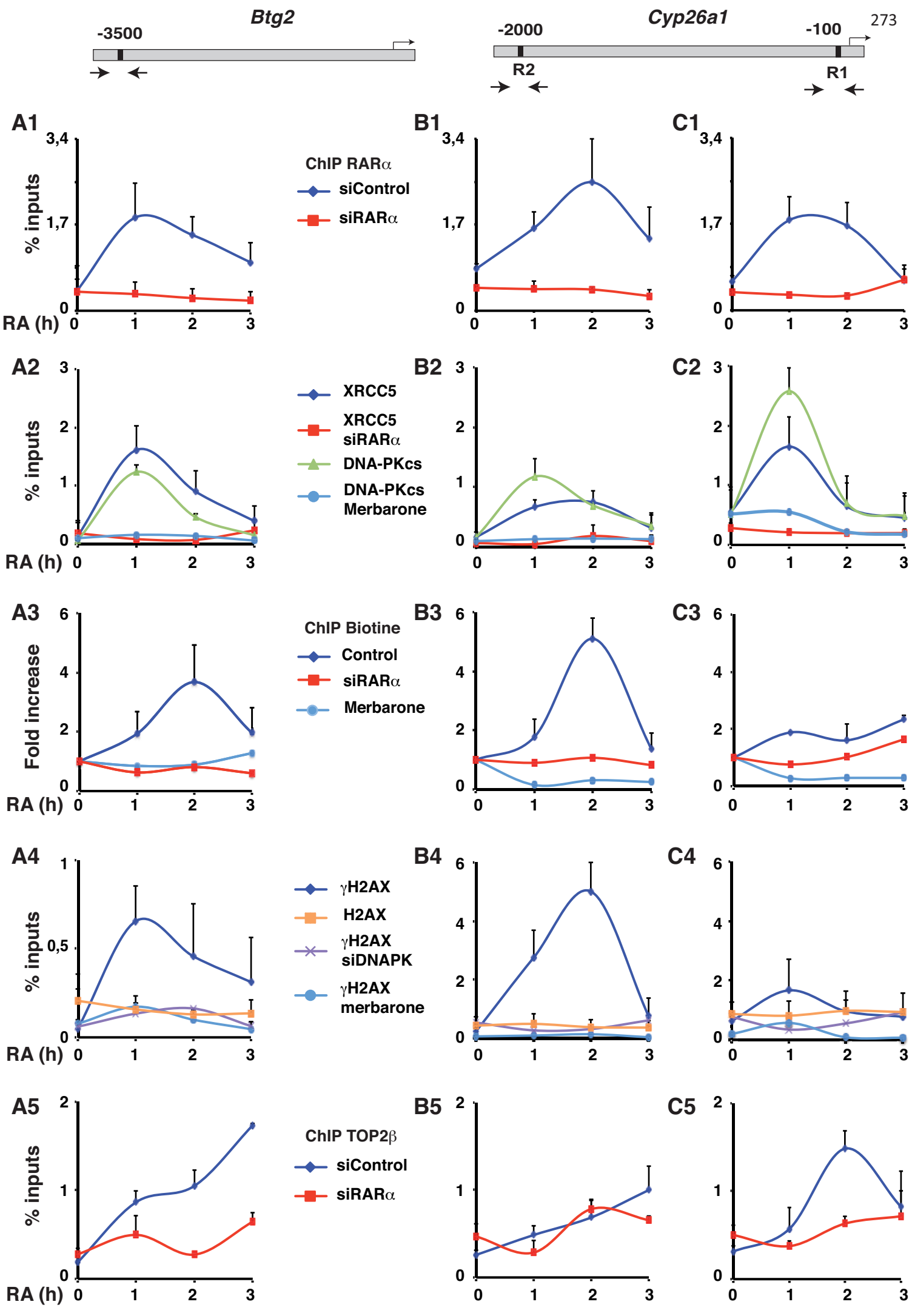
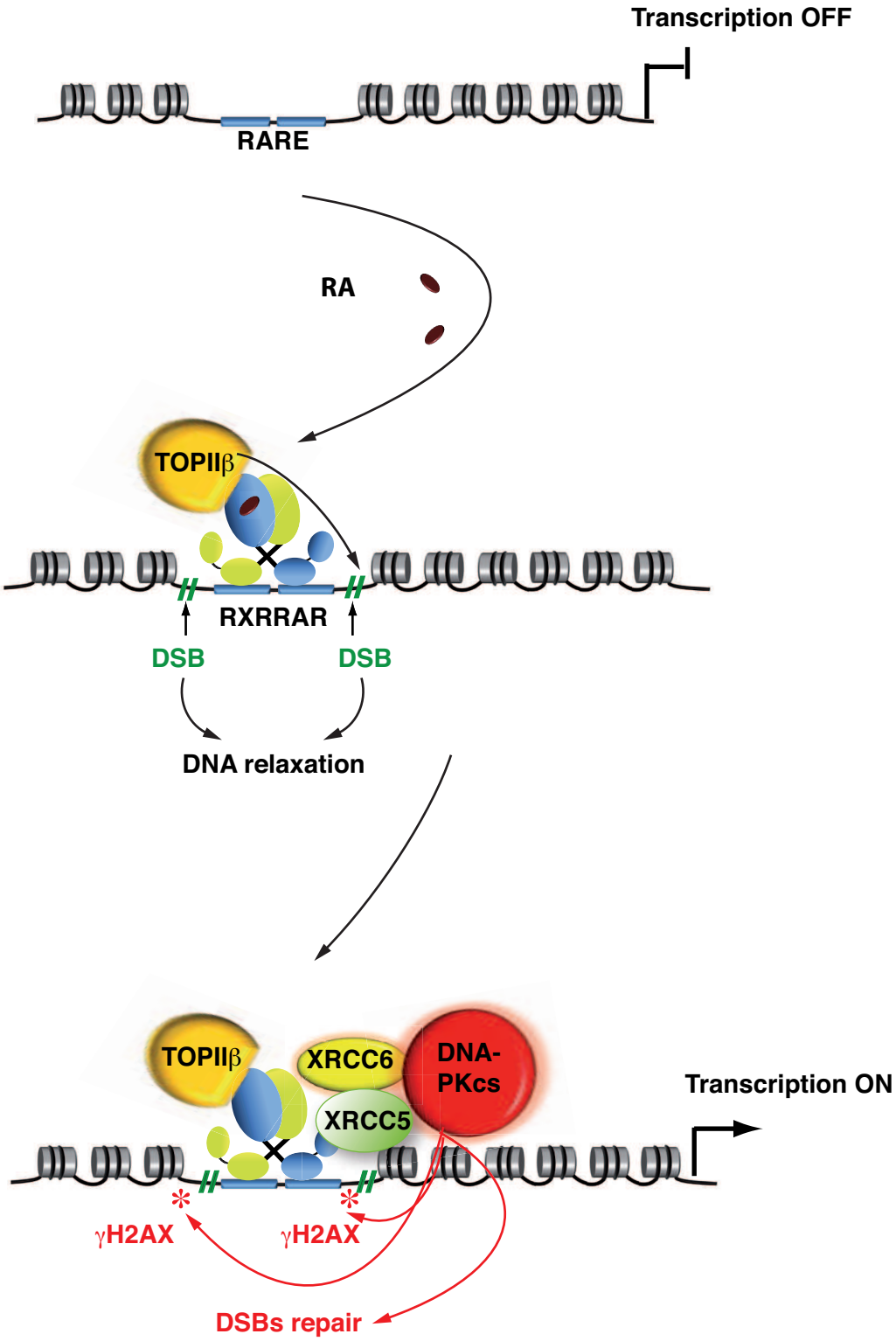

Btg2
-3500
Cyp26a1
-2000
-100
R2
R1
A1
B1
C1
% inputs
RA (h)
ChIP RARα
siControl
siRARα
A2
B2
C2
XRCC5
XRCC5 siRARα
DNA-PKcs
DNA-PKcs Merbarone
A3
B3
C3
Fold increase
ChIP Biotine
Control
siRARα
Merbarone
A4
B4
C4
γH2AX
H2AX
γH2AX siDNAPK
γH2AX merbarone
A5
B5
C5
ChIP TOP2β
siControl
siRARα

Figure 3


Transcription OFF
RARE
RA
TOPIIβ
RXRRAR
DSB
DSB
DNA relaxation
TOPIIβ
XRCC6
DNA-PKcs
XRCC5
Transcription ON
γH2AX
γH2AX
DSBs repair

Supplemental Material

Supplemental experimental procedures

NanoLC-MS/MS after SDS-PAGE

The eluates were acetone precipitated, redissolved in SDS sample loading buffer, boiled and subjected to SDS-PAGE. Then the gels were stained using the SilverQuest™ staining kit (Life Technologies). The protein bands of interest were excised, subjected to automatic in-gel reduction, alkylation and tryptic digestion (EVO100 Robot, Tecan, Männedorf, Switzerland). After washing in 50 mM NH_4HCO_3/acetonitrile (ACN)(50/50-v/v) and dehydratation with ACN, they were dried (Eppendorf SpeedVac 5301 Concentrator), reduced with 10 mM DTT in 100 mM NH_4HCO_3 (1 h at 57°C), alkylated with 55 mM iodoacetamide in 100 mM NH_4HCO_3 (45 min in the dark at room temperature), washed in 25 mM NH_4HCO_3, dehydrated with ACN and dried in a speed-vac. Then the gel pieces were rehydrated with trypsin (12.5 ng/µL in 50 mM NH_4HCO_3, overnight at 37°C) and the peptides were extracted twice with ACN/water/formic acid (FA) (45/45/10-v/v/v) followed by a final extraction with ACN/FA (95/05-v/v). Finally, the samples were dried in a speed-vac and resuspended in 0.1% FA (2 µL).

Mass spectrometry analysis was performed on a linear ion trap LTQ XL ETD (Thermo Scientific, San Jose California) with nano-Electrospray ionization source interfaced to a nanoLC system Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Germering, Germany). Samples were first desalted and concentrated on a reverse phase precolumn of 300 µm x 5 mm for 3 min at 20 µL/min. Protein digests were then separated on a Pepmap C18 (15 cm x 75 µm, Thermo Scientific) with a gradient of 5-60% solvent B (A = 5% ACN, 0.1% FA; B = 80% ACN, 0.08% FA) at a flow rate of 200 nL/min. MS/MS spectra were recorded in the data dependent mode on the five most intense ions observed in MS scan recorded in the mass range m/z 400-1600. The enhanced scan rate was used for the full MS spectrum. A micro zoom scan was acquired before MS/MS acquisition scans to determine the peptide charge. Parameters for acquiring Collision-Induced Dissociation (CID) MS/MS spectra were as follows; activation time = 30 ms, activation Q = 0.25, relative collision energy = 35% and an isolation width of 3 m/z. Peptides selected for MS/MS acquisition were then placed on an exclusion list for 60 s using the dynamic exclusion mode to limit duplicate spectra.

Proteome Discoverer 1.3 software (Thermo Fisher Scientific) with Sequest® search engine was used for spectra processing protein ID. The searches were conducted against the human Swissprot database (2012-07 release, 20203 sequences). Database searches were performed with the following fixed parameters: precursor mass tolerance of +/- 1 Da, product ion mass tolerance +/- 0.8 Da, and 2 missed cleavages, carbamidomethylation of cysteine as fixed modification and methionine oxidation as variable modification. Peptides were filtered with Xcorr versus charge state 1.5-1, 2.5-2, 3-3, 3.2-4 and proteins were filtered with 2 unique peptides.

Direct nanoLC-MS/MS analysis of the eluates (Orbitrap technology)

Samples were TCA-precipitated (overnight at 4°C) and centrifuged (14000 rpm, 30 min at 4°C). Pellets were washed twice with 500 µL cold acetone, centrifuged (14000 rpm, 10 min at 4°C) and urea-denatured (8 M urea in Tris-HCl 0.1 mM). Then they were reduced with 5 mM TCEP (30 min) and alkylated with 10 mM iodoacetamid (30 min in the dark) at room temperature and under agitation (850 rpm). Double digestion was performed at 37°C with endoproteinase Lys-C (Wako Chemicals GmbH) at a ratio 1/100 (enzyme/proteins) in 8 M urea for 6h, followed by an overnight digestion with trypsin (sequencing grade modified, Promega) at a ratio 1/100 (enzyme/proteins) in 2 M urea. Finally, samples were then desalted on C18 spin-column and dried on Speed-Vacuum.

Samples were analyzed using an Ultimate 3000 nano-RSLC (Thermo Scientific, San Jose California) coupled in line with a LTQ-Orbitrap ELITE mass spectrometer via a nano-electrospray ionization source (Thermo Scientific, San Jose California). Peptide mixtures were loaded on a C18 Acclaim PepMap100 trap-column (75 µm x 2 cm, 3 µm, 100Å, Thermo Fisher Scientific) for 3.5 min at 5 µL/min with 2% ACN, 0.1% FA in H_2O and then separated on a C18 Accucore nano-column (75 µm x 15 cm, 2 µm, 100Å, Thermo Fisher Scientific) with a 210 min linear gradient from 2% to 60% buffer B (A: 0.1% FA in H_2O / B: 80% ACN, 0.08% FA in H_2O). The total duration was set to 240 min at a flow rate of 300 nL/min. The oven temperature was kept constant at 35°C. The mass spectrometer was operated in data-dependent mode with survey scans from m/z 300-1650 acquired in the Orbitrap at a resolution of 240,000 at m/z 400. The 20 most intense peaks from survey scans were selected for further fragmentation in the LTQ with an isolation window of 2.0 Da and were fragmented by CID with a normalized collision energy of 35%. Unassigned and single charged states were rejected. The Ion

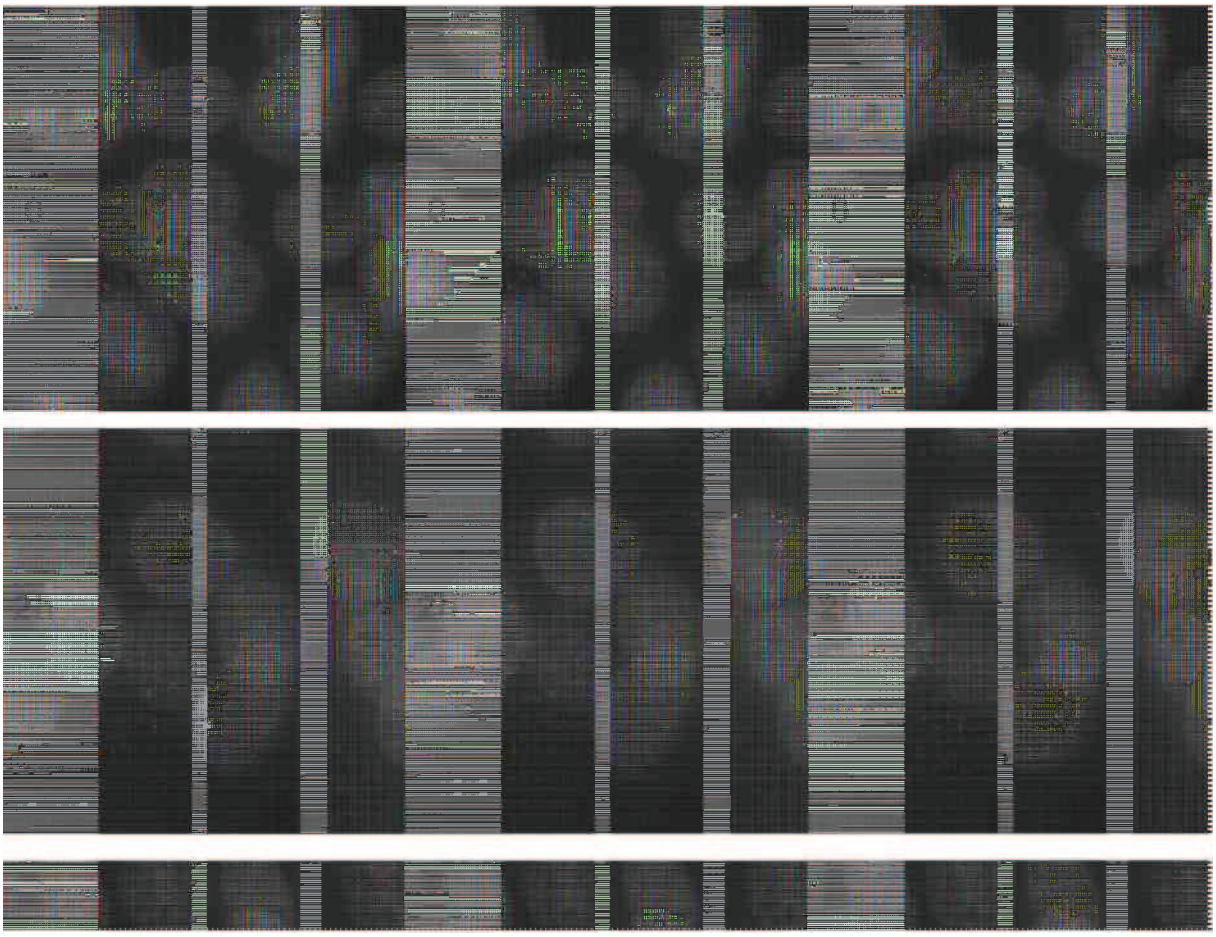
Target Value for the survey scans in the Orbitrap and the MS2 mode in the LTQ were set to 1E6 and 1E4 respectively and the maximum injection time was set to 100 ms for both scan modes. Dynamic exclusion was used. Exclusion duration was set to 30 s, repeat count was set to 1 and exclusion mass width was ± 10 ppm.

Proteins were identified by database searching as above. Precursor and fragment mass tolerances were set at 7 ppm and 0.5 Da respectively, and up to 2 missed cleavages were allowed. Oxidation (M) was set as variable modification, and Carbamidomethylation (C) as fixed modification. Peptides were filtered with a false discovery rate (FDR) 1% and rank 1 and proteins were identified with 2 unique peptides.

Supplemental Figure 1: The DNA damage/repair machinery is not recruited at the promoter of RA non responsive genes such as the 36B4 gene.

Data points show mean ±SD of tripicates from two to three individual experiments

Supplemental Figure 2 : RA induces the formation of γH2AX foci in MCF7 cells.
MCF7 cells were treated with RA (10-7M) or vehicule for the indicated times and stained for γH2AX foci (red) and DAPI (blue). Immunofluorescence analysis was previously described (Al Tanoury et al., 2014).



Supplemental Table 1
Identification by NanoLC-MS/MS analysis (Orbitrap technology) of the XRCC5 and XRCC6 proteins directly in the eluates obtained after GST-RARα(69-168) pull down of MCF7 and SH5H5Y cell extracts

		GST				GST-RARα					
Accession	Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSM	Score	Coverage	# Peptides	# PSM	# AAs	MW [kDa]
MCF7 cells											
P13010	XRCC5		0,00			71,12	16,39	9	15	732	82,7
P12956	XRCC6		0,00			74,61	32,02	14	16	609	69,8
SH-5H-5Y cells											
P13010	XRCC5		0,00			153,23	34,43	17	30	732	82,7
P12956	XRCC6		0,00			155,12	40,39	18	33	609	69,8

Supplemental Table 2
Identification by nanoLC-MS/MS analysis of the XRCC5 and XRCC6 proteins in the 90 and 75 kDa bands obtained after SDS-PAGE and pull down experiments performed with immobilized GST or GST-RARa(69-168) and extracts from MCF7, BT474 and HeLa cells.

		GST				GST-RARα						
Accession	Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSM	Score	Coverage	# Peptides	# PSM	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
HeLa cells												
P13010	XRCC5		0,00			9,07	4,10	3	3	732	82,7	5,81
P12956	XRCC6					9,32	4,11	2	2	609	69,8	6,64
BT474 cells												
P13010	XRCC5		0,00			37,96	22,40	9	10	732	82,7	5,81
P12956	XRCC6					29,69	15,44	7	7	609	69,8	6,64
MCF7 cells												
P13010	XRCC5		0,00			32,72	15,16	9	9	732	82,7	5,81
P12956	XRCC6		0,00			29,62	16,42	7	7	609	69,8	6,64

Supplemental Table 3
Identification by NanoLC-MS/MS analysis (Orbitrap technology) of the DNA damage and repair machineries in the complexes associated with RARα after immunoprecipitation of MCF7 extracts

		IP IgG control				IP RARα					
Accession	Description	Score	Coverage	# Peptides	# PSM	Score	Coverage	# Peptides	# PSM	# AAs	MW [kDa]
P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit [PRKDC_HUMAN]		0,00			110,80	9,81	28	30	4128	468,8
Q02880	DNA topoisomerase 2-beta [TOP2B_HUMAN]		0,00			83,36	14,94	20	23	1626	183,2
Q92769	Histone deacetylase 2 [HDAC2_HUMAN]		0,00			71,01	34,22	10	17	488	55,3
P10276	Retinoic acid receptor alpha [RARA_HUMAN]		0,00			53,98	31,82	10	15	462	50,7
Q13547	Histone deacetylase 1 [HDAC1_HUMAN]		0,00			54,84	32,78	8	14	482	55,1
Q9Y618	Nuclear receptor corepressor 2 [NCOR2_HUMAN]		0,00			37,99	7,92	12	12	2525	274,6
P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase 1 [PARP1_HUMAN]		0,00			29,27	12,43	8	8	1014	113,0
P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6 [XRCC6_HUMAN]		0,00			30,23	17,73	7	8	609	69,8
P13010	X-ray repair cross-complementing protein 5 [XRCC5_HUMAN]		0,00			32,35	13,52	7	8	732	82,7
Q9BZK7	F-box-like/WD repeat-containing protein TBL1XR1 [TBL1R_HUMAN]		0,00			25,21	24,32	7	7	514	55,6

Marilyn CARRIER

Dérégulation du phosphoprotéome dans les cancers : conséquences sur l'activité transcriptionnelle et la dégradation des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR)

Résumé (français):

L'acide rétinoïque (AR) agit via des récepteurs nucléaires (RAR) qui sont des facteurs de transcription inductibles par le ligand. L'AR a aussi des effets non-génomiques et active des cascades de kinases qui ciblent les RAR et modulent leur activité transcriptionnelle. Cependant, l'ensemble des protéines phosphorylées en réponse à l'AR est encore mal connu. Il en est de même des conséquences des dérégulations du « kinome » sur les effets non-génomiques de l'AR et le fonctionnement des RAR.

Pendant ma thèse, j'ai comparé les effets de l'AR sur le phosphoprotéome de deux lignées de cellules de cancer du sein : la lignée MCF7 qui est sensible à l'AR et la lignée BT474 qui surexprime le récepteur a activité tyrosine kinase erbB-2 et est résistante à l'AR. De nombreuses différences ont été observées dans les deux lignées avec des répercussions sur l'expression des gènes, la phosphorylation de RARα, le recrutement de RARα aux promoteurs des gènes cibles et finalement la dégradation de RARα par le protéasome. Dans ce dernier contexte, j'ai aussi montré que la dégradation de RARα met en jeu le corégulateur TRIM24 qui contrôle la déubiquitination de RARα.

Mots clés: acide rétinoïque, récepteur de l'acide rétinoïque (RAR), cancer du sein, phosphorylation, phosphoprotéome, spectrométrie de masse, RNA-seq, transcription, TRIM24, ubiquitination, dégradation, protéasome.

Résumé (anglais)/Abstract:

Retinoic acid (RA) acts by binding to specific nuclear receptors (RARs), which are ligand-dependant transcription factors. RA also has non-genomic effects and activates kinase cascades that target RARs and modulate their transcriptional activity. However, the proteins that are phosphorylated in response to RA remain to be identified. Also, the consequences of deregulations of the "kinome" on the non-genomic effects of RA and on RAR function require further investigation.

During my thesis, I compared the effect of RA on the phosphoproteome of two breast cancer cell lines: MCF7, a RA-sensitive cell line, and BT474, a RA-resistant cell line that overexpresses the receptor tyrosine kinase erbB-2. Multiple differences were observed between the two cell lines with consequences on gene expression, RARα phosphorylation, RARα recruitment on target genes promoters and finally RARα degradation by the proteasome. In the context or RARα degradation, I showed the involvement of TRIM24 which controls RARα deubiquitination.

Keywords: retinoic acid, retinoic acid receptor (RAR) breast cancer, phosphorylation, phosphoproteome, mass spectrtometry, RNA-seq, transcription, TRIM24, ubiquitination, degradation, proteasome.