



HAL
open science

Le récepteur de l'acide rétinoïque alpha (RAR- α) : nouveau rôle dans l'adhésion des fibroblastes

Dina Andriamoratsiresy

► **To cite this version:**

Dina Andriamoratsiresy. Le récepteur de l'acide rétinoïque alpha (RAR- α): nouveau rôle dans l'adhésion des fibroblastes. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ092 . tel-01587730

HAL Id: tel-01587730

<https://theses.hal.science/tel-01587730>

Submitted on 14 Sep 2017

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
Institut de Génétique et de Biologie Cellulaire et Moléculaire (IGBMC)**

THÈSE

Dina ANDRIAMORATSIRESY

Soutenue le **08 Décembre 2016**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**
Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Le récepteur de l'acide rétinoïque alpha (RAR α)
Nouveau rôle dans l'adhésion des fibroblastes**

Directeur de thèse
Mme ROCHETTE-EGLY Cécile Dr, IGBMC

Rapporteurs externes
Mme LE ROMANCER Muriel Dr, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL)
Mr LAUDET Vincent Pr PUPH, Observatoire océanique de Banyuls-sur-Mer

Examineur interne
Mr KIEFFER Bruno Pr PUPH, IGBMC

REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'exprime toute ma gratitude envers Dr Cécile ROCHETTE-EGLY de m'avoir offert l'opportunité d'effectuer mes études doctorales au sein de son équipe. Je suis reconnaissante pour son soutien indéfectible, sa patience et surtout pour les enseignements et les compétences transmis durant ces années de recherche à l'IGBMC qui ont permis mon développement scientifique.

Je remercie Dr Muriel LE ROMANCER, Pr Vincent LAUDET et Pr Bruno KIEFFER pour leur expertise apportée à l'examen de mon travail de thèse.

Je tiens également à exprimer mes remerciements aux membres de l'équipe qui m'ont accueilli et qui ont contribué à l'accomplissement de ce travail : Aleksandr PISKUNOV, Ziad AL TANOURY, Régis LUTZING, Marilyn CARRIER, Gabriella PANKOTAI-BODO et spécialement Samia GAOUAR.

Je n'oublie pas non plus les Services et Plateformes communs de l'IGBMC pour leur collaboration : Marcel BOEGLIN et Yves LUTZ de l'Imagerie, Thierry LEROUGE et Paola ROSSOLILLO de la BIOMol, Betty HELLER et les filles de la Culture cellulaire, Mathilde JOINT et Luc NEGRONI de la MassSpec (...)

Je remercie également les personnes de l'administration de l'IGBMC qui ont été d'une aide précieuse : Armelle PETILLON, Elisabeth TOUSSAINT, Francine DENIER ... ainsi qu' Evelyne ACKER pour son Accueil et bien sûr Maïté.

Puis, je remercie toute personne avec qui j'ai partagé et échangé cette expérience humaine : Anas, Jacky, Rana, Naimah, Nisha, Holy (...).

Enfin, je dédie ce travail à toute ma famille et mes amis pour leur soutien et leurs encouragements, pour avoir supporté « les contraintes de la thèse », particulièrement à celui qui me complète Nirina ANDRIAMANANTENASOA, à mes sources Dà sy Neny, mon frère Andy et à mon trésor Harena.

T'sy hay ny tsy hisaotra an' Andriamanitra noho ny fahasoavana lehibe natolony antsika rehetra sy ny fitahiany isan'andro.

ABBREVIATIONS

A	Alanine
ABP	Actin binding protein
ACTR	Acetyltransferase
ADH	Aldehyde deshydrogenase
ADH	Alcool deshydrogenase
ADN/ARN	Acide désoxyribonucléique/ribonucléique
ALB	Amplified in breast
APC	Adenomatous polyposis coli
AR	Acide rétinoïque
Arp 2/3	Actin related protein 2/3
ATP/ADP	Adenosine triphosphate/diphosphate
atRA	Acide rétinoïque all-trans
BCO1	β -carotène-15, 15'-monooxygénase (ou BCMO1)
BCO2	β -carotène-9'10'-dioxygenase (ou BCMO2)
ChIP-Seq	Chromatin immunoprecipitation sequencing
COBL	Cordon bleu
CP	Capping protein
CRBP	Cellular Retinol Binding Protein
CTE	Carboxy-terminal extension
Cyp26	Cytochrome 450, family 26, subfamily a, polypeptide 1
DAD	Diaphanous Autoinhibitory Domain
DBD	DNA binding domain
Dia	Diaphanous-related formin
DID	DAD-Interacting Domain
DMT	Histone demethylase
DR	Direct repeat
E	Glutamate
ER	Estrogen receptor
ER	Everted repeat
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ERM	Ezrin, radixin and moesin
EVH	Ena/VASP homology
EVL	Ena/VASP-like
FABP	Fatty acid binding protein
FHD	Formin Homology Domain
FMN	Formin
FMNL	Formin-like

GBD	GTPase binding domain
GRIP	Glucocorticoid receptor-interacting protein
GTP/GDP	Guanosine triphosphate/diphosphate
HACE	HECT domain and ankyrin repeat-containing E3 ubiquitin-protein ligase
HAT	Histone acetyltransferase
HDAC	Histone deacetylase
HDM	Histone demethylase
HMT	Histone methyltransferase
HNF	Hepatocyte Nuclear Factor
Hox	Homeobox
HRE	Hormon response element
HSC	Cellules hépatiques stellaires
INF	Inverted formin
IR	Inverted repeat
IUB	International Union of Biochemistry
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JAK/STAT	Janus kinase/signal transducers and activators of transcription
JMY	junction-mediating and regulatory protein
K	Lysine
Kd	Constante de dissociation
kDa	kiloDalton
LBD	Ligand binding domain
LBP	Ligand binding pocket
LRAT	Lecithin Retinol Acyl Transferase
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MSK	Mitogen and stress activated protein kinase
NCoA	Nuclear receptor coactivator
NCoR	Nuclear Receptor CoRepressor
NER	Nucleotide Excision Repair
NLS	Nuclear Localisation Signal
NPF	Nucleation promoting factor
NTD	N-terminal domain
P	Proline
PARG	Poly (ADP-ribose) glycohydrolase
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PcG	Polycomb
PFN	Profiline
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
Pin1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase never in mitosis A (NIMA)-interacting 1
PKA	cAMP-dependant protein kinase
PPAR	Peroxisomal proliferator activated receptor
PRAME	Preferentially expressed Antigen in Melanoma
PRM	Proline rich motif

R	Arginine
RAC	Receptor-associated coactivator
RALDH	Retinaldehyde deshydrogenases
RAR	Récepteur de l'acide rétinoïque
RARE	Retinoic acid response element
RBP	Retinol binding protein
RE	Retinyl Ester
REH	Retinyl Ester Hydrolase
RID	Receptor Interaction Domain
RIP	Receptor Interacting Protein
RN	Récepteur nucléaire
RXR	Récepteur des rétinoïdes X
S	Sérine
SCAR	Suppressor of cAMP activator
SDR/RDH	Short-chain dehydrogenase/reductase
SH3	Src-homology-3
SMRT	Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptor
SR-B1	Scavenger receptor-B1
Src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
SRC-1,2,3	Steroid Receptor Coactivator
STRA6	Stimulated by retinoic acid gene 6
SUG1	Suppressor for Gal 1
T	Thréonine
TBL1	Transducine β -like 1
TBLR1	TBL1-related protein 1
TF	Transcription factor
TIF	Transcriptional intermediary factor
TRAM	Thyroid hormone receptor activator molecule
TRIM	Tripartite motif containing
TRIP	Thyroid Receptor Interacting Protein
TTR	Transporter of thyroxin and retinol
UNICEF	Fonds des nations unies pour l'enfance
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VDR	Vitamin D receptor
W	Phénylalanine
WASH	WASP and Scar homolog
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome protein
WAVE	WASP family verprolin homologous protein
WH2	WASP-homology-2
WHAMM	WASP homolog associated with actin, membranes and microtubules
WRC	WAVE regulatory complex
WW	Tryptophane-tryptophane

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Structure du rétinol et de l'acide rétinoïque
Figure 2	Produits des clivages central et excentrique du β -carotène
Figure 3	Absorption intestinale et estérification du rétinol
Figure 4	Un modèle intégré de l'homéostasie de l'atRA
Figure 5	Activation de la transcription dans la cellule cible
Figure 6	Criblages de banque d'ADNc avec des sondes pour identifier les RAR
Figure 7	Le rétinol et ses deux principaux métabolites
Figure 8	Structure modulaire des RAR
Figure 9	Structure du DBD de l'hétérodimère RAR/RXR
Figure 10	Changement structural induit par la fixation du ligand
Figure 11	Structure chimique, activité et sélectivité des principaux rétinoïdes
Figure 12	Les sites de phosphorylation des RAR
Figure 13	Les éléments de réponse RARE
Figure 14	Prévalence de fixation de RAR/RXR sur les RARE
Figure 15	Différentes orientations de RAR/RXR en fonction du RARE
Figure 16	Schéma de recrutement des corégulateurs
Figure 17	Modèle de fixation différente de SMRT sur les RAR
Figure 18	Cascade de phosphorylation des RAR par les kinases
Figure 19	Modèle canonique de régulation de la transcription RAR-RXR
Figure 20	Le rétinol active la voie de signalisation JAK/STAT
Figure 21	Une fraction de RAR membranaires active des kinases
Figure 22	Principe du mouvement de la cellule
Figure 23	Structure de l'actine et d'un filament d'actine
Figure 24	Nucléation dendritique/ Modèle de tapis roulant dans les réseaux
Figure 25	Les organisations spécialisées d'actine in vivo
Figure 26	Protéines à domaines WH2 et les modèles de polymérisation
Figure 27	Protéines de la famille WASP/WAVE chez les Mammifères
Figure 28	Structure de la profiline et ses complexes
Figure 29	La profiline influence l'homéostasie de l'actine et la migration
Figure 30	Organisation des domaines d'autoinhibition des formines
Figure 31	Autorégulation moléculaire des formines
Figure 32	Domaines d'interaction des Ena/VASP
Figure 33	Mécanisme anti-coiffe par les protéines Ena/VASP
Figure 34	Formation du réseau d'actine ramifié par le complexe Arp2/3
Figure 35	Activité concentration dépendante de la cofiline
Figure 36	Les trois types de fibres de tension
Figure 37	Complexes RAR α /PFN2a dans les extensions neuronales

Publications

Cette thèse est fondée sur les publications suivantes :

1. Al Tanoury Z, Piskunov A, **Andriamoratsiresy D**, Gaouar S, Lutzinger R, Ye T, Jost B, Keime C, and Rochette-Egly C. Genes involved in cell adhesion and signaling: a new repertoire of retinoic acid receptor target genes in mouse embryonic fibroblasts. *Journal of Cell Science*. 127:521(2014)
2. **Andriamoratsiresy D**, Piskunov A, Lutzinger R, and Rochette-Egly C. The interaction of Retinoic Acid Receptor alpha (RAR α) with Profilin 2a controls the architecture of actin filaments (Manuscrit en préparation)

Communications

- **Communication orale :**

A novel function of the retinoic acid receptor RAR α in cell adhesion and migration. Sixième Journée des récepteurs nucléaires. 9 Mai 2016, Université Paris Descartes, Paris

- **Communication par affiche :**

A novel function of RAR α in cell adhesion and migration. EMBO/ EMBL Symposium Actin in Action: from Molecules to Cellular Functions. 7-10 Septembre 2016, Heidelberg

Tables des matières

Remerciements	1
Abréviations	3
Liste des figures	7
Introduction	15
Chapitre 1- Vitamine A : découverte et carences	17
1.1- Les pionniers de la vitamine et les maladies à carence en vitamine.....	17
1.2- La découverte de la première vitamine liposoluble : la vitamine A	19
1.3- Rôle physiologique de la vitamine A.....	19
1.4- Les sources de vitamine A dans l'alimentation	20
1.4.1- Les sources animales de vitamine A.....	20
1.4.2- Les sources végétales de la vitamine A.....	20
1.5- Les rétinoïdes : Nomenclature et structure	21
1.6- Métabolisme et transport des rétinoïdes.....	22
1.6.1- Absorption intestinale et métabolisme des caroténoïdes.....	22
1.6.2- Absorption intestinale et estérification du rétinol.....	23
1.6.3- Stockage et métabolisme hépatique	24
1.6.4- Absorption par les cellules cibles	25
1.6.5- Synthèse et dégradation de l'acide rétinoïque	25
Chapitre 2- Les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (RAR) :	
Découverte et mode d'action canonique	29
2.1- Le concept de récepteur nucléaire et les RAR.....	29
2.2- Structure des RAR.....	34
2.2.1- Le domaine de liaison à l'ADN (DBD, DNA-binding domain).....	34
2.2.2- Le domaine de fixation du ligand (LBD, Ligand Binding Domain)	35
2.2.3- La poche de fixation du ligand (LBP).	36
2.2.4- La surface d' hétérodimérisation	38
2.2.5- L'hélice 12 C-terminale, appelée AF-2	38
2.2.6- Le domaine N-terminal (NTD) ou AF-1.....	39
2.2.7- La région D ou "charnière"	39
2.2.8- La région F	40
2.3- Modèle canonique de régulation de la transcription par les RAR : effets « génomiques ».....	41

2.3.1- Les éléments de réponse spécifiques des RAR (RARE)	41
2.3.2- Les multiples corégulateurs des RAR	44
2.3.2.1- Les corépresseurs	44
2.3.2.2- Les coactivateurs « classiques »	46
2.3.2.3- Les autres corégulateurs	47
2.3.3- Le modèle canonique de la régulation de la transcription par les RAR	49
2.3.3.1- Absence de ligand : Transcription “inactivée”	49
2.3.3.2- Présence de ligand : Transcription “activée”	51
2.3.3.3- La fin de la transcription : rôle du protéasome	52
Chapitre 3- Nouveaux concepts : la vitamine A est active <i>per se</i> et les RAR	
ont des effets extranucléaires	55
3.1- Le rétinol est actif via le récepteur membranaire Stra6	55
3.2- Les RAR ont des effets extranucléaires et non-transcriptionnels :	
Activation de kinases	56
3.3- Les kinases activées en dehors du noyau participent à l’activité	
transcriptionnelle des RAR dans le noyau	57
3.4- RAR α interagit dans le cytoplasme avec la profiline 2a	57
Chapitre 4- La polymérisation des filaments d’actine : Rôle de la profiline	
.....	59
4.1- L’actine	60
4.2- Les filaments d’actine	61
4.3- Architecture des filaments d’actine	62
4.4- Les protéines fixatrices de l’actine	64
4.4.1- La thymosine- β 4 : Protéine de séquestration de l’actine monomérique	64
4.4.2- Protéines à domaines WH2 (WASP-homology 2)	64
4.4.3- La profiline : Protéine charnière contrôlant la nucléation et la polymérisation	
de l’actine	66
4.4.3.1- Caractéristiques	66
4.4.3.2- Structure	66
4.4.3.3- Mécanisme d’action moléculaire	67
4.4.4- Les protéines de nucléation et de polymérisation	69
4.4.4.1- Les formines	69
4.4.4.2- La famille Ena/VASP	72
4.4.4.3- Le complexe Arp2/3	74
4.4.5- Protéine de coiffe	76
4.4.6- Protéines de démontage (severing)	76
4.4.7- Protéines de réticulation	78

4.4.8- Protéines associées aux fibres de tension	78
4.5- Conclusion.....	79
Objectifs	81
Résultats.....	85
1. Les RAR contribuent à la morphologie, l'adhésion et la migration des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) (Publication 1)	87
2. Les RAR contrôlent l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion (Publication 1).....	87
3. RARα forme des complexes avec une protéine fixatrice de l'actine, la profiline 2a dans le cytoplasme des MEF (Publication 2).....	89
4. La surexpression de RARα dans le cytoplasme perturbe la morphologie des MEF et le réseau d'actine.	90
Discussion & Perspectives	93
Références	99
Publications.....	121

INTRODUCTION

Chapitre 1- VITAMINE A : DECOUVERTE ET CARENCES

1.1-Les pionniers de la vitamine et les maladies à carence en vitamine

Dans l'Antiquité des témoignages écrits attestent de l'effet bénéfique de certains aliments pour le traitement ou la prévention de certaines affections. Ces récits constituent les prémices d'un concept largement répandu sur l'existence de nutriments organiques essentiels (Lee and McDowell, 2013).

Durant des décennies, la xérophtalmie, le béribéri, le scorbut ainsi que le rachitisme respectivement causés par une carence en vitamine A, B, C et D ont fait énormément de victimes essentiellement sur les continents asiatique et africain. Voilà pourquoi, de nombreux chercheurs se sont passionnés par l'étude de ces maladies « nutritionnelles » (Semba, 2012).

Au début du XIXème siècle jusqu'au milieu du XXème siècle, les pionniers de la vitamine, épidémiologistes, physiciens, physiologistes et chimistes s'acharnaient à isoler, identifier et synthétiser les vitamines (Tableau 1) et à réfuter la dogme de l'époque selon lequel seulement quatre facteurs nutritionnels sont nécessaires : protéines, carbohydrates, graisse et minéraux. (Tableau 1).

Frederick Gowland Hopkins (1861-1947), physiologiste et chimiste britannique, est considéré comme le père spirituel de la théorie des vitamines. Hopkins mit en évidence pour la première fois l'importance des facteurs solubles dans la graisse par des essais d'alimentation sur les rats qu'il nomma à l'époque les « facteurs accessoires ». En effet, il observa qu'une alimentation « artificielle » composée d'une mixture de caséines pures, lard, amidon, sucre de canne et sels supplémentée avec de quantités infimes de lait naturel frais induisait une croissance normale chez les rats autrement incapables de croissance et même de maintenance de leur poids (Hopkins, 1912). Cette découverte lui valut le prix Nobel de physiologie ou médecine de 1929. Hopkins a partagé ce prix Nobel avec Christiaan Eijkman pour ses travaux sur la découverte de la thiamine ou vitamine B1.

En 1912, Casimir Funk inventa le terme « vitamine » du latin *vita* pour vie et du suffixe amine pour la fonction chimique amine de la thiamine. Cependant, il s'est avéré que toutes les vitamines ne présentent pas de groupement amine. C'est pourquoi elles sont nommées Vitamine A, B ou C. Actuellement, les vitamines sont

essentiellement classées selon leur capacité à se dissoudre dans l'eau ou dans les lipides (Tableau 2).

Chercheur	Année	Découverte
James Lind	1747	Démontre que les oranges et les citrons guérissent le scorbut
Kanehira Takaki	1880	Prévient le béribéri en réduisant la consommation de riz décortiqué
Christiaan Eijkman	1897	Prévient le béribéri
Gerrit Grijns	1901	Établit que le béribéri est une maladie à carence
Sir Frederic G.Hopkins	1912	Découvre les "facteurs accessoires" (Prix Nobel de 1929)
Dr Casimir Funk	1912	Invente le terme "vitamine"
Elmer V. McCollum	1915	Utilise les termes "lipo-soluble A" et hydro-soluble B", vitamines A et D
Sir Edward Mellanby	1919	Suggère que le rachitisme est du à un manque de nutriment lipo-soluble
Joseph Goldberger	1920	Détermine que la pellagre est causée par une malnutrition
Herbert Evans	1922	Découvre la vitamine E
George Minot	1926	Prouvent que le foie cru prévient l'anémie (Prix Nobel de 1934)
William Murphy		
Carl P. H. Dam	1929	Découvre la vitamine K (Prix Nobel de 1943)
Paul Gyorgy	1934	Identifie pour la première fois la vitamine B ₆
Albert Szent-Györgyi	1937	Isole la vitamine C
Robert R Williams	1936	Détermine la formule chimique de la thiamine
Conrad Elvehjem	1937	Prouve que la niacine prévient la pellagre
Edward Adelbert Doisy	1939	Synthétise la vitamine K (Prix Nobel de 1943)
Otto Isler	1946	Synthétise industrielle à grand-échelle de la vitamine A
Dorothy Crowfoot Hodgkin	1955	Détermine la structure de la vitamine B ₁₂ (Prix Nobel 1964)
Robert Burns Woodward	1973	Synthétise de la vitamine B ₁₂

Tableau 1. Les pionniers de la vitamine

Vitamines	Synonyme
Liposolubles	A Rétinol, rétinol, acide rétinoïque
	D D ₂ (Ergocalciférol), D ₃ (Cholécalciférol)
	E Tocophérol, Tocotriénol
	K K ₁ (Phylloquinone), K ₂ (Ménaquinone), K ₃ (Ménadione), K ₄ (Ménadiol)
Hydrosolubles	B B ₁ (Thiamine), B ₂ (Riboflavine), B ₃ (Niacin), B ₅ (Acide pantothénique), B ₆ (Pyridoxine, Pyridoxal, Pyridoxamine), B ₈ (Biotine), B ₉ (Acide folique), B ₁₂ (Cobalamine)
	C Acide ascorbique

Tableau 2. Les vitamines

Généralement, les maladies à carence en vitamine peuvent s'expliquer par un apport insuffisant en nutriments dans l'alimentation (malnutrition). Pour prévenir les carences en vitamine A, par exemple, l'UNICEF effectue régulièrement des campagnes de prévention par 2 doses élevées de vitamine A pour les enfants en périscolaire <https://data.unicef.org/resources/vitamin-supplementation-interactive-dashboard/>.

1.2-La découverte de la première vitamine liposoluble : la vitamine A

En 1909, W. Stepp observe que les souris blanches ne survivent pas à un régime alimentaire entièrement dépourvu de gras. En 1913, deux équipes de recherche indépendantes découvrent la vitamine « A » la toute première vitamine liposoluble.

McCullum du Wisconsin observa que les vaches nourries avec des grains de maïs jaunes étaient en excellente santé. Par contre, lorsque les vaches étaient nourries au blé et à l'avoine, leurs veaux venaient au monde plus petits ou aveugles ou naissaient prématurément ou mort-nées. Puis, en collaboration avec Marguerite Davis, il publia pour la première fois la nécessité d'une substance liposoluble (nommée plus tard vitamine A) présente dans le beurre ou le jaune d'œuf pour la croissance des rats (McCullum and Davis, 1913).

De leur côté, Osborne (Connecticut) et Mendel (Université de Yale) découvrent également que l'ajout de beurre dans le lait « artificiel » des rats influence positivement leur croissance (Osborne and Mendel, 1912). Osborne remarqua également l'importance d'une substance jaune présente dans les plantes, le carotène qui sera défini plus tard comme la provitamine A.

1.3-Rôle physiologique de la vitamine A

La vitamine A est essentielle dans le règne animal depuis l'embranchement des Chordées (Blomhoff and Blomhoff, 2006). La vitamine A (rétinol) est nécessaire au développement embryonnaire (Clagett-Dame and DeLuca, 2002), à la prolifération et la différenciation cellulaires (Bour et al., 2006) et à l'apoptose (Zanotto-Filho et al., 2008). Elle est aussi indispensable à de nombreuses autres fonctions physiologiques comme l'homéostasie des tissus, la vision (Diniz Ada and Santos, 2000), les fonctions immunitaires (Duong and Rochette-Egly, 2011) et la

reproduction (Mark et al., 2009). On peut souffrir de carence en vitamine A mais également d'excès de vitamine A ou hypervitaminose (Hussey and Klein, 1990).

Les propriétés anti-prolifératives de la vitamine A sont à la base de son utilisation en prévention et en thérapie anticancéreuse (Altucci et al., 2004).

1.4-Les sources de vitamine A dans l'alimentation

Chez les mammifères, le rétinol provient uniquement de l'alimentation, et est converti en composés actifs tels que l'acide rétinoïque (AR). La concentration en AR endogène est rigoureusement contrôlée par une balance entre sa synthèse et sa dégradation (Samarut and Rochette-Egly, 2012).

En général, il existe deux sources de vitamine A dans l'alimentation :

1.4.1- Les sources animales de vitamine A

La vitamine A d'origine animale est sous-forme de rétinol ou de rétinylesters, présents essentiellement dans le foie (bovins, volailles, poissons) et dans les produits dérivés comme le jaune d'œuf, le lait, le beurre, l'huile de foie de morue (...). Cette vitamine A « préformée » peut être directement assimilée et utilisée par notre organisme.

1.4.2- Les sources végétales de la vitamine A

Les caroténoïdes représentent le plus grand groupe de pigment répandu dans la nature. Ils sont présents dans les plantes photosynthétiques et sont responsables des couleurs jaunes, orange et rouges des fruits et des fleurs. Ils sont également la source des couleurs des oiseaux, des insectes et des invertébrés marins dont les caroténoïdes sont contenus dans la diète.

Il existe environ 600 caroténoïdes connus mais seulement 10% parmi eux peuvent être métabolisés en vitamine A par les animaux.

La vitamine A issue des légumes et fruits très colorés est sous-forme de « provitamine A » ou caroténoïdes, qui sont convertis en rétinol après ingestion par notre corps. Les aliments riches en provitamine A sont les carottes, les patates douces, les épinards et les choux. Il existe plusieurs formes de caroténoïdes mais le beta-carotène est la provitamine A la plus répandue et la plus efficace (Fraser and Bramley, 2004).

1.5-Les rétinoïdes : Nomenclature et structure

En 1934 Wald isola de la rétine d'un animal un composé qu'il appela *retinene* (Wald, 1968). Morton suggéra que ce composé est la forme aldéhyde de la vitamine A qu'il appela alors rétinaldéhyde (au lieu de rétinal) (Morton, 1944; Morton and Goodwin, 1944).

La structure complète de la vitamine A a été résolue par Karrer en 1931 qui proposa de la nommer axérophtol pour son action contre la xérophtalmie (Karrer et al., 1931; v.Euler et al., 1938). La vitamine A est une molécule composée d'un noyau cyclique β -ionone associé à une chaîne latérale linéaire isoprène polyinsaturée terminée par un groupement alcool. C'est un alcool primaire avec un poids moléculaire de 286 Da.

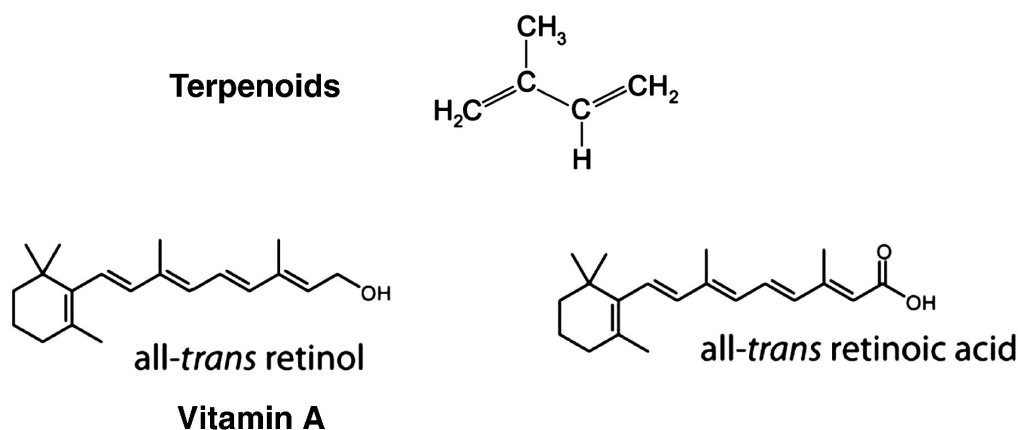


Figure 1. Structure du rétinol et de l'acide rétinolique. Le rétinol (Vitamine A) et le all-trans-acide rétinolique sont des dérivés des terpénoïdes. (Rochette-Egly, 2015)

En 1982, l'IUPAC-IUB (International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry) a décidé d'utiliser le terme générique de « rétinoïde » pour les molécules ayant les mêmes activités biologiques que le rétinol (IUPAC-IUB, 1978).

Généralement, les rétinoïdes dérivent d'un composé parental monocyclique avec une chaîne latérale composée de quatre unités d'isoprénoïdes qui se suivent en tête-à-queue et d'un groupe terminal polaire. La variabilité des chaînes latérales et des groupes terminaux sont à l'origine des différentes classes de rétinoïdes. Le système conjugué formé par l'alternance des doubles liaisons C=C dans la chaîne latérale donne leur couleur aux rétinoïdes (typiquement jaune, orange ou rouge). Par conséquent, beaucoup de rétinoïdes sont des chromophores.

Ainsi définis, les rétinoïdes regroupent aussi bien les composés naturels que les analogues synthétiques du rétinol, avec ou sans activité biologique. Cependant, Sporn et Roberts (1985), en évoquant certains composés synthétiques qui sont plus actifs que le rétinol, ont suggéré que les rétinoïdes devraient correspondre à des substances provoquant des réponses biologiques avérées en se fixant et en activant des récepteurs spécifiques.

Les rétinoïdes de première et deuxième génération peuvent se fixer à différents récepteurs des rétinoïdes grâce à la flexibilité induite par l'alternance de simples et doubles liaisons. Par contre, les rétinoïdes de troisième génération ont une structure plus rigide et sont donc plus spécifiques d'un type de récepteur.

En pratique, de nos jours les chercheurs se réfèrent à une combinaison de ces deux définitions, selon laquelle, les rétinoïdes regroupent non seulement les analogues du rétinol (avec ou sans activité biologique) mais aussi plusieurs composés qui ne ressemblent pas au rétinol mais qui ont une activité biologique de rétinoïdes (vitamine A au sens large).

La vitamine A et la majorité de ses métabolites sont dans la configuration *all-trans*. Cependant, le rétinol *all-trans* et ses dérivés sont très sensibles à la dégradation par oxydation et ils peuvent subir des changements de configuration *cis-trans* suite à l'exposition à la lumière (Gundersen and Blomhoff, 2001). Il faut noter que le 11-*cis* rétinaldéhyde est spécifique à la rétine de l'œil (Al Tanoury et al., 2013; Kusakabe et al., 2009). Finalement, il existe actuellement plus d'un millier de rétinoïdes.

1.6-Métabolisme et transport des rétinoïdes

1.6.1- Absorption intestinale et métabolisme des caroténoïdes

En 1930, Moore montre que le beta-carotène est absorbé au niveau de l'intestin grêle pour être transformé en rétinoïde. Puis, en 1965, Goodman and Huang puis Olson and Hayaishi (1965) identifient le $\beta\beta$ -carotène-15, 15'-monooxygénase (BCO1 ou BCMO1) qui permet le clivage symétrique d'une molécule de β -carotène en 2 molécules de rétinol (Olson, 1997) (Figure 2).

En 2001, Kiefer identifie un deuxième enzyme BCO2 ou BCMO2 ($\beta\beta$ -carotène-9'10'-dioxygénase qui permet un clivage asymétrique d'une molécule de β -carotène en une molécule d'apocaroténal et 1 molécule de β -ionone (Figure 2).

Cette voie alternative permet la synthèse d'acide rétinique indépendante de la « voie classique » par certains tissus qui expriment BCO2 (Simoes-Costa, 2008).

Le rétinol obtenu se fixe à CRBP II (Cellular Retinol Binding Protein II). C'est sous-forme de ce complexe que le rétinol est converti en rétinol par une rétinol réductase intestinale.

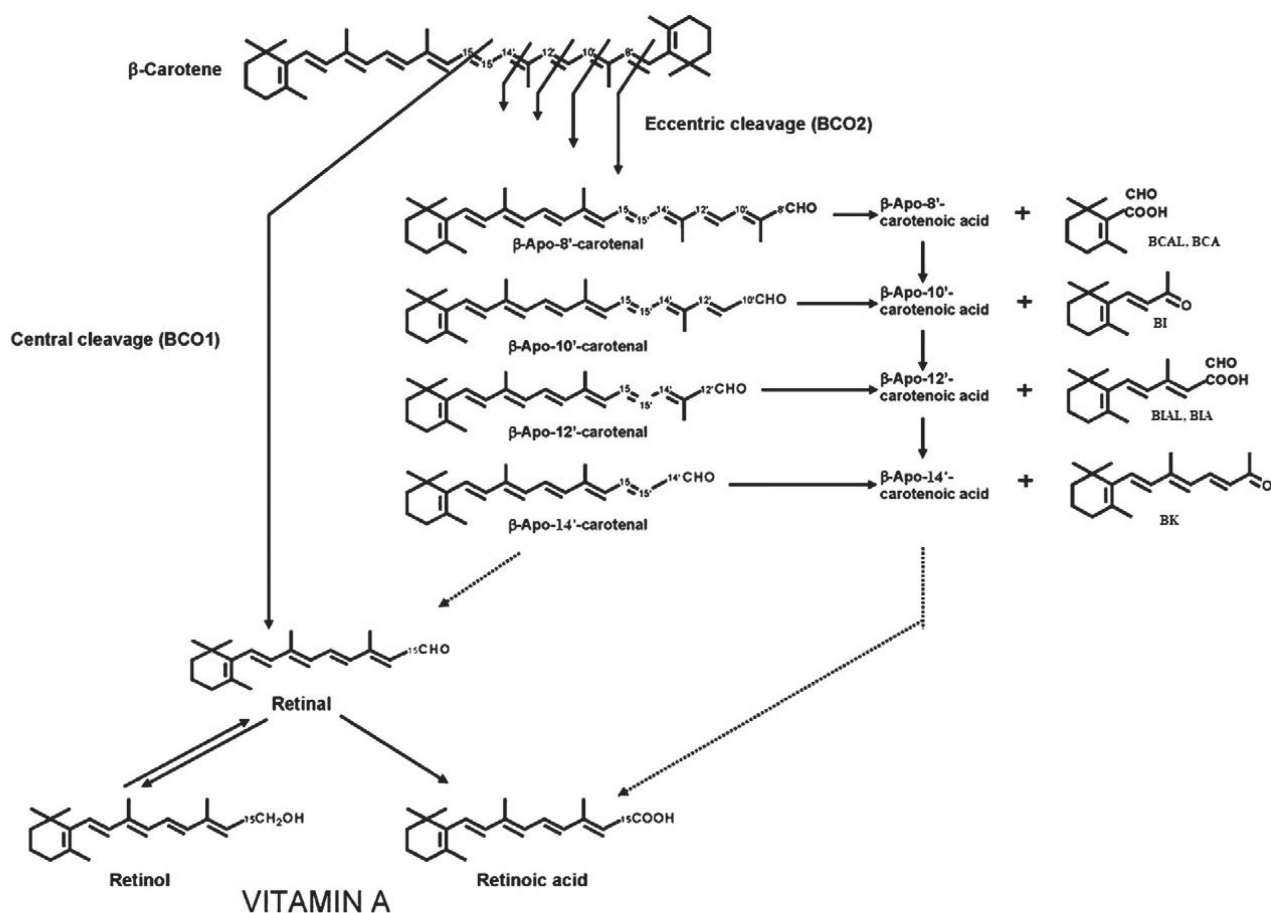


Figure 2. Produits des clivages central et excentrique du β -carotène. BCO1 permet le clivage central du β -carotène au niveau de la double liaison 15,15' en deux molécules de rétinol. Le clivage excentré des autres doubles liaisons par BCO2 donne une molécule de β -apocaroténal et de β -apocaroténone. (Harrison, 2012)

1.6.2- Absorption intestinale et estérification du rétinol

Les rétinoïdes présents dans les dérivés animaux de l'alimentation normale sont essentiellement sous-forme de rétinol ou de rétinyl esters. Le rétinol est absorbé directement par les cellules intestinales. Par contre, les esters doivent être hydrolysés sous-forme de rétinol par une rétinyl ester hydrolase (REH) (Blomhoff and Blomhoff, 2006).

Une fois absorbé au niveau de la lumière de l'intestin grêle par les entérocytes, le rétinol (provenant des caroténoïdes ou des esters de rétinol) se lie à CRBP II et est ré-estérifié par un enzyme appelé LRAT (Lecithin Retinol Acyl

Transferase) (D'Ambrosio et al., 2011). Ces rétinyl esters s'associent aux chylomicrons et sont secrétés dans la circulation lymphatique pour être conduits dans le foie, principal lieu de stockage des rétinoïdes sous-forme d'esters (Blomhoff and Blomhoff, 2006; Blomhoff et al., 1992).

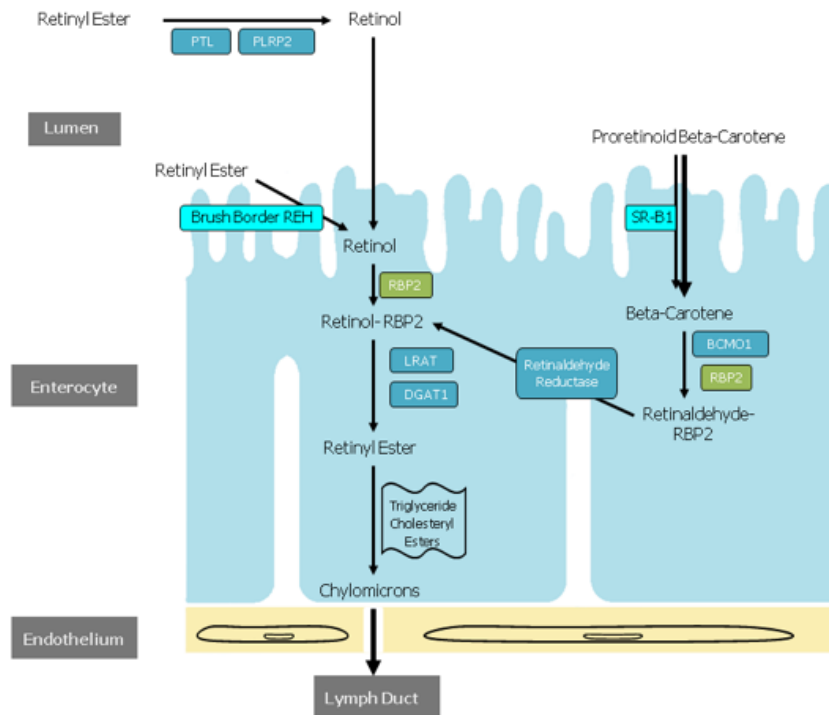


Figure 3. Absorption intestinale et estérification du rétinol (Blaner, sous presse). Au niveau de l'intestin grêle, le rétinyl ester (RE) est métabolisé en rétinol, le rétinol lui est directement absorbé par diffusion dans les entérocytes. Le Pro- β -carotène est absorbé par l'entérocyte via le récepteur membranaire SR-B1 (Scavenger receptor-B1) puis transformé en rétinol. Le rétinol est converti à nouveau en rétinyl ester puis incorporé dans les chylomicrons pour le transport lymphatique et être stocké dans le foie.

1.6.3- Stockage et métabolisme hépatique

Les esters de rétinol qui sont internalisés dans le foie vont être séparés des autres lipides des chylomicrons. Puis ils vont être soit stockés dans les cellules stellaires hépatiques (HSC) sous-forme de gouttelettes lipidiques, soit secrétés dans la circulation.

Plus de 80% des rétinoïdes hépatiques sont stockés dans les HSC. Mais le mécanisme de transfert des esters de rétinol vers les HSC est encore mal connu.

Par contre la mobilisation des réserves de rétinoïdes à partir des HSC impliquerait tout d'abord l'hydrolyse des esters en rétinol via une REH. Le rétinol libéré se fixerait à CRBP1 pour traverser la membrane des HSC puis serait pris en

charge par RBP4 dans les hépatocytes pour être sécrété dans la circulation et agir sur les cellules cibles.

Dans la circulation, le complexe rétinol:RBP se lie à TTR (TransThyretin, Transporter of thyroxin and retinol) (Blomhoff and Blomhoff, 2006). La protéine TTR remplit deux rôles essentiels dans la livraison de la vitamine A aux tissus périphériques : il permet la sécrétion du holo-RBP par le foie (Bellovino et al., 1996; Wei et al., 1995), et évite la perte du RBP qui a un très faible poids moléculaire (21 kDa) lors de la filtration glomérulaire des reins (van Bennekum et al., 2001).

1.6.4- Absorption par les cellules cibles

Le rétinol parvient aux cellules-cibles par la circulation sanguine ou lymphatique, sous-forme de rétinol:RBP:TTR mais également sous-forme de rétinylesters dans les chylomicrons résiduels (Yeum and Russell, 2002). Généralement, le rétinol se dissocie de RBP4 et TTR et entre dans la cellule par diffusion passive.

Cependant, dans certains tissus comme l'œil qui a des besoins importants en rétinol, le complexe rétinol-RBP est reconnu par un transporteur membranaire appelé Stra6 (Stimulated by Retinoic Acid gene 6).

A noter que le rétinol sous-forme d'esters dans les chylomicrons résiduels peut aussi parvenir aux cellules cibles par diffusion (Yeum and Russell, 2002).

1.6.5- Synthèse et dégradation de l'acide rétinoïque

Il est admis depuis de nombreuses années que le rétinol *per se* est inactif et que des métabolites comme l'acide rétinoïque sont les molécules actives.

Par une réaction chimique réversible, le rétinol associé à CRBP1 est converti en rétinal essentiellement par les SDR/RDH (short-chain dehydrogenase/reductase) et en partie par les ADH (aldéhyde déshydrogénase). Puis, le rétinal associé à CRBP1 est converti en acide rétinoïque par les enzymes RALDH (rétinaldéhyde déshydrogénases).

L'acide rétinoïque est transporté dans la cellule par les CRABP (cellular retinoic acid binding proteins). Finalement, après avoir effectué son action au sein de la cellule-cible, l'AR est dégradé par une réaction d'oxydation par les enzymes Cyp26 (cytochrome 450, family 26, subfamily a, polypeptide 1) (Marletaz et al., 2006; Napoli, 2012).

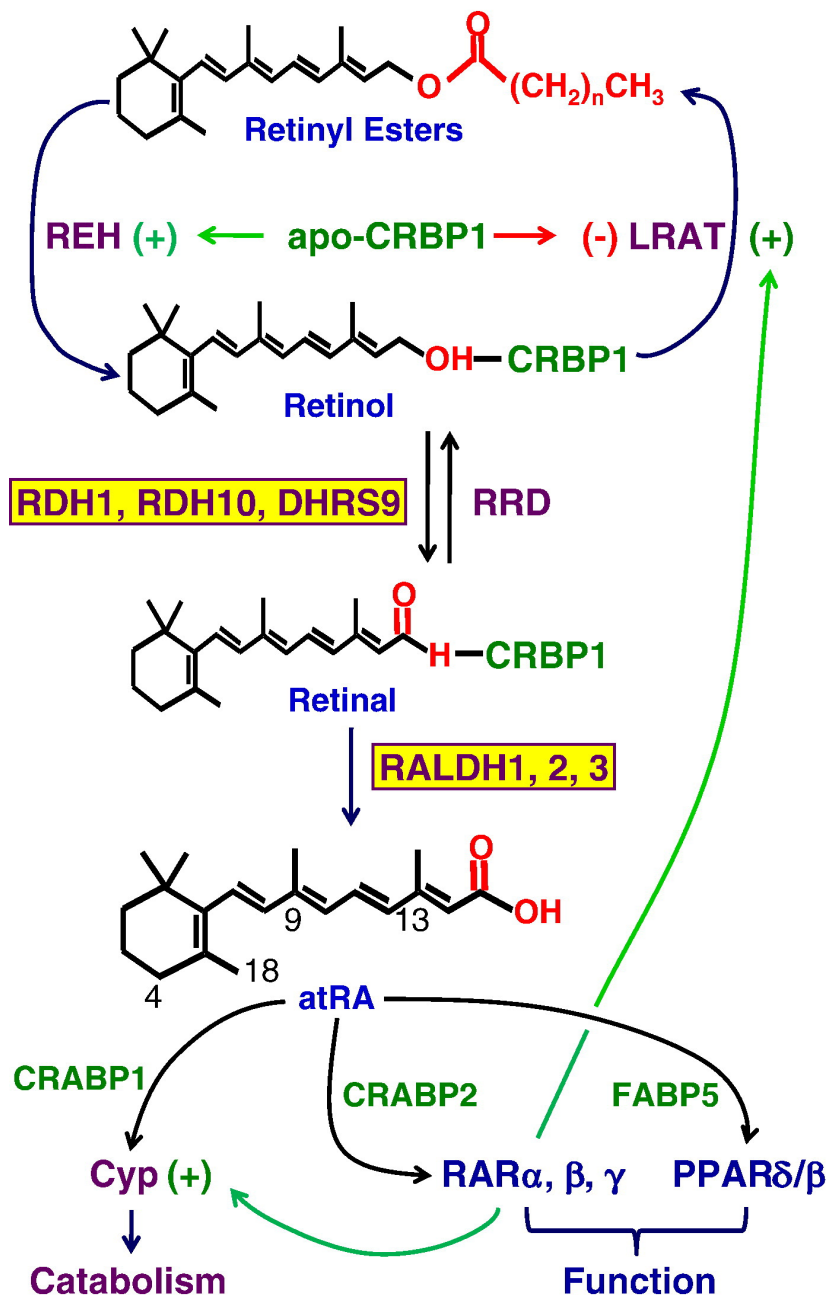


Figure 4. Un modèle intégré de l'homéostasie de l'acide rétinoïque tout-*trans* (atRA). Ce modèle tient compte du fait que la protéine de liaison au rétinol à très haute affinité, l'holo-CRBP1, représente la forme physiologique majeure du rétinol intracellulaire, et l'apo-CRBP1 interagit avec les enzymes pour réguler la concentration intracellulaire de rétinol. Le modèle présente les principales enzymes qui catalysent la première déshydrogénation du rétinol, et l'étape irréversible de la déshydrogénation du rétinol. Ces enzymes ont toutes été validées biochimiquement, physiologiquement, génétiquement, comme contribuant à la biosynthèse de l'atRA dans les conditions physiologique. Le modèle pose également des fonctions pour les protéines de liaison de l'atRA, CRABP1, CRABP2 et FABP5 dans la délivrance de l'atRA à des récepteurs nucléaires distincts ou pour le catabolisme. Enfin, deux des nœuds autorégulateurs activés par l'atRA sont représentés : l'induction de CYP et de LRAT pour diminuer respectivement les concentrations d'atRA et de rétinol (Napoli, 2012)

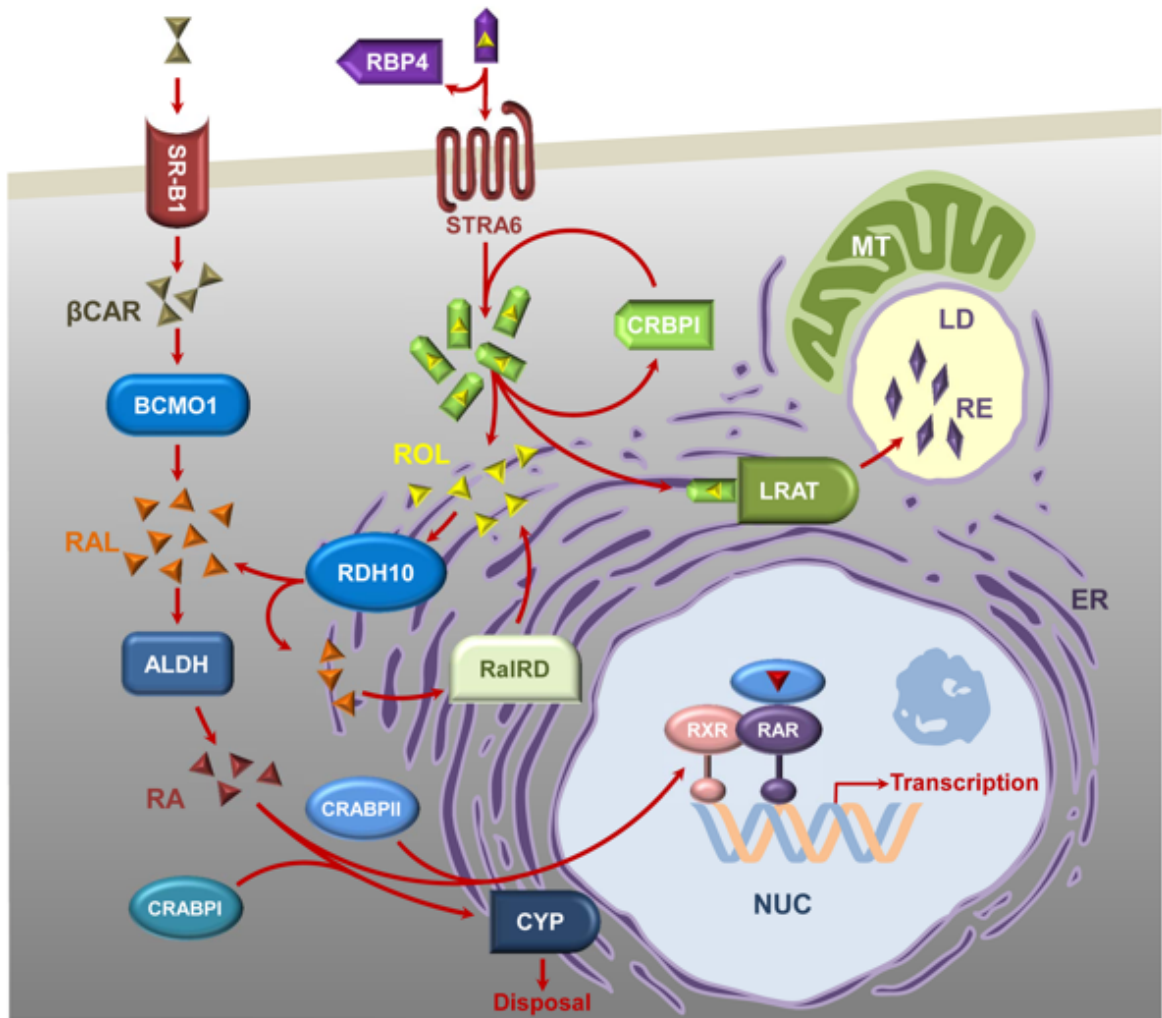


Figure 5. Activation de la transcription dans la cellule cible. Au niveau de la cellule-cible, le pro-β-caroténoïde et le rétinol sont respectivement absorbés via deux récepteurs membranaires : SR-B1 et STRA6. Le β-carotène et le rétinol sont transformés en rétinaldéhyde par des enzymes (BCMO1 et RDH10). En fin, l'acide rétinoïque (RA) est la forme qui active la transcription en se fixant aux récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (RAR) (Kedishvili (sous-presse))

Chapitre 2- LES RECEPTEURS NUCLEAIRES DE L'ACIDE RETINOÏQUE (RAR) : DECOUVERTE ET MODE D'ACTION CANONIQUE

2.1-Le concept de récepteur nucléaire et les RAR

On a longtemps considéré que la vitamine A ou rétinol était inactive *per se* et qu'elle agissait *via* certains métabolites dont le principal est l'acide rétinoïque (AR). Au niveau moléculaire, l'AR agit par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires, les RAR, qui appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires (RN) des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes. Les récepteurs nucléaires sont exprimés chez tous les métazoaires. Aujourd'hui la famille des RN humains comprend 49 membres mais plus d'une centaine de RN ont été identifiés, toutes espèces confondues (Evans and Mangelsdorf, 2014; Germain et al., 2006c) (Tableau 3).

Récepteur nucléaire	Gène	Nom	Ligands
Androgen receptor	AR	NR3I4	androgens
Constitutive androstane receptor	CAR	NR1I3	xenobiotics
Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor alpha	COUP-TF α	NR2F1	
Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor beta	COUP-TF β	NR2F2	
Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor gamma	COUP-TF γ	NR2F6	
Dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene 1	DAX-1	NR0B1	
Estrogen receptor alpha	ER α	NR3A1	estrogens
Estrogen receptor beta	ER β	NR3A2	estrogens
Estrogen related receptor alpha	ERR α	NR3B1	
Estrogen related receptor beta	ERR β	NR3B2	
Estrogen related receptor gamma	ERR γ	NR3B3	
Farnesoid X receptor alpha	FXR α	NR1H4	bile acids
Farnesoid X receptor beta*	FXR β	NR1H5	
Germ cell nuclear factor	GCNF	NR6A1	
Glucocorticoid receptor	GR	NR3C1	glucocorticoids
Hepatocyte nuclear factor 4 alpha	HNF4 α	NR2A1	
Hepatocyte nuclear factor 4 gamma	HNF4 γ	NR2A2	
Liver receptor homolog-1	LRH-1	NR5A2	
Liver X receptor alpha	LXR α	NR1H3	oxysterols
Liver X receptor beta	LXR β	NR1H2	oxysterols
Mineralocorticoid receptor	MR	NR3C2	mineralocorticoids, glucocorticoids
Nerve growth factor induced gene B	NGF1-B	NR4A1	
Neuron-derived orphan receptor 1	NOR-1	NR4A3	
Nur-related factor 1	NURR1	NR4A2	
Photoreceptor-cell specific nuclear receptor	PNR	NR2E3	

Récepteur nucléaire (suite)	Gène	Nom	Ligands
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	PPAR α	NR1C1	fatty acids
Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta	PPAR β/δ	NR1C2	fatty acids
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	PPAR γ	NR1C3	fatty acids
Progesterone receptor	PR	NR3C3	progesterone
Pregnane X receptor	PXR	NR1I2	endobiotics, xenobiotics
Retinoic acid receptor alpha	RAR α	NR1B1	retinoic acids
Retinoic acid receptor beta	RAR β	NR1B2	retinoic acids
Retinoic acid receptor gamma	RAR γ	NR1B3	retinoic acids
Reverse-erb alpha	REV-ERB α	NR1D1	heme
Reverse-erb beta	REV-ERB β	NR1D2	heme
RAR-related orphan receptor alpha	ROR α	NR1F1	
RAR-related orphan receptor beta	ROR β	NR1F2	
RAR-related orphan receptor gamma	ROR γ	NR1F3	
Retinoid X receptor alpha	RXR α	NR2B1	9-cis retinoic acid, docosahexanoic acid
Retinoid X receptor beta	RXR β	NR3B2	9-cis retinoic acid, docosahexanoic acid
Retinoid X receptor gamma	RXR γ	NR2B3	9-cis retinoic acid, docosahexanoic acid
Steroidogenic factor 1	SF-1	NR5A1	
Short heterodimeric partner	SHP	NR0B2	
Tailless homolog orphan receptor	TLX	NR2E1	
Testicular orphan receptor 2	TR2	NR2C1	
Testicular orphan receptor 4	TR4	NR2C2	
Thyroid hormone receptor alpha	TR α	NR1A1	thyroid hormones
Thyroid hormone receptor beta	TR β	NR1A2	thyroid hormones
Vitamin D receptor	VDR	NR1I1	1 α ,25-dihydroxyvitamin D3, lithocholic acid

Tableau 3. Les récepteurs nucléaires humains et leurs ligands (Evans and Mangelsdorf, 2014)

Chez les mammifères, la superfamille des RN regroupe des protéines avec une homologie de séquence codante (cDNA) (Germain et al., 2006c) (Figure). De manière générale, les RN ont la capacité de se lier directement à l'ADN, de fixer un ligand et de réguler l'expression d'une panoplie de gènes cibles. C'est pourquoi ils sont considérés comme des facteurs de transcription inductibles par le ligand. Cependant pour certains RN dits « orphelins » aucun ligand n'a encore été identifié. Parmi les RN on compte essentiellement les récepteurs stéroïdiens - récepteurs des glucocorticoïdes (GR) (Hollenberg et al., 1986), œstrogène (ER) (Green et al., 1986), de la progestérone (PR) (Loosfelt et al., 1986), des androgènes (AR) (Chang et al., 1988) - les récepteurs des minéralocorticoïdes (MR) (Arriza et al., 1987), les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR) (Weinberger et al., 1986), et le récepteur de la vitamine D3 (VDR) (Baker et al., 1988).

En ce qui concerne les RAR, ils ont été découverts par analogie avec le récepteur nucléaire des œstrogènes (ER), principalement par rapport à un domaine fonctionnel conservé qui correspond au domaine de fixation de l'ADN (DBD). Les RAR ont été découverts en 1987 par deux équipes, celle de Pierre Chambon et celle de Ronald M. Evans (pour revue (Benbrook et al., 2014)).

L'équipe de Pierre Chambon clona le premier RAR humain, aujourd'hui appelé RAR α en utilisant une sonde correspondant au DBD de ER, PR et GR et une banque d'ADNc dérivée de cellules de cancer du sein (Figure 6).

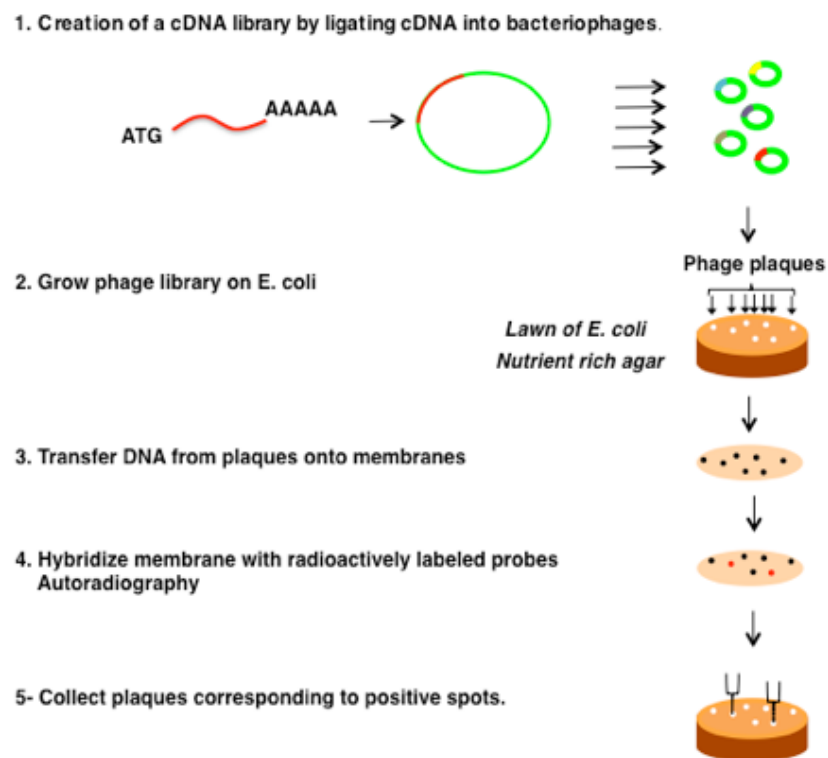


Figure 6. Criblages de banque d'ADNc avec des sondes pour identifier les RAR (Benbrook et al., 2014)

Puis, en construisant un récepteur chimérique RAR-ER.CAS où le DBD de RAR a été remplacé par celui de ER, cette équipe a montré que ce nouveau récepteur est activé spécifiquement avec des concentrations physiologiques d'AR et non par le rétinol (Petkovich et al., 1987). Quelques mois plus tard, l'équipe de Ronald Evans clona le même récepteur en utilisant une autre sonde correspondant au DBD de récepteurs stéroïdiens qu'ils avaient identifiés dans un carcinome hépatocellulaire (Giguere et al., 1987). Puis les groupes de Pfahl, Chambon et

Dejean clonèrent deux autres types de RAR qu'ils appelèrent RAR β et RAR γ (Brand et al., 1988; de The et al., 1989; Pfahl, 1994; Zelent et al., 1989).

Par la suite, il a été montré que les 3 sous-types de RAR, RAR α (NR1B1), RAR β (NR1B2) et RAR γ (NR1B3) (Tableau 3) (Germain et al., 2006a) sont codés par des gènes distincts. De plus, pour chaque sous-type, plusieurs isoformes ont été identifiées. Ces isoformes diffèrent au niveau de leur région N-terminale et résultent d'un épissage alternatif ou de l'utilisation de promoteurs différents d'un même gène (Benbrook et al., 2014).

Pendant longtemps, les cellules pluripotentes de tératocarcinome de souris F9 et P19 ont représenté un modèle de choix pour étudier les effets des RAR au niveau moléculaire. En effet, ces cellules se différencient en cellules d'endoderme de type primitif ou en cellules neuronales respectivement, suite à l'addition d'acide rétinoïque au milieu de culture. Il a été montré que cette différenciation s'accompagne d'une augmentation de l'expression de toute une panoplie de gènes impliqués dans une large variété de processus biologiques essentiels qui se superposent aux effets déjà connus de la vitamine A, comme le contrôle de la prolifération et la différenciation cellulaires (Lotan, 1980) ou le développement embryonnaire (Slack, 1987).

Finalement en 1990, le groupe de Evans mit en évidence une autre famille de récepteurs nucléaires des rétinoïdes, les RXR (Mangelsdorf et al., 1990). Cependant les RXR ne sont pas activés par l'AR tout-*trans* mais seulement par son isomère 9-*cis* (Mangelsdorf et al., 1990). Par contre les RAR sont activés à la fois par l'AR-tout-*trans* (atRA) et l'AR-9-*cis* (9cRA) (Durand et al., 1992).

De manière intéressante, il a été rapidement observé que non seulement les RAR mais aussi les RXR ont le potentiel de transduire le signal induit par l'AR *in vivo* (Leid et al., 1992). Ces observations ont été à la base du concept que ces 2 familles de récepteurs régulent la transcription de leurs gènes cibles sous-forme d'hétérodimères RAR/RXR.

Cependant, les RXR peuvent former des homodimères ou des hétérodimères avec d'autres RN tels que les récepteurs des acides gras -peroxisomal proliferator activated receptor (PPAR)-, des acides biliaires -farnesoid x receptor (FXR)-, des oxystérols -liver x receptor (LXR)-, des xenobiotics -pregnane x receptor (PXR), constitue androstane receptor (CAR)- et le récepteur de la vitamine D (VDR). C'est

pourquoi, les RXR sont appelés “récepteurs de promiscuité”. C’est un cas unique au sein des RN et cela augmente le niveau de complexité du mécanisme d’action des rétinoïdes (Evans and Mangelsdorf, 2014).

L’AR peut également lier d’autres RN comme PPAR β/δ (Berry and Noy, 2009; Chandra et al., 2008; Hihi et al., 2002), mais avec une affinité moindre, de l’ordre de 15 nM (Xu et al., 1999) au lieu de moins de 10nM pour les RAR (Johnson et al., 1999; Vasios et al., 1989). D’où, la régulation d’autres panoplies de gènes par l’AR. Les rétinoïdes pourraient aussi se lier à ROR β (NR1F2) (Stehlin-Gaon et al., 2003), COUP-TFII (NR2F2) (Kruse et al., 2008), ou TR2/4 (Zhou et al., 2011). Des études récentes ont montré que des protéines navette comme CRABPII et FABP5, qui sont des « fatty acid binding proteins » cytoplasmiques capables de fixer l’AR, apportent le ligand au récepteur localisé dans le noyau (Budhu and Noy, 2002; Delva et al., 1999; Schug et al., 2008) (Figure 7).

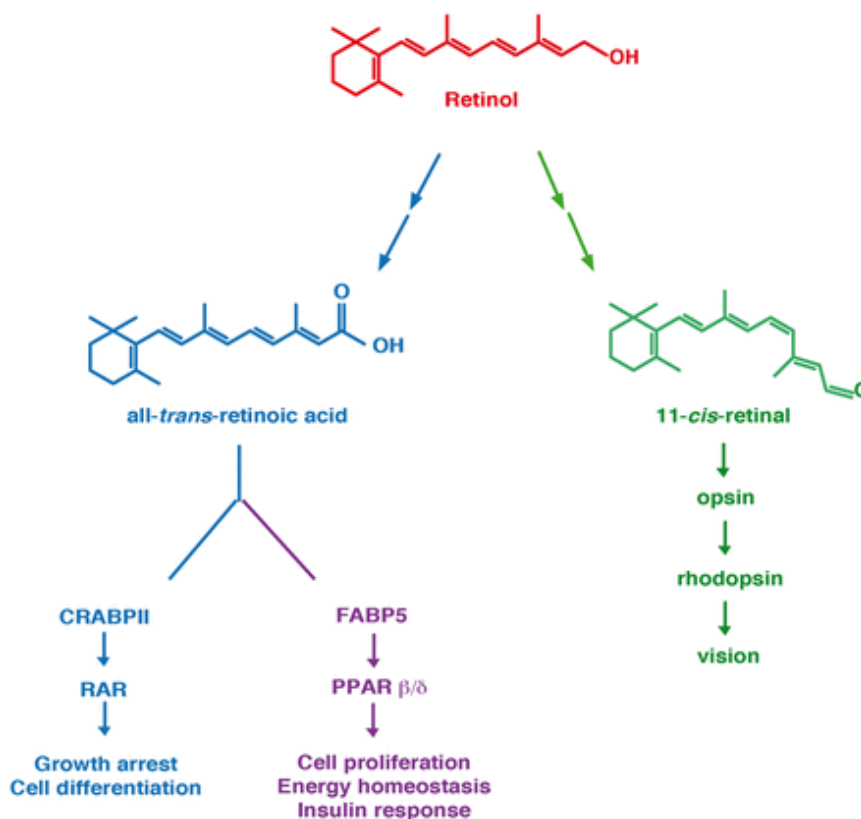


Figure 7. Le rétinol et ses deux principaux métabolites, l’acide rétinoïque tout-*trans* (atRA) et le rétinol-11-*cis* (11cRA). L’atRA se lie aux protéines navette des lipides CRABP II ou FBP5 pour atteindre respectivement les RAR qui contrôlent la prolifération et la différenciation cellulaire et PPAR β/δ , important pour l’homéostasie énergétique et la réponse à l’insuline. Le 11cRA est un cofacteur de la rhodopsine essentiel pour la vision (Al Tanoury et al., 2013).

2.2-Structure des RAR

Les RAR et les RXR présentent une même structure modulaire conservée au sein des RN. Cette séquence est divisée en 6 régions appelées A à F, de l'extrémité N-terminale à C-terminale (Chambon, 1996; Laudet and Gronemeyer, 2001).

Les régions C et E correspondent à deux domaines fonctionnels hautement conservés et structurés, caractéristiques des récepteurs nucléaires : un domaine central de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine C-terminal de liaison du ligand (LBD) respectivement (Figure 8) (Chambon, 1996; Rochette-Egly and Germain, 2009). Ces deux domaines gouvernent le modèle classique de l'activité transcriptionnelle des RAR. Par contre, les régions A/B, D et F sont faiblement conservées.

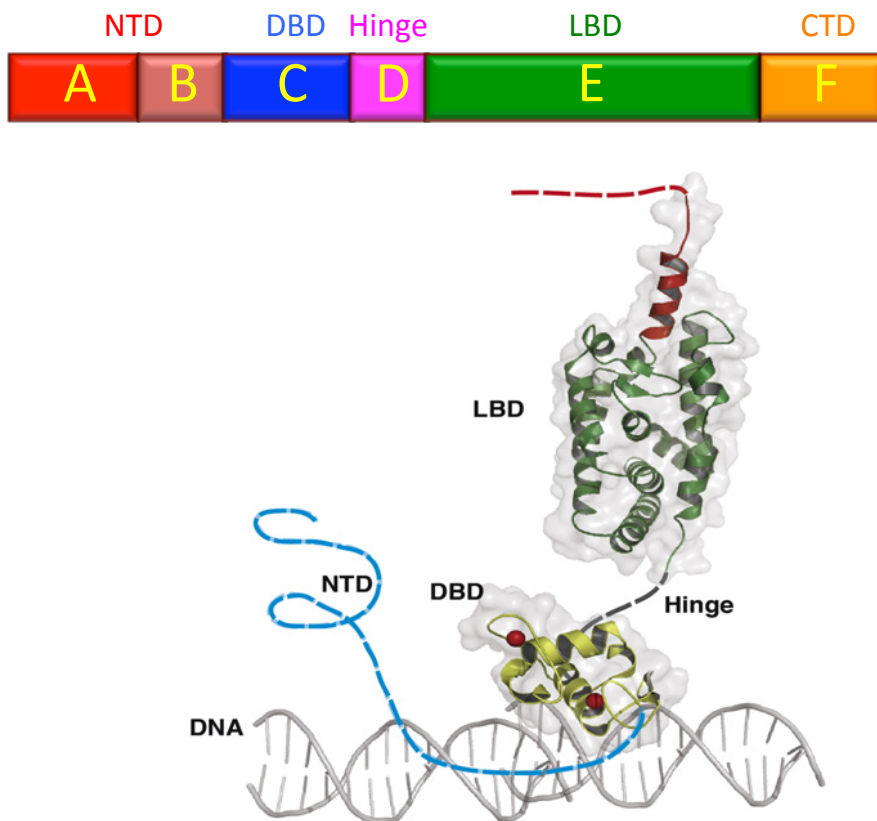


Figure 8. Structure modulaire des RAR. (Rochette-Egly, 2015)

2.2.1- Le domaine de liaison à l'ADN (DBD, DNA-binding domain)

Le DBD confère la spécificité de reconnaissance des éléments de réponse localisés dans les promoteurs des gènes cibles.

La structure du DBD a été déterminée par résonance magnétique nucléaire (RMN) et par cristallographie. Il est constitué de deux modules en doigt de zinc, de deux hélices- α et d'un prolongement terminal-COOH (CTE, COOH-terminal

extension) (Zechel, 1994a et b). L'hélice 1 et l'hélice 2 se croisent en angle droit pour former un domaine globulaire unique appelé "core" du DBD (Renaud and Moras*, 2000) (Figure 8 et 9).

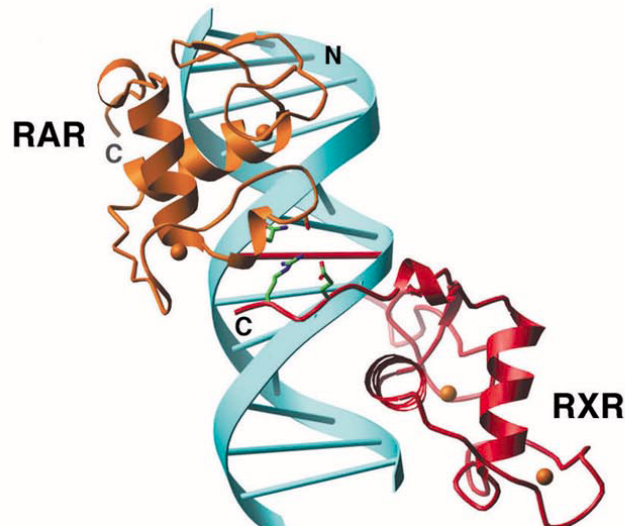


Figure 9. Structure du DBD de l'hétérodimère RAR/RXR fixés sur un élément de réponse DR1. (Rastinejad, 2001)

Le DBD comprend plusieurs éléments hautement conservés appelés boîtes P, D, T et A. Ces boîtes contribuent à la reconnaissance spécifique de l'élément de réponse et à la formation de l'interface de dimérisation entre les DBD des deux partenaires de l'hétérodimère RAR-RXR (Germain et al., 2006c; Rastinejad, 2001; Rochette-Egly and Germain, 2009).

2.2.2- Le domaine de fixation du ligand (LBD, Ligand Binding Domain)

Les LBD des différents RAR présentent des structures assez similaires, selon les études cristallographiques (Moras and Gronemeyer, 1998; Renaud and Moras*, 2000; Wurtz et al., 1996).

Le LBD est composé de douze hélices- α et d'un tour- β (situé entre H5 et H6). Les hélices 1-11 sont repliées en un sandwich formé de trois couches antiparallèles: une couche centrale formée par H4, H5, H8, H9 et H11 pris en sandwich entre H1, H2 et H3 d'un côté et H6, H7 et H10 d'autre part. En revanche, l'hélice C-terminale, H12, est plus souple et adopte des conformations qui peuvent varier d'un sous-type de RAR à l'autre (voir ci-dessous) (Figure 10). Après la fixation du ligand, le LBD subit des changements de conformation importants, comme le basculement de

l'hélice H12 selon le modèle d'un piège à souris (Figure 10) (Bourguet et al., 1995; Renaud et al., 1995).

Le LBD est fonctionnellement très complexe. En effet, il contient la poche de fixation du ligand (LBP), un domaine de dimérisation et un domaine de fixation de corégulateurs.

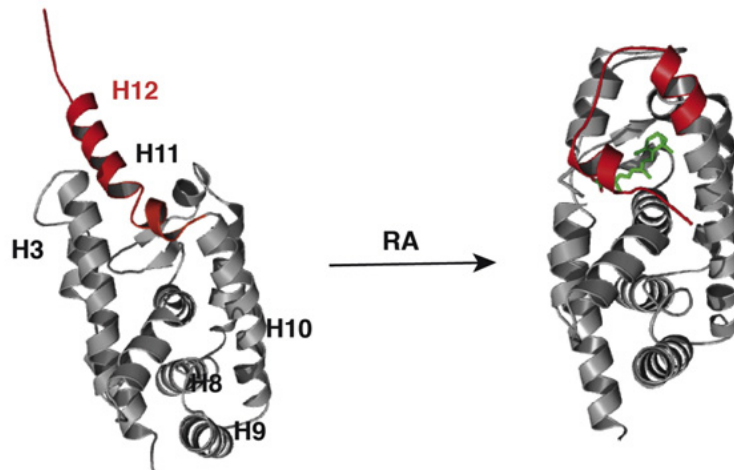


Figure 10. Changement structural induit par la fixation du ligand (Rochette-Egly, 2015)

2.2.3- La poche de fixation du ligand (LBP)

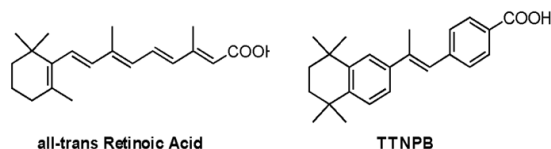
La poche de fixation du ligand (LBP) comprend principalement des résidus hydrophobes issus des hélices H3, H5, H11 et du feuillet- β . Des études cristallographiques ont révélé la base structurale de la reconnaissance du ligand (Bourguet et al., 2000a; Li et al., 2003; Renaud et al., 1995).

La forme du LBP correspond au volume du ligand, ce qui maximise les contacts hydrophobes contribuant à la sélectivité de sa fixation (Géhin et al., 1999; Klaholz et al., 2000).

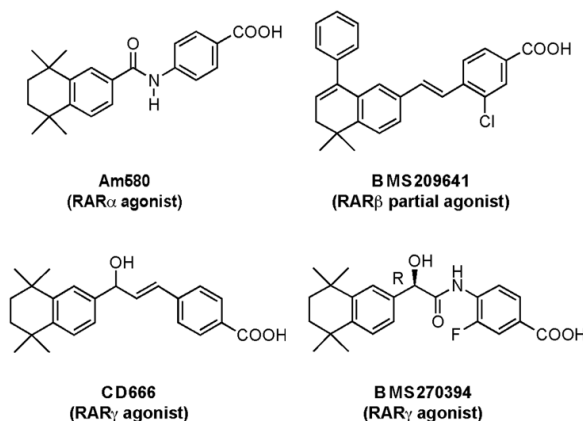
Les contacts précis avec le ligand impliquent trois résidus situés dans les hélices H3, H5 et H11, qui sont uniques pour chaque sous-type de récepteur. C'est pourquoi, il a été possible de générer des ligands sélectifs pour un sous-type donné (Germain et al., 2004). Par exemple, les résidus polaires S232 et M272 spécifiques de la LBP de RAR α et RAR γ ont respectivement permis de développer des ligands qui sont spécifiques pour RAR α (Am580) ou RAR γ (BMS270394 ou CD666). Par l'intermédiaire de leur groupe amine, ces ligands établissent des liaisons hydrogène avec RAR α S232 ou RAR γ M272, ce qui augmente respectivement l'affinité et la sélectivité pour RAR α et RAR γ .

Cependant, comme le LBP de RAR β ne contient pas de résidus polaires spécifiques, le développement de ligands sélectifs pour RAR β est plus difficile (Germain et al., 2004). Néanmoins, en raison des différences dans le volume et la forme des LBP de chaque sous-type de RAR, il a été possible de produire des molécules ayant des activités complexes telles que des ligands qui sont RAR β -agonistes et RAR α /RAR γ -antagonistes, ce profil mixte tient compte de la plus grande taille du LBP de RAR β (Chen et al., 1995; Germain et al., 2004) (Figure 11).

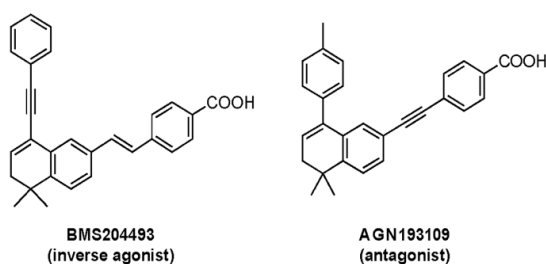
A Pan-RAR agonists



B RAR-selective agonists



C Pan-RAR antagonists



D RAR α -selective antagonists

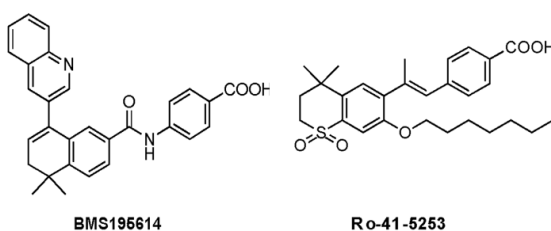


Figure 11. Structure chimique, activité transcriptionnelle, et sélectivité des principaux rétinoïdes (Rochette-Egly and Germain, 2009)

2.2.4- La surface d'hétérodimérisation

La surface d'hétérodimérisation comprend des résidus provenant des hélices H7, H9, H10 et H11, ainsi que des boucles L8-9 et L9-10 (Bourguet et al., 2000b; Pogenberg et al., 2005). Les hélices H9 et H10 contribuent à plus de 75% de la surface totale de dimérisation et constituent le "core" de l'interface du dimère. Il a été proposé que, dans les hétérodimères RXR-RAR, la fixation du ligand affecte la stabilité et la propagation des signaux à travers la surface d'hétérodimérisation, ce qui indique que le LBP et l'interface de dimérisation sont en quelque sorte énergiquement liés (Brélivet et al., 2012).

2.2.5- L'hélice 12 C-terminale, appelée AF-2

L'hélice H12 C-terminale, aussi appelée AF-2, contrôle la capacité des RAR à interagir avec les corégulateurs. L'analyse des structures cristallographiques des LBD sans ligand de RXR α et avec ligand de RAR γ (Bourguet et al., 1995; Renaud et al., 1995), a mis en exergue la flexibilité conformationnelle de H12 et a suggéré un mécanisme qui rend les RAR transcriptionnellement compétents (Egea et al., 2001; Steinmetz et al., 2001). En effet, lors de la fixation du ligand, une série d'interactions intramoléculaires provoque le positionnement de l'hélice H11 dans la continuité de H10 puis le pivotement de H12 suivant le modèle d'un piège à souris, refermant le «couvercle» du LBP, et se serrant contre H3 et H4. Par conséquent, la fixation du ligand est stabilisée, et une nouvelle fente hydrophobe se forme entre H3, H4 et H12, générant une surface d'interaction définie pour des coactivateurs de la transcription (Figure 11, précédemment).

En fait, ce modèle a été validé pour RAR α seulement. En effet, dans le cas des sous-types RAR β et RAR γ (Farboud et al., 2003; Farboud and Privalsky, 2004; Hauksdottir et al., 2003), les études biochimiques ont proposé que, même en l'absence de ligand, H12 interagirait avec H3 et adopterait une conformation fermée qui se rapprocherait de la conformation de RAR α -ligandé. L'importance de la H12 dans la régulation de la fixation des coactivateurs et corépresseurs est détaillée plus loin.

2.2.6- Le domaine N-terminal (NTD) ou AF-1

Les RAR ont également un domaine N-terminal (NTD) qui correspond aux régions A et B et referme la fonction de transactivation AF-1. Ce domaine est faiblement conservé d'un RAR à l'autre, et d'un RN à l'autre. La région A est fortement différente entre les différents sous-types de RAR et entre les isoformes (Chambon, 1996). En revanche, la région B est plutôt conservée.

Contrairement au DBD et au LBD, il n'y a toujours pas de structures à haute résolution disponibles pour le NTD de RAR. Plusieurs études biochimiques et structurales couplées à des algorithmes de prédiction des structures ont suggéré que le NTD des RAR, et des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires, sont de structure naturellement désordonnée (Lavery and McEwan, 2005; Wärnmark et al., 2003). Pourtant, les premières études ont mis en exergue l'importance du NTD des RAR et d'autres RN dans le contrôle de la transcription de leurs gènes cibles (Nagpal et al., 1993; Nagpal et al., 1992).

En effet, il est admis que des protéines ou des domaines non structurés peuvent être fonctionnels, subissant des transitions vers des structures secondaires ou tertiaires stables lors de la fixation à l'ADN ou à des protéines de corégulation (Dyson and Wright, 2005; Liu et al., 2006). En outre, les domaines désordonnés confèrent une flexibilité qui est nécessaire pour une modification par des enzymes telles que des kinases et des ubiquitine ligases (Dyson and Wright, 2005).

De manière intéressante, dans le cas des RAR, la région B présente un motif riche en proline (PRM, Proline Rich Motif) conservé entre les différents RAR (Figure 12). Un tel PRM peut adopter une structure en hélice et interagir avec des protéines à domaine SH3 (Src-homologie-3) ou à domaine WW (tryptophane-tryptophane) (Ball et al., 2005). De plus, ce PRM contient des serines dont la phosphorylation peut moduler l'association ou la dissociation de corégulateurs.

2.2.7- La région D ou "charnière"

Mal conservée, cette région sert de charnière flexible entre le DBD et le LBD. Cela permet la rotation du DBD. Par conséquent, il pourrait permettre aux RAR d'adopter différentes conformations selon l'élément de réponse où ils sont fixés (Rochel et al., 2011). Elle renferme également un signal de localisation nucléaire (NLS, Nuclear Localisation Signal) (Hamy et al., 1991; Hu et al., 2014).

2.2.8- La région F

Cette région s'étend de l'hélice H12 à la partie C-terminale des RAR. Elle est absente dans les RXR. Elle est très variable entre les différents sous-types de RAR et sa structure tridimensionnelle est encore inconnue. Fait intéressant, la région F est phosphorylée à de multiples positions (Bastien et al., 2000; Rochette-Egly et al., 1995). Bien que les fonctions de la région F soient encore mal connues, il a été suggéré que, en l'absence de ligand, cette région stabiliserait l'hélice H12 de RAR α dans une conformation non fermée, favorisant ainsi la fixation de corépresseur (Farboud and Privalsky, 2004). Cette région serait également capable de se lier à des motifs d'ARNm spécifiques (Poon and Chen, 2008).

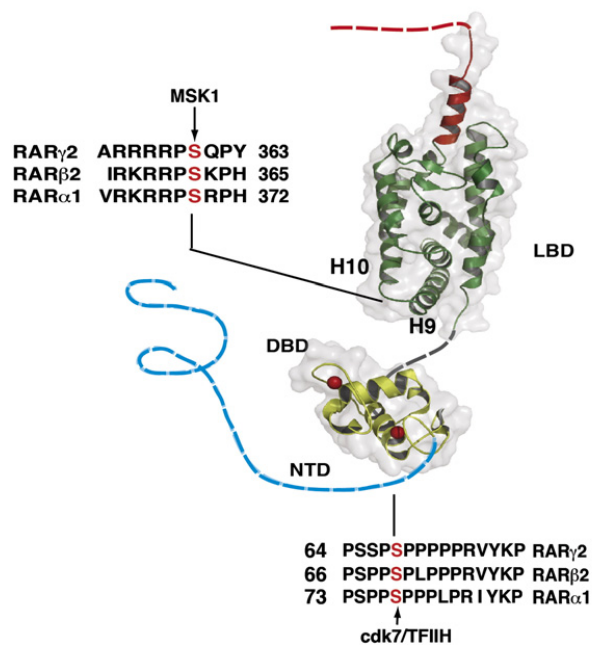


Figure 12. Les sites de phosphorylation des RAR. Les RAR renferment un site de phosphorylation au sein d'un motif riche en proline (PRM) dans leur domaine NTD (Rochette-Egly, 2015).

2.3-Modèle canonique de régulation de la transcription par les RAR : effets « génomiques »

Les RAR régulent la transcription de gènes cibles sous-forme d'hétérodimères avec un autre récepteur nucléaire de la même famille, le récepteur des rétinoïdes X (RXR) pour lequel il existe aussi trois sous-types : RXR α (NR2B1), RXR β (NR2B2) et RXR γ (NR2B3) (Germain et al., 2006b).

2.3.1- Les éléments de réponse spécifiques des RAR (RARE)

En réponse à l'AR, les hétérodimères RXR/RAR orientés de manière asymétriques se lient à des éléments de réponse spécifiques (RARE ou Retinoic Acid Response Element) localisés au niveau de séquences régulatrices des promoteurs des gènes cibles (Germain et al., 2003).

Un RARE "classique" est une répétition directe de motifs hexamériques du type PuG(G/T)TCA espacés par 1, 2 ou 5 paires de bases, respectivement nommés DR1, DR2 ou DR5 (Bastien and Rochette-Egly, 2004; Leid et al., 1992; Mangelsdorf et al., 1995) (Figure 13).

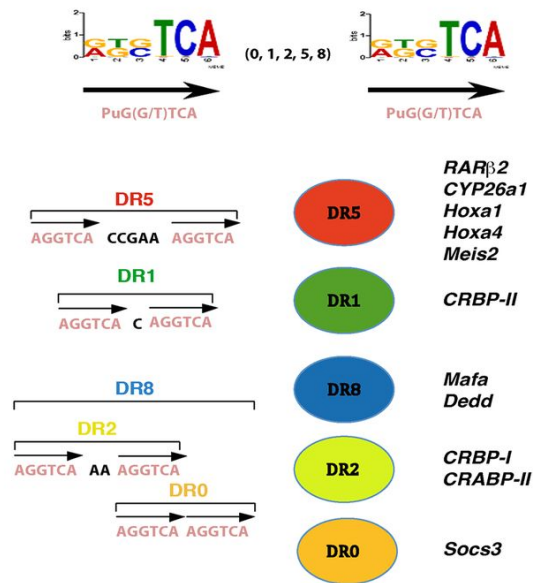


Figure 13. Les éléments de réponse RARE. Les RARE classiques sont composés de DR0, DR1, DR2, DR5. DR8 est un RARE composite constitué de la juxtaposition d'un DR2 et d'un DR0. Certains gènes-cibles associés sont montrés (Al Tanoury et al., 2013)

De tels RARE ont été identifiés dans les promoteurs d'une panoplie de gènes cibles impliqués dans une grande variété de fonctions des rétinoïdes. Depuis plusieurs années, on sait que les éléments DR5 classiques sont présents dans les promoteurs des gènes *RARβ2* (de The et al., 1990) et *CYP26A1* (cytochrome 450, family 26, subfamily a, polypeptide 1) (Loudig et al., 2000) et de plusieurs gènes *Hox* (Homeobox) (Dupe et al., 1997) et *HNF* (Hepatocyte Nuclear Factor) (Qian et al., 2000). Cependant, des études *in silico* récentes ont mis en évidence de nouveaux gènes associés aux éléments DR5 : *Meis2* et *Bhlhbe40* (Lalevée et al., 2011). Les éléments DR2 ont été identifiés dans les promoteurs des gènes *CRBPI* (Smith et al., 1991) et *CRABPII* (Durand and Raleigh, 1998). Un seul DR1 naturel fixant des homodimères RXR, a été trouvé au niveau du promoteur de *CRBPII* de rat (Mangelsdorf et al., 1990).

Finalement, des expériences récentes de ChIP-Seq ont révélé l'existence de nouvelles formes d'éléments de réponse naturels, DR0 et DR8. En fait, DR8 est un RARE composite constitué de la juxtaposition d'un DR2 et d'un DR0 (Delacroix et al., 2010; Moutier et al., 2012) (Figure 13). Et, des analyses de prévalence de fixation de l'hétérodimère RAR/RXR sur les éléments de réponses des gènes-cibles indique une plus forte affinité de RAR/RXR pour les DR (particulièrement DR0 et DR5) que pour IR3 (Inverted repeat 3) et ER2 (Everted repeat 2) (Chatagnon et al., 2015).

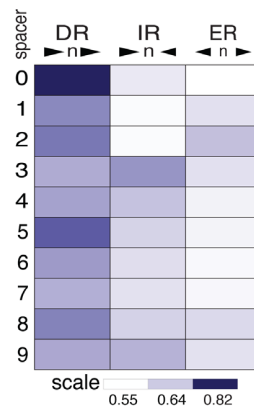


Figure 14. Prévalence de fixation de RAR/RXR sur les éléments de réponse RARE dans les régions cibles. (Chatagnon et al., 2015)

In vitro, sur des éléments DR2 et DR5, RXR occupe le motif 5'-hexamérique, tandis que le RAR partenaire occupe l'extrémité 3' du motif 5 (5'-RXR-RAR-3') (Chambon, 1996; Laudet and Gronemeyer, 2001). En revanche, sur les éléments DR1, la polarité est inversée, avec une fixation en amont du DBD de RAR et du DBD de RXR en aval (5'-RAR-RXR-3'). Par conséquent, dans ce dernier cas, les hétérodimères répriment l'expression des gènes cibles en présence de ligand (Figure 15).

Il n'est pas aisé de visualiser le complexe formé par l'hétérodimère entier RAR-RXR fixé sur l'ADN. Cependant, la structure cristallographique des DBD en complexe avec l'ADN a été résolue (Khorasanizadeh and Rastinejad, 2001; Rastinejad, 2001; Rastinejad et al., 2000). Chaque DBD interagit avec le sillon majeur de l'ADN au niveau d'un demi-site via la boîte P de la première hélice contenant trois résidus exposés responsables de la discrimination entre les séquences des différents demi-sites (Figure 9). Ensuite, ils s'organisent en tête-à-queue, avec des contacts de coopération entre les DBD, conduisant à un renforcement mutuel des interactions protéine-protéine et protéine-ADN. En fonction de l'espacement des DR, différentes régions du DBD de chaque récepteur sont utilisées pour créer l'interface de dimérisation, afin d'obtenir la liaison nécessaire pour des éléments de réponse. L'interface d'hétérodimérisation des DBD qui est responsable de la fixation des hétérodimères RAR-RXR sur un élément DR5 implique la boîte D du deuxième doigt de zinc de RXR, et la pointe du premier doigt de zinc de RAR. Cependant, lorsque les hétérodimères se fixent en polarité inverse sur un élément DR1, ils s'associent à travers le second doigt de zinc de RAR et la boîte T (dans le CTE de RXR). Cela implique que les DBD doivent avoir une flexibilité de rotation par rapport à l'interface de dimérisation du LBD et que la courbure de

l'ADN soit différent (Renaud and Moras*, 2000). En conclusion, les DBD de chaque partenaire d'hétérodimérisation dictent la spécificité de la reconnaissance du RARE et contribuent par leur dimérisation à accroître l'efficacité de la liaison d'ADN.

Récemment, l'architecture des hétérodimères RAR-RXR entiers (mais sans le NTD) et fixes à des RARE de type DR0, DR1 et DR5 a été résolue en solution (Rochel et al., 2011).

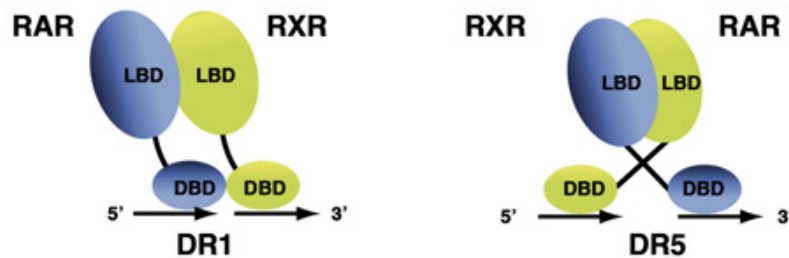


Figure 15. Différentes orientations de RAR/RXR en fonction de l'élément de réponse DR. Sur les éléments DR1, le motif 5'-hexamérique est occupé par RAR alors que sur un DR5 il est occupé par RXR. (Rochette-Egly, 2015)

2.3.2- Les multiples corégulateurs des RAR

Depuis des décennies, une pléthore de corégulateurs a été associée au modèle canonique d'activation de la transcription par les RAR (Dilworth and Chambon, 2001). Ce modèle repose sur les changements de conformation induits par le ligand qui entraînent le départ de corépresseurs, puis le recrutement de coactivateurs.

Les premiers corégulateurs qui ont été identifiés interagissent avec les RAR au niveau de la surface hydrophobique du LBD formée par les hélices H3 et H4 (Chambon, 1996; le Maire and Bourguet, 2014; Renaud and Moras*, 2000). Mais, récemment d'autres corégulateurs interagissant via d'autres surfaces du LBD ou via le NTD ont été identifiés (Al Tanoury et al., 2013).

Au niveau moléculaire, la discrimination entre corépresseur et coactivateur se fait en fonction de l'orientation de l'hélice H12 induite par le ligand qui influence la conformation de la surface d'interaction entre les hélices H3 et H4.

2.3.2.1-Les corépresseurs

En absence de ligand, la surface hydrophobique du sous-type RAR α peut fixer des corépresseurs tels que NCoR (Nuclear Receptor CoRepressor) (Horlein et al., 1995; le Maire and Bourguet, 2014) ou SMRT (Silencing Mediator of Retinoic

acid and Thyroid hormone receptor) (Chen et al., 1995), qui sont des paralogues génétiques. En réalité, SMRT serait le corépresseur favori des RAR.

Il existe plusieurs variantes de SMRT, issues d'un épissage alternatif. La majorité de ces variantes possède au moins deux domaines d'interaction RID (Receptor Interaction Domain), qui contiennent une boîte hélicoïdale alpha étendue avec un motif LxxI/HIxxxI/L (Perissi et al., 1999). Via un de ces domaines, SMRT s'incruste dans la rainure hydrophobe à la surface du LBD de RAR générée par H3 et H4. Selon des études structurales récentes, une interaction efficace exigerait également un feuillet- β -antiparallèle, formée par les résidus flanquant le RID du corépresseur en N-terminal et une conformation étendue de type brin- β de l'hélice H11 du récepteur (le Maire and Bourguet, 2014). La formation de ce feuillet démasquerait la rainure hydrophobe pour mettre la fixation du RID (Figure 16) (Bourguet et al., 2000a).

Coregulators binding

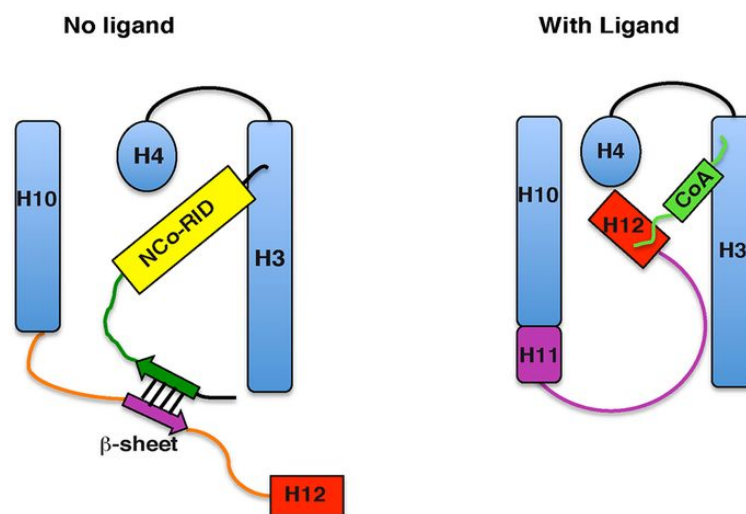


Figure 16. Schéma de recrutement des corégulateurs. (Al Tanoury et al., 2013)

Il a été longtemps admis que chacun des partenaires d'un hétérodimère RAR/RXR interagissait avec un RID différent d'un même corépresseur. Toutefois, selon des études récentes, il semblerait que SMRT serait recruté à l'hétérodimère uniquement via le partenaire RAR. En effet, la rainure hydrophobe de RXR serait masquée par son hélice H12 (Ghosh et al., 2002). En outre, SMRT ϵ (SMRT epsilon), la variante interagissant spécifiquement avec les RAR, présente un domaine RID

unique, excluant la possibilité d'une interaction avec le partenaire RXR (Mengeling et al., 2012). Cependant, on notera que les sous-types RAR γ et RAR β interagissent faiblement avec les corépresseurs (Farboud et al., 2003; Hauksdottir et al., 2003; Privalsky, 2004). Il a été proposé que, dans ces récepteurs, H3 interagisse avec H12, même en l'absence de ligand, obstruant ainsi le site d'ancrage du corépresseur (Figure 17).

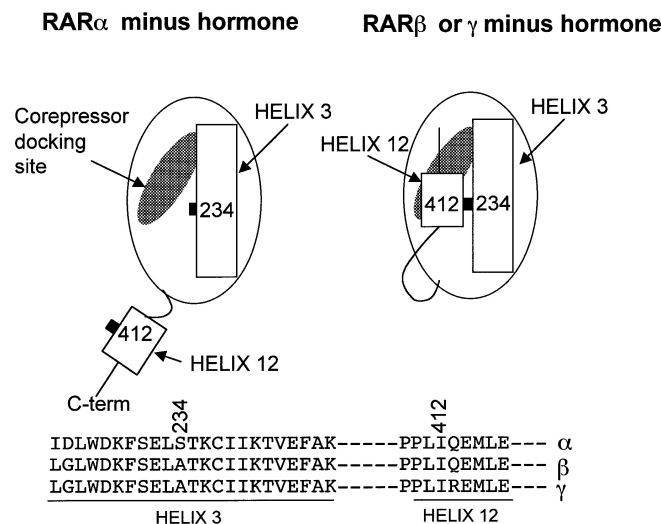


Figure 17. Modèle de fixation différente de SMRT sur les RAR. RAR α fixe efficacement le corépresseur en l'absence du ligand, contrairement à RAR β et RAR γ . Cette propriété est liée à la présence d'un résidu Ser234 dans l'hélice H3 de RAR α qui abroge l'interaction hydrophobe avec le résidu Ile412. Cela libère l'hélice H12 rendant le site de fixation accessible aux corépresseurs de RAR α (Privalsky, 2004)

2.3.2.2-Les coactivateurs « classiques »

Il a été montré qu'après fixation du ligand, RAR α se lie à des coactivateurs qui comprennent essentiellement la sous-famille des p160 : les coactivateurs des récepteurs stéroïdiens (SRC, Steroid Receptor Coactivator), à savoir, SRC-1 (également dénommé NCoA-1), SRC-2 (TIF-2, GRIP-1), et SRC-3 (pCIP, ACTR, ALB1, TRAM1, RAC3) (Lefebvre et al., 2005). Leur principale caractéristique est la présence de trois copies d'un motif LxxLL hautement conservé, qui forme une courte hélice- α . Grâce à l'un de ces motifs, les coactivateurs se lient à une surface qui est topologiquement semblable à celle impliquée dans l'interaction avec les corépresseurs mais qui comprend l'hélice H12, suite aux changements structuraux induits par la fixation de l'AR.

Lorsque AR est verrouillé dans la cavité de la poche du LBD par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes, il se produit un changement de structure

secondaire du brin- β en hélice- α (le Maire and Bourguet, 2014; le Maire et al., 2010). Cela induit le repositionnement de H11 dans la continuité de H10. Puis, le pivotement de l'hélice H12 suivant le modèle d'un "piège à souris", scelle le «couvercle» du LBP et s'immisce étroitement entre H3 et H4. La nouvelle fente hydrophobe formée entre H3, H4, H12 génère une surface d'interaction définie destinée aux coactivateurs p160 (Chambon, 1996; Rochette-Egly, 2015) (Figure 16). En effet, une "pince de charge" formée entre un résidu glutamate conservé dans H12 et une lysine H3 peut spécifiquement accrocher les extrémités d'une hélice de longueur précise spécifiée par le motif LxxLL des coactivateurs p160, permettant ainsi aux chaînes latérales de leucine de s'immiscer dans la cavité hydrophobe.

Ces coactivateurs servent de plateforme pour le recrutement d'autres protéines à activités enzymatiques multiples comme des histones acétyltransférases/déacétylases, des histones méthyltransférases/déméthylases, des ADN-dépendant ATPases et des ubiquitine- ligases/déubiquitinases qui vont remodeler et décompacter la structure de la chromatine autour du promoteur des gènes cibles, afin de permettre le recrutement de la machinerie transcriptionnelle qui comprend l'ARN Polymérase II et les facteurs généraux de transcription (Bastien and Rochette-Egly, 2004; Rochette-Egly and Germain, 2009).

2.3.2.3-Les autres corégulateurs

A l'état « ligandé », les RAR peuvent également recruter à la même surface d'autres corégulateurs non-conventionnels avec des motifs LxxLL, comme une sous-unité spécifique du Mediator, qui a été identifiée comme DRIP205 / TRAP220 (Lefebvre et al., 2005), la protéine de 140 kDa (RIP140 / NRIP1, Receptor Interacting Protein) (Hu et al., 2004), PRAME (Preferentially expressed Antigen in Melanoma) (Epping et al., 2005), TIF1 α /Trim24 (Transcription Intermediary Factor-1 alpha) (Le Douarin et al., 1995), et TRIP1/SUG-1 (Thyroid Receptor Interacting Protein-1) (vom Baur et al., 1996), qui est une sous-unité du sous-complexe de régulation du protéasome 19S avec une activité ATPase.

Plusieurs autres molécules se sont révélées interagir avec le LBD de RAR mais à travers d'autres interfaces. Parmi celles-ci, la cycline H, dont l'interaction avec le LBD implique L8-9 et le début de H9 (Bour et al., 2005a) (Figure 18), ce qui permet le recrutement de TFIIH (voir plus loin). Et CRABPII, en association avec la

cycline D3 (Despouy et al., 2003) sert de molécule qui guide l'AR au récepteur (Budhu and Noy, 2002; Delva et al., 1999)(voir ci-plus haut).

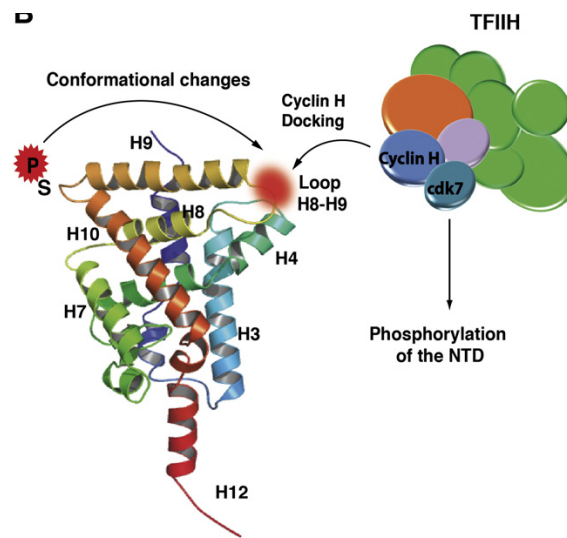


Figure 18. Cascade de phosphorylation des RAR par les kinases. MSK1 phosphoryle la sérine entre les hélices H9-H10. Cela facilite la fixation de la cycline H, sous -unité de TFIID, impliquant les loops L9-10 (Rochette-Egly, 2015).

Enfin, quelques protéines interagissant avec le NTD des RAR ont été récemment identifiées, parmi lesquels Acinus-S¹, une protéine nucléaire impliquée dans la condensation de la chromatine apoptotique et la maturation de l'ARNm, et HACE1 -HECT domain and ankyrin repeat-containing E3 ubiquitin-protein ligase- (Vucetic et al., 2008; Zhao et al., 2009).

Comme mentionné plus haut, la caractéristique intéressante du NTD des RAR (mais pas des RXR, ni des autres récepteurs nucléaires) est la présence d'un motif riche en proline (PRM), qui contient des sites de phosphorylation (Piskunov et al., 2014; Rochette-Egly, 2015). Ces PRM lient les protéines avec un domaine SH3 ou WW, la phosphorylation empêchant ou favorisant l'interaction (Macias et al., 2002; Zarrinpar et al., 2003). Conformément à cela, il a été montré que le PRM phosphorylé de RAR α interagit avec Pin1 (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase never in mitosis A (NIMA)-interacting 1) (Brondani et al., 2005; Gianni et al., 2009; Zarrinpar and Lim, 2000), une protéine contenant un domaine WW.

En revanche, d'après une étude récente réalisée dans notre laboratoire, le PRM non phosphorylé de RAR γ interagit avec la vinexin β (Bour et al., 2005b), un adaptateur, caractérisé par la présence de trois domaines SH3. En fait, la vinexin β

se dissocie lors de la phosphorylation du PRM de RAR γ (Lalévée et al., 2010)(voir plus loin).

2.3.3- Le modèle canonique de la régulation de la transcription par les RAR

2.3.3.1-Absence de ligand : Transcription “inactivée”

D'après le modèle de la régulation des gènes par les RAR/RXR selon Dilworth et Chambon (Dilworth and Chambon, 2001), en absence de ligand, le sous-type RAR α lié à l'ADN est associé aux corépresseurs qui servent d'adaptateurs pour le recrutement de complexes de haut poids moléculaire possédant une activité histone déacétylase (HDAC) (Perissi et al., 2010). Ces complexes déacétylent les résidus lysine au niveau des queues N-terminales des histones et maintiennent la chromatine au niveau des promoteurs des gènes-cible dans un état condensé ou réprimé (Dilworth and Chambon, 2001; Rosenfeld et al., 2006) (Fig. 4A de Ziad JLR 2013). Les complexes corépresseurs contiennent également d'autres composants, tels que TBL1 (transducine β -like 1) et TBLR1 (TBL1-related protein 1), qui servent d'adaptateurs régulant l'assemblage et la fonction des corépresseurs (Perissi et al., 2004; Perissi et al., 2010).

On notera que la répression de la transcription en l'absence d'AR implique également un grand nombre d'autres protéines qui forment des complexes avec les hétérodimères RAR/RXR et se lient à des régions spécifiques de l'ADN. A titre d'exemple, la répression implique les interactions avec les protéines du groupe Polycomb (PcG) (Gillespie and Gudas, 2007) et la protéine Ajuba qui contient plusieurs domaines LIM (Hou et al., 2010). Ces protéines se dissocient après addition de AR par l'intermédiaire d'un mécanisme encore mal défini (Figure 19A).

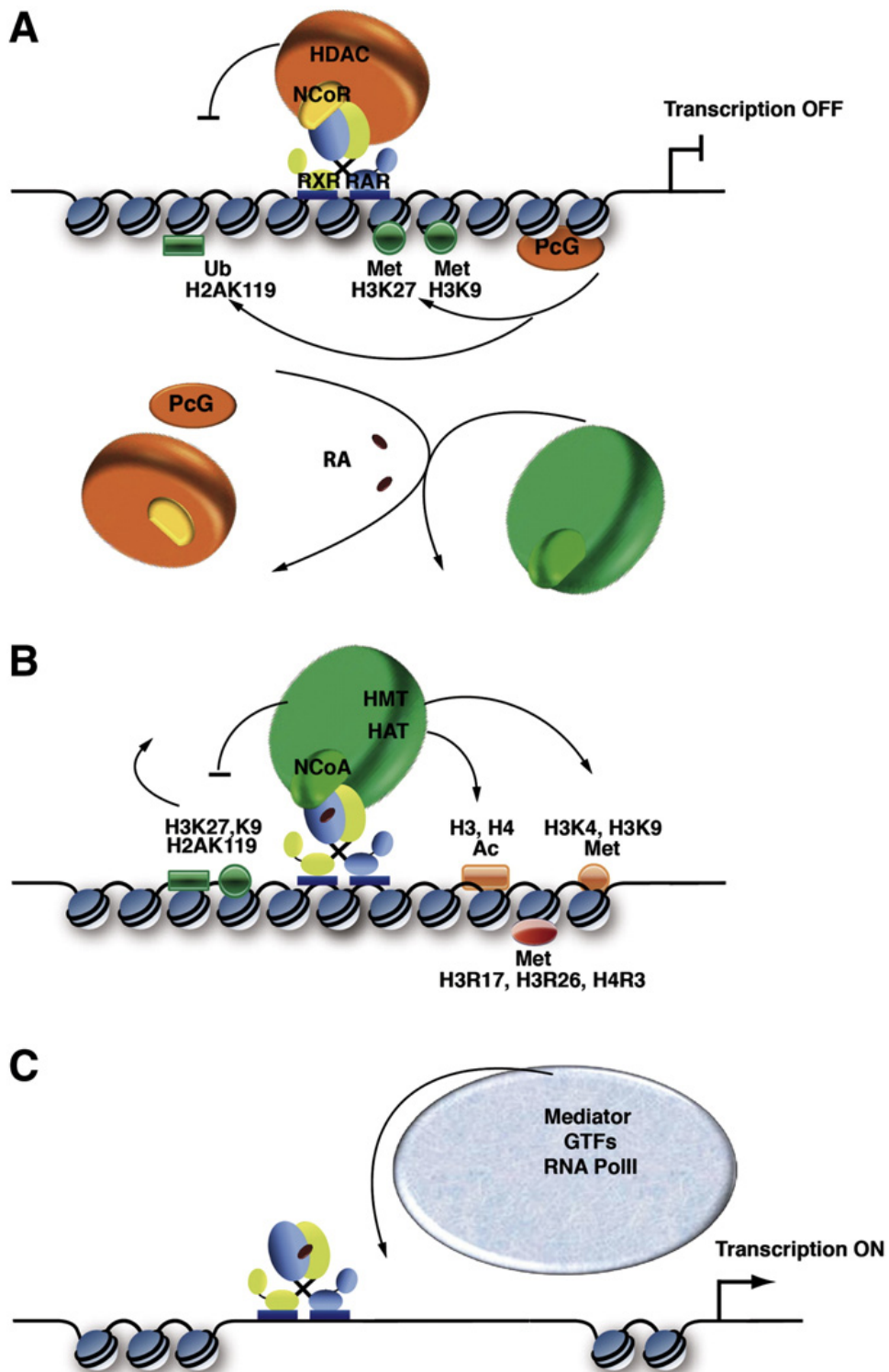


Figure 19. Modèle canonique de régulation de la transcription par l'hétérodimère RAR-RXR. **A.** En l'absence du ligand (RA), RAR-RXR fixé à l'ADN maintient la chromatine dans un état réprimé compacté grâce au recrutement de corépresseurs (NCoR1 et NCoR2), qui fonctionnent comme une plateforme de recrutement des sous-complexes avec une activité histone déacétylase (HDAC). Les histones qui entourent le RARE sont également méthylées et ubiquitinées par les protéines du groupe polycomb (PcG). **B.** En présence du ligand (RA), les corépresseurs se dissocient. Les RAR s'associent aux coactivateurs (NCoA1, 2, 3) qui permettent la fixation des histones acétyl/méthyltransférases (HAT/HMT) qui enlève la répression. **C.** Le remodelage de la chromatine permet sa décompaction, le recrutement de la machinerie transcriptionnelle (Mediator, RNA Pol II et les facteurs généraux de transcription, GTF) au niveau du promoteur, et l'initiation de la transcription (Rochette-Egly, 2015)

2.3.3.2-Présence de ligand : Transcription "activée"

Selon des expériences récentes de CHIP-seq, l'occupation des RARE augmente en réponse à l'ajout de RA (Biddie et al., 2010; Bruck et al., 2009; Chatagnon et al., 2015). En général, il y a une corrélation significative entre l'activation de la transcription et la fixation des hétérodimères sur l'ADN (Mendoza-Parra et al., 2011). Mais comment RA favorise le recrutement de RAR/RXR à l'ADN reste encore à explorer.

Néanmoins, lors de la liaison du ligand, RAR α subit des changements conformationnels qui provoquent le départ des corépresseurs et la liaison des coactivateurs (Figure 19B).

Selon des études récentes (Brélivet et al., 2012; Osz et al., 2012), une seule molécule de coactivateur serait recrutée par l'hétérodimère via le partenaire RAR. De plus, l'architecture des hétérodimères liés à l'ADN oriente le coactivateur d'un côté de l'ADN opposé au LBD et DBD du RXR afin qu'il puisse atteindre les queues d'histones. Cela soulève la question de savoir comment le RXR partenaire participe à l'activité transcriptionnelle des hétérodimères en plus d'augmenter l'efficacité de fixation de l'ADN (Leid et al., 1992). Cette question suscite beaucoup d'intérêt, même si un certain nombre d'études soutient que RXR est subordonné à son partenaire RAR, qui est en effet le partenaire «actif» (Germain et al., 2002).

Ensuite, les coactivateurs initient et lancent le recrutement ordonné et coordonné de grands complexes avec différentes activités enzymatiques, comme les HAT (Histone acétyltransférases), les HMT (Histone méthyltransférases), les HDM (Histone déméthylases) et des ATPases ADN-dépendantes (Glass and Rosenfeld, 2000; Perissi et al., 2010; Rosenfeld et al., 2006) (Figure 19B). Tous ces complexes modifient la structure de la chromatine entourant le promoteur des gènes cibles et créent des balises ou des sites de liaison qui forment un "code histone" lu par des effecteurs particuliers, qui à leur tour conduisent à d'autres modifications (Sims and Reinberg, 2008). La plupart du temps, ces marques sur la chromatine fonctionnent d'une manière combinée. En effet, le code histone coordonne le recrutement d'autres HAT, HMT ou HDM qui vont décompacter davantage la chromatine. Il orchestre également le recrutement de remodeleurs de la chromatine, qui utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour repositionner les nucléosomes en les transformant en *cis* ou en *trans*, permettant la formation de régions sans

nucléosides ou de régions contenant des espaces entre les nucléosomes au niveau du promoteur. D'autres études montrent que le remodelage optimal de la chromatine au niveau des gènes cibles de AR exige également le recrutement par RXR/RXR de complexes de PARP-1 (poly (ADP-ribose) polymerase) (Pavri et al., 2005) et de PARG (poly (ADP-ribose) glycohydrolase) (Le May et al., 2012).

Ensuite, les RAR activés recrutent la machinerie de la transcription, incluant le complexe multimérique Mediator, l'ARN polymérase II, et les facteurs généraux de la transcription (Dilworth and Chambon, 2001; Rosenfeld et al., 2006) (Figure 19C). Des études récentes ont démontré que la machinerie transcriptionnelle s'assemble de manière séquentielle avec les facteurs NER (Nucleotide Excision Repair) au niveau du promoteur pour réaliser les modifications des histones optimales et ainsi une synthèse de l'ARN efficace (Le May et al., 2010). Une transcription optimale implique également d'autres protéines qui forment des complexes avec les hétérodimères RAR/RXR et se fixent à des régions spécifiques de l'ADN, comme la protéine à doigt de zinc ZNFP423 (Huang et al., 2009), FOXA1 et Gata3 (Hua et al., 2009; Ross-Innes et al., 2010). Enfin, selon les expériences récentes de capture de la conformation de la chromatine, lorsqu'ils sont liés à plusieurs RARE d'un même gène, les RAR peuvent former des boucles (Bruck et al., 2009). Un point de vue émergent est que les RAR, comme d'autres facteurs de transcription, créeraient à grande échelle des boucles dans la chromatine, reliant des loci génomiques situés même sur des chromosomes différents, créant ainsi des points chauds de la transcription (Rudan et al.; Schoenfelder et al., 2010).

2.3.3.3-La fin de la transcription : rôle du protéasome.

D'après un certain nombre d'études, à la fin de la transcription, les RAR ligandés recruteraient des corégulateurs non-conventionnels avec des motifs LxxLL, tels que RIP140 et PRAME (Al Tanoury et al., 2013). Contrairement aux corégulateurs p160 classiques, PRAME et RIP140 inhibent l'activité transcriptionnelle des RAR via le recrutement d'HDAC (Wei et al., 2000) et de protéines PcG (Gillespie and Gudas, 2007), respectivement. Il a été suggéré qu'ils constitueraient un mécanisme de rétroaction négative fonctionnelle limitant et/ou de mise fin à l'activité de RAR. TIF1 α inhibe également la transcription régulée par RAR α (Khetchoumian et al., 2007), mais via un mécanisme qui n'a pas encore été élucidé.

Les RAR sont également dégradés par le système ubiquitine-protéasome, via le recrutement de TRIP1/SUG-1, qui est une sous-unité 19S du sous-complexe de régulation du protéasome avec une activité ATPase (Ferry et al., 2009; Gianni et al., 2002; Kopf et al., 2000). Il a été proposé que, comme pour la plupart des "activateurs" de la transcription, cette dégradation fournisse un moyen efficace de limiter la fonction des RAR et/ou de signaler la fin du processus de transcription (Tansey, 2001).

Chapitre 3- NOUVEAUX CONCEPTS : LA VITAMINE A EST ACTIVE *PER SE* ET LES RAR ONT DES EFFETS EXTRANUCLEAIRES

3.1-Le rétinol est actif via le récepteur membranaire Stra6

La vitamine A sous-forme de rétinol est une molécule hydrophobe. De part cette nature, pour atteindre les cellules-cibles, elle circule dans le plasma grâce à une protéine de transport, le RBP (Retinol binding protein). Dans la majorité des tissus, le rétinol rentre dans la cellule par diffusion. Dans d'autres cas comme celui de l'œil, l'absorption du rétinol met en jeu une protéine membranaire, appelée STRA6, qui reconnaît le complexe rétinol:RBP ou holo-RBP (cf. Paragraphe sur le métabolisme).

Cependant, des études récentes ont révélé que STRA6 est aussi un récepteur membranaire de signalisation qui peut être activé par holo-RBP. En effet, la fixation de holo-RBP sur STRA6 active la voie de signalisation JAK/STAT induisant la transcription d'une nouvelle panoplie de gènes distincts des gènes cibles classiques des RAR. En effet, ces gènes sont plutôt impliqués dans la régulation du métabolisme et la réponse à l'insuline (Berry and Noy, 2009)(Figure 20).

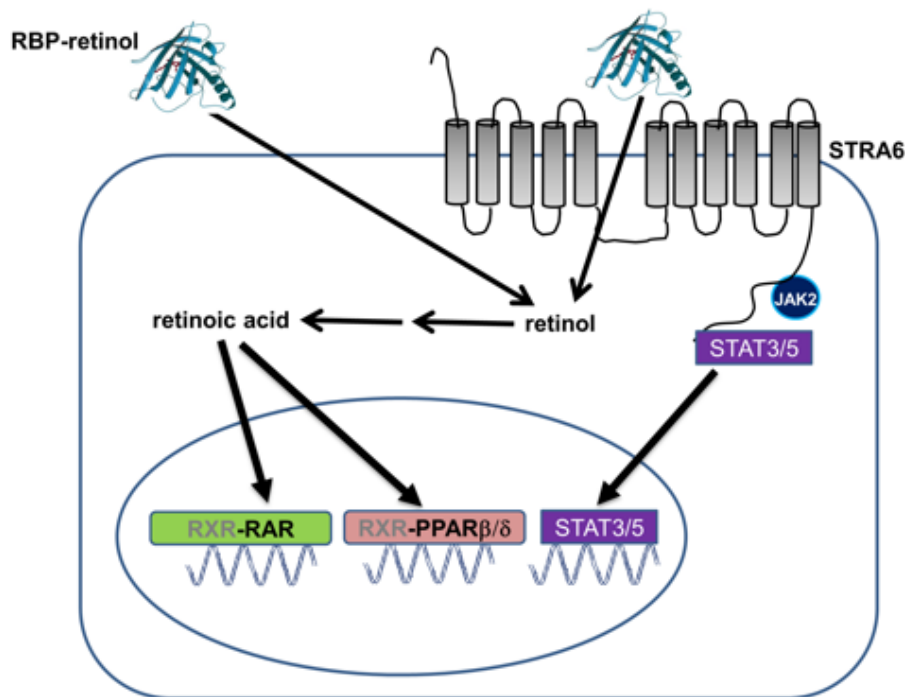


Figure 20. Le rétinol :RBP active la voie de signalisation JAK/STAT et une nouvelle panoplie de gènes (Noa Noy, sous-presse)

3.2-Les RAR ont des effets extranucléaires et non-transcriptionnels : Activation de kinases

Récemment, le laboratoire du Dr Rochette-Egly a montré que l'acide rétinoïque et les RAR induisent l'activation rapide de la voie p38MAPK/MSK1 (Bruck et al., 2009) via un mécanisme non-transcriptionnel et extranucléaire. En effet, ces effets mettent en jeu une fraction de RAR α présente dans la membrane cytoplasmique au niveau des radeaux lipidiques ou « Lipid rafts » (Figure 21A). Ces radeaux lipidiques sont des microdomaines enrichis non seulement en cholestérol et en sphingolipides, mais aussi en protéines impliquées dans les voies de signalisation, telles que les flotillines/reggie, les récepteurs couplés aux protéines G, les protéines G (α , β et γ), les Rho et Rac GTPases et leurs effecteurs. L'équipe a montré que le sous-type RAR α est présent dans ces radeaux lipidiques où il interagit avec la protéine G α_q (Figure 21A) en réponse à l'AR pour activer les Rho/Rock GTPases, et finalement la p38MAPK (Piskunov and Rochette-Egly, 2012).

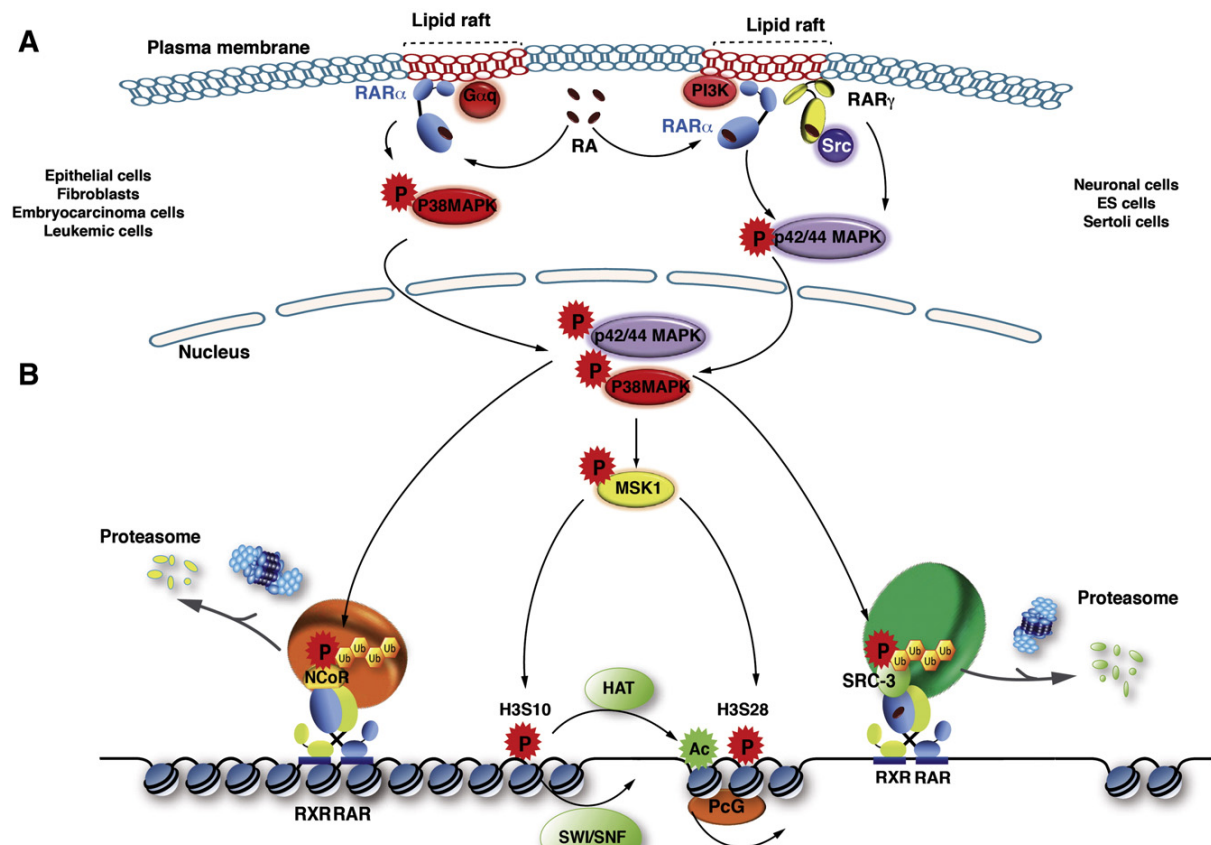


Figure 21. Une fraction de RAR accrochée aux radeaux lipidiques membranaires active des cascades de kinases. En réponse au ligand (RA), ces RAR extranucléaires activent des cascades de kinases (p38MAPK dans les cellules épithéliales et les fibroblastes, p42/44MAPK dans les cellules neuronales, cellules ES et les cellules de Sertoli) qui vont migrer dans le noyau et phosphoryler plusieurs cibles : RAR et corégulateurs. Après avoir joué leur rôle, les RAR et leur corégulateur sont dégradés par le protéasome (Rochette-Egly, 2015).

3.3-Les kinases activées en dehors du noyau participent à l'activité transcriptionnelle des RAR dans le noyau

La p38MAPK activée par l'AR migre dans le noyau où elle phosphoryle des cibles diverses. Le laboratoire a montré que dans le noyau, la p38MAPK phosphoryle le coactivateur SRC3, régulant ainsi sa dissociation de RAR α puis sa dégradation par le protéasome (Ferry et al., 2011).

P38MAPK phosphoryle aussi une autre kinase, MSK1 qui va phosphoryler les histones et les RAR eux-mêmes (Figure 21B). En effet, MSK1 est recrutée au niveau de la chromatine et phosphoryle les histones H3 au niveau des serine S10 et S28. Ce processus participe au remodelage de la chromatine pour préparer le recrutement des RAR et de la machinerie transcriptionnelle (MSK1 induit aussi une cascade de phosphorylations ciblant les RAR) (Bruck et al., 2009). En effet, MSK1 phosphoryle le LBD de RAR α au niveau de la sérine S369 localisée dans la boucle L9-10 (Bruck et al., 2009). Cette phosphorylation induit des changements conformationnels subtils de la boucle voisine L8-9 (Chebaro et al., 2013; Samarut et al., 2011) qui vont permettre la fixation de la cycline H, sous-unité régulatrice de la kinase cdk7 qui appartient au facteur général de transcription TFIIH. D'où le bon positionnement de cdk7 qui va phosphoryler la sérine S77 localisée dans le PRM du NTD (Bour et al., 2005a).

In fine, cette cascade de phosphorylations est indispensable à l'activité transcriptionnelle optimale de RAR α (Bruck et al., 2009).

Des travaux récents du laboratoire ont également montré dans le cas de RAR γ que la phosphorylation du NTD induit la dissociation de la vinexine β (Lalévée et al., 2010). Cette dissociation dépendante de la phosphorylation est indispensable au recrutement de RAR γ au niveau de certains promoteurs et à l'expression de gènes impliqués dans la différenciation neuronale des cellules souches embryonnaires de souris (Al Tanoury et al., 2014).

3.4-RAR α interagit dans le cytoplasme avec la profiline 2a

Comme mentionné plus haut, les motifs riches en prolines (PRM) ont la capacité d'interagir avec des protéines à domaines de type SH3 ou riches en tryptophane de manière phosphodépendante ou non (Freund et al., 2008). Le laboratoire a montré que le PRM de RAR γ interagit avec la vinexine β qui réprime

l'activité transcriptionnelle du récepteur en séquestrant la forme non phosphorylée en dehors de la chromatine. Suite à la phosphorylation de RAR γ , la vinexine β se dissocie, permettant le recrutement du récepteur au niveau des promoteurs des gènes cibles et l'initiation de la transcription (Lalevée et al., 2010).

Récemment, le laboratoire a identifié un nouveau partenaire du PRM de RAR α . Il s'agit de la profiline 2a, une protéine avec un domaine SH3-like qui fixe l'actine et régule la dynamique du cytosquelette, le trafic membranaire et le transport nucléaire (Jockusch et al., 2007). Cette protéine est essentiellement présente dans le cytoplasme des cellules neuronales (Birbach, 2008; Murk et al., 2009; Murk et al., 2012) et des fibroblastes. Cette découverte nous a permis de montrer que RAR α est présent dans le cytoplasme de ces cellules et contrôle leur adhésion via un mécanisme non-transcriptionnel.

Chapitre 4- LA POLYMERISATION DES FILAMENTS D'ACTINE : ROLE DE LA PROFILINE

Les filaments d'actine contrôlent la formation d'une grande variété de structures subcellulaires ainsi que de nombreux processus cellulaires comme la polarité, la morphogénèse, l'endocytose, la phagocytose et le mouvement (migration, contraction, adhésion et protrusion). Le mouvement d'une cellule est le résultat d'extensions à l'avant de la cellule (filopodes puis lamellipodes) qui adhèrent ensuite au substrat, de la dé-adhérence de l'arrière de la cellule et de la contraction de la cellule pour déplacer le corps de la cellule vers l'avant (Figure 22). Les filopodes et lamellipodes guident la motilité tandis que les structures contractiles (arcs transversaux et fibres de tension ventrales ancrées aux adhérences focales) assurent l'intégrité mécanique et un mouvement cohérent de la cellule dans son ensemble (Ananthakrishnan and Ehrlicher, 2007).

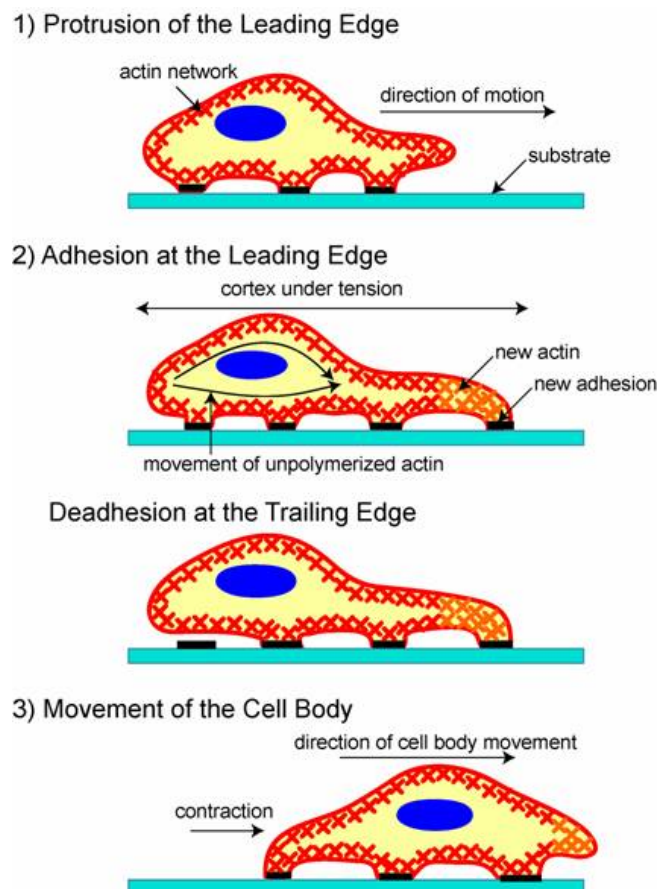


Figure 22. Principe du mouvement de la cellule (Ananthakrishnan and Ehrlicher, 2007)

Les filaments d'actine sont des acteurs clef et dynamiques de ces processus. Ils se polymérisent et se démontent, s'associent en réseaux ou faisceaux avec d'autres molécules ou aux membranes. La polymérisation de l'actine s'effectue en 3 étapes : nucléation, élongation et démantèlement.

4.1-L'actine

L'actine est la protéine la plus abondante (5% au moins de la masse protéique totale). Il s'agit d'une protéine de 42 kDa, très conservée entre les espèces (Lee et al., 2015). C'est un constituant essentiel du cytosquelette des cellules eucaryotes, ainsi que des fibres musculaires.

Chez les mammifères, il existe 6 sous-types d'actine : trois isoformes d'actine- α , une isoforme d'actine- β et deux isoformes d'actine- γ . Les actine- α et une forme d'actine- γ sont présentes essentiellement dans les cellules musculaires (muscle strié et muscle lisse). Par contre, l'autre actine- γ et l'actine- β ne sont pas musculaires. Les différentes actines présentent plus de 90% d'identité dans leur séquence en acides aminés, la partie variable concernant les 30 acides aminés de l'extrémité N-terminale (sur un total de 375 résidus, soit 8% de variabilité).

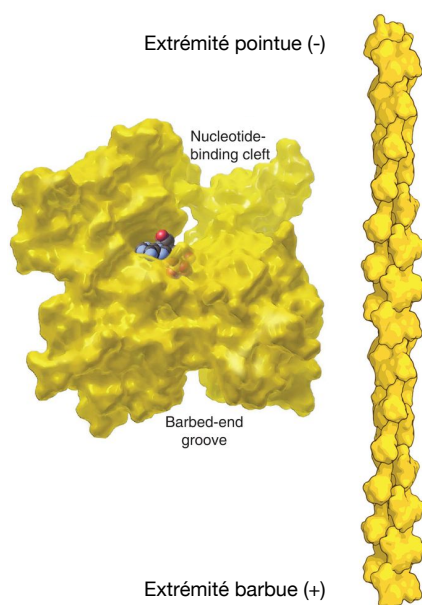


Figure 23. Structure de l'actine et d'un filament d'actine. La molécule d'actine fixe une molécule d'ATP vers son extrémité pointue (-) et présente un sillon à son extrémité barbue (+). Le filament d'actine montre son extrémité pointue et barbue (Pollard, 2016)

4.2-Les filaments d'actine

Dans la cellule, l'actine est présente sous-forme soit monomérique (actine-G), soit polymérisée en filament (actine-F). Les filaments d'actine forment une double hélice serrée de 5-9 nm de diamètre, flexible et polarisée.

Les monomères d'actine fixent l'ATP au niveau d'une cavité centrale (Figure 23) en présence de cations divalents (calcium ou magnésium) (Pollard, 2016).

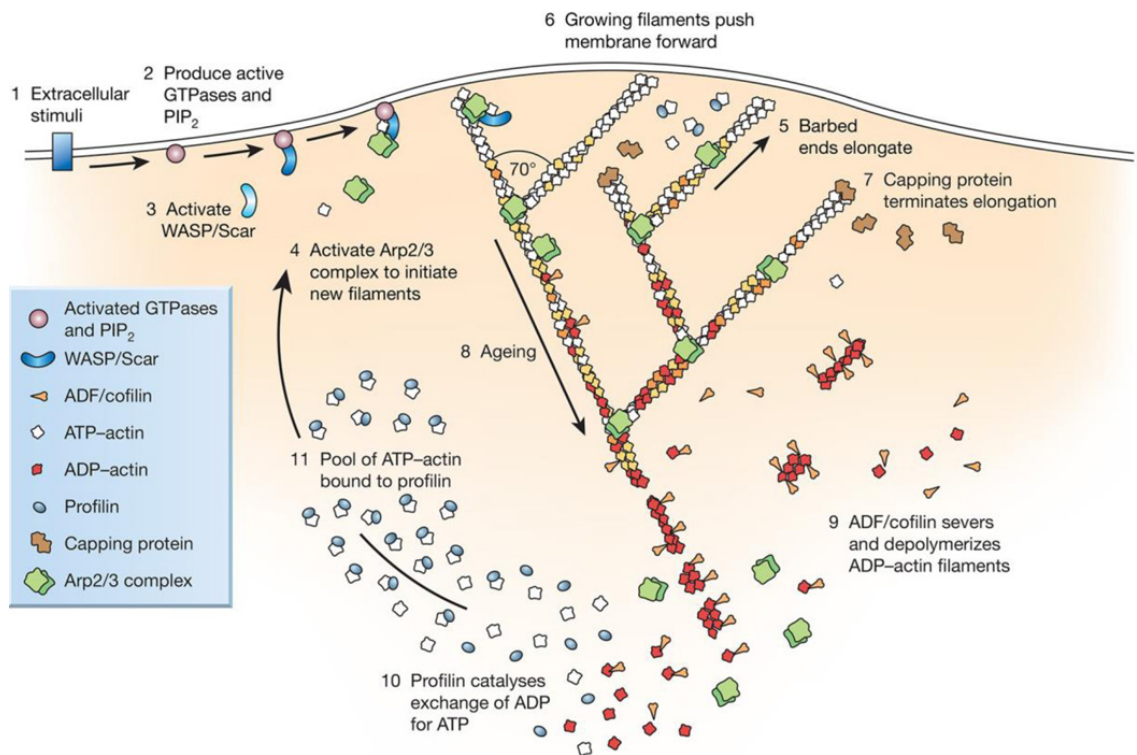


Figure 24. Nucléation dendritique/ Modèle de tapis roulant dans les réseaux. L'assemblage de filaments d'actine est contrôlé par un ensemble de protéines qui s'y lie. La polymérisation de l'actine à l'extrémité barbue commence avec la stimulation de l'intégrine qui conduit au décoiffage de cette extrémité et à l'initiation de l'allongement du filament médié par Arp2/3. De nouveaux filaments sont polymérisés à partir des filaments existants à un angle de 70 ° degrés menant à un réseau ramifié de filaments d'actine. À l'extrémité pointue, l'actine-F est démontée par la cofiline et la profiline catalyse la conversion de l'ADP-actine en ATP-actine. (Huda et al., 2014)

La polymérisation s'amorce par une phase de nucléation, où sont formés majoritairement des dimères et des trimères. Cette étape limitante, non spontanée nécessite des facteurs de nucléation qui stabilisent les petits oligomères. Puis, le filament s'allonge par assemblage d'autres monomères de manière polarisée. En effet, la croissance du filament est très rapide (1000

actines/s) au pôle (+), appelé extrémité barbue, et très lente, voire absente, au pôle moins (-) ou extrémité pointue. Puis, dans un filament « vieillissant », l'ATP est hydrolysé en ADP et le phosphate se dissocie. A l'aide de protéines de démontage (severing proteins), le filament subit des changements de conformation et les molécules d'actine liées à l'ADP se détachent aux extrémités pointues (-) des filaments. Les monomères d'actine ainsi libérés sont alors rechargés en ATP avant de rejoindre le filament aux extrémités barbues (+). Cette propriété est à l'origine du phénomène dit de « tapis roulant » (anglais : treadmilling) (Figure 24) (Baum et al., 2006; Cingolani and Goda, 2008; Huda et al., 2014; Krause and Gautreau, 2014).

4.3-Architecture des filaments d'actine

Au sein de la cellule, les filaments d'actine s'associent en faisceaux ou en réseaux grâce à des protéines de réticulation et s'organisent avec des architectures différentes (Blanchoin et al., 2014) (Figure 25) :

- faisceaux parallèles avec leurs extrémités barbues orientées dans la même direction, la plupart du temps contre la membrane cellulaire. Ce type de structure est caractéristique des filopodes.

- faisceaux antiparallèles. Ces faisceaux forment les fibres de tension impliquées dans les interactions cellule/cellule et dans l'adhésion cellule-matrice. Ils sont associés à la myosine et forment des réseaux contractiles.

- réseaux d'actine réticulée. Les filaments d'actine forment des mailles avec des interconnexions orthogonales de façon parallèle, antiparallèle, ou mixte, en fonction des protéines de liaison. Ces réseaux sont impliqués dans le contrôle de la forme des cellules et de leur intégrité mécanique. On les retrouve dans les lamellipodes et le cortex cellulaire

- réseaux d'actine ramifiée. Ils sont présents dans les lamellipodes et génèrent des forces qui contrôlent les changements de forme et les mouvements des cellules.

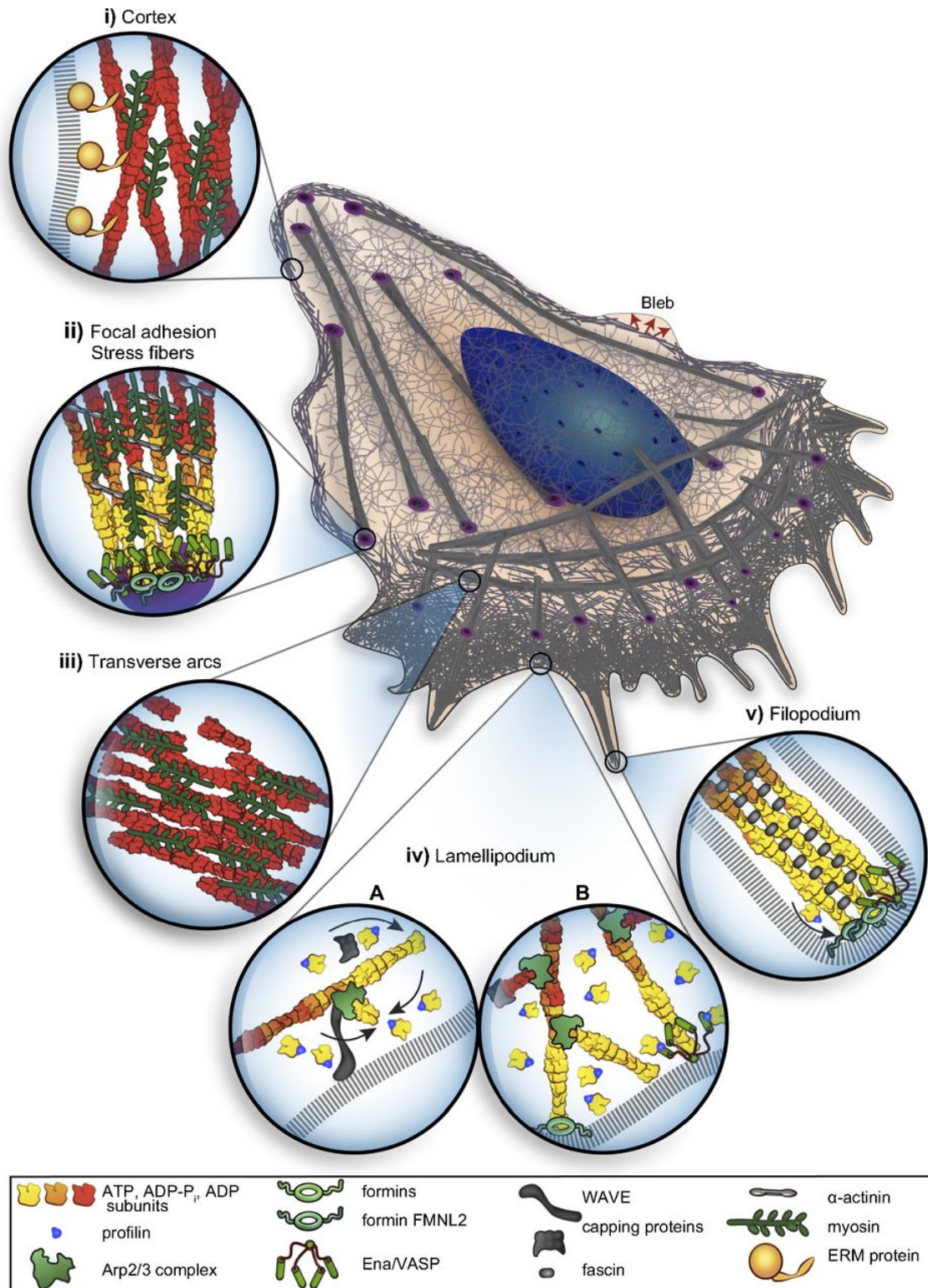


Figure 25. Les organisations spécialisées d'actine *in vivo*. i) Le cortex d'actine est ancré à la membrane plasmique par l'intermédiaire des protéines ERM ii) Les fibres de stress le long du corps de la cellule, orientés parallèlement à la direction du mouvement sont attachés aux adhérences focales et impliquent un ensemble spécifique de facteurs régulateurs intracellulaires, parmi lesquels les protéines Ena/VASP, la β -actinine et la myosine. iii) Les arcs transversaux sont des formations de filaments d'actine antiparallèles spécifiques trouvées à l'arrière du lamellipode. Ces structures sont contractiles par l'activité de la myosine. iv) L'organelle moteur, le lamellipode, est la scène d'une polymérisation rapide, massive et localisée de réseaux d'actine ramifiés impliquant les complexes Arp2/3 et les nucléateurs WAVE. L'allongement du réseau se produit par addition du complexe profiline-actine (flèches noires) aux extrémités barbues en contact avec la membrane plasmique. B: Les protéines Ena/VASP, les formins FMNL2 et les protéines de coiffage contrôlent l'allongement du réseau en modulant la dynamique au niveau des extrémités barbues (zoom à droite). Ena/VASP et FMNL2 favorisent l'allongement des extrémités des barbues alors que les protéines de coiffage le bloquent. v) Les organelles capteurs, les filopodes, sont constitués de faisceaux d'actine parallèles allongés par Ena/VASP, les formins, et la fascine. Un autre type de protrusion du bord d'attaque sont les bulles, initialement formées sans cytosquelette (flèches brunes) (Blanchoin et al., 2014)

4.4-Les protéines fixatrices de l'actine

Dans la cellule, la polymérisation de l'actine est contrôlée par une panoplie de protéines. Certaines de ces protéines se fixent à l'actine-G pour maintenir le pool de monomères d'actine (profiline, thymosine β -4) ou pour initier la formation de dimères ou de trimères d'actine. D'autres se fixent à l'actine-F pour allonger les filaments (formines, Ena/VASP, Arp2/3), terminer l'élongation (protéine de coiffe), les démanteler (cofiline, gelsoline) ou pour les réticuler (α -actinine, fascine, filamine).

4.4.1- La thymosine- β 4 : Protéine de séquestration de l'actine monomérique

Chez les mammifères, la principale protéine qui fixe les monomères d'actine est la thymosine- β 4. Il s'agit d'une petite protéine de 43 résidus, très abondante. Via deux hélices, elle interagit avec les extrémités (+) et (-) de l'actine. En raison de son abondance, elle séquestre la majorité de l'actine monomérique, l'empêchant ainsi de s'engager dans tout mécanisme de polymérisation (Pollard, 2016).

4.4.2- Protéines à domaines WH2 (WASP-homology 2)

Cette famille comprend les protéines appelées spire 1 et 2, cordon bleu (Cobl), la famille leiomodine (Lmod1, 2, 3 essentiellement musculaires) qui renferment 1 à 4 domaines WH2 en tandem (Campellone and Welch, 2010; Dominguez, 2016) (Figure 26). Ce domaine correspond à la séquence consensus LKKV. Elles fixent les monomères d'actine-G et, *in vitro*, elles permettent la formation d'un « noyau » composé de dimères ou de trimères d'actine servant d'amorce à l'élongation des filaments. En fait, dans les conditions physiologiques, ces protéines ne seraient pas impliquées dans la nucléation, mais séquestreeraient l'actine G, ou agiraient en association avec d'autres protéines pour l'élongation (voir plus loin) ou le démontage.

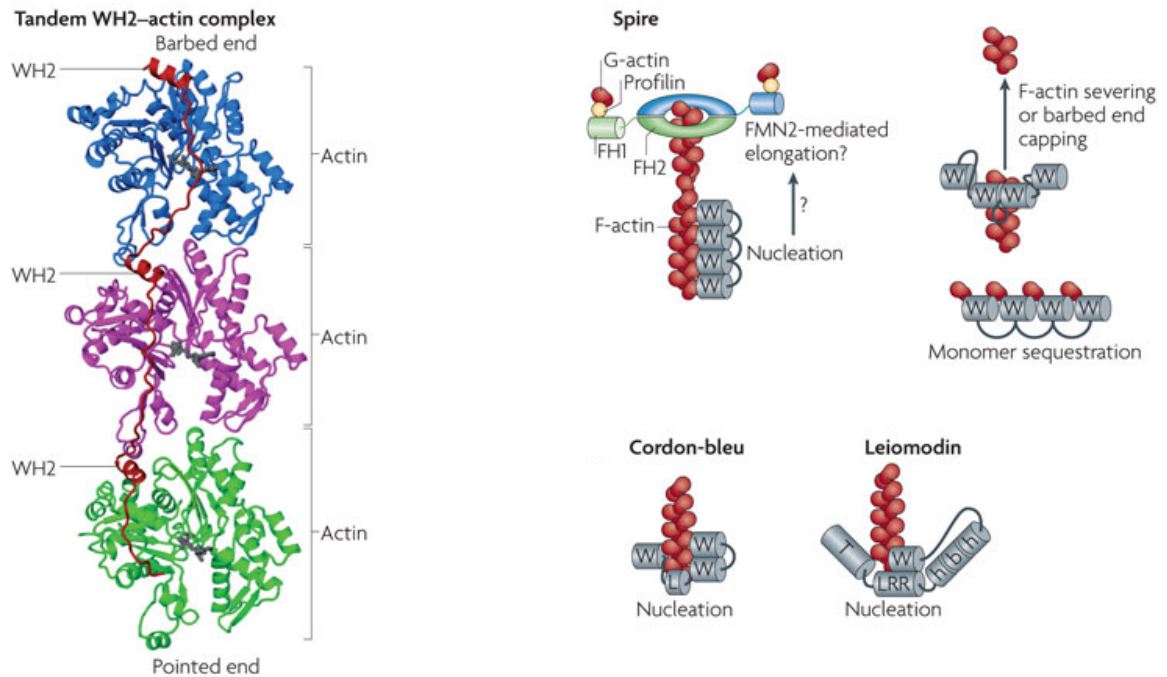


Figure 26. Protéines à domaines WH2 et les modèles de polymérisation. a. Les membres de la famille Spire, cordon-bleu (COBL), et léiomodine utilisent les domaines d'homologie WH2 (W) pour assembler des filaments d'actine non-ramifiés (visible en b). c. Spire peut participer à la nucléation de l'actine (qui sera allongée par les formines FMN2) mais aussi servir au coiffage/démontage et à la séquestration des monomères. d. COBL et Leiomodine servent à la nucléation et s'associent à l'extrémité pointue (Campellone and Welch, 2010).

Il faut noter que de nombreuses protéines impliquées dans l'élongation des filaments (protéines WASP/WAVE) contiennent aussi des domaines WH2, augmentant ainsi le nombre des molécules d'actine transférées aux extrémités barbues des filaments. De manière intéressante, les protéines de la famille WASP/WAVE renferment une région riche en proline (Chereau et al., 2005; Dominguez, 2016) (Figure 27).

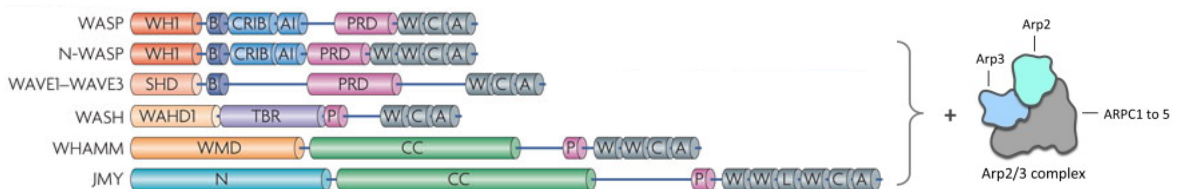


Figure 27. Protéines de la famille WASP/WAVE chez les Mammifères. Ces protéines contiennent un domaine WCA C-terminal qui fixe le monomère d'actine et le complexe Arp2/3, et des régions régulatrices en N-terminal (WH1, SHD, WAHD1, WMD). Elles renferment aussi des régions riche en proline (PRD, P) (Campellone and Welch, 2010)

4.4.3- La profiline : Protéine charnière contrôlant la nucléation et la polymérisation de l'actine

4.4.3.1-Caractéristiques

La profiline (PFN) est une petite protéine fixatrice de l'actine ubiquiste de 12-16 kDa, présente chez tous les eucaryotes à une concentration de l'ordre de 10-80 μ M. Chez les mammifères, 5 isoformes (PFN1, PFN2a, PFN2b, PFN3 et PFN4) ont été identifiées (Jockusch et al., 2007). Bien que conservées du point de vue structural et fonctionnel, chez la souris, ces isoformes ne présentent que 30% d'identité au niveau de leur séquence entre PFN1 et PFN3, 42% entre PFN2 et PFN3 puis 65% entre PFN1 et PFN2 (Witke, 2004).

PFN1 est exprimée dans la plupart des tissus sauf le muscle squelettique (Carlsson et al., 1977). Par contre, PFN2a et PFN2b (qui diffèrent seulement au niveau de 4 acides aminés à l'extrémité C-terminale) sont exprimées majoritairement dans le cerveau et les cellules nerveuses (Honoré et al., 1993; Witke et al., 1998). Cependant d'après des études récentes, PFN2a qui est majoritaire par rapport à PFN2b, est aussi présente dans d'autres types cellulaires comme les fibroblastes (Rotty et al., 2015) et les cellules épithéliales mammaires (Mouneimne et al., 2012). PFN3 et PFN4 sont spécifiques des testicules.

En raison de leur capacité à fixer l'actine, les profilines sont présentes essentiellement dans les zones cellulaires où l'actine est dynamique : filopodes, lamellipodes, fibres de tension et adhésions focales (Henty-Ridilla and Goode, 2015). Des expériences d'inactivation effectuées avec des cellules non musculaires ont montré que PFN1 serait impliquée dans la migration des cellules alors que PFN2a contrôlerait plutôt l'adhésion (Mouneimne et al., 2012).

4.4.3.2-Structure

La structure des profilines (complexées ou non à l'actine) a été établie par cristallographie (Cedergren-Zeppezauer et al., 1994; Honoré et al., 1993; Pollard and Quirk, 1994; Schutt et al., 1993). Elles comprennent 4 hélices- α et un feuillet- β central composé de 7 brins organisés en 4 domaines fonctionnels (Figure 28).

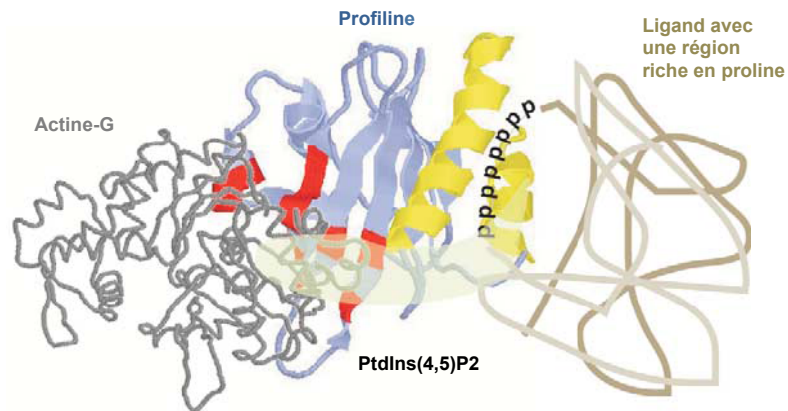


Figure 28. Structure de la profiline et ses complexes (Witke, 2004)

- Un domaine de fixation de l'actine formé de résidus des hélices H3 et H4 et des brins du feuillet- β .

- Un domaine SH3-like capable d'interagir avec les domaines riches en prolines de protéines telles que les formines et VASP. Ce domaine est composé des hélices H1 et H4. Dans le cas de PFN2a, l'isoforme la plus affine pour les PRM, ce domaine met en jeu les chaînes latérales des résidus Y7, N10, Y134 et F140 (Haikarainen et al., 2009; Murk et al., 2009). A noter que l'isoforme PFN2b qui est minoritaire, est incapable de fixer les PRM.

- Deux domaines de fixation des phosphoinositides (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate ou PIP2). L'un chevauche le domaine de fixation de l'actine et l'autre la surface de fixation des PRM. C'est la PFN1 qui a la plus forte affinité pour PIP2. Cette interaction permet l'association de la profiline aux membranes.

4.4.3.3-Mécanisme d'action moléculaire

La profiline a pour rôle de réguler la dynamique de la polymérisation de l'actine (Shekhar et al., 2016). Elle se lie préférentiellement à l'extrémité barbue des monomères d'actine liés à l'ATP avec une haute affinité ($K_d = 0,1 \mu\text{M}$) (Kinosian et al., 2000). Par contre, son affinité pour l'actine-G fixée à l'ADP est plus faible ($25\mu\text{M}$) (Jégou et al., 2011). De manière générale, elle est considérée comme un régulateur du cytosquelette d'actine du type « housekeeping ».

La PFN maintient une réserve d'actine-G non polymérisée dans la cellule et empêche sa nucléation en trimères par les formines. Cependant, lorsque les

filaments sont amorcés, elle participe à leur élongation (Krause and Gautreau, 2014). Tout d'abord, chez les mammifères, lorsque la cellule a besoin de polymériser l'actine, elle entre en compétition avec la thymosine- β 4, afin de mobiliser l'actine-G pour la polymérisation (Xue et al., 2014). Puis, la profiline dirige exclusivement l'assemblage de l'actine-G à l'extrémité barbue des filaments d'actine où la croissance est rapide, tout en empêchant la polymérisation à l'extrémité pointue, donnant ainsi une polarité à la croissance des filaments (Pring et al., 1992; Ridley, 2011). Puis, comme l'affinité de la profiline pour l'actine-F est plus faible que pour l'actine-G, elle se dissocie rapidement, libérant ainsi l'extrémité barbue pour continuer l'élongation.

En fait la profiline est un accélérateur de l'élongation catalysée par les formines ou Ena/VASP (voir plus loin). Elle s'attache aux séquences riches en proline des formines ou de VASP via son domaine SH3-like et augmente ainsi la vitesse de l'addition des molécules d'actine.

En effet, en présence du tandem PFN/Formine, la vitesse d'élongation des filaments passe de $10\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ à $90\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ (Kovar, 2006; Kovar et al., 2006). La profiline prend aussi en charge les monomères d'actine-G/ADP qui se dissocient du filament vieillissant et les recharge en ATP, permettant ainsi leur ré-intégration au niveau des extrémités (+) libres.

Ainsi, la profiline se présente comme un régulateur de l'homéostasie de l'actine. Cette homéostasie requiert un équilibre complexe et dynamique entre les pools d'actine-G libre, de profiline libre, de complexes PFN-actin-G et d'extrémités barbues des filaments libres, coiffées ou associées aux protéines d'élongation. C'est pourquoi, une augmentation ou une diminution de la concentration en profiline perturbe le cytosquelette d'actine ainsi que les propriétés ces cellules. En effet des travaux récents (Pernier et al., 2016; Rotty et al., 2015; Suarez et al., 2015) ont montré que lorsque la concentration en profiline est augmentée, celle-ci entre en compétition avec les formines, le complexe Arp2/3 (branchements d'actine) et la protéine de coiffe (Figure 29). Par voie de conséquence, la migration des cellules est diminuée.

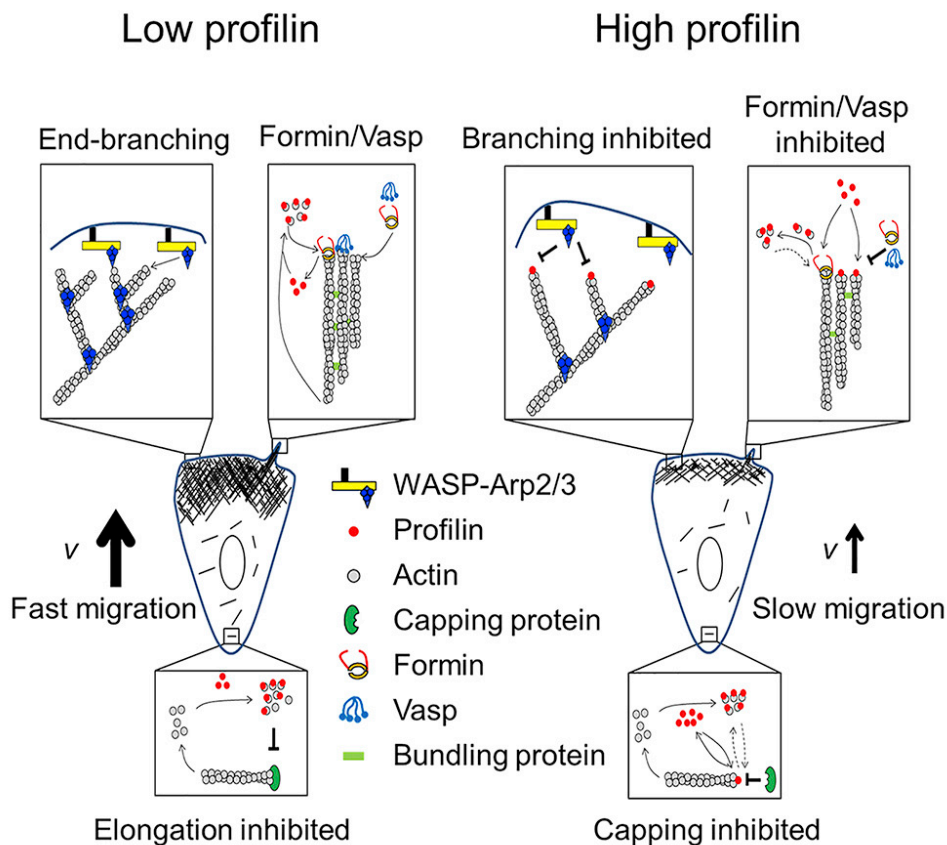


Figure 29. La quantité de profiline présente à l'extrémité pointue influence l'homéostasie de l'actine et la migration des cellules. A forte concentration la profiline rentre en compétition avec les formines/ VASP puis inhibe leur activité d'allongement des filaments et des réseaux ramifiés d'actine au niveau des lamellipodes. Ceci a pour conséquence de ralentir la vitesse de migration des cellules (Pernier et al., 2016).

4.4.4- Les protéines de nucléation et de polymérisation

La nucléation et la polymérisation des filaments d'actine est contrôlée par une pléthore de facteurs comme les formines, Ena/VASP et le complexe Arp2/3. Certains de ces facteurs renferment des motifs riches en proline qui interagissent avec la profiline qui amène les nouvelles molécules d'actine pour l'élongation des filaments.

4.4.4.1-Les formines

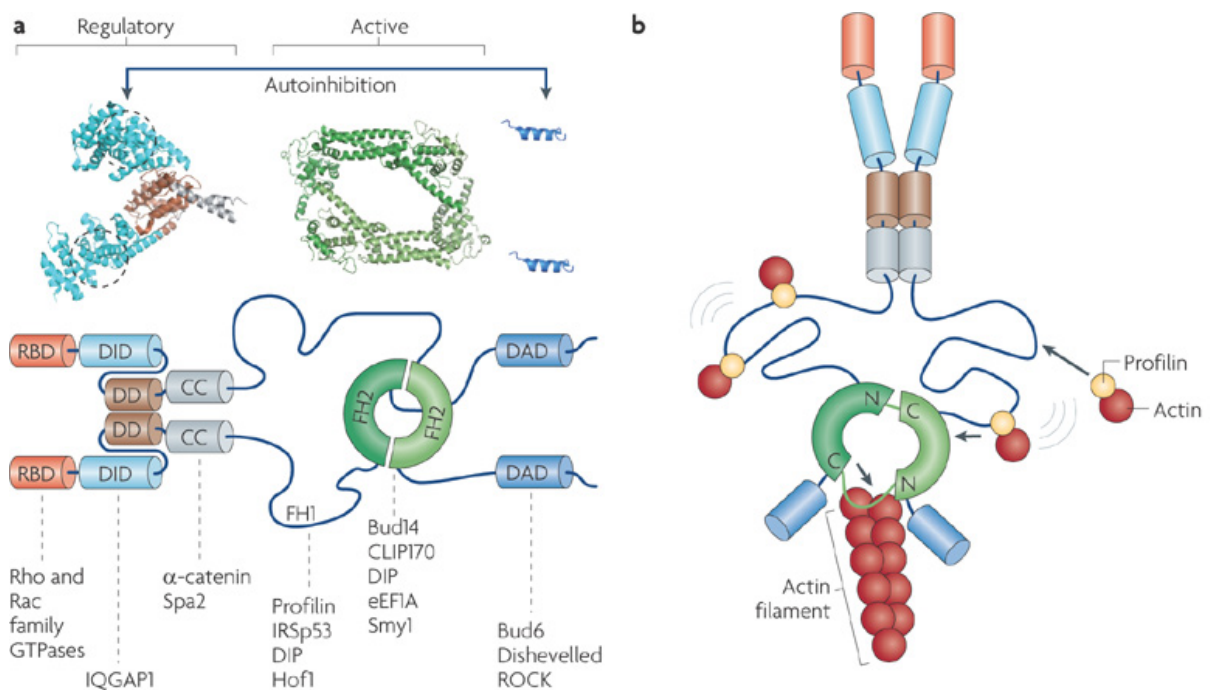
Il s'agit d'une grande famille de protéines qui, chez les mammifères, comprend 15 membres comme FMN1 (Formin-1), FMN2, Dia1 (Diaphanous-related formin-1), Dia2, Dia3, FMNL1 (Formin-like protein 1), FMNL2 et FMNL3 (Schönichen and Geyer, 2010) (Tableau 4). La plupart des formines stabilisent les dimères d'actine et ont ainsi une activité de nucléation.

Elles sont aussi impliquées dans l'élongation des filaments non-ramifiés dans les filopodes et les fibres de tension (Chesarone et al., 2010; Schönichen et al., 2013).

<i>protein name</i>	<i>short name</i>	<i>alternative names</i>	<i>accession number</i>	<i>gene locus</i>	<i>length</i>	<i>no. of isoforms</i>	<i>homology relations</i>
protein Diaphanous homolog 1 (Diaphanous-related formin-1)	Dia1	(DRF1)	O60610	5q31.3	1272 aa	2	90.3% sequence identity to mouse mDia1 (O08808)
Diaphanous-related formin-2	Dia2	(DRF2)	O60879	Xq21.33	1101 aa	3	49.0% ident. to Dia1
Diaphanous-related formin-3	Dia3	(DRF3)	Q9NSV4	13q21.2	1193 aa	7	43.4% ident. to Dia1; 53.5% ident. to Dia2
Disheveled-associated activator of morphogenesis 1	Daam1		Q9Y4D1	14q23.1	1078 aa	3	26.9% ident. to Dia1
Disheveled-associated activator of morphogenesis 2	Daam2		Q86T65	6p21.2	1068 aa	1	67.7% ident. to Daam1; 25.3% ident. to Dia1
Formin-like protein 1 (Leukocyte formin)	FMNL1	(FRL1)	O95466	17q21.31	1100 aa	2	23.6% ident. to Dia1
Formin-like protein 2	FMNL2	(FRL3, FHOD2)	Q96PY5	2q23.3	1086 aa	2	59.4% ident. to FMNL1; 22.8% ident. to Dia1
Formin-like protein 3	FMNL3	(FRL2, FHOD3)	Q8IVF7	12q13.12	1028 aa	3	56.5% ident. to FMNL1; 69.2% id. to FMNL2; 22.4% id. to Dia1
WH2 domain-containing formin 1	WHIF1	(INF2)	Q27J81	14q32.33	1249 aa	2	23.8% ident. to Dia1
Inverted formin 1	INF1	(FHDC1)	Q9C0D6	4q31.3	1143 aa	1	16.9% ident. to Dia1, 19.2% ident. to INF2
FH1/FH2 domain-containing protein 1	FHOD1	(FHOS)	Q9Y613	16q22.1	1164 aa	1	20.2% ident. to Dia1; 20.3% ident. to FMNL2
FH1/FH2 domain-containing protein 3	FHOD3		Q2V2M9	18q12.2	1422 aa	2	43.4% ident. to FHOD1; 19.9% ident. to Dia1
Delphilin	Delphilin	(GRID2IP)	A4D2P6	7p22.1	1211 aa	1	21.3% ident. to Dia1
Formin-1 (Limb deformity protein homolog)	FMN1		Q68DA7	15q13.3	1419 aa	4	21.9% ident. to Dia1
Formin-2	FMN2		Q9NZ56	1q43	1722 aa	1	28.5% ident. to FMN1; 22.8% ident. to Dia1

Tableau 4. Récapitulatif des 15 formines identifiées chez l'Homme. La taille des protéines et le degré d'homologie sont donnés pour l'isoforme canonique (selon UniProt databases) (Schönichen and Geyer, 2010)

Les formines renferment plusieurs domaines et forment des homodimères. La caractéristique principale est la présence de deux domaines FH1 et FH2 (Formin Homology Domains) qui travaillent de concert pendant l'assemblage de l'actine (Goode and Eck, 2007). Le domaine FH1 est un domaine non structuré qui renferme des motifs riches en proline. Il agit comme un lasso qui attrape les molécules de profiline-actine (Paul and Pollard, 2008). Le domaine FH2 interagit avec les extrémités barbues des filaments d'actine (Chen et al., 2012; Goode and Eck, 2007) et guide l'arrivée de l'actine transportée par la profiline. Puis, le domaine FH2 « saute » sur l'extrémité barbue de la nouvelle molécule d'actine (Pollard, 2016) ce qui fait des formines une machine d'élongation processive empêchant la fixation des protéines de coiffe (Campellone and Welch, 2010; Chesarone et al., 2010).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 30. Organisation des domaines d'autoinhibition des formines. a. Structure cristallographique et schéma des domaines (avec les couleurs correspondantes) avec les protéines qui les fixent dont la famille des Rho et Rac GTPases et la profiline (Chesarone et al., 2010). b. Schéma de l'homodimère de formine en action. Le dimère FH2 capture l'extrémité barbutte croissante du filament d'actine par le mouvement dynamique des deux moitiés. Les domaines adjacents FH1 en forme de lasso attrape les complexes profiline-actine et additionnent les sous-unités d'actine à l'extrémité du filament (indiquée par une flèche).

Certaines formines (FMNL3, Dia1) présentent en C-terminal d'autres domaines comme un domaine WH2 (WASP-homology 2) qui participe aussi à la fixation de l'actine et coopère avec le domaine FH2 (Dominguez, 2016). Parfois, ce domaine coïncide avec le domaine DAD (Diaphanous Autoinhibitory Domain) qui, en interagissant avec un autre domaine en N-terminal DID (DAD-Interacting Domain), participe à l'autoinhibition de la protéine. Cette inhibition peut être levée suite à la fixation de Rho-GTPases près du domaine DID (Alberts, 2001; Faix and Grosse, 2006; Higgs, 2005) (Figure 31) ou via la fixation de l'actine (Gould et al., 2011). D'autres formines renferment, en C-terminal du domaine FH2, des séquences qui peuvent recruter d'autres protéines capables de fixer l'actine comme APC (Adenomatous polyposis coli) ou des protéines à domaines WH2 (Spire ou Bud6). *In fine* ces protéines augmentent l'activité de nucléation des formines (Dominguez, 2016).

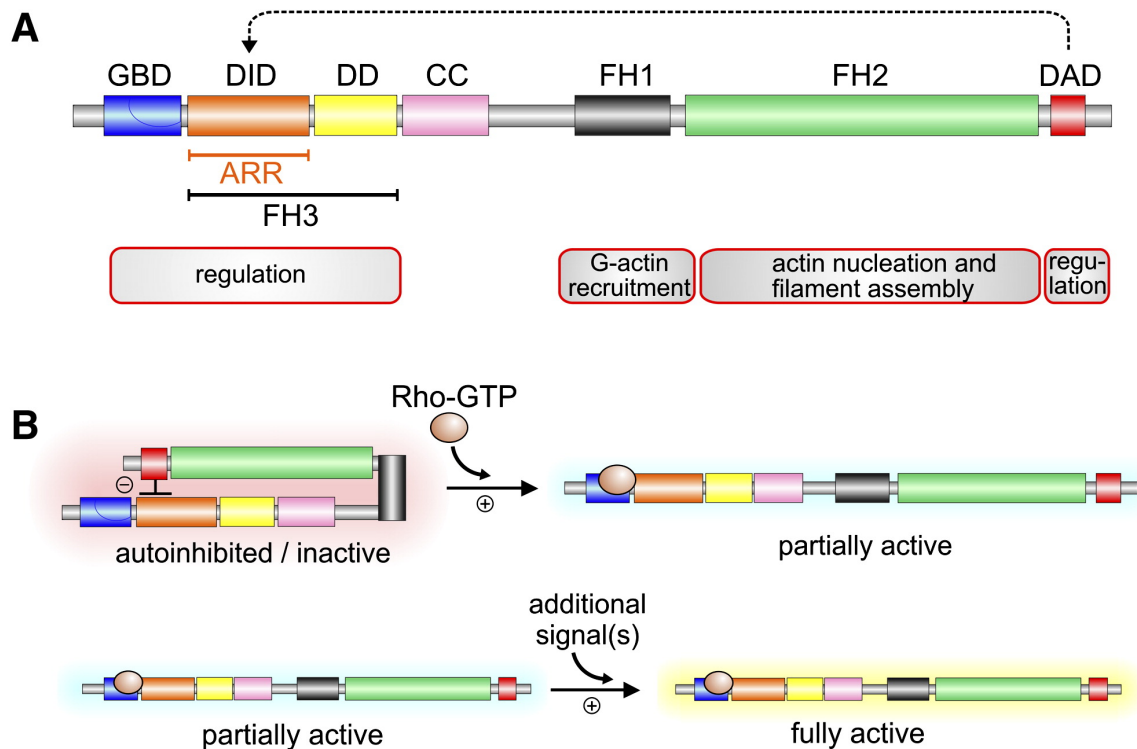


Figure 31. Autorégulation moléculaire des formines. A. Domaines des formines. B. L'autoinhibition causée par l'interaction des domaines DAD et DID, est partiellement levée par l'association d'une forme active de Rho-GTPase au domaine GBD. Ceci permet des changements conformationnels qui libère DAD. Un signal supplémentaire est requis pour activer pleinement les formines (Faix and Grosse, 2006).

Finalement, certaines formines ne sont pas processives et se déplacent lors de l'assemblage de l'actine de l'extrémité barbue vers les côtés du filament d'actine (Michelot et al., 2006). Cette propriété permet aux formines d'être non seulement un élongateur lors de l'assemblage de l'actine, mais aussi une protéine de réticulation qui organise les filaments d'actine dans les grandes structures parallèles ou antiparallèles (Harris et al., 2006; Michelot et al., 2005). *In vivo*, ces formines travailleraient de concert avec des protéines de réticulation comme la fascine ou la fimbrine pour la formation des faisceaux (Breitsprecher and Goode, 2013).

4.4.4.2-La famille Ena/VASP

Les protéines de cette famille, Mena, VASP et EVL (Bear and Gertler, 2009), permettent aussi l'élongation des filaments d'actine non ramifiés (Ferron et al., 2007; Hansen and Mullins, 2010; Sechi and Wehland, 2004). Cependant, elles ne participent pas à la nucléation. Elles forment des tétramères et comprennent trois domaines spécifiques (Figure 32) :

- Un domaine EVH1 (Ena/VASP homology 1) N-terminal qui fixe des protéines renfermant des motifs riches en proline comme la vinculine et zyxine, des protéines d'adhésion.
- Un domaine central riche en prolines qui peut fixer la profiline et d'autres protéines à domaines SH3 ou WW.
- Un domaine EVH2 C-terminal qui est impliqué dans la tétramérisation de la protéine et qui interagit avec l'actine-G ou -F (domaine de type WH2).

Les protéines Ena/VASP fixent les complexes PFN-Actine-G, via 2 surfaces simultanément : une interface PFN-PRM et une interface Actine G/EVH2. Au sein de ce complexe, l'actine G est orientée vers le site de fixation de l'actine-F afin de faciliter son transfert aux filaments en croissance. De manière intéressante, elles s'associent à l'extrémité barbue des filaments en élévation de telle sorte qu'elles empêchent l'action des protéines de coiffe qui stoppent l'élévation (Breitsprecher et al., 2011).

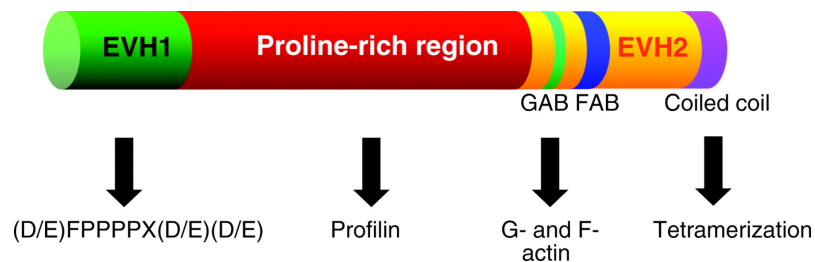


Figure 32. Domaines d'interaction des protéines Ena/VASP (Bear and Gertler, 2009).

Les protéines Ena/VASP contribueraient également à la rigidité mécanique de faisceaux, car elles sont multimériques. Et, comme les protéines de réticulation, elles interagissent avec l'actine filamenteuse (domaine EVH2) avec une activité anti-coiffe supplémentaire (Figure 33). En effet, il a été montré que Ena/VASP potentialise l'effet de la fascine sur la rigidité du réseau, expliquant peut-être la présence de ces deux protéines dans les filopodes (Faix et al., 2009; Swei et al., 2012).

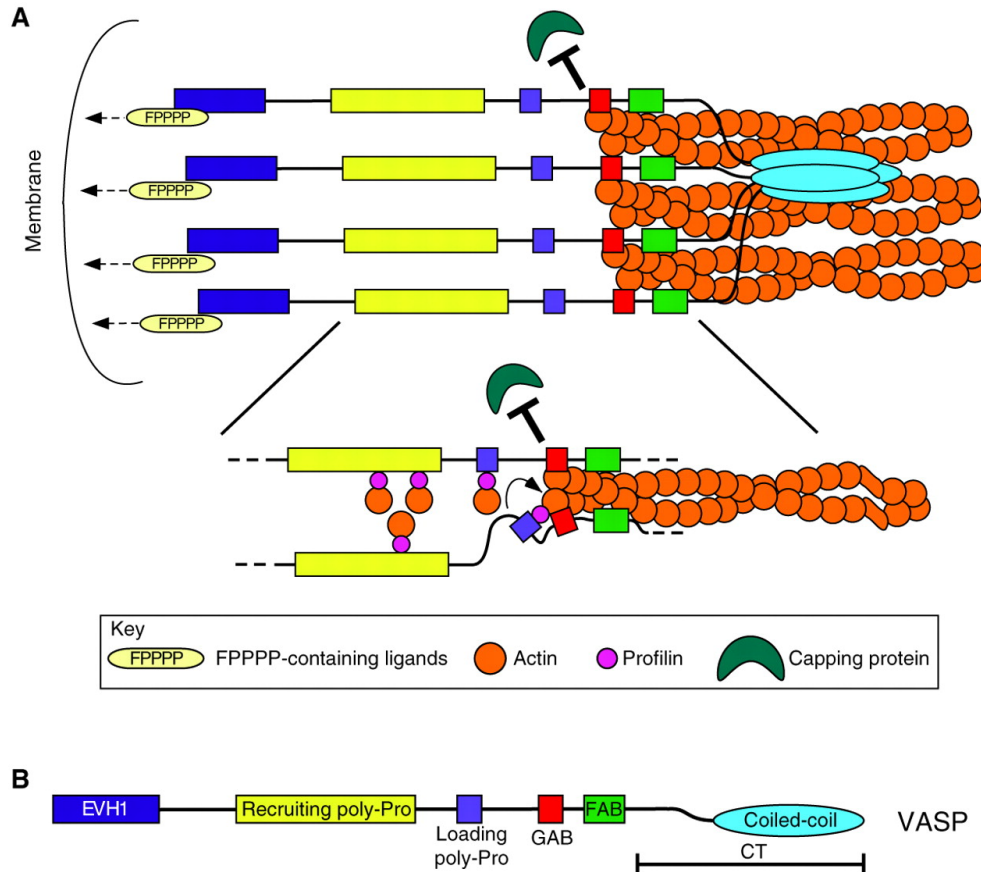


Figure 33. Mécanisme anti-coiffe par les protéines Ena/VASP. A. Le tétramère VASP en association avec les faisceaux de filaments d'actine. L'association des domaines EVH1 de VASP avec des motifs à FPPP des protéines accroche VASP à la membrane plasmique. B. Les domaines qui permettent de capturer la PFN-actine-G et de les ajouter aux filaments tout en bloquant les protéines de coiffe (CP) par le domaine GAB. (Bear and Gertler, 2009)

4.4.4.3-Le complexe Arp2/3

Ce complexe ubiquiste est composé de 7 sous-unités dont 2 protéines apparentées à l'actine, Arp2 et Arp3 (Actin related protein). Il est impliqué dans la ramification des filaments d'actine dans les lamellipodes (Campellone and Welch, 2010; Pollard, 2016) (cf. Figure 24)

Ce complexe est constitutivement inactif car la configuration des deux Arp est inappropriée à la polymérisation de l'actine. Il doit donc être activé par les protéines de la famille du Wiskott-Aldrich Syndrome : WASP, N-WASP, Scar (suppressor of cAMP activator)/WAVE (WASP family verprolin homologous protein), WASH (WASP and Scar homolog), WHAMM (WASP homolog associated with actin, membranes and microtubules) et JMY (junction-mediating and regulatory protein) (Campellone and Welch, 2010; Rottner et al., 2010). Le rôle

principal de ces protéines est de servir d'intermédiaire entre la machine moléculaire de polymérisation de l'actine et les voies de signalisation nécessaires à son activation.

Les protéines WASP/WAVE renferment un module C-terminal impliqué dans la fixation des protéines Arp, plusieurs domaines WH2 fixant l'actine et un domaine riche en proline capable d'interagir avec la profiline (cf. Figure 27).

Tous ces facteurs sont également inactifs intrinsèquement car leurs sites de fixation à l'actine et au complexe Arp2/3 sont masqués. Ces inhibitions sont levées par des GTPases de la famille Rho, des phosphoinositides et des protéines à domaines SH3 (Parsons et al., 2010; Rottner and Stradal, 2011). Grâce à leurs multiples domaines, ces protéines augmentent le nombre de molécules d'actine qui sont apportées sur le filament « mère » préexistant pour former un filament « fille » branché, croissant à un angle fixe de 70 degrés sur un côté du filament mère. Contre intuitivement, afin que le réseau ramifié soit suffisamment dense, il ne doit pas s'allonger indéfiniment. C'est pourquoi, les protéines de la famille WASP recrutent rapidement des protéines de coiffe afin de bloquer la croissance à l'extrémité barbue des filaments (Figure 34).

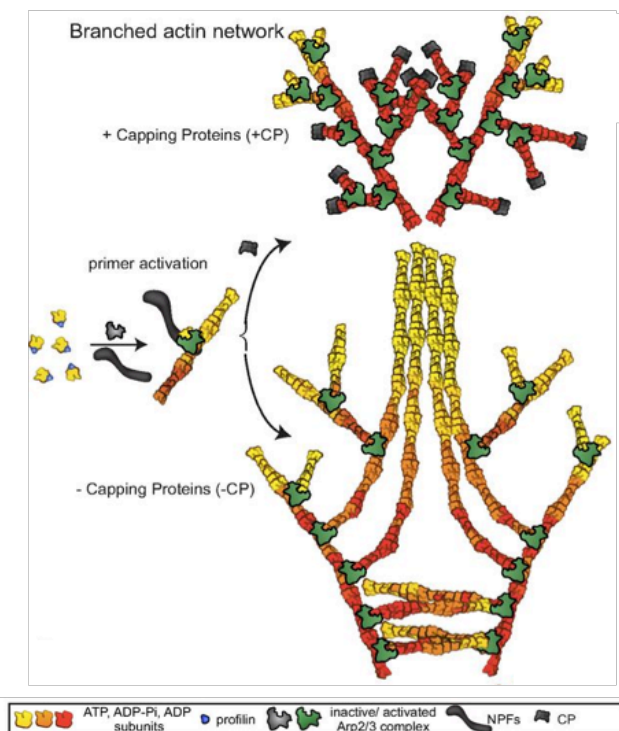


Figure 34. Formation du réseau d'actine ramifié par le complexe Arp2/3. Le complexe Arp2 / 3 est activé par des facteurs favorisant la nucléation, et génère un réseau ramifié à partir du côté d'un filament d'actine préexistant, appelé «amorce». En présence de protéines coiffantes (+ CP), les branches sont plus courtes et donnent des réseaux denses. En l'absence de protéines de coiffage (-CP), les filaments d'actine deviennent plus longs et peuvent s'aligner en faisceau stables de type filopode. (Blanchoin et al., 2014)

A noter que la profiline, en concentration supérieure aux concentrations physiologiques, entre en compétition avec les protéines WASP et inhibe la formation des branchements d'actine (Figure 29)(Pernier et al., 2016; Rotty et al., 2015; Suarez et al., 2015).

4.4.5- Protéine de coiffe

La protéine de coiffe (CP) est un hétérodimère de 64 kDa composé d'une sous-unité- α et d'une sous-unité- β , pour laquelle il existe des orthologues comme CapZ, la β -actinine et cap34/32. En se fixant aux extrémités barbues de l'actine, elle bloque l'élongation des filaments en empêchant le recrutement de nouvelles molécules d'actine (Edwards et al., 2014).

CP est active constitutivement mais son activité est contrôlée par de nombreux facteurs. Comme mentionné plus haut, les facteurs d'élongation comme les formines et Ena/VASP empêchent la fixation de CP au niveau des extrémités barbues des filaments (Barzik et al., 2005). Par contre, le complexe Arp2/3 peut recruter CP et ainsi contrôler la longueur des filaments branchés (Akin and Mullins, 2008; Blanchoin et al., 2014). Enfin, plusieurs régulateurs stériques qui interagissent directement avec CP (protéines CARMIL, polyphosphoinositides, CKIP1, FAM21) empêchent son interaction avec l'actine (Edwards et al., 2014).

Une autre protéine, la tropomoduline se fixe aux extrémités pointues et bloque l'addition de sous-unités d'actine à cette extrémité (Ly et al., 2016). Cette activité de coiffage est augmentée par la tropomyosine (Ostrowska et al., in press).

4.4.6- Protéines de démontage (severing)

Les protéines de la famille de la cofiline et de celle de la gelsoline sont les principaux facteurs de démontage de l'actine (Reymann et al., 2011). Cependant, la formine INF-2 (Inverted formin 2) est la seule formine capable d'une double activité de polymérisation et démontage (Rollason et al., 2016). Ces protéines sont indispensables à la dynamique de l'actine.

La cofiline est une petite protéine (15 kDa) pour laquelle il y a 3 isoformes (cofilin-1, cofilin-2 et ADF) et dont l'activité est inhibée par

phosphorylation. En se fixant sur les cotés des filaments au niveau des sous-unités d'actine-ADP, elle provoque une rotation du filament, ce qui entraîne une modification de sa stabilité thermodynamique et son démontage. Puis, après « coiffage » des extrémités barbues, les monomères d'actine se dissocient des extrémités pointues et sont repris par la profiline pour être rechargés en ATP et accélérer la polymérisation. Cependant à fortes concentrations, la cofiline accélère aussi le relargage du phosphate et dissocie les branchements formés par Arp2/3 (Andrianantoandro and Pollard, 2006).

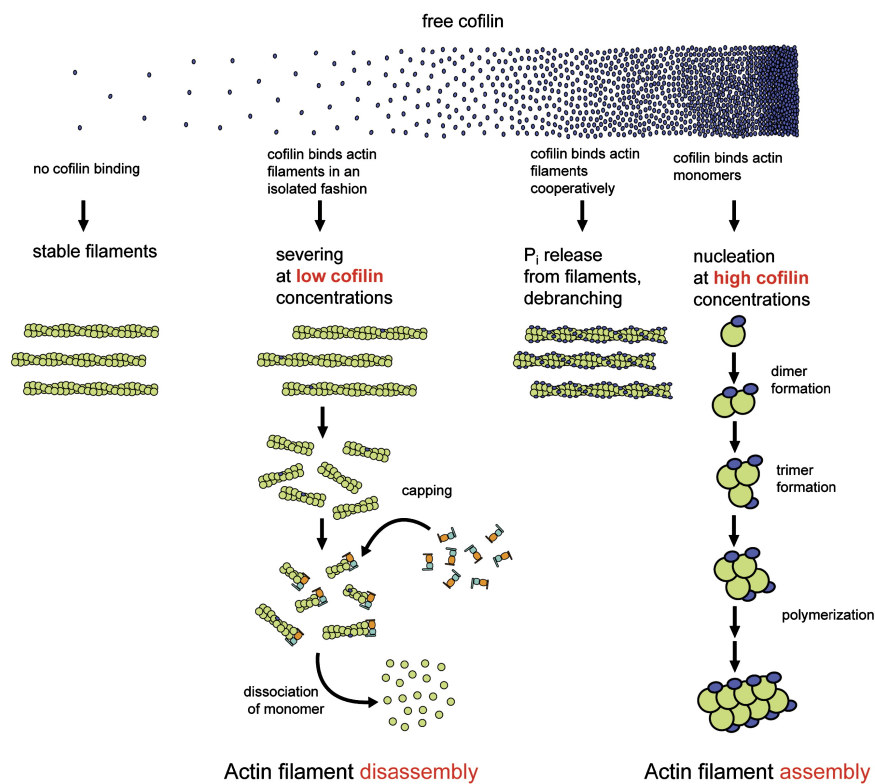


Figure 35. Activité concentration dépendante de la cofiline. A faible concentration, la cofiline (ovales bleus) ne fixent pas l'actine (vert). A une concentration faible optimale la cofiline lie l'actine-F et la démonte par fragment. L'action supplémentaire de protéines de coiffe conduit à la dissociation des monomères. A haute concentration, la cofiline coopère avec les filaments d'actine-F en les stabilisant. A très haute concentration, la cofiline se lie aux monomères d'actine-G et induit une nucléation (Andrianantoandro and Pollard, 2006)

Quant à la gelsoline, protéine de 93 kDa, elle est composée de 6 domaines de fixation à l'actine (Khaitlina et al., 2013). Certains de ces domaines se fixent à l'actine de manière calcium dépendante. En présence de calcium, la gelsoline dépolymérise les filaments d'actine et coiffe l'extrémité barbue. Cette famille de

protéines compte d'autres membres comme la protéine séverine qui ne contient que 3 domaines. Cette dernière conserve cependant les propriétés de sensibilité au calcium, de dépolymérisation et de coiffage.

4.4.7- Protéines de réticulation

Les filaments d'actine sont connectés entre eux par des protéines de réticulation comme la fimbrine, la fascine, la filamine, l' α -actinine et la palladine formant ainsi des faisceaux ou des fibres de tension. Ces protéines renferment deux domaines de fixation de l'actine (calponin-homology domains). Cependant, comme leur affinité pour l'actine est faible, elles s'échangent rapidement. Ceci est à la base de l'élasticité et des capacités de déformation des réseaux d'actine. A noter que, dans les fibres de tension, la palladine qui renferme un domaine riche en prolines, interagit avec la profiline et avec VASP. Par conséquent, cette protéine est à la fois une protéine de réticulation et un régulateur de la dynamique des fibres de tension (Azatov et al., 2016; Beck et al., 2013; Boukhelifa et al., 2004; Gurung et al., 2016).

4.4.8- Protéines associées aux fibres de tension

Les fibres de stress (Figure 36) caractéristiques des cellules non-musculaires et adhérentes comme les fibroblastes sont des structures contractiles dont l'organisation est semblable à celle des myofibrilles du muscle. Elles jouent un rôle crucial dans la morphogénèse, l'adhésion et la mécanotransduction lorsqu'elles sont associées aux adhésions focales (Burrige and Wittchen, 2013; Colombelli et al., 2009; Zaidel-Bar et al., 2015).

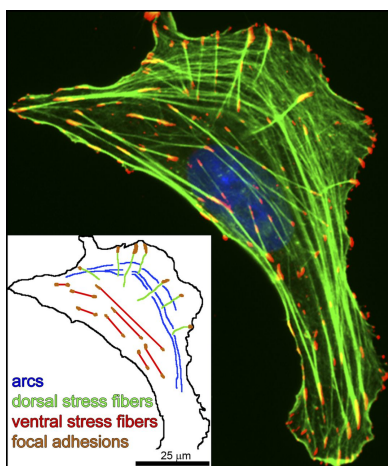


Figure 36. Les trois types de fibres de tension. Les arcs transversaux, les fibres dorsaux et les fibres ventraux sont tous attachés aux adhésions focales. (Burrige and Wittchen, 2013)

Dans ces structures, les filaments sont réticulés par l' α -actinine et fixent la tropomyosine (Laporte et al., 2012; von der Ecken et al., 2015). Celle-ci empêche la dépolymérisation des filaments et surtout détermine quelle myosine interagira avec eux pour réguler la contraction des filaments (Tojkander et al., 2011). La contraction des fibres de stress est régulée par la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine et par la caldesmone une protéine calcium dépendante (Katoh et al., 2008). Comme les filaments d'actine sont des polymères semi-flexibles, leur association à des moteurs moléculaires comme les myosines, leur confère des propriétés de ressorts moléculaires actifs exerçant des forces de tension ou de contraction (Zaidel-Bar et al., 2015).

4.5-Conclusion

La formation des filaments d'actine est un processus dynamique qui produit des forces nécessaires à la migration des cellules, leur morphogénèse, l'endocytose etc. Elle est finement contrôlée par la concentration relative des régulateurs qui interviennent au niveau des extrémités barbues (Shekhar et al., 2016). Ces régulateurs sont des protéines d'élongation (avec des domaines WH2 ou FH2), des protéines de coiffe et des protéines de démontage qui agissent de manière concertée.

Cependant, le rôle physiologique de la profiline reste encore confus puisque cette protéine coordonne la croissance polarisée des filaments d'actine par plusieurs mécanismes : séquestration de l'actine-G, addition d'actine-G aux extrémités barbues et compétition avec les protéines de coiffe et de branchement (Pernier et al., 2016). En fait, l'homéostasie des filaments d'actine et par voie de conséquence la motilité et l'adhésion des cellules, dépendent d'un équilibre dynamique et complexe entre les différents acteurs (Henty-Ridilla and Goode, 2015; Rotty and Bear, 2015).

OBJECTIFS

La génomique fonctionnelle a pour but d'apporter des réponses quant à l'interprétation de notre capital génétique par la machinerie transcriptionnelle qui comprend essentiellement des facteurs de transcription tels que les récepteurs nucléaires pour expliquer des phénotypes normaux ou pathologiques.

Le laboratoire du Dr Cécile ROCHETTE-EGLY a longuement contribué à la compréhension des mécanismes moléculaires qui gouvernent la régulation des gènes cibles par les RAR. Plus précisément, son équipe s'est focalisée sur le rôle crucial de la phosphorylation de ces récepteurs. En effet, dans l'ordre d'enchaînement du processus, le laboratoire a mis en évidence que :

- Une fraction des RAR est extranucléaire et accrochée aux radeaux lipidiques des membranes

- En réponse au ligand, ces RAR activent des cascades de kinases qui vont migrer dans le noyau et phosphoryler de nombreuses cibles

- Ces kinases phosphorylent les RAR eux-mêmes ainsi que leurs corégulateurs. Le résidu phosphorylable des RAR est localisé dans un domaine N-terminal, riche en prolines. L'intérêt de ce domaine réside dans sa capacité à interagir avec les domaines SH3 ou WW d'une variété de protéines de façon dépendante ou non de la phosphorylation. La phosphorylation de ce domaine s'est avérée indispensable à l'initiation de la transcription.

- Les RAR sont dégradés par le système ubiquitine-protéasome après avoir joué leur rôle dans la transcription.

D'ores et déjà, le laboratoire a montré que l'activité transcriptionnelle des RAR dépend des effets extranucléaires non-génomiques. Donc ces deux types d'effets sont interconnectés pour obtenir une transcription optimale des gènes cibles.

A mon arrivée au laboratoire, deux observations ont suscité mon intérêt :

1. Des fibroblastes invalidés pour tous les RAR présentent un cytosquelette d'actine perturbé, sont rondes et ont perdu leurs propriétés d'adhésion. Le cytosquelette d'actine, de par son architecture est par définition, responsable de la morphologie et de la motilité des cellules. C'est pourquoi cette observation a soulevé la question suivante : est-ce que les RAR contrôlent

l'expression de gènes codant pour des protéines du cytosquelette et/ou des protéines impliquées dans l'adhésion?

2. Le laboratoire venait d'isoler par criblage double hybride (Y2H, Yeast two-hybrid) un nouveau partenaire du NTD de RAR α , la profiline 2a (PFN2a) qui est une protéine adaptatrice de l'actine avec un domaine SH3-like. En fait, PFN2a est une protéine cytosolique qui participe avec d'autres protéines (Formines, Ena/VASP) à l'élongation des filaments d'actine qui, suivant les besoins et/ou les contraintes de la cellule, forment des architectures en faisceaux contractiles (fibres de tension) ou des structures réticulées.

D'où les questions suivantes :

- **Est ce que, *in vivo*, RAR α forme des complexes avec PFN2a dans le cytoplasme des cellules ?**
- **Quel est le rôle de cette interaction ? Est-ce qu'elle interfère avec le mécanisme de polymérisation de l'actine ?**

Mon but étant de comprendre comment les RAR interviennent au niveau des fonctions vitales de la cellule, ma thèse a eu pour objectifs d'analyser comment les RAR contrôlent la morphologie et l'adhésion/migration des cellules d'une part via la régulation de l'expression de gènes codant pour des protéines du cytosquelette ou des protéines d'adhésion (mécanisme génomique) et d'autre part via la formation de complexes avec la profiline 2a dans le cytoplasme (mécanisme non génomique). *In fine*, ces mécanismes sont-ils interconnectés ou indépendants ?

RESULTATS

1. LES RAR CONTRIBUENT A LA MORPHOLOGIE, L'ADHESION ET LA MIGRATION DES FIBROBLASTES EMBRYONNAIRES DE SOURIS (MEF) (PUBLICATION 1)

Le laboratoire utilise couramment des MEF sauvages (WT) ainsi que des MEF invalidés pour les trois RAR (MEF RAR (α , β , γ)-/-). De manière inattendue l'analyse de ces cellules révéla que les MEF RAR (α , β , γ)-/-

- sont plus ronds et plus compacts que les MEF WT et s'étalent moins sur le substrat
- présentent un réseau de filaments d'actine et des adhésions focales désorganisés
- ne s'attachent pas à une matrice de collagène I ou IV
- migrent moins vite que les MEF WT

2. LES RAR CONTROLENT L'EXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS L'ADHESION (PUBLICATION 1)

La première hypothèse est que les RAR réguleraient l'expression de protéines du cytosquelette et/ou de protéines d'adhésion via un processus transcriptionnel.

- Le répertoire de gènes exprimés dans les MEF WT et RAR (α , β , γ)-/- a été comparé dans des expériences de séquençage à haut-débit (RNA-seq). L'analyse des résultats a montré qu'un certain nombre de gènes sont réprimés dans les MEF RAR (α , β , γ)-/-. De manière intéressante, ces gènes codent pour des protéines impliquées dans l'adhésion telles que les intégrines (α 1 et α 11), la cadhérine 17, la protocadhérine 9, les laminines (α 1, α 2 et α 4), les collagènes (type II α 1, type XI α 1), la vitrine, la vanine-1, robo 1 et robo 2.

Le fait que ces gènes soient régulés négativement dans les MEF RAR (α , β , γ)-/- a été corroboré dans des expériences de RT-qPCR. Les promoteurs de ces gènes renferment des éléments de réponse spécifiques des RAR (RARE) de type DR ou IR séparés par 0 à 8 paires de base (Moutier et al., 2012), confirmant qu'il s'agit

bien de gènes cibles des RAR. Ces résultats indiquent que, même en absence de ligand, les RAR peuvent contrôler de façon positive l'expression de gènes cibles. Ceci suppose que les éléments de réponse de ces gènes sont accessibles et que les RAR peuvent activer leur expression en absence de ligand (Su and Gudas, 2008). En fait un certain nombre de travaux vont dans ce sens puisque en absence de ligand RAR α peut recruter des complexes qui régulent la méthylation de régions spécifiques des promoteurs (Delacroix et al., 2010; Laursen et al., 2012). Quant à RAR γ , il a une faible capacité à fixer des corépresseurs (Farboud et al., 2003; Hauksdottir et al., 2003).

- Les MEF WT expriment RAR α 1 et RAR γ 1 mais RAR β est difficile à détecter. C'est pourquoi nous avons entrepris de déterminer si RAR α 1 et/ou RAR γ 1 sont impliqués dans la régulation de la morphologie et de l'adhésion des MEF. Nous avons généré des MEF réexprimant de façon stable RAR α 1, RAR γ 1 ou les deux dans le fond RAR (α , β , γ)-/-.

Dans aucun des cas nous avons obtenu une récupération totale de la morphologie et de l'adhésion des cellules. De plus, d'après les expériences de RNA-seq, seulement 40% des gènes qui sont réprimés dans les MEF RAR (α , β , γ)-/- sont restaurés. En fait, en utilisant des combinaisons d'inhibiteurs spécifiques nous avons montré que la régulation de ces gènes nécessite une coopération de RAR β avec RAR α ou RAR γ .

En conclusion, la morphologie et l'adhésion des MEF nécessitent l'expression de gènes régulés par des combinaisons variées des RAR.

- Finalement, il s'agissait de savoir si l'expression de ces gènes est sensible à l'acide rétinoïque. En fait, l'addition d'AR n'affecte pas la morphologie, l'adhésion et l'expression des gènes d'adhésion dans les MEF WT. Par contre, l'addition d'AR régule l'expression de toute une panoplie de gènes codant pour des protéines de signalisation. La comparaison des différentes lignées (MEF WT, RAR (α , β , γ)-/- et MEF réexprimant RAR α et/ou RAR γ) indique que l'activation de ces gènes par l'AR implique aussi des combinaisons variées des RAR.

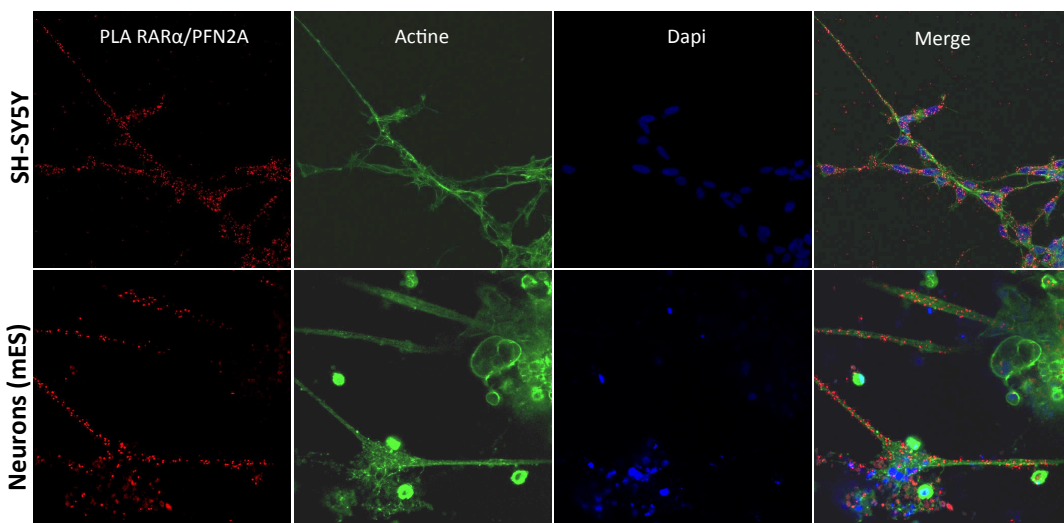
En conclusion, l'ensemble de ces résultats indique que les RAR régulent l'expression de toute une panoplie de gènes codant pour des protéines d'adhésion, même en absence de ligand.

3. RAR α FORME DES COMPLEXES AVEC UNE PROTEINE FIXATRICE DE L'ACTINE, LA PROFILINE 2A DANS LE CYTOPLASME DES MEF (PUBLICATION 2)

Au cours d'un crible double hybride dans la levure, le laboratoire a isolé un nouveau partenaire du domaine N-terminal du sous-type RAR α , la profiline 2a (PFN2a), une protéine fixatrice de l'actine avec un domaine SH3-like. Cette interaction a été confirmée *in vitro* dans des expériences d'immunoprécipitation et de GST pull down. Elle met en jeu le domaine riche en proline de RAR α et le domaine SH3-like de PFN2a. De manière intéressante, elle n'est pas sensible à l'AR ni à la phosphorylation de la sérine présente dans le PRM.

L'expression et la localisation intracellulaire de PFN2a ont été analysées par immunoblotting et par immunofluorescence. PFN2a est présente dans le cytoplasme des MEF et de plusieurs autres types de cellules adhérentes comme les cellules nerveuses (cellules de neuroblastome SH-SY-5Y humaines, cellules HT22 de l'hippocampe de souris, cellules neuronales obtenues à partir de cellules souches embryonnaires de souris traitées par l'AR).

De manière intéressante, dans ces cellules, RAR α est présent majoritairement dans le noyau mais est aussi détectable dans le cytoplasme. De plus, en utilisant la technique du PLA (Proximity Ligation Assay), qui permet de détection *in situ* des complexes endogènes même en faible quantité, nous avons montré que RAR α forme des complexes avec PFN2a dans le cytoplasme de ces cellules (Figure 37).



4. LA SUREXPRESSION DE RAR α DANS LE CYTOPLASME PERTURBE LA MORPHOLOGIE DES MEF ET LE RESEAU D'ACTINE.

La Profiline 2a est une protéine régulatrice de la polymérisation de l'actine et par voie de conséquence de la migration et de l'adhésion des cellules (voir chapitre 4 de l'Introduction).

Dans des expériences de spectrométrie de masse après immunoprécipitation de PFN2a (PFN2a étiqueté et surexprimé dans les MEF WT) nous avons confirmé que PFN2a interagit avec des protéines impliquées dans la polymérisation de l'actine et renfermant des domaines riches en proline (Formines, Evl, VASP etc). Étant donné que RAR α renferme aussi un domaine riche en proline, nous avons émis l'hypothèse que RAR α pourrait entrer en compétition avec ces protéines et ainsi interférer avec la polymérisation de l'actine. Dans ce contexte, la stratégie de l'inactivation de RAR α n'était pas appropriée puisqu'elle affecterait non seulement le pool cytoplasmique de RAR α aussi le pool nucléaire avec des répercussions sur l'expression des gènes d'adhésion (Publication 1). C'est pourquoi nous avons choisi de surexprimer RAR α spécifiquement dans le cytoplasme après délétion de la région D qui renferme le signal de localisation nucléaire (RAR α Δ D).

A partir de MEF surexprimant de façon stable RAR α Δ D, nous avons fait les observations suivantes :

- augmentation du nombre de complexes RAR α /PFN2a dans le cytoplasme (PLA)
- changement de morphologie : les cellules sont plus allongées avec moins de fibres de tension.
- augmentation de l'actine monomérique G par rapport à l'actine polymérisée F (augmentation du rapport G/F)
- diminution du nombre de complexes entre PFN2a avec les formines et Evl
- diminution de l'adhésion sur des matrices de fibrinogène et de fibronectine
- diminution de la migration

- la surexpression de PFN2a dans ces cellules restaure la morphologie, les fibres de tension, le nombre de complexes avec les formines, l'adhésion et la migration.

Ces résultats indiquent que

- RAR α dans le cytoplasme entre en compétition avec les protéines de polymérisation de l'actine qui possèdent un PRM. Donc il affecte la polymérisation de l'actine via un mécanisme non génomique.

- la polymérisation de l'actine nécessite une concentration critique de PFN2a associée à ces protéines et toute altération de cette concentration affecte la morphologie et les fonctions d'adhésion et de migration des cellules.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

L'ensemble de mes travaux met en exergue de nouveaux aspects du mode d'action des RAR, en particulier dans les fibroblastes. En effet, j'ai montré que les RAR sont nécessaires à l'adhésion des fibroblastes en absence de ligand, via deux mécanismes complémentaires :

- Un mécanisme transcriptionnel et nucléaire (génomique) mettant en jeu les 3 sous-types de RAR (α , β et γ) et contrôlant l'expression des gènes codant pour des protéines d'adhésion et de la matrice extracellulaire,
- Un mécanisme non-transcriptionnel et extranucléaire (non-génomique) mettant en jeu RAR α et contrôlant l'architecture des filaments d'actine dans le cytoplasme.

Un équilibre dynamique entre ces 2 types de mécanismes est nécessaire à la morphologie et à l'adhésion des fibroblastes.

L'adhésion des fibroblastes à un substrat met en jeu un réseau complexe de macromolécules extracellulaires sécrétées (la matrice extracellulaire ou MEC) et de protéines transmembranaires interagissant d'une part avec les protéines de la MEC et d'autre part avec les microfilaments d'actine. Par l'intermédiaire de complexes moléculaires d'adhérence regroupés aux sites appelés contacts focaux, les filaments d'actine sont reliés à la matrice extracellulaire. Les faisceaux contractiles d'actine forment des fibres de tension qui exercent une traction sur la matrice extracellulaire contrôlant leur adhésion et leur migration.

Nos résultats indiquent que l'expression de plusieurs protéines de la MEC et de complexes d'adhérence dépend, au niveau transcriptionnel, de la présence des RAR. C'est le cas des laminines ($\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 4$), du collagène (II $\alpha 1$ et XI $\alpha 1$) et de la vitrine, qui sont des constituants essentiels de la MEC. C'est aussi le cas de certaines intégrines ($\alpha 1$ et $\alpha 11$) et cadhérines qui sont des protéines transmembranaires et qui assurent la liaison entre les protéines de la matrice extracellulaire et le cytosquelette (Zamir and Geiger, 2001). Dans les fibroblastes invalidés pour les RAR, nous avons corrélé l'inhibition de l'expression de ces protéines à la perte de leurs propriétés d'adhésion et d'étalement.

De manière intéressante, l'intégrité du cytosquelette d'actine et donc l'adhésion des fibroblastes dépendent aussi de la présence de RAR α dans le cytoplasme où il forme des complexes avec PFN2a. En fait dans ce cas, RAR α agirait via un mécanisme non-transcriptionnel et servirait de tampon, contrôlant le pool de PFN2a disponible pour l'élongation des filaments d'actine.

L'originalité de ce travail réside dans la mise en évidence que RAR α n'est pas seulement un facteur de transcription nucléaire, mais aussi une protéine qui peut contrôler l'architecture d'une cellule par son interaction avec des protéines de liaison à l'actine. Ceci augmente la complexité des mécanismes d'action des RAR et soulève les questions suivantes :

1. Comment les RAR contrôlent l'expression des gènes en absence de ligand ?

En fait, les gènes codant pour les protéines impliquées dans l'adhésion renferment des éléments de réponse pour les RAR (RARE). Le fait que ces gènes soient exprimés suppose que les RARE sont accessibles aux RAR et que ces derniers soient actifs même en absence de ligand. Un certain nombre de travaux vont dans ce sens puisque, en absence de ligand RAR α peut recruter des complexes qui régulent la méthylation de régions spécifiques des promoteurs (Delacroix et al., 2010; Laursen et al., 2012). Quant à RAR γ , il a une faible capacité à fixer des corépresseurs (Farboud et al., 2003; Hauksdottir et al., 2003).

2. Pourquoi y a-t-il un pool de RAR α dans le cytoplasme ?

Il est intéressant de noter que non seulement les RAR mais aussi plusieurs autres récepteurs nucléaires sont présents à la fois dans et en dehors du noyau (Poulard et al., 2012). Des modifications post-traductionnelles, telles que des processus de phosphorylation ou de sumoylation, ont été proposées pour favoriser l'exclusion des RAR du noyau (Al Tanoury et al., 2013; Zhu et al., 2009). En effet, RAR α possède trois sites de sumoylation dont deux dans la région charnière entre le DBD et le LBD qui contient la séquence d'adressage nucléaire. D'après d'autres travaux, la localisation extranucléaire de RAR α reflèterait plutôt l'état de phosphorylation du récepteur, en particulier au niveau de la sérine S369 localisée

dans le LBD de RAR α , qui est une cible pour plusieurs types de kinases (Bruck et al., 2009; Santos and Kim, 2010). Des expériences futures seront nécessaires pour résoudre cette question.

3. Comment RAR α contrôle l'architecture du cytosquelette ?

En dehors du noyau, dans le corps cellulaire de fibroblastes adhérents, RAR α forme des complexes avec PFN2a, une protéine qui fixe l'actine-G et qui est un coordonnateur majeur de la croissance des filaments d'actine. En effet, PFN2a associée à l'actine G se lie aux PRM des protéines d'allongement des filaments tels que les formines et Ena/VASP, et accélère l'allongement de ces filaments (Bear and Gertler, 2009) au niveau des structures de protrusion (lamellipodes, filopodes) et contractiles (fibres de contrainte des cellules non musculaires), qui jouent un rôle central dans la morphologie cellulaire, la migration cellulaire et l'adhérence cellulaire (Blanchoin et al., 2014; Blanchoin and Michelot, 2012).

Comment RAR α interfère avec ces processus? A partir de nos résultats, nous privilégions l'hypothèse selon laquelle RAR α entre en compétition avec les protéines d'allongement pour la liaison de PFN2a. En effet, comme les formines et les protéines Ena/VASP, RAR α se lie au domaine de type SH3 de PFN2a par un PRM (Kursula et al., 2008). En rentrant en compétition avec des formines et/ou Ena/VASP pour lier PFN2a, RAR α empêcherait la délivrance des sous-unités d'actine aux filaments, bloquant ainsi l'allongement.

Il faut souligner que la bonne régulation de tous les processus à base d'actine dépend d'un équilibre fin et dynamique entre les pools de profiline et les protéines d'élongation liés aux extrémités barbues de F-actine. En effet, d'après un certain nombre d'études récentes, l'augmentation des concentrations en profiline perturbe les réseaux d'actine-F (Pernier et al., 2016, Rotty et al., 2015, Suarez et coll., 2015). Par conséquent, un nouveau rôle de RAR α pourrait être de contrôler la quantité de PFN2a disponible pour l'allongement des filaments. Dans ces conditions, aussi bien une augmentation qu'une diminution de RAR α dans le cytoplasme aurait des répercussions sur l'architecture du cytosquelette d'actine.

4. Quelles seraient les conséquences de la variation du pool de RAR α dans le cytoplasme sur la fonction d'une cellule ?

Plusieurs types de cellules cancéreuses sont caractérisés par des voies de signalisation aberrantes ayant des conséquences sur la phosphorylation et d'autres modifications de RAR α (Carrier et al., 2016). Ceci soulève la question de savoir si, dans de telles cellules, la quantité de RAR α cytosolique et donc de complexes PFN2a-RAR α serait augmentée ou diminuée avec des conséquences sur l'adhérence.

Dans le contexte d'un contrat d'interface avec l'hôpital de C. Rochette-Egly, le laboratoire a observé que le pool cytosolique de RAR α est augmenté dans des fibroblastes issus du stroma (CAF) de tumeurs mammaires humaines erbB-2 positives, hautement invasives. Etant donné que l'état des CAF est souvent associé au pronostic des patients (Box et al., 2010; Goetz et al., 2011), il a été suggéré que la thérapie doit cibler, à la fois, la tumeur et son microenvironnement (Sherman et al., 2012). D'où l'hypothèse qu'une augmentation de RAR α dans le cytosol des fibroblastes du stroma des tumeurs pourrait avoir une valeur pronostic quant à l'évolution métastatique de la tumeur et le cas échéant, pourrait être une cible pour la thérapie anticancéreuse.

D'après des travaux préliminaires, les cellules neuronales renferment aussi des complexes RAR α / PFN2a. C'est pourquoi on ne peut pas exclure que dans certains maladies dégénératives du système nerveux, des altérations des niveaux de RAR α dans le cytoplasme affecteraient la croissance et la plasticité des neurones (Michaelsen-Preusse et al., 2016).

En conclusion, mes travaux ouvrent de nouvelles voies d'investigation d'autant plus que le laboratoire est le seul à avoir produit des anticorps anti-RAR spécifiques pour des expériences d'immunocytochimie et d'immunohistochimie.

REFERENCES

- Akin, O., and R.D. Mullins. 2008. Capping Protein Increases the Rate of Actin-Based Motility by Promoting Filament Nucleation by the Arp2/3 Complex. *Cell*. 133:841-851.
- Al Tanoury, Z., S. Gaouar, A. Piskunov, T. Ye, S. Urban, B. Jost, C. Keime, I. Davidson, A. Dierich, and C. Rochette-Egly. 2014. Phosphorylation of the retinoic acid receptor RAR γ 2 is crucial for the neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*. 127:2095.
- Al Tanoury, Z., A. Piskunov, and C.c. Rochette-Egly. 2013. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects: Thematic Review Series: Fat-Soluble Vitamins: Vitamin A. *Journal of Lipid Research*. 54:1761-1775.
- Alberts, A.S. 2001. Identification of a Carboxyl-terminal Diaphanous-related Formin Homology Protein Autoregulatory Domain. *Journal of Biological Chemistry*. 276:2824-2830.
- Altucci, L., E. Wilhelm, and H. Gronemeyer. 2004. Leukemia: beneficial actions of retinoids and rexinoids. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 36:178-182.
- Ananthakrishnan, R., and A. Ehrlicher. 2007. The Forces Behind Cell Movement. *International Journal of Biological Sciences*. 3:303-317.
- Andrianantoandro, E., and T.D. Pollard. 2006. Mechanism of Actin Filament Turnover by Severing and Nucleation at Different Concentrations of ADF/Cofilin. *Molecular Cell*. 24:13-23.
- Arriza, J.L., C. Weinberger, G. Cerelli, T.M. Glaser, B.L. Handelin, D.E. Housman, and R.M. Evans. 1987. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*. 237:268-275.
- Azatov, M., S.M. Goicoechea, C.A. Otey, and A. Upadhyaya. 2016. The actin crosslinking protein palladin modulates force generation and mechanosensitivity of tumor associated fibroblasts. *Scientific Reports*. 6:28805.
- Baker, A.R., D.P. McDonnell, M. Hughes, T.M. Crisp, D.J. Mangelsdorf, M.R. Haussler, J.W. Pike, J. Shine, and B.W. O'Malley. 1988. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 85:3294-3298.
- Ball, L.J., R. Kühne, J. Schneider-Mergener, and H. Oschkinat. 2005. Recognition of Proline-Rich Motifs by Protein-Protein-Interaction Domains. *Angewandte Chemie International Edition*. 44:2852-2869.
- Barzik, M., T.I. Kotova, H.N. Higgs, L. Hazelwood, D. Hanein, F.B. Gertler, and D.A. Schafer. 2005. ENA/VASP PROTEINS ENHANCE ACTIN POLYMERIZATION IN THE PRESENCE OF BARBED END CAPPING PROTEINS. *The Journal of biological chemistry*. 280:28653-28662.
- Bastien, J., S. Adam-Stitah, T. Riedl, J.-M. Egly, P. Chambon, and C. Rochette-Egly. 2000. TFIIH Interacts with the Retinoic Acid Receptor α and Phosphorylates Its AF-1-activating Domain through cdk7. *Journal of Biological Chemistry*. 275:21896-21904.
- Bastien, J., and C. Rochette-Egly. 2004. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene*. 328:1-16.

- Baum, J., A.T. Papenfuss, B. Baum, T.P. Speed, and A.F. Cowman. 2006. Regulation of apicomplexan actin-based motility. *Nat Rev Micro.* 4:621-628.
- Bear, J.E., and F.B. Gertler. 2009. Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end. *Journal of Cell Science.* 122:1947.
- Beck, M.R., R.D.S. Dixon, S.M. Goicoechea, G.S. Murphy, J.G. Brungardt, M.T. Beam, P. Srinath, J. Patel, J. Mohiuddin, C.A. Otey, and S.L. Campbell. 2013. Structure and Function of Palladin's Actin Binding Domain. *Journal of Molecular Biology.* 425:3325-3337.
- Bellovino, D., T. Morimoto, F. Tosetti, and S. Gaetani. 1996. Retinol Binding Protein and Transthyretin Are Secreted as a Complex Formed in the Endoplasmic Reticulum in HepG2 Human Hepatocarcinoma Cells. *Experimental Cell Research.* 222:77-83.
- Benbrook, D.M., P. Chambon, C. Rochette-Egly, and M.A. Asson-Batres. 2014. History of Retinoic Acid Receptors. In *The Biochemistry of Retinoic Acid Receptors I: Structure, Activation, and Function at the Molecular Level.* A.M. Asson-Batres and C. Rochette-Egly, editors. Springer Netherlands, Dordrecht. 1-20.
- Berry, D.C., and N. Noy. 2009. All-trans-Retinoic Acid Represses Obesity and Insulin Resistance by Activating both Peroxisome Proliferation-Activated Receptor β/δ and Retinoic Acid Receptor. *Molecular and Cellular Biology.* 29:3286-3296.
- Biddie, S.C., S. John, and G.L. Hager. 2010. Genome-Wide Mechanisms of Nuclear Receptor Action. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM.* 21:3.
- Birbach, A. 2008. Profilin, a multi-modal regulator of neuronal plasticity. *BioEssays.* 30:994-1002.
- Blanchoin, L., R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes, and J. Plastino. 2014. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev.* 94.
- Blanchoin, L., and A. Michelot. 2012. Actin Cytoskeleton: A Team Effort during Actin Assembly. *Current Biology.* 22:R643-R645.
- Blomhoff, R., and H.K. Blomhoff. 2006. Overview of retinoid metabolism and function. *Journal of Neurobiology.* 66:606-630.
- Blomhoff, R., M.H. Green, and K.R. Norum. 1992. Vitamin A: Physiological and Biochemical Processing. *Annual Review of Nutrition.* 12:37-57.
- Boukhelifa, M., M.M. Parast, J.E. Bear, F.B. Gertler, and C.A. Otey. 2004. Palladin is a novel binding partner for Ena/VASP family members. *Cell Motility and the Cytoskeleton.* 58:17-29.
- Bour, G., E. Gaillard, N. Bruck, S. Lalevée, J.-L. Plassat, D. Busso, J.-P. Samama, and C. Rochette-Egly. 2005a. Cyclin H binding to the RAR α activation function (AF)-2 domain directs phosphorylation of the AF-1 domain by cyclin-dependent kinase 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 102:16608-16613.
- Bour, G., J.-L. Plassat, A. Bauer, S. Lalevée, and C. Rochette-Egly. 2005b. Vinexin β Interacts with the Non-phosphorylated AF-1 Domain of Retinoid Receptor γ (RAR γ) and Represses RAR γ -mediated Transcription. *Journal of Biological Chemistry.* 280:17027-17037.
- Bour, G., R. Taneja, and C. Rochette Egly. 2006. Mouse embryocarcinoma F9 cells and retinoic acid: A model to study the molecular mechanisms of endodermal

- differentiation. *In Advances in Developmental Biology*. Vol. Volume 16. T. Reshma, editor. Elsevier. 211-253.
- Bourguet, W., P. Germain, and H. Gronemeyer. 2000a. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends in Pharmacological Sciences*. 21:381-388.
- Bourguet, W., M. Ruff, P. Chambon, H. Gronemeyer, and D. Moras. 1995. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nature*.
- Bourguet, W., V. Vivat, J.-M. Wurtz, P. Chambon, H. Gronemeyer, and D. Moras. 2000b. Crystal Structure of a Heterodimeric Complex of RAR and RXR Ligand-Binding Domains. *Molecular Cell*. 5:289-298.
- Box, C., S.J. Rogers, M. Mendiola, and S.A. Eccles. 2010. Tumour-microenvironmental interactions: paths to progression and targets for treatment. *Seminars in Cancer Biology*. 20:128-138.
- Brand, N., M. Petkovich, A. Krust, P. Chambon, H. de The, A. Marchio, P. Tiollais, and A. Dejean. 1988. Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature*. 332:850-853.
- Breitsprecher, D., and B.L. Goode. 2013. Formins at a glance. *Journal of Cell Science*. 126:1.
- Breitsprecher, D., A.K. Kiesewetter, J. Linkner, M. Vinzenz, T.E.B. Stradal, J.V. Small, U. Curth, R.B. Dickinson, and J. Faix. 2011. Molecular mechanism of Ena/VASP-mediated actin-filament elongation. *The EMBO Journal*. 30:456-467.
- Brélivet, Y., N. Rochel, and D. Moras. 2012. Structural analysis of nuclear receptors: From isolated domains to integral proteins. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 348:466-473.
- Brondani, V., Q. Schefer, F. Hamy, and T. Klimkait. 2005. The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 regulates phospho-Ser77 retinoic acid receptor α stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 328:6-13.
- Bruck, N., D. Vitoux, C. Ferry, V. Duong, A. Bauer, H. de The, and C. Rochette-Egly. 2009. A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RAR α to target promoters. *The EMBO Journal*. 28:34-47.
- Budhu, A.S., and N. Noy. 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. *Molecular and Cellular Biology*. 22:2632-2641.
- Burridge, K., and E.S. Wittchen. 2013. The tension mounts: Stress fibers as force-generating mechanotransducers. *The Journal of Cell Biology*. 200:9-19.
- Campellone, K.G., and M.D. Welch. 2010. A Nucleator Arms Race: Cellular Control of Actin Assembly. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 11:237-251.
- Carlsson, L., L.E. Nystrom, I. Sundkvist, F. Markey, and U. Lindberg. 1977. Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *Journal of Molecular Biology*. 115:465-483.
- Cedergren-Zeppezauer, E.S., N.C.W. Goonesekere, M.D. Rozycki, J.C. Myslik, Z. Dauter, U. Lindberg, and C.E. Schutt. 1994. Crystallization and Structure

- Determination of Bovine Profilin at 2.0 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*. 240:459-475.
- Chambon, P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *The FASEB Journal*. 10:940-954.
- Chandra, V., P. Huang, Y. Hamuro, S. Raghuram, Y. Wang, T.P. Burris, and F. Rastinejad. 2008. Structure of the intact PPAR- γ -RXR- α nuclear receptor complex on DNA. *Nature*. 456:350-356.
- Chang, C.S., J. Kokontis, and S.T. Liao. 1988. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science*. 240:324-326.
- Chatagnon, A., P. Veber, V. Morin, J. Bedo, G. Triqueneaux, M. Sémon, V. Laudet, F. d'Alché-Buc, and G. Benoit. 2015. RAR/RXR binding dynamics distinguish pluripotency from differentiation associated cis-regulatory elements. *Nucleic Acids Research*. 43:4833-4854.
- Chebaro, Y., I. Amal, N. Rochel, C. Rochette-Egly, R.H. Stote, and A. Dejaegere. 2013. Phosphorylation of the Retinoic Acid Receptor Alpha Induces a Mechanical Allosteric Regulation and Changes in Internal Dynamics. *PLoS Computational Biology*. 9:e1003012.
- Chen, J.Y., S. Penco, J. Ostrowski, P. Balaguer, M. Pons, J.E. Starrett, P. Reczek, P. Chambon, and H. Gronemeyer. 1995. RAR-specific agonist/antagonists which dissociate transactivation and AP1 transrepression inhibit anchorage-independent cell proliferation. *The EMBO Journal*. 14:1187-1197.
- Chen, Q., S. Nag, and T.D. Pollard. 2012. Formins filter modified actin subunits during processive elongation(). *Journal of structural biology*. 177:32-39.
- Chereau, D., F. Kerff, P. Graceffa, Z. Grabarek, K. Langsetmo, and R. Dominguez. 2005. Actin-bound structures of Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP)-homology domain 2 and the implications for filament assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:16644-16649.
- Chesarone, M.A., A.G. DuPage, and B.L. Goode. 2010. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:62-74.
- Cingolani, L.A., and Y. Goda. 2008. Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci*. 9:344-356.
- Clagett-Dame, M., and H.F. DeLuca. 2002. The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development *Annual Review of Nutrition*. 22:347-381.
- Colombelli, J., A. Besser, H. Kress, E.G. Reynaud, P. Girard, E. Caussin, U. Haselmann, J.V. Small, U.S. Schwarz, and E.H.K. Stelzer. 2009. Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization. *Journal of Cell Science*. 122:1665.
- D'Ambrosio, D.N., R.D. Clugston, and W.S. Blaner. 2011. Vitamin A Metabolism: An Update. *Nutrients*. 3:63-103.
- de The, H., M. del Mar Vivanco-Ruiz, P. Tiollais, H. Stunnenberg, and A. Dejean. 1990. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor & beta;gene. *Nature*. 343:177-180.

- de The, H., A. Marchio, P. Tiollais, and A. Dejean. 1989. Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor alpha and beta genes. *The EMBO Journal*. 8:429-433.
- Delacroix, L., E. Moutier, G. Altobelli, S. Legras, O. Poch, M.-A. Choukrallah, I. Bertin, B. Jost, and I. Davidson. 2010. Cell-Specific Interaction of Retinoic Acid Receptors with Target Genes in Mouse Embryonic Fibroblasts and Embryonic Stem Cells. *Molecular and Cellular Biology*. 30:231-244.
- Delva, L., J.-N. Bastie, C. Rochette-Egly, R. Kraïba, N. Balitrand, G. Despouy, P. Chambon, and C. Chomienne. 1999. Physical and Functional Interactions between Cellular Retinoic Acid Binding Protein II and the Retinoic Acid-Dependent Nuclear Complex. *Molecular and Cellular Biology*. 19:7158-7167.
- Despouy, G., J.-N. Bastie, S. Deshaies, N. Balitrand, A. Mazharian, C. Rochette-Egly, C. Chomienne, and L. Delva. 2003. Cyclin D3 Is a Cofactor of Retinoic Acid Receptors, Modulating Their Activity in the Presence of Cellular Retinoic Acid-binding Protein II. *Journal of Biological Chemistry*. 278:6355-6362.
- Dilworth, F.J., and P. Chambon. 2001. Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene*. 20:3047-3054.
- Diniz Ada, S., and L.M. Santos. 2000. Vitamin A deficiency and xerophthalmia.
- Dominguez, R. 2016. The WH2 Domain and Actin Nucleation: Necessary but Insufficient. *Trends in Biochemical Sciences*. 41:478-490.
- Duong, V., and C. Rochette-Egly. 2011. The molecular physiology of nuclear retinoic acid receptors. From health to disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1812:1023-1031.
- Dupe, V., M. Davenne, J. Brocard, P. Dolle, M. Mark, A. Dierich, P. Chambon, and F.M. Rijli. 1997. In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development*. 124:399.
- Durand, B., M. Saunders, P. Leroy, M. Leid, and P. Chambon. 1992. All-trans and 9-cis retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs. *Cell*. 71:73-85.
- Durand, R.E., and J.A. Raleigh. 1998. Identification of nonproliferating but viable hypoxic tumor cells in vivo. *Cancer Res*. 58.
- Dyson, H.J., and P.E. Wright. 2005. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6.
- Edwards, M., A. Zwolak, D.A. Schafer, D. Sept, R. Dominguez, and J.A. Cooper. 2014. Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15:677-689.
- Egea, P.F., N. Rochel, C. Birck, P. Vachette, P.A. Timmins, and D. Moras. 2001. Effects of ligand binding on the association properties and conformation in solution of retinoic acid receptors RXR and RAR1. *Journal of Molecular Biology*. 307:557-576.
- Epping, M.T., L. Wang, M.J. Edel, L. Carlée, M. Hernandez, and R. Bernards. 2005. The Human Tumor Antigen PRAME Is a Dominant Repressor of Retinoic Acid Receptor Signaling. *Cell*. 122:835-847.
- Evans, Ronald M., and David J. Mangelsdorf. 2014. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell*. 157:255-266.

- Faix, J., D. Breitsprecher, T.E.B. Stradal, and K. Rottner. 2009. Filopodia: Complex models for simple rods. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 41:1656-1664.
- Faix, J., and R. Grosse. 2006. Staying in Shape with Formins. *Developmental Cell*. 10:693-706.
- Farboud, B., H. Hauksdottir, Y. Wu, and M.L. Privalsky. 2003. Isotype-Restricted Corepressor Recruitment: a Constitutively Closed Helix 12 Conformation in Retinoic Acid Receptors β and γ Interferes with Corepressor Recruitment and Prevents Transcriptional Repression. *Molecular and Cellular Biology*. 23:2844-2858.
- Farboud, B., and M.L. Privalsky. 2004. Retinoic Acid Receptor- α Is Stabilized in a Repressive State by Its C-Terminal, Isotype-Specific F Domain. *Molecular Endocrinology*. 18:2839-2853.
- Ferron, F., G. Rebowski, S.H. Lee, and R. Dominguez. 2007. Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *The EMBO Journal*. 26:4597-4606.
- Ferry, C., S. Gaouar, B. Fischer, M. Boeglin, N. Paul, E. Samarut, A. Piskunov, G. Pankotai-Bodo, L. Brino, and C. Rochette-Egly. 2011. Cullin 3 mediates SRC-3 ubiquitination and degradation to control the retinoic acid response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:20603-20608.
- Ferry, C., M. Gianni, S. Lalevée, N. Bruck, J.-L. Plassat, I. Raska, E. Garattini, and C. Rochette-Egly. 2009. SUG-1 Plays Proteolytic and Non-proteolytic Roles in the Control of Retinoic Acid Target Genes via Its Interaction with SRC-3. *The Journal of Biological Chemistry*. 284:8127-8135.
- Fraser, P.D., and P.M. Bramley. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*. 43:228-265.
- Freund, C., H.G. Schmalz, J. Sticht, and R. Kuhne. 2008. Proline-rich sequence recognition domains (PRD): ligands, function and inhibition.
- Géhin, M., V. Vivat, J.-M. Wurtz, R. Losson, P. Chambon, D. Moras, and H. Gronemeyer. 1999. Structural basis for engineering of retinoic acid receptor isotype-selective agonists and antagonists. *Chemistry & Biology*. 6:519-529.
- Germain, P., L. Altucci, W. Bourguet, C. Rochette-Egly, and H. Gronemeyer. 2003. Nuclear receptor superfamily: Principles of signaling. *Pure Appl. Chem.*:1619-1664.
- Germain, P., P. Chambon, G. Eichele, R.M. Evans, M.A. Lazar, M. Leid, A.R. De Lera, R. Lotan, D.J. Mangelsdorf, and H. Gronemeyer. 2006a. International Union of Pharmacology. LX. Retinoic Acid Receptors. *Pharmacological Reviews*. 58:712-725.
- Germain, P., P. Chambon, G. Eichele, R.M. Evans, M.A. Lazar, M. Leid, A.R. De Lera, R. Lotan, D.J. Mangelsdorf, and H. Gronemeyer. 2006b. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X Receptors. *Pharmacological Reviews*. 58:760-772.
- Germain, P., J. Iyer, C. Zechel, and H. Gronemeyer. 2002. Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy. *Nature*. 415:187-192.
- Germain, P., S. Kammerer, E. Pérez, C. Peluso-Iltis, D. Tortolani, F.C. Zusi, J. Starrett, P. Lapointe, J.-P. Daris, A. Marinier, A.R. de Lera, N. Rochel, and H.

- Gronemeyer. 2004. Rational design of RAR-selective ligands revealed by RAR β crystal structure. *EMBO Reports*. 5:877-882.
- Germain, P., B. Staels, C. Dacquet, M. Spedding, and V. Laudet. 2006c. Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacological Reviews*. 58:685-704.
- Ghosh, J.C., X. Yang, A. Zhang, M.H. Lambert, H. Li, H.E. Xu, and J.D. Chen. 2002. Interactions that determine the assembly of a retinoid X receptor/corepressor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99:5842-5847.
- Gianni, Maurizio, A. Boldetti, V. Guarnaccia, A. Rambaldi, E. Parrella, I. Raska, C. Rochette-Egly, G. Del Sal, A. Rustighi, M. Terao, and E. Garattini. 2009. Inhibition of the Peptidyl-Prolyl-Isomerase Pin1 Enhances the Responses of Acute Myeloid Leukemia Cells to Retinoic Acid via Stabilization of RAR α and PML-RAR α . *Cancer Research*. 69:1016.
- Gianni, M., A. Bauer, E. Garattini, P. Chambon, and C. Rochette-Egly. 2002. Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR γ degradation and transactivation. *The EMBO Journal*. 21:3760-3769.
- Giguere, V., E.S. Ong, P. Segui, and R.M. Evans. 1987. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature*. 330:624-629.
- Gillespie, R.F., and L.J. Gudas. 2007. Retinoid Regulated Association of Transcriptional Coregulators and the Polycomb Group Protein SUZ12 with the Retinoic Acid Response Elements of Hoxa1, RAR β (2), and Cyp26A1 in F9 Embryonal Carcinoma Cells. *Journal of molecular biology*. 372:298-316.
- Glass, C.K., and M.G. Rosenfeld. 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes & Development*. 14:121-141.
- Goetz, J.G., S. Minguet, I. Navarro-LÈrida, J.J. Lazcano, R. Samaniego, E. Calvo, M. Tello, T. Osteso-Ib-Òez, T. Pellinen, A. Echarri, A. Cerezo, A.J.P. Klein-Szanto, R. Garcia, P.J. Keely, P. S-nchez-Mateos, E. Cukierman, and M.A. Del†Pozo. 2011. Biomechanical Remodeling of the Microenvironment by Stromal Caveolin-1 Favors Tumor Invasion and Metastasis. *Cell*. 146:148-163.
- Goode, B.L., and M.J. Eck. 2007. Mechanism and Function of Formins in the Control of Actin Assembly. *Annual Review of Biochemistry*. 76:593-627.
- Gould, C.J., S. Maiti, A. Michelot, B.R. Graziano, L. Blanchoin, and B.L. Goode. 2011. The formin DAD domain plays dual roles in autoinhibition and actin nucleation. *Current biology : CB*. 21:384-390.
- Green, S., P. Walter, V. Kumar, A. Krust, J.-M. Bornert, P. Argos, and P. Chambon. 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. 320:134-139.
- Gundersen, T.E., and R. Blomhoff. 2001. Qualitative and quantitative liquid chromatographic determination of natural retinoids in biological samples. *J Chromatogr*. 935:13-43.
- Gurung, R., R. Yadav, J.G. Brungardt, A. Orlova, E.H. Egelman, and M.R. Beck. 2016. Actin Polymerization is Stimulated by Actin Crosslinking Protein Palladin. *The Biochemical journal*. 473:383-396.
- Haikarainen, T., W.-Q. Chen, G. Lubec, and P. Kursula. 2009. Structure, modifications and ligand-binding properties of rat profilin 2a. *Acta Crystallographica Section D*. 65:303-311.

- Hamy, F., N. Verwaerde P Fau - Helbecque, P. Helbecque N Fau - Formstecher, J.P. Formstecher P Fau - Henichart, and J.P. Henichart. 1991. Nuclear targeting of a viral-cointernalized protein by a short signal sequence from human retinoic acid receptors.
- Hansen, S.D., and R.D. Mullins. 2010. VASP is a processive actin polymerase that requires monomeric actin for barbed end association. *The Journal of Cell Biology*. 191:571.
- Harris, E.S., I. Rouiller, D. Hanein, and H.N. Higgs. 2006. Mechanistic Differences in Actin Bundling Activity of Two Mammalian Formins, FRL1 and mDia2. *Journal of Biological Chemistry*. 281:14383-14392.
- Harrison, E.H. 2012. Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. *Biochimica et biophysica acta*. 1821:70-77.
- Hauksdottir, H., B. Farboud, and M.L. Privalsky. 2003. Retinoic Acid Receptors β and γ Do Not Repress, But Instead Activate Target Gene Transcription in Both the Absence and Presence of Hormone Ligand. *Molecular Endocrinology*. 17:373-385.
- Henty-Ridilla, Jessica L., and Bruce L. Goode. 2015. Global Resource Distribution: Allocation of Actin Building Blocks by Profilin. *Developmental Cell*. 32:5-6.
- Higgs, H.N. 2005. Formin proteins: a domain-based approach. *Trends in Biochemical Sciences*. 30:342-353.
- Hiji, A.K., L. Michalik, and W. Wahli. 2002. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 59:790-798.
- Hollenberg, S.M., C. Weinberger, E.S. Ong, G. Cerelli, A. Oro, R. Lebo, E.B. Thompson, M.G. Rosenfeld, and R.M. Evans. 1986. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*. 318:635-641.
- Honoré, B., P. Madsen, A.H. Andersen, and H. Leffers. 1993. Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II. *FEBS Letters*. 330:151-155.
- Hopkins, F.G. 1912. Feeding experiments illustrating the importance of accessory factors in normal dietaries. *The Journal of Physiology*. 44:425-460.
- Horlein, A.J., A.M. Naar, T. Heinzl, J. Torchia, B. Gloss, R. Kurokawa, A. Ryan, Y. Kamei, M. Soderstrom, C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld. 1995. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*. 377:397-404.
- Hou, Z., H. Peng, D.E. White, D.G. Negorev, G.G. Maul, Y. Feng, G.D. Longmore, S. Waxman, A. Zelent, and F.J. Rauscher. 2010. LIM protein Ajuba functions as a nuclear receptor corepressor and negatively regulates retinoic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107:2938-2943.
- Hu, X., Y. Chen, M. Farooqui, M.C. Thomas, C.-M. Chiang, and L.-N. Wei. 2004. Suppressive Effect of Receptor-interacting Protein 140 on Coregulator Binding to Retinoic Acid Receptor Complexes, Histone-modifying Enzyme Activity, and Gene Activation. *Journal of Biological Chemistry*. 279:319-325.
- Hu, X.X., L. Zhong, X. Zhang, Y.M. Gao, and B.Z. Liu. 2014 . NLS-RARalpha promotes proliferation and inhibits differentiation in HL-60 cells.

- Hua, S., R. Kittler, and K.P. White. 2009. Genomic Antagonism between Retinoic Acid and Estrogen Signaling in Breast Cancer. *Cell*. 137:1259-1271.
- Huang, S., J. Laoukili, M.T. Epping, J. Koster, M. Hölzel, B.A. Westerman, W. Nijkamp, A. Hata, S. Asgharzadeh, R.C. Seeger, R. Versteeg, R.L. Beijersbergen, and R. Bernards. 2009. ZNF423 Is Critically Required for Retinoic Acid-Induced Differentiation and Is a Marker of Neuroblastoma Outcome. *Cancer Cell*. 15:328-340.
- Huda, S., D. Pilans, M. Makurath, T. Hermans, K. Kandere-Grzybowska, and B.A. Grzybowski. 2014. Microfabricated Systems and Assays for Studying the Cytoskeletal Organization, Micromechanics, and Motility Patterns of Cancerous Cells. *Advanced materials interfaces*. 1:1400158.
- Hussey, G.D., and M. Klein. 1990. A Randomized, Controlled Trial of Vitamin A in Children with Severe Measles. *New England Journal of Medicine*. 323:160-164.
- IUPAC-IUB. 1978. International Union of Nutritional Sciences, Committee 1/I, Nomenclature. *Nutr Abstr Rev*. 48A:831-835.
- Jégou, A., T. Niedermayer, J. Orbán, D. Didry, R. Lipowsky, M.-F. Carlier, and G. Romet-Lemonne. 2011. Individual Actin Filaments in a Microfluidic Flow Reveal the Mechanism of ATP Hydrolysis and Give Insight Into the Properties of Profilin. *PLOS Biology*. 9:e1001161.
- Jockusch, B.M., K. Murk, and M. Rothkegel. 2007. The profile of profilins
Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Vol. 159. S.G. Amara, E. Bamberg, B. Fleischmann, T. Gudermann, S.C. Hebert, R. Jahn, W.J. Lederer, R. Lill, A. Miyajima, S. Offermanns, and R. Zechner, editors. Springer Berlin Heidelberg. 131-149.
- Johnson, A.T., L. Wang, A.M. Standeven, M. Escobar, and R.A.S. Chandraratna. 1999. Synthesis and biological activity of high-affinity retinoic acid receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 7:1321-1338.
- Karrer, P., R. Morf, and K. Schoepp. 1931. *Helv Chim Acta*. 14:1431-1436.
- Katoh, K., Y. Kano, and S. Ookawara. 2008. Role of stress fibers and focal adhesions as a mediator for mechano-signal transduction in endothelial cells in situ. *Vascular Health and Risk Management*. 4:1273-1282.
- Khaitlina, S., H. Fitz, and H. Hinssen. 2013. The interaction of gelsolin with tropomyosin modulates actin dynamics. *FEBS Journal*. 280:4600-4611.
- Khetchoumian, K., M. Teletin, J. Tisserand, M. Mark, B. Herquel, M. Ignat, J. Zucman-Rossi, F. Cammas, T. Lerouge, C. Thibault, D. Metzger, P. Chambon, and R. Losson. 2007. Loss of Trim24 (Tif1[alpha]) gene function confers oncogenic activity to retinoic acid receptor alpha. *Nat Genet*. 39:1500-1506.
- Khorasanizadeh, S., and F. Rastinejad. 2001. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends in Biochemical Sciences*. 26:384-390.
- Kinosian, H.J., L.A. Selden, L.C. Gershman, and J.E. Estes. 2000. Interdependence of Profilin, Cation, and Nucleotide Binding to Vertebrate Non-Muscle Actin. *Biochemistry*. 39:13176-13188.
- Klaholz, B.P., A. Mitschler, and D. Moras. 2000. Structural basis for isotype selectivity of the human retinoic acid nuclear receptor1. *Journal of Molecular Biology*. 302:155-170.

- Kopf, E., J.-L. Plassat, V. Vivat, H. de Thé, P. Chambon, and C. Rochette-Egly. 2000. Dimerization with Retinoid X Receptors and Phosphorylation Modulate the Retinoic Acid-induced Degradation of Retinoic Acid Receptors α and γ through the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 275:33280-33288.
- Kovar, D.R. 2006. Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Current Opinion in Cell Biology*. 18:11-17.
- Kovar, D.R., E.S. Harris, R. Mahaffy, H.N. Higgs, and T.D. Pollard. 2006. Control of the Assembly of ATP- and ADP-Actin by Formins and Profilin. *Cell*. 124:423-435.
- Krause, M., and A. Gautreau. 2014. Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 15:577-590.
- Kruse, S.W., K. Suino-Powell, X.E. Zhou, J.E. Kretschman, R. Reynolds, C. Vonrhein, Y. Xu, L. Wang, S.Y. Tsai, M.-J. Tsai, and H.E. Xu. 2008. Identification of COUP-TFII Orphan Nuclear Receptor as a Retinoic Acid-Activated Receptor. *PLoS Biol*. 6:e227.
- Kursula, P., I. Kursula, M. Massimi, Y.-H. Song, J. Downer, W.A. Stanley, W. Witke, and M. Wilmanns. 2008. High-resolution Structural Analysis of Mammalian Profilin 2a Complex Formation with Two Physiological Ligands: The Formin Homology 1 Domain of mDia1 and the Proline-rich Domain of VASP. *Journal of Molecular Biology*. 375:270-290.
- Kusakabe, T.G., N. Takimoto, M. Jin, and M. Tsuda. 2009. Evolution and the origin of the visual retinoid cycle in vertebrates. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 364:2897-2910.
- Lalevée, S., Y.N. Anno, A. Chatagnon, E. Samarut, O. Poch, V. Laudet, G. Benoit, O. Lecompte, and C. Rochette-Egly. 2011. Genome-wide in Silico Identification of New Conserved and Functional Retinoic Acid Receptor Response Elements (Direct Repeats Separated by 5 bp). *Journal of Biological Chemistry*. 286:33322-33334.
- Lalevée, S., G. Bour, M. Quinternet, E. Samarut, P. Kessler, M. Vitorino, N. Bruck, M.-A. Delsuc, J.-L. Vonesch, B. Kieffer, and C. Rochette-Egly. 2010. Vinexin β , an atypical β -sensor, β of retinoic acid receptor α signaling: union and sequestration, separation, and phosphorylation. *The FASEB Journal*. 24:4523-4534.
- Laporte, D., N. Ojkic, D. Vavylonis, and J.-Q. Wu. 2012. α -Actinin and fimbrin cooperate with myosin II to organize actomyosin bundles during contractile-ring assembly. *Molecular Biology of the Cell*. 23:3094-3110.
- Laudet, V., and H. Gronemeyer. 2001. H. Nuclear Receptor Factsbook. . London: Academic Press.
- Laursen, K.B., P.-M. Wong, and L.J. Gudas. 2012. Epigenetic regulation by RAR α maintains ligand-independent transcriptional activity. *Nucleic Acids Research*. 40:102-115.
- Lavery, Derek N., and Iain J. McEwan. 2005. Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochemical Journal*. 391:449-464.

- Le Douarin, B., C. Zechel, J.M. Garnier, Y. Lutz, L. Tora, P. Pierrat, D. Heery, H. Gronemeyer, P. Chambon, and R. Losson. 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. *The EMBO Journal*. 14:2020-2033.
- le Maire, A., and W. Bourguet. 2014. Retinoic Acid Receptors: Structural Basis for Coregulator Interaction and Exchange. *In* The Biochemistry of Retinoic Acid Receptors I: Structure, Activation, and Function at the Molecular Level. A.M. Asson-Batres and C. Rochette-Egly, editors. Springer Netherlands, Dordrecht. 37-54.
- le Maire, A., C. Teyssier, C. Erb, M. Grimaldi, S. Alvarez, A.R. de Lera, P. Balaguer, H. Gronemeyer, C.A. Royer, P. Germain, and W. Bourguet. 2010. A unique secondary-structure switch controls constitutive gene repression by retinoic acid receptor. *Nat Struct Mol Biol*. 17:801-807.
- Le May, N., I. Iltis, J.-C. Amé, A. Zhovmer, D. Biard, J.-M. Egly, V. Schreiber, and F. Coin. 2012. Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase Regulates Retinoic Acid Receptor-Mediated Gene Expression. *Molecular Cell*. 48:785-798.
- Le May, N., D. Mota-Fernandes, R. Vélez-Cruz, I. Iltis, D. Biard, and J.M. Egly. 2010. NER Factors Are Recruited to Active Promoters and Facilitate Chromatin Modification for Transcription in the Absence of Exogenous Genotoxic Attack. *Molecular Cell*. 38:54-66.
- Lee, R., and McDowell. 2013. Vitamin History, the Early Years First Edition Design Publishing.
- Lee, W.L., J.M. Grimes, and R.C. Robinson. 2015. Yersinia effector YopO uses actin as bait to phosphorylate proteins that regulate actin polymerization. *Nat Struct Mol Biol*. 22:248-255.
- Lefebvre, P., P.J. Martin, S. Flajollet, S. Dedieu, X. Billaut, and B. Lefebvre. 2005. Transcriptional Activities of Retinoic Acid Receptors. *In* Vitamins & Hormones. Vol. Volume 70. Academic Press. 199-264.
- Leid, M., P. Kastner, R. Lyons, H. Nakshatri, M. Saunders, T. Zacharewski, J.-Y. Chen, A. Staub, J.-M. Garnier, S. Mader, and P. Chambon. 1992. Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell*. 68:377-395.
- Li, Y., M.H. Lambert, and H.E. Xu. 2003. Activation of Nuclear Receptors: A Perspective from Structural Genomics. *Structure*. 11:741-746.
- Liu, J., N.B. Perumal, C.J. Oldfield, E.W. Su, V.N. Uversky, and A.K. Dunker. 2006. Intrinsic Disorder in Transcription Factors. *Biochemistry*. 45:6873-6888.
- Loosfelt, H., M. Atger, M. Misrahi, A. Guiochon-Mantel, C. Meriel, F. Logeat, R. Benarous, and E. Milgrom. 1986. Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83:9045-9049.
- Lotan, R. 1980. Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta*. 605:33-91.
- Loudig, O., C. Babichuk, J. White, S. Abu-Abed, C. Mueller, and M. Petkovich. 2000. Cytochrome P450RAI(CYP26) Promoter: A Distinct Composite Retinoic Acid Response Element Underlies the Complex Regulation of Retinoic Acid Metabolism. *Molecular Endocrinology*. 14:1483-1497.

- Ly, T., N. Moroz, C.T. Pappas, S.M. Novak, D. Tolkatchev, D. Wooldridge, R.M. Mayfield, G. Helms, C.C. Gregorio, and A.S. Kostyukova. 2016. The N-terminal tropomyosin- and actin-binding sites are important for leiomodulin 2's function. *Molecular Biology of the Cell*. 27:2565-2575.
- Macias, M.J., S. Wiesner, and M. Sudol. 2002. WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Letters*. 513:30-37.
- Mangelsdorf, D.J., E.S. Ong, J.A. Dyck, and R.M. Evans. 1990. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature*. 345:224-229.
- Mangelsdorf, D.J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G.n. Sch \sqrt tz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon, and R.M. Evans. 1995. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*. 83:835-839.
- Mark, M., N. Ghyselinck, and P. Chambon. 2009. Function of retinoic acid receptors during embryonic development.
- Marletaz, F., V. Holland Lz Fau - Laudet, M. Laudet V Fau - Schubert, and M. Schubert. 2006. Retinoic acid signaling and the evolution of chordates.
- McCollum, E.V., and M. Davis. 1913. THE NECESSITY OF CERTAIN LIPINS IN THE DIET DURING GROWTH. *Journal of Biological Chemistry*. 15:167-175.
- Mendoza-Parra, M.A., M. Walia, M. Sankar, and H. Gronemeyer. 2011. Dissecting the retinoid-induced differentiation of F9 embryonal stem cells by integrative genomics. *Molecular Systems Biology*. 7.
- Mengeling, B.J., M.L. Goodson, W. Bourguet, and M.L. Privalsky. 2012. SMRT ϵ , a corepressor variant, interacts with a restricted subset of nuclear receptors, including the retinoic acid receptors α and β . *Molecular and Cellular Endocrinology*. 351:306-316.
- Michaelsen-Preusse, K., S. Zessin, G. Grigoryan, F. Scharkowski, J. Feuge, A. Remus, and M. Korte. 2016. Neuronal profilins in health and disease: Relevance for spine plasticity and Fragile X syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113:3365-3370.
- Michelot, A., E. Derivery, R. Paterski-Boujemaa, C. Guérin, S. Huang, F. Parcy, C.J. Staiger, and L. Blanchoin. 2006. A Novel Mechanism for the Formation of Actin-Filament Bundles by a Nonprocessive Formin. *Current Biology*. 16:1924-1930.
- Michelot, A., C. Guérin, S. Huang, M. Ingouff, S. Richard, N. Rodiuc, C.J. Staiger, and L. Blanchoin. 2005. The Formin Homology 1 Domain Modulates the Actin Nucleation and Bundling Activity of Arabidopsis FORMIN1. *The Plant Cell*. 17:2296-2313.
- Moras, D., and H. Gronemeyer. 1998. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*. 10:384-391.
- Morton, R.A. 1944. *Nature*. 153:69-71.
- Morton, R.A., and T.W. Goodwin. 1944. *Nature*. 153:405-406.
- Mouneimne, G., S.D. Hansen, L.M. Selfors, L. Petrak, M.M. Hickey, L.L. Gallegos, K.J. Simpson, J. Lim, F.B. Gertler, J.H. Hartwig, R.D. Mullins, and J.S. Brugge. 2012. Differential Remodeling of Actin Cytoskeleton Architecture by Profilin Isoforms Leads to Distinct Effects on Cell Migration and Invasion. *Cancer cell*. 22:615-630.

- Moutier, E., T. Ye, M.-A. Choukrallah, S. Urban, J. Osz, A. Chatagnon, L. Delacroix, D. Langer, N. Rochel, D. Moras, G. Benoit, and I. Davidson. 2012. Retinoic Acid Receptors Recognize the Mouse Genome through Binding Elements with Diverse Spacing and Topology. *The Journal of Biological Chemistry*. 287:26328-26341.
- Murk, K., S. Buchmeier, B.M. Jockusch, and M. Rothkegel. 2009. In birds, profilin-2a is ubiquitously expressed and contributes to actin-based motility. *Journal of Cell Science*. 122:957-964.
- Murk, K., N. Wittenmayer, K. Michaelsen-Preusse, T. Dresbach, C.-A. Schoenenberger, M. Korte, B.M. Jockusch, and M. Rothkegel. 2012. Neuronal Profilin Isoforms Are Addressed by Different Signalling Pathways. *PLoS ONE*. 7:e34167.
- Nagpal, S., S. Friant, H. Nakshatri, and P. Chambon. 1993. RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *The EMBO Journal*. 12:2349-2360.
- Nagpal, S., M. Saunders, P. Kastner, B. Durand, H. Nakshatri, and P. Chambon. 1992. Promoter context- and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. *Cell*. 70:1007-1019.
- Napoli, J.L. 2012. Physiological insights into all-trans-retinoic acid biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1821:152-167.
- Olson, J.A. 1997. The conversion of carotene to vitamin A (Thomas Moore, 1930). *J Nutr*. 127.
- Osborne, T.B., and L.B. Mendel. 1912. Feeding experiments with fat-free food mixtures. *Experimental Biology and Medicine*. 9:73-73.
- Ostrowska, Z., K. Robaszkiewicz, and J. Moraczewska. in press. Regulation of actin filament turnover by cofilin-1 and cytoplasmic tropomyosin isoforms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*.
- Osz, J., Y. Brélivet, C. Peluso-Iltis, V. Cura, S. Eiler, M. Ruff, W. Bourguet, N. Rochel, and D. Moras. 2012. Structural basis for a molecular allosteric control mechanism of cofactor binding to nuclear receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109:E588-E594.
- Parsons, J.T., A.R. Horwitz, and M.A. Schwartz. 2010. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:633-643.
- Paul, A., and T. Pollard. 2008. The Role of the FH1 Domain and Profilin in Formin-Mediated Actin-Filament Elongation and Nucleation. *Current Biology*. 18:9-19.
- Pavri, R., B. Lewis, T.-K. Kim, F.J. Dilworth, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, G. de Murcia, R. Evans, P. Chambon, and D. Reinberg. 2005. PARP-1 Determines Specificity in a Retinoid Signaling Pathway via Direct Modulation of Mediator. *Molecular Cell*. 18:83-96.
- Perissi, V., A. Aggarwal, C.K. Glass, D.W. Rose, and M.G. Rosenfeld. 2004. A Corepressor/Coactivator Exchange Complex Required for Transcriptional Activation by Nuclear Receptors and Other Regulated Transcription Factors. *Cell*. 116:511-526.

- Perissi, V., K. Jepsen, C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld. 2010. Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nat Rev Genet.* 11:109-123.
- Perissi, V., L.M. Staszewski, E.M. McInerney, R. Kurokawa, A. Krones, D.W. Rose, M.H. Lambert, M.V. Milburn, C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld. 1999. Molecular determinants of nuclear receptor–corepressor interaction. *Genes & Development.* 13:3198-3208.
- Pernier, J., S. Shekhar, A. Jegou, B. Guichard, and M.-F. Carlier. 2016. Profilin Interaction with Actin Filament Barbed End Controls Dynamic Instability, Capping, Branching, and Motility. *Developmental Cell.* 36:201-214.
- Petkovich, M., N.J. Brand, A. Krust, and P. Chambon. 1987. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature.* 330:444-450.
- Pfahl, M. 1994. Molecular Mechanisms of Thyroid Hormone and Retinoic acid Action. *In Steroid Hormone Receptors: Basic and Clinical Aspects.* V.K. Moudgil, editor. Birkhäuser Boston, Boston, MA. 193-211.
- Piskunov, A., Z. Al Tanoury, and C. Rochette-Egly. 2014. Nuclear and Extra-Nuclear Effects of Retinoid Acid Receptors: How They Are Interconnected. *In The Biochemistry of Retinoic Acid Receptors I: Structure, Activation, and Function at the Molecular Level.* M.A. Asson-Batres and C. Rochette-Egly, editors. Springer Netherlands, Dordrecht. 103-127.
- Piskunov, A., and C. Rochette-Egly. 2012. A retinoic acid receptor RAR α pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein α Q to activate p38MAPK. *Oncogene.* 31:3333-3345.
- Pogenberg, V., J.-F. Guichou, V. Vivat-Hannah, S. Kammerer, E. Pérez, P. Germain, A.R. de Lera, H. Gronemeyer, C.A. Royer, and W. Bourguet. 2005. Characterization of the Interaction between Retinoic Acid Receptor/Retinoid X Receptor (RAR/RXR) Heterodimers and Transcriptional Coactivators through Structural and Fluorescence Anisotropy Studies. *Journal of Biological Chemistry.* 280:1625-1633.
- Pollard, T., and S. Quirk. 1994. Profilins, ancient actin binding proteins with highly divergent primary structures.
- Pollard, T.D. 2016. Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 8.
- Poon, M.M., and L. Chen. 2008. Retinoic acid-gated sequence-specific translational control by RAR α . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 105:20303-20308.
- Poulard, C., I. Treilleux, E. Lavergne, K. Bouchekioua-Bouzaghrou, S. Goddard-Léon, S. Chabaud, O. Trédan, L. Corbo, and M. Le Romancer. 2012. Activation of rapid oestrogen signalling in aggressive human breast cancers. *EMBO Molecular Medicine.* 4:1200-1213.
- Pring, M., M.R. Weber A Fau - Bubb, and M.R. Bubb. 1992 . Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end.
- Privalsky, M.L. 2004. The Role of Corepressors in Transcriptional Regulation by Nuclear Hormone Receptors. *Annual Review of Physiology.* 66:315-360.

- Qian, A., Y. Cai, T.R. Magee, and Y.-J.Y. Wan. 2000. Identification of Retinoic Acid-Responsive Elements on the HNF1 α and HNF4 α Genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 276:837-842.
- Rastinejad, F. 2001. Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Current Opinion in Structural Biology*. 11:33-38.
- Rastinejad, F., T. Wagner, Q. Zhao, and S. Khorasanizadeh. 2000. Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. *The EMBO Journal*. 19:1045-1054.
- Renaud, J., N. Rochel, M. Ruff, V. Vivat, P. Chambon, H. Gronemeyer, and D. Moras. 1995 . Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid.
- Renaud, P.J., and D. Moras*. 2000. Structural studies on nuclear receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 57:1748-1769.
- Reymann, A.-C., C. Suarez, C. Guérin, J.-L. Martiel, C.J. Staiger, L. Blanchoin, and R. Boujemaa-Paterski. 2011. Turnover of branched actin filament networks by stochastic fragmentation with ADF/cofilin. *Molecular Biology of the Cell*. 22:2541-2550.
- Ridley, Anne J. 2011. Life at the Leading Edge. *Cell*. 145:1012-1022.
- Rochel, N., F. Ciesielski, J. Godet, E. Moman, M. Roessle, C. Peluso-Iltis, M. Moulin, M. Haertlein, P. Callow, Y. Mély, D.I. Svergun, and D. Moras. 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. 2015. Retinoic acid signaling and mouse embryonic stem cell differentiation: Cross talk between genomic and non-genomic effects of RA. *Biochim Biophys Acta*. 1:66-75.
- Rochette-Egly, C., and P. Germain. 2009. Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs). *Nuclear Receptor Signaling*. 7:1-18.
- Rochette-Egly, C., M. Oulad-Abdelghani, A. Staub, V. Pfister, I. Scheuer, P. Chambon, and M.P. Gaub. 1995. Phosphorylation of the retinoic acid receptor-alpha by protein kinase A. *Molecular Endocrinology*. 9:860-871.
- Rollason, R., M. Wherlock, Jenny A. Heath, Kate J. Heesom, Moin A. Saleem, and Gavin I. Welsh. 2016. Disease causing mutations in inverted formin 2 regulate its binding to G-actin, F-actin capping protein (CapZ α -1) and profilin 2. *Bioscience Reports*. 36:e00302.
- Rosenfeld, M.G., V.V. Lunyak, and C.K. Glass. 2006. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes & Development*. 20:1405-1428.
- Ross-Innes, C.S., R. Stark, K.A. Holmes, D. Schmidt, C. Spyrou, R. Russell, C.E. Massie, S.L. Vowler, M. Eldridge, and J.S. Carroll. 2010. Cooperative interaction between retinoic acid receptor- α and estrogen receptor in breast cancer. *Genes & Development*. 24:171-182.
- Rottner, K., J. Hänisch, and K.G. Campellone. 2010. WASH, WHAMM and JMY: regulation of Arp2/3 complex and beyond. *Trends in Cell Biology*. 20:650-661.

- Rottner, K., and T.E.B. Stradal. 2011. Actin dynamics and turnover in cell motility. *Current Opinion in Cell Biology*. 23:569-578.
- Rotty, J.D., and J.E. Bear. 2015. Competition and collaboration between different actin assembly pathways allows for homeostatic control of the actin cytoskeleton. *Bioarchitecture*. 5:27-34.
- Rotty, Jeremy D., C. Wu, Elizabeth M. Haynes, C. Suarez, Jonathan D. Winkelman, Heath E. Johnson, Jason M. Haugh, David R. Kovar, and James E. Bear. 2015. Profilin-1 Serves as a Gatekeeper for Actin Assembly by Arp2/3-Dependent and -Independent Pathways. *Developmental Cell*. 32:54-67.
- Rudan, M.V., S. Hadjur, and T. Sexton. Detecting Spatial Chromatin Organization by Chromosome Conformation Capture II: Genome-Wide Profiling by Hi-C. Humana Press, Totowa, NJ. 1-28.
- Samarut, E., I. Amal, G.V. Markov, R. Stote, A. Dejaegere, V. Laudet, and C.c. Rochette-Egly. 2011. Evolution of Nuclear Retinoic Acid Receptor Alpha (RAR α) Phosphorylation Sites. Serine Gain Provides Fine-Tuned Regulation. *Molecular Biology and Evolution*. 28:2125-2137.
- Samarut, E., and C.c. Rochette-Egly. 2012. Nuclear retinoic acid receptors: Conductors of the retinoic acid symphony during development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 348:348-360.
- Santos, N.C., and K.H. Kim. 2010. Activity of Retinoic Acid Receptor-alpha Is Directly Regulated at Its Protein Kinase A Sites in Response to Follicle-Stimulating Hormone Signaling. *Endocrinology*. 151:2361-2372.
- Schoenfelder, S., T. Sexton, L. Chakalova, N.F. Cope, A. Horton, S. Andrews, S. Kurukuti, J.A. Mitchell, D. Umlauf, D.S. Dimitrova, C.H. Eskiw, Y. Luo, C.-L. Wei, Y. Ruan, J.J. Bieker, and P. Fraser. 2010. Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. *Nat Genet*. 42:53-61.
- Schönichen, A., and M. Geyer. 2010. Fifteen formins for an actin filament: A molecular view on the regulation of human formins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1803:152-163.
- Schönichen, A., H.G. Mannherz, E. Behrmann, A.J. Mazur, S. Kühn, U. Silván, C.-A. Schoenenberger, O.T. Fackler, S. Raunser, L. Dehmelt, and M. Geyer. 2013. FHOD1 is a combined actin filament capping and bundling factor that selectively associates with actin arcs and stress fibers. *Journal of Cell Science*. 126:1891.
- Schug, T.T., D.C. Berry, I.A. Toshkov, L. Cheng, A.Y. Nikitin, and N. Noy. 2008. Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by diverting retinoic acid from PPAR β / δ to RAR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:7546-7551.
- Schutt, C.E., J.C. Myslik, M.D. Rozycki, N.C.W. Goonesekere, and U. Lindberg. 1993. The structure of crystalline profilin [beta]-actin. *Nature*. 365:810-816.
- Sechi, A.S., and J. Wehland. 2004. ENA/VASP proteins: multifunctional regulators of actin cytoskeleton dynamics. *Front Biosci*. 9.
- Semba, R.D. 2012. The discovery of the vitamins.
- Shekhar, S., J. Pernier, and M.-F. Carrier. 2016. Regulators of actin filament barbed ends at a glance. *Journal of Cell Science*. 129:1085.

- Sherman, M.H., M. Downes, and R.M. Evans. 2012. Nuclear Receptors as Modulators of the Tumor Microenvironment. *Cancer Prevention Research*. 5:3-10.
- Sims, R.J., and D. Reinberg. 2008. Is there a code embedded in proteins that is based on post-translational modifications? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:815-820.
- Slack, J.M. 1987. Embryology: we have a morphogen! 327:553-554.
- Smith, W.C., H. Nakshatri, P. Leroy, J. Rees, and P. Chambon. 1991. A retinoic acid response element is present in the mouse cellular retinol binding protein I (mCRBPI) promoter. *The EMBO Journal*. 10:2223-2230.
- Stehlin-Gaon, C., D. Willmann, D. Zeyer, S. Sanglier, A. Van Dorsselaer, J.-P. Renaud, D. Moras, and R. Schule. 2003. All-trans retinoic acid is a ligand for the orphan nuclear receptor ROR[β]. *Nat Struct Mol Biol*. 10:820-825.
- Steinmetz, A.C.U., J.-P. Renaud, and D. Moras. 2001. Binding of Ligands and Activation of Transcription by Nuclear Receptors. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 30:329-359.
- Su, D., and L.J. Gudas. 2008. Gene Expression Profiling Elucidates a Specific Role for RAR γ in the Retinoic Acid Induced Differentiation of F9 Teratocarcinoma Stem Cells. *Biochemical pharmacology*. 75:1129-1160.
- Suarez, C., Robert T. Carroll, Thomas A. Burke, Jenna R. Christensen, Andrew J. Bestul, Jennifer A. Sees, Michael L. James, V. Sirotkin, and David R. Kovar. 2015. Profilin Regulates F-Actin Network Homeostasis by Favoring Formin over Arp2/3 Complex. *Developmental Cell*. 32:43-53.
- Suei, S., J. Plastino, and L. Kreplak. 2012. Fascin and VASP synergistically increase the Young's modulus of actin comet tails. *Journal of Structural Biology*. 177:40-45.
- Tansey, W.P. 2001. Transcriptional activation: risky business. *Genes & Development*. 15:1045-1050.
- Tojkander, S., G. Gateva, G. Schevzov, P. Hotulainen, P. Naumanen, C. Martin, Peter W. Gunning, and P. Lappalainen. 2011. A Molecular Pathway for Myosin II Recruitment to Stress Fibers. *Current Biology*. 21:539-550.
- v.Euler, H., P. Karrer, and U. Solmssen. 1938. *Helv Chim Acta*. 21:211-222.
- van Bennekum, A.M., S. Wei, M.V. Gamble, S. Vogel, R. Piantedosi, M. Gottesman, V. Episkopou, and W.S. Blaner. 2001. Biochemical Basis for Depressed Serum Retinol Levels in Transthyretin-deficient Mice. *Journal of Biological Chemistry*. 276:1107-1113.
- Vasios, G.W., J.D. Gold, M. Petkovich, P. Chambon, and L.J. Gudas. 1989. A Retinoic Acid-Responsive Element is Present in the 5' Flanking Region of the Laminin B1 Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86:9099-9103.
- vom Baur, E., C. Zechel, D. Heery, M.J. Heine, J.M. Garnier, V. Vivat, B. Le Douarin, H. Gronemeyer, P. Chambon, and R. Losson. 1996. Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1. *The EMBO Journal*. 15:110-124.
- von der Ecken, J., M. Muller, W. Lehman, D.J. Manstein, P.A. Penczek, and S. Raunser. 2015. Structure of the F-actin-tropomyosin complex. *Nature*. 519:114-117.

- Vucetic, Z., Z. Zhang, J. Zhao, F. Wang, K.J. Soprano, and D.R. Soprano. 2008. Acinus-S' Represses Retinoic Acid Receptor (RAR)-Regulated Gene Expression through Interaction with the B Domains of RARs. *Molecular and Cellular Biology*. 28:2549-2558.
- Wald, G. 1968. The Molecular Basis of Visual Excitation. *Nature*. 219:800-807.
- Wärnmark, A., E. Treuter, A.P.H. Wright, and J.-Å. Gustafsson. 2003. Activation Functions 1 and 2 of Nuclear Receptors: Molecular Strategies for Transcriptional Activation. *Molecular Endocrinology*. 17:1901-1909.
- Wei, L.-N., X. Hu, D. Chandra, E. Seto, and M. Farooqui. 2000. Receptor-interacting Protein 140 Directly Recruits Histone Deacetylases for Gene Silencing. *Journal of Biological Chemistry*. 275:40782-40787.
- Wei, S., V. Episkopou, R. Piantedosi, S. Maeda, K. Shimada, M.E. Gottesman, and W.S. Blaner. 1995. Studies on the Metabolism of Retinol and Retinol-binding Protein in Transthyretin-deficient Mice Produced by Homologous Recombination. *Journal of Biological Chemistry*. 270:866-870.
- Weinberger, C., C.C. Thompson, E.S. Ong, R. Lebo, D.J. Gruol, and R.M. Evans. 1986. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature*. 324:641-646.
- Witke, W. 2004. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends in Cell Biology*. 14:461-469.
- Witke, W., A.V. Podtelejnikov, A. Di Nardo, J.D. Sutherland, C.B. Gurniak, C. Dotti, and M. Mann. 1998. In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly.
- Wurtz, J.M., W.R. Bourguet, J. P., V. Vivat, M. Chambon, D., and H. Gronemeyer. 1996. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors.
- Xu, H.E., M.H. Lambert, V.G. Montana, D.J. Parks, S.G. Blanchard, P.J. Brown, D.D. Sternbach, J.M. Lehmann, G.B. Wisely, T.M. Willson, S.A. Kliewer, and M.V. Milburn. 1999. Molecular Recognition of Fatty Acids by Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Molecular Cell*. 3:397-403.
- Xue, B., C. Leyrat, J.M. Grimes, and R.C. Robinson. 2014. Structural basis of thymosin-beta4/profilin exchange leading to actin filament polymerization. *PNAS*.
- Yeum, K.-J., and R.M. Russell. 2002. Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annual Review of Nutrition*. 22:483-504.
- Zaidel-Bar, R., G. Zhenhuan, and C. Luxenburg. 2015. The contractome – a systems view of actomyosin contractility in non-muscle cells. *Journal of Cell Science*. 128:2209.
- Zamir, E., and B. Geiger. 2001. Components of cell-matrix adhesions. *Journal of Cell Science*. 114:3577-3579.
- Zanotto-Filho, A., M. Cammarota, D.P. Gelain, R.B. Oliveira, A. Delgado-Canedo, R.J.S. Dalmolin, M.A.B. Pasquali, and J.C.F. Moreira. 2008. Retinoic acid induces apoptosis by a non-classical mechanism of ERK1/2 activation. *Toxicology in Vitro*. 22:1205-1212.
- Zarrinpar, A., R.P. Bhattacharyya, and W.A. Lim. 2003. The Structure and Function of Proline Recognition Domains. *Science Signaling*. 2003:re8-re8.

- Zarrinpar, A., and W.A. Lim. 2000. Converging on proline: the mechanism of WW domain peptide recognition. *Nat Struct Mol Biol.* 7:611-613.
- Zelent, A., A. Krust, M. Petkovich, P. Kastner, and P. Chambon. 1989. Cloning of murine [alpha] and [beta] retinoic acid receptors and a novel receptor [gamma] predominantly expressed in skin. *Nature.* 339:714-717.
- Zhao, J., Z. Zhang, Z. Vucetic, K.J. Soprano, and D.R. Soprano. 2009. HACE1: A Novel Repressor of RAR Transcriptional Activity. *Journal of cellular biochemistry.* 107:482-493.
- Zhou, X.E., K.M. Suino-Powell, Y. Xu, C.-W. Chan, O. Tanabe, S.W. Kruse, R. Reynolds, J.D. Engel, and H.E. Xu. 2011. The Orphan Nuclear Receptor TR4 Is a Vitamin A-activated Nuclear Receptor. *Journal of Biological Chemistry.* 286:2877-2885.
- Zhu, L., N.C. Santos, and K.H. Kim. 2009. Small Ubiquitin-Like Modifier-2 Modification of Retinoic Acid Receptor- α Regulates Its Subcellular Localization and Transcriptional Activity. *Endocrinology.* 150:5586-5595.

PUBLICATIONS

Publication 1

RESEARCH ARTICLE

Genes involved in cell adhesion and signaling: a new repertoire of retinoic acid receptor target genes in mouse embryonic fibroblasts

Ziad Al Tanoury*, Aleksandr Piskunov*, Dina Andriamoratsiresy, Samia Gaouar, Régis Lutzings, Tao Ye, Bernard Jost, Céline Keime and Cécile Rochette-Egly[‡]

ABSTRACT

Nuclear retinoic acid (RA) receptors (RAR α , β and γ) are ligand-dependent transcription factors that regulate the expression of a battery of genes involved in cell differentiation and proliferation. They are also phosphoproteins and we previously showed the importance of their phosphorylation in their transcriptional activity. In the study reported here, we conducted a genome-wide analysis of the genes that are regulated by RARs in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) by comparing wild-type MEFs to MEFs lacking the three RARs. We found that in the absence of RA, RARs control the expression of several gene transcripts associated with cell adhesion. Consequently the knockout MEFs are unable to adhere and to spread on substrates and they display a disrupted network of actin filaments, compared with the WT cells. In contrast, in the presence of the ligand, RARs control the expression of other genes involved in signaling and in RA metabolism. Taking advantage of rescue cell lines expressing the RAR α or RAR γ subtypes (either wild-type or mutated at the N-terminal phosphorylation sites) in the null background, we found that the expression of RA-target genes can be controlled either by a specific single RAR or by a combination of RAR isoforms, depending on the gene. We also selected genes that require the phosphorylation of the receptors for their regulation by RA. Our results increase the repertoire of genes that are regulated by RARs and highlight the complexity and diversity of the transcriptional programs regulated by RARs, depending on the gene.

KEY WORDS: Retinoic acid, Nuclear receptors, Transcription, Adhesion

INTRODUCTION

Retinoic acid (RA), the active metabolite of Vitamin A, regulates multiple biological processes and plays key roles in embryonic development, cell growth and differentiation, and in tissue homeostasis through modifications in the expression of target genes. It exerts its effects through two classes of nuclear receptors, the retinoic acid receptors (RARs; α , β and γ) and the retinoid X receptors (RXRs; α , β and γ), which function as ligand-dependent heterodimeric RAR/RXR transcription regulators (Germain et al., 2006a; Germain et al., 2006b; Germain et al., 2006c). For each subtype, there are at least two known isoforms, which are

generated by differential promoter usage and alternative splicing, and differ in their N-terminal regions (Chambon, 1996).

Similar to most nuclear receptors, 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). RARs that are heterodimerized with RXRs control the expression of target genes through binding specific and polymorphic RA response elements (RAREs) located in the promoters (Moutier et al., 2012). According to the canonical model of gene regulation by RARs, in the absence of ligand, DNA-bound RARs repress transcription through the recruitment of corepressor complexes, which maintain chromatin in a repressed state. In contrast, upon ligand binding, RARs undergo conformational changes in their LBD, which induces the dissociation of co-repressors and the recruitment of other coregulator complexes, which alter the chromatin structure surrounding the promoter of target genes and pave the way for the recruitment of the transcription machinery (for reviews see Al Tanoury et al., 2013; Rochette-Egly and Germain, 2009).

During the last decade, this scenario became more complicated with the discovery that RARs are phosphoproteins (Al Tanoury et al., 2013; Rochette-Egly, 2003). Indeed, we identified two main phosphorylation sites, one in the LBD (S369 in RAR α and S371 in RAR γ 1) (Gaillard et al., 2006; Rochette-Egly et al., 1995) and the other one in the NTD (S77 in RAR α and S79 in RAR γ 1) (Bastien et al., 2000; Rochette-Egly et al., 1997). These two sites are rapidly phosphorylated in response to RA (Bruck et al., 2009) subsequent to extranuclear and non-genomic effects of RA that lead to the activation of the p38MAPK–MSK1 pathway (Piskunov and Rochette-Egly, 2012). RA-activated MSK1 phosphorylates RARs at the serine residue located in the LBD and phosphorylation of this residue allows the recruitment of the cyclin-H–cdk7 subcomplex of TFIIH, which then can phosphorylate the second site located in the NTD (Chebaro et al., 2013; Samarut et al., 2011). This final phosphorylation step is crucial for the binding of the receptor to DR5 RAREs and the transcription of canonical RA target genes (Bruck et al., 2009).

Recently, genome-wide chromatin immunoprecipitation coupled with deep sequencing (ChIP-seq) and high throughput sequencing (RNA-seq) technologies expanded the repertoire of the RAR-target genes and RAR binding sites in breast cancer cell lines (Hua et al., 2009; Ross-Innes et al., 2010) and during the RA-induced differentiation of F9 cells (Mendoza-Parra et al., 2011; Su and Gudas, 2008) and ES cells into neurons (Mahony et al., 2011; Moutier et al., 2012). The RA response has been correlated to the DNA binding of RARs and to the transcriptional regulation of cell specific target genes (Delacroix et al., 2010).

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.

*These authors contributed equally to this work

[‡]Author for correspondence (cegly@igbmc.fr)

Here we conducted a genome-wide analysis of the genes that are regulated by RARs, in mouse embryonic fibroblasts (MEFs), by comparing wild-type (WT) MEFs with MEFs in which the three RARs had been knocked out. We observed that, in the absence of RA, the lack of RARs is associated with reduced levels of several gene transcripts associated with cell adhesion and with the disruption of the morphology and adhesion properties of the cells. The lack of RARs also prevented the expression of all the genes that are regulated by RA and that are associated with cell signaling in MEFs. Finally, taking advantage of rescue cell lines expressing the RAR α or RAR γ subtypes (either WT or mutated at the N-terminal phosphorylation sites) in the null background, we selected genes that require phosphorylation of the receptors for their regulation by RA.

RESULTS

In MEFs, RARs contribute to the expression of genes involved in cell adhesion

The repertoire of genes that are regulated by RARs in the absence of RA was profiled by comparing WT MEFs and *Rara*^{-/-} *Rarb*^{-/-} *Rarg*^{-/-} MEFs [referred to as RAR(α,β,γ)-/- MEFs hereafter] in high throughput sequencing (RNA-seq) experiments (supplementary material Table S1). This analysis revealed a

number of genes that are downregulated in the knockout cells. Remarkably, these genes predominantly encode proteins involved in cell adhesion, such as integrins (alpha 1 and alpha 11), cadherin 17, protocadherin 9, laminins (alpha 1, alpha 2 and alpha 4), collagens (type II alpha 1, type 11 alpha 1), vitrin, vanin-1, robo 1 and robo 2 (Fig. 1A). That these genes are downregulated in RAR knockout MEFs was corroborated in RT-qPCR experiments (Fig. 1B).

Such results suggest that in the absence of ligand, RARs would sustain the transcription of genes associated to adhesion. Therefore, we analyzed whether these genes had RA response elements in their promoters. The analysis of the regions located ± 10 kb from the gene limits revealed the presence of several direct repeats (DRs) and inverted repeats (IRs) (Moutier et al., 2012) with spacing of between 0 and 8 base pairs (data not shown). We also treated the WT MEFs with the panRAR antagonist BMS493. In fact BMS493 is as an inverse agonist that displaces the positioning of helix 12 so that the interaction with corepressors is strongly enhanced (Bourguet et al., 2010; le Maire et al., 2010). Treatment of WT MEFs with this compound strongly repressed the expression of the genes involved in adhesion (Fig. 1C). Altogether, these data indicate that RARs can mediate a substantial level of transcriptional activation in the absence of RA.

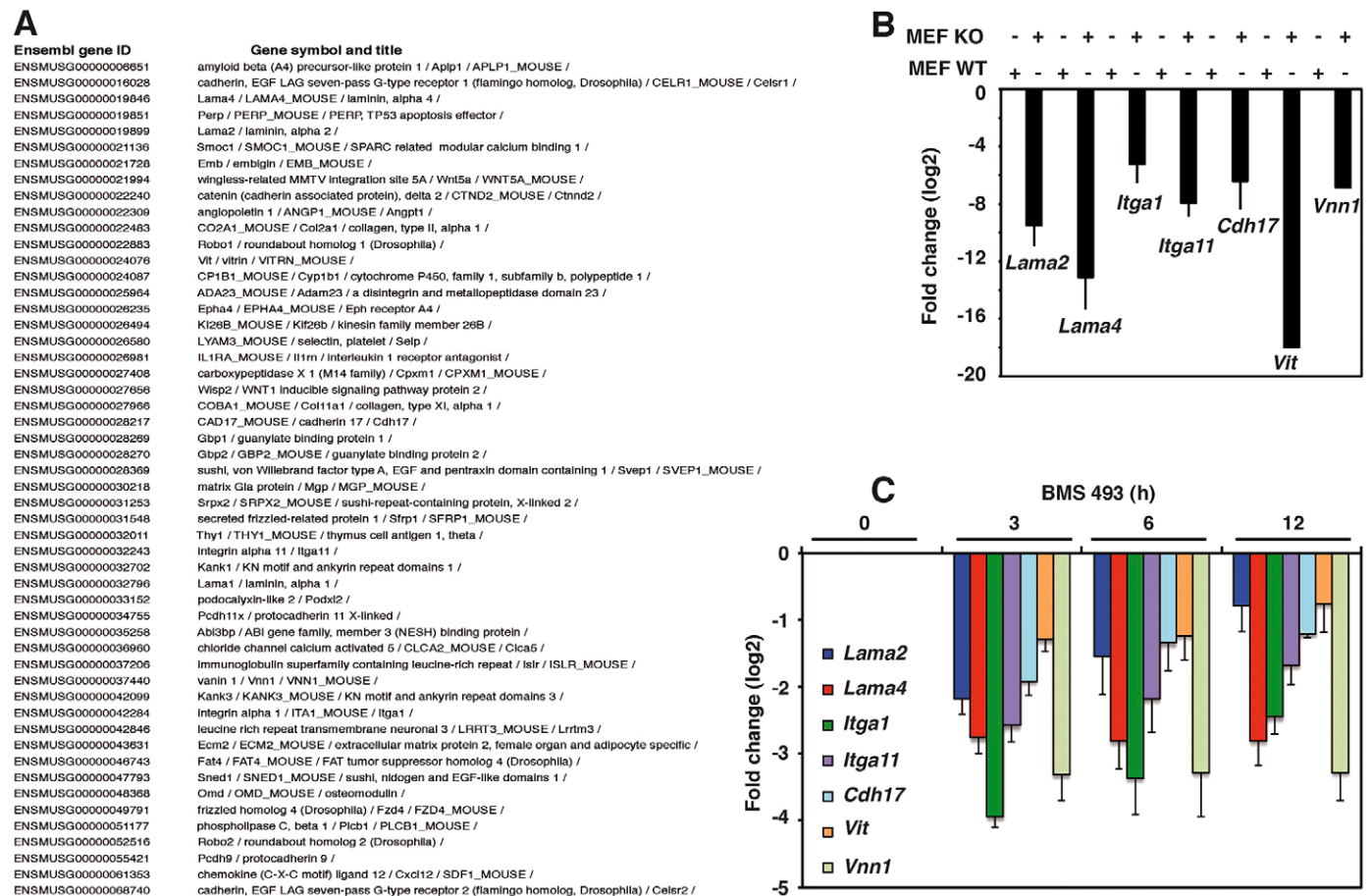


Fig. 1. In the absence of RA, RARs control the expression of genes involved in cell adhesion. (A) Cell adhesion is the major biological process, which is downregulated in RAR(α,β,γ)-/- MEFs (MEF KO) compared with WT cells. The genes involved are listed. (B) RT-qPCR experiments confirming the downregulation of genes involved in cell adhesion in RAR(α,β,γ)-/- MEFs compared with WT MEFs. Values are the means \pm s.d. of triplicates from two or three separate experiments. (C) RT-qPCR experiments showing that treatment of WT MEFs with the pan RAR antagonist BMS 493 (1 μ M) inhibits the expression of the genes involved in cell adhesion. Values are the means \pm s.d. of triplicates from three separate experiments.

Then the question was whether the expression of these genes is regulated by a specific RAR subtype, α , β or γ , in the absence of RA. MEFs express constitutively the RAR α and RAR γ subtypes at both the mRNA and proteins levels, whereas RAR β is hardly detectable (Fig. 2A,B). Immunoprecipitation experiments performed with monoclonal antibodies recognizing specifically the two main RAR γ isoforms (RAR γ 1 and RAR γ 2) indicated that RAR γ 1 is expressed in MEFs and not RAR γ 2 (Fig. 2C). Such results suggest that the RAR α and/or RAR γ 1 subtypes might control the expression of the genes involved in cell adhesion.

In order to determine which RAR, alpha or gamma1, contributes to the expression of these genes, we took advantage of MEF rescue cell lines stably expressing RAR α or RAR γ 1 in the triple RAR null background. The rescue line expressing RAR α has already been

characterized [(Bruck et al., 2009) and Fig. 2D, lane 3] and we established stable rescue lines expressing RAR γ 1. Three clones expressing the receptor at levels similar to the endogenous receptor were obtained and one was selected (Fig. 2D, lane 4).

The RAR α and RAR γ rescue cell lines were then compared with the WT and triple RAR knockout cells in RNA-seq experiments (supplementary material Table S1). The upregulated or downregulated genes of the knockout versus wild-type cells were crossed with the RAR α rescue cells (versus the WT cells) and with the RAR γ rescue cells (versus the WT cells). The Venn diagram in Fig. 2E shows that among the genes that were downregulated in the triple RAR knockout cells, 15% were restored in the two rescue cell lines, 15% in the RAR γ rescue cell line (and not in the RAR α line) and 10% in the RAR α line (and not in the RAR γ line). From

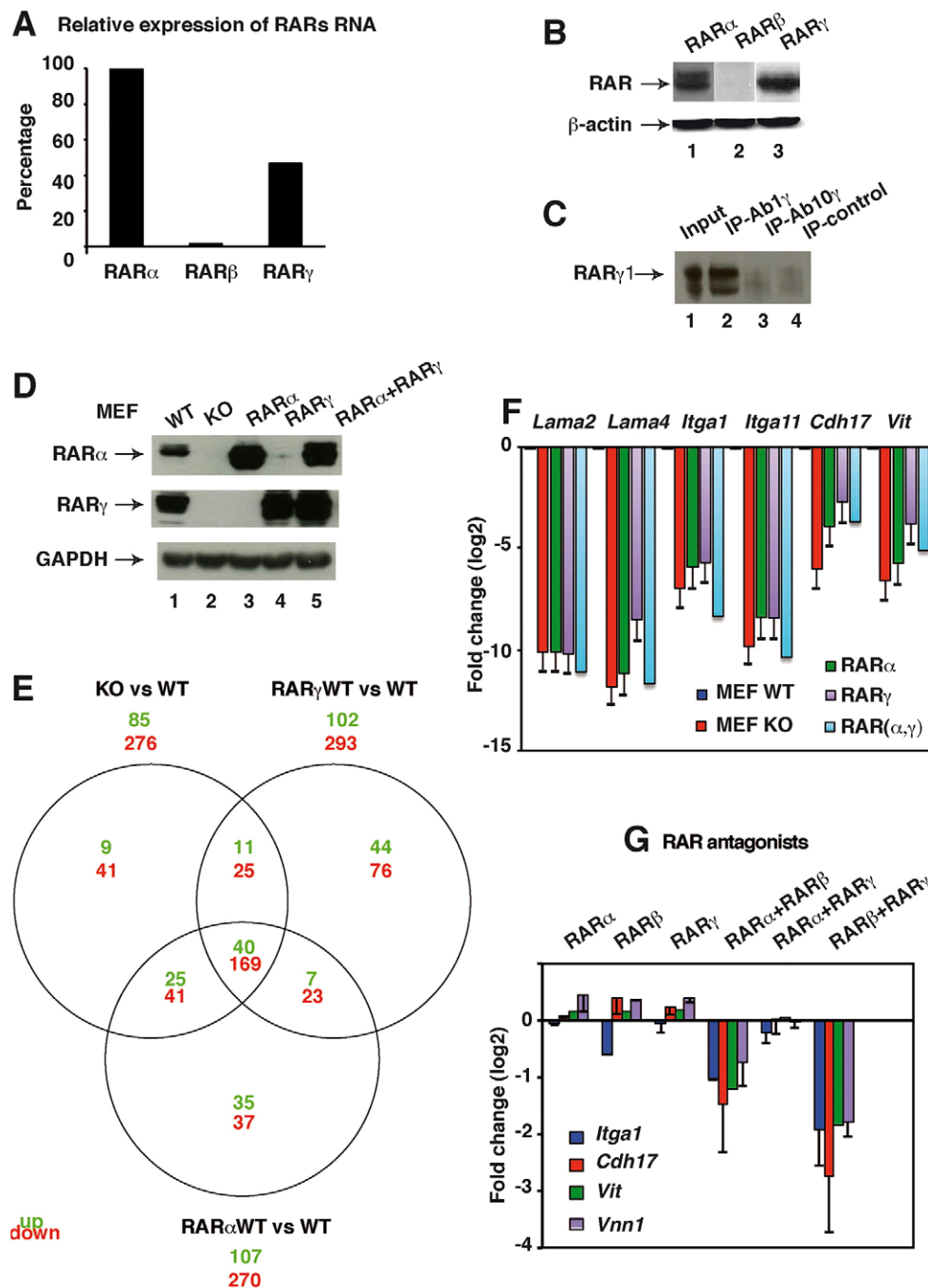


Fig. 2. Comparison of WT MEFs, RAR(α,β,γ)-/- MEFs and MEFs expressing RAR α and RAR γ , in the absence of RA. (A) Comparison of RAR α , RAR β and RAR γ RNA levels in WT MEFs by RT-qPCR analysis.

(B) Immunoblotting analysis of RAR α , RAR γ and RAR β levels in WT MEFs.

(C) MEFs express the RAR γ 1 isoform and not the RAR γ 2 isoform as assessed by immunoprecipitation (IP) with antibodies specifically recognizing the isoforms, Ab1 γ (A1) and Ab10 γ (A2), respectively.

(D) Expression of RAR α and RAR γ 1, alone or in combination, compared with WT levels in the triple RAR knockout background.

(E) Venn diagram comparing the transcripts of the knockout (KO), RAR α and RAR γ rescue lines versus the WT cells.

(F) RT-qPCR experiments showing that the expression of the genes involved in cell adhesion is not restored in the rescue lines expressing RAR α , RAR γ or both RAR α and RAR γ .

Values are the means \pm s.d. of triplicates from three separate experiments. (G) RT-qPCR experiments showing that treatment of WT MEFs with RAR α or RAR γ antagonists combined with a RAR β antagonist inhibits the expression of the genes involved in cell adhesion.

Values are the means \pm s.d. of triplicates from two separate experiments.

Values are the means \pm s.d. of triplicates from three separate experiments.

Values are the means \pm s.d. of triplicates from two separate experiments.

Values are the means \pm s.d. of triplicates from two separate experiments.

Values are the means \pm s.d. of triplicates from two separate experiments.

Values are the means \pm s.d. of triplicates from two separate experiments.

Values are the means \pm s.d. of triplicates from two separate experiments.

Values are the means \pm s.d. of triplicates from two separate experiments.

Values are the means \pm s.d. of triplicates from two separate experiments.

Values are the means \pm s.d. of triplicates from two separate experiments.

these results, one can suggest that the expression of these restored genes is regulated by a specific single receptor, RAR α or RAR γ .

In contrast, 60% of the downregulated genes (including most of the adhesion genes) were not restored upon re-expression of RAR α or RAR γ . We first hypothesized that the expression of these genes would require both RAR α and RAR γ and/or a pioneer factor, itself under the control of RAR α or RAR γ (Delacroix et al., 2010; Hua et al., 2009; Mahony et al., 2011). Therefore we established an additional stable rescue line expressing both RAR α and RAR γ (Fig. 2D, lane 5). Unfortunately, the adhesion genes that were downregulated in the triple knockout cells, were not restored in either double rescue line (Fig. 2F), suggesting a role for the third RAR, RAR β , despite its low and hardly detectable level of expression. In order to corroborate such a hypothesis, WT MEFs were treated with antagonists for each RAR subtype, either alone or in combination. When added alone, none of the antagonists significantly affected the expression of the genes involved in adhesion, as exemplified by *Itga1*, *Cdh17*, *Vit* and *Vnn1* (Fig. 2G), and neither did the combination of the RAR α and RAR γ antagonists (Fig. 2G). However, the combination of RAR β with either RAR γ or RAR α significantly decreased their expression (Fig. 2G). Collectively, these results highlight the complexity of the mechanisms regulating genes expression in the absence of ligand, some genes requiring RAR α or RAR γ and others a cooperation between RAR α or RAR γ with RAR β .

Finally, genes that were not affected in the triple RAR knockout cells were induced or repressed upon expression of RAR α or RAR γ in the triple RAR knockout background (Fig. 2E), highlighting an additional class of genes, which can be regulated by a single RAR upon inactivation of the others.

RARs contribute to the morphology, adhesion and migration of MEFs in the absence of RA

Collectively, the above results suggest that RARs would control the adhesion properties of MEFs. To corroborate this hypothesis, we monitored the ability of WT and RAR(α,β,γ)-/- MEFs to attach to different extracellular matrix (ECM) proteins (collagen I, collagen IV, laminin, fibrinogen and fibronectin) with *in vitro* adhesion assays. Both cell types attached as efficiently to laminin, fibronectin and fibrinogen (Fig. 3A). However, the triple knockout cells did not attach well to collagen I and collagen IV (Fig. 3A).

Then WT and RAR(α,β,γ)-/- MEFs were also compared for cell shape and spreading in fluorescence experiments performed after incubation of the cells with fluorescent green 488 phalloidin. Although the WT cells spread rapidly, RAR(α,β,γ)-/- MEFs remained compact and round without substantial spreading (Fig. 4A). Moreover, in the triple knockout cells the network of actin filaments was disrupted, compared with the WT cells (Fig. 4A). Focal adhesions, labeled with vinculin antibodies, were also disrupted (Fig. 4B). Note that co-labeling with our purified RAR α or RAR γ antibodies corroborated the absence of the receptors in the knockout cells (Fig. 4A). That RAR(α,β,γ)-/- MEF cells are more compact round cells was corroborated by phase-contrast time-lapse video microscopy after splitting each cell line on microplates coated with different ECM proteins (Fig. 3B; Fig. 5; supplementary material Movie 1).

It is interesting to note that the triple knockout cells also seemed more motile than the WT counterparts (supplementary material Movie 1). Therefore, we addressed whether their migration properties were affected or not in a RadiusTM Cell Migration Assay with different ECM substrates (collagen I, laminin, fibronectin) or on plastic. Remarkably, the triple RAR null MEFs migrated less

efficiently than the WT MEFs when seeded on laminin or plastic (Fig. 5; supplementary material Movie 2).

As most of the genes involved in cell adhesion that were downregulated in the knockout MEFs, were not restored upon expression of RAR α , RAR γ or both RAR α and RAR γ , one could expect that the rescue lines do not recover the adhesion, morphology and migration of the WT cells. Accordingly, the rescue lines did not recover the ability to attach to collagen I and collagen IV (Fig. 3A) and to migrate on laminin and plastic (Fig. 3C). They did not fully recover the morphology of the WT cells either (Fig. 3B). However, it is interesting to note that the RAR γ and RAR(α,γ) rescue lines recovered a more dense network of actin fibers than the RAR α rescue line (Fig. 4B and data not shown). Such observations were unexpected but in fact could reflect the fact that RAR γ restores more genes than RAR α (Fig. 2E).

Collectively such results corroborate the RNA-seq results and highlight a new role for RARs in the control of cell adhesion, migration and morphology through the regulation of the expression of adhesion proteins.

The addition of RA does not affect the adhesion of MEFs but enhances the expression of genes involved in signaling

Then the repertoire of genes that are regulated by RARs in response to RA was profiled by comparing WT MEFs and RAR(α,β,γ)-/- MEFs, RA-treated versus untreated, in RNA-seq experiments. In order to select the primary target genes, the two MEF lines were treated with RA for 2 hours only.

A list of up- and downregulated genes was generated with WT MEFs (supplementary material Table S2). Remarkably, this list did not include genes involved in cell adhesion and migration. Accordingly, adhesion and spreading of MEFs were the same in the absence and presence of RA (supplementary material Movie 3). In fact, the list of upregulated genes included the *Rarb2* gene and the canonical RA-target genes involved in RA metabolism such as *Cyp26b1* (cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1) and *Dhrs3* [dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3]. It also included several genes encoding proteins involved in signaling such as *Pfkfb3* (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-biphosphatase 3), *Tnfrsf1b* (tumor necrosis factor receptor super family, member 1b), *Cxcr7* [chemokine (C-X-C motif) receptor 7], *Adora2b* (adenosine A2b receptor), *Rab20* (RAB20 member RAS oncogene family), *Rhpn2* (rhophilin, Rho GTPase binding protein 2) and *Stab1* (stabilin 1). Note that the list did not include the canonical homeobox genes involved in development and activated in other cell lines (Kashyap and Gudas, 2010; Mahony et al., 2011; Moutier et al., 2012; Su and Gudas, 2008) (Z.A.T., S.G., A.P., T.Y., Sylvia Urban, B.J., C.K., Irwin Davidson, Andree Dierich, C.R.E., unpublished data), in line with the fact that fibroblasts are already differentiated cells.

Remarkably all the genes that were RA-regulated in the WT cells did not have any significant differential expression in the triple-knockout cells (supplementary material Table S2). Moreover analysis of their promoters revealed the presence of several DR motifs with spacing between 0 and 8 base pairs (data not shown), indicating that they are targets for RARs (Moutier et al., 2012).

Then in order to investigate which genes are specifically regulated by RAR α or RAR γ , WT MEFs were compared to the different rescue lines, i.e. expressing RAR α or RAR γ in the triple-null background, in RNA-seq experiments (supplementary material Table S2; Fig. 6). The results were corroborated in RT-qPCR experiments (Fig. 7 and Table 1).

The Venn diagram (Fig. 6) shows that among the genes that were upregulated in WT MEFs, 25% (exemplified by *Cyp26b1*,

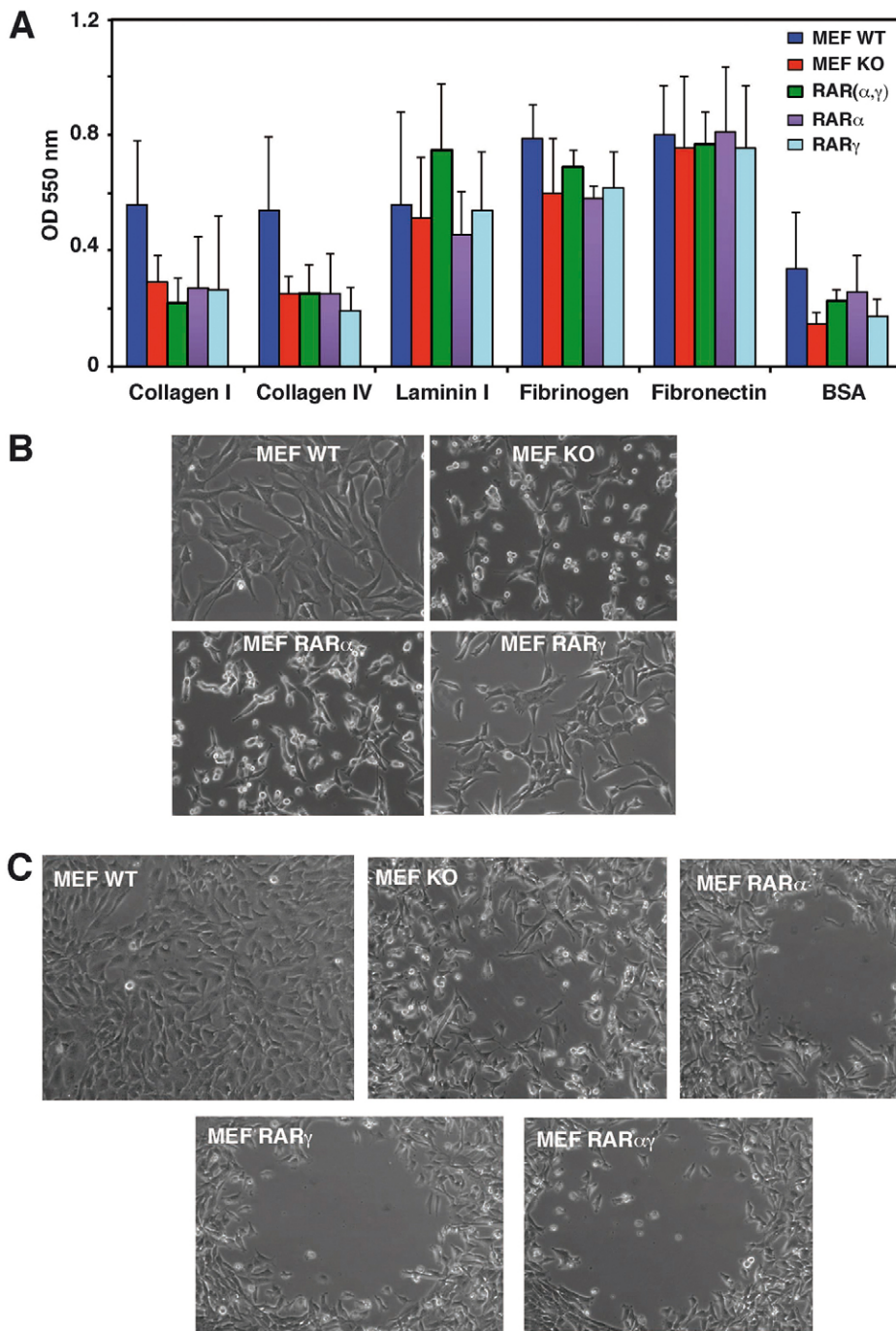


Fig. 3. RARs control MEF adhesion, morphology and migration.

(A) Adhesion of WT MEFs, RAR(α,β,γ)-/- MEFs and of the rescue lines expressing RAR α , RAR γ or both RAR α and RAR γ on different substrates. Values are the means \pm s.d. of duplicates from three separate experiments. (B) MEFs WT, RAR(α,β,γ)-/- MEFs and MEFs expressing RAR α or RAR γ in the null background, were compared for their morphology by phase-contrast microscopy, 6 hours after seeding on plastic micro plates. (C) Invasion of WT MEFs, RAR(α,β,γ)-/- MEFs and of the rescue lines expressing RAR α , RAR γ or both RAR α and RAR γ in a RadiusTM Cell Migration Assay on plastic (12 hours after removal of the hydrogel spot).

Dhrs3, *Cxcr7* and *Tnfrsf1b*) were restored in the two rescue lines (Fig. 7A). Thus the expression of these genes could be mediated by either RAR α or RAR γ , each RAR being able to substitute for the other. Consequently, the expression of these genes was not further regulated in the double RAR (α,γ) rescue line (supplementary material Fig. S1A). In contrast, 5% (exemplified by *Rab20* and *Rhpn2*) were restored only in the RAR γ rescue cell line (Fig. 7B) and 15% (exemplified by *Stab1*) in the RAR α rescue line (Fig. 7C). Thus the RA regulation of these genes appears to involve a single RAR (RAR α or RAR γ). This conclusion was corroborated in the double RAR(α,γ) rescue line and by using specific RAR α or RAR γ agonists (supplementary material Fig. S1A,B).

Remarkably, 55% of the upregulated genes were not restored (Fig. 6). One can suggest that both RAR α and RAR γ in combination would control their expression in response to RA (Su and Gudas, 2008; Taneja et al., 1996) but a role for RAR β 2 cannot be excluded.

Finally, several other genes, which were not RA-regulated in WT MEFs, were activated in the RAR α rescue line (*Dlx3*; distal-less homeobox 3), in the RAR γ rescue line (*Ngfr*; nerve growth factor receptor; TNFR super family, member 16) or in the two rescue lines [*Cyp26a1* (cytochrome P450, family 26, subfamily a, polypeptide 1); *Wnt7b* (wingless-related MMTV integration site 7B); and *Nrip1* (nuclear receptor interacting protein 1)] (Fig. 7D). Most interestingly, the expression of these genes decreased to the

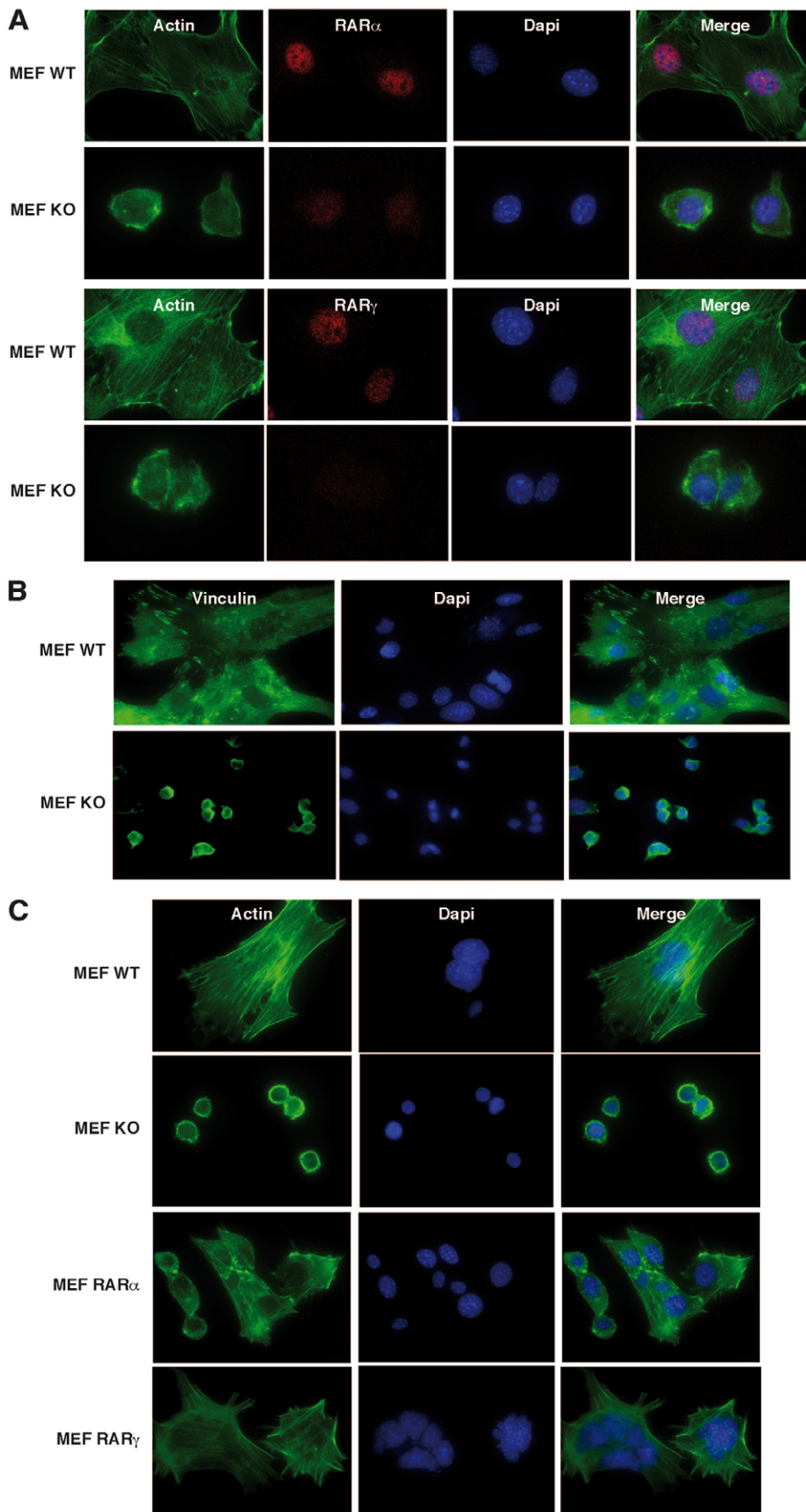


Fig. 4. RARs control MEF morphology and the actin filament network. (A) Fluorescence experiments performed with green 488 phalloidin showing the disruption of the actin network in RAR(α,β,γ)-/- MEFs. Co-labeling with purified polyclonal antibodies raised against RAR α or RAR γ confirmed the absence of these RARs in the KO cells. (B) Immunofluorescence experiments performed with vinculin antibodies showing that the microfilaments network is disturbed in MEFs knocked out for the three RARs. (C) WT MEFs, RAR(α,β,γ)-/- MEFs, and MEFs expressing RAR α or RAR γ in the null background, were compared in fluorescence experiments performed with green 488 phalloidin.

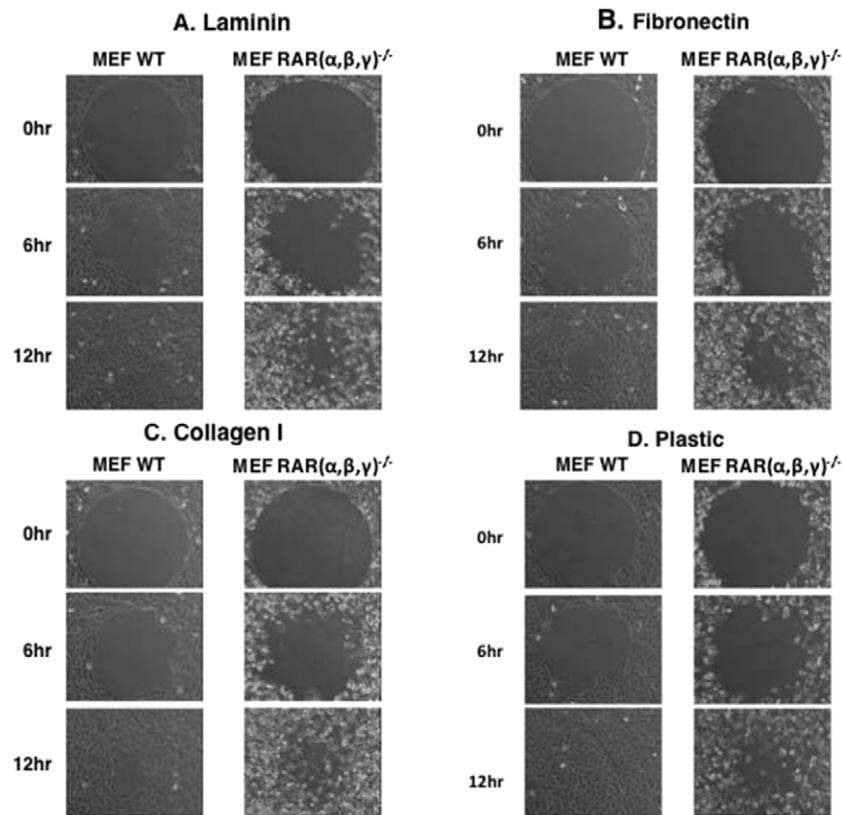


Fig. 5. RARs control the migration of MEFs. WT MEFs and $RAR(\alpha,\beta,\gamma)^{-/-}$ MEFs were compared in a Radius™ Cell Migration Assay with different substrates: collagen I, laminin, fibronectin and plastic.

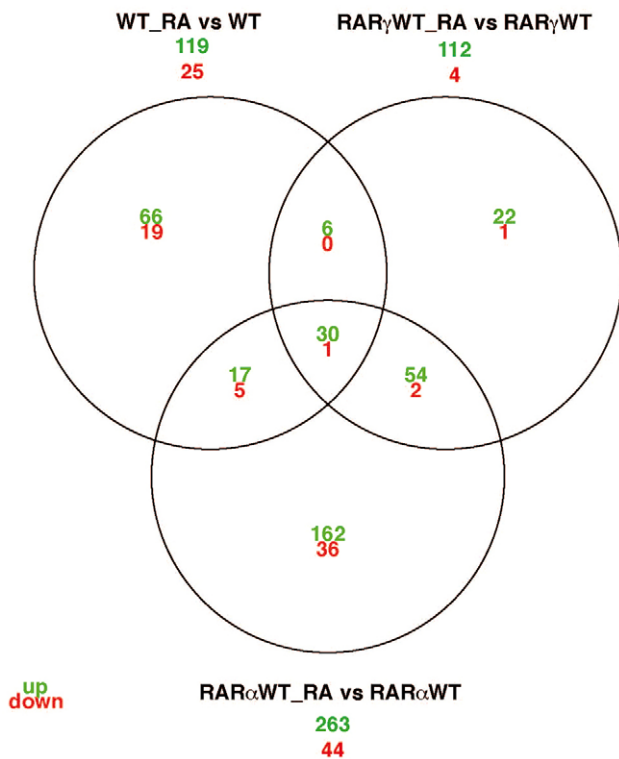


Fig. 6. Venn diagram comparing the genes that are regulated by RA in WT MEFs and in the rescue MEFs expressing $RAR\alpha$ WT or $RAR\gamma$ WT in the null background.

WT levels in the double rescue cell line (supplementary material Fig. S1A), indicating that in the WT cells, the two receptors antagonize each other for the induction of these genes, which have DR motifs in their promoters (data not shown) (Taneja et al., 1996).

RAR phosphorylation and the RA regulation of their target genes

$RAR\alpha$ and $RAR\gamma$ have a conserved phosphorylation site (S77 and S79, respectively) in their NTD (Fig. 8A). Upon treatment of MEFs with RA, $RAR\alpha$ becomes rapidly phosphorylated at this site (Bruck et al., 2009). $RAR\gamma$ also becomes rapidly phosphorylated at the same conserved site. Indeed, the amount of $RAR\gamma$ phosphorylated at S79 markedly increased within minutes after RA addition, as assessed by immunoprecipitation with antibodies recognizing specifically $RAR\gamma$ phosphorylated at this residue (Fig. 8B).

In order to determine whether phosphorylation plays a role in the activation of the $RAR\alpha$ and/or $RAR\gamma$ target genes, we generated additional stable rescue lines in the triple RAR knockout cells, which expressed $RAR\alpha$ or $RAR\gamma$ mutated at the N-terminal phosphorylation site. The rescue line expressing $RAR\alpha$ with S77 replaced with an alanine ($RAR\alpha$ S77A) has already been characterized (Bruck et al., 2009) (Fig. 8C, lane 4, D). We also established stable rescue lines expressing $RAR\gamma$ S79A. Three clones expressing the mutated receptor at levels similar to the endogenous receptor were obtained and one was selected and analyzed (Fig. 8C, lane 6, B).

Then the $RAR\alpha$ S77A and $RAR\gamma$ S79A cell lines, RA-treated versus untreated were compared with the WT $RAR\alpha$ and $RAR\gamma$ rescue lines, respectively, and with the WT cells in RNA-seq

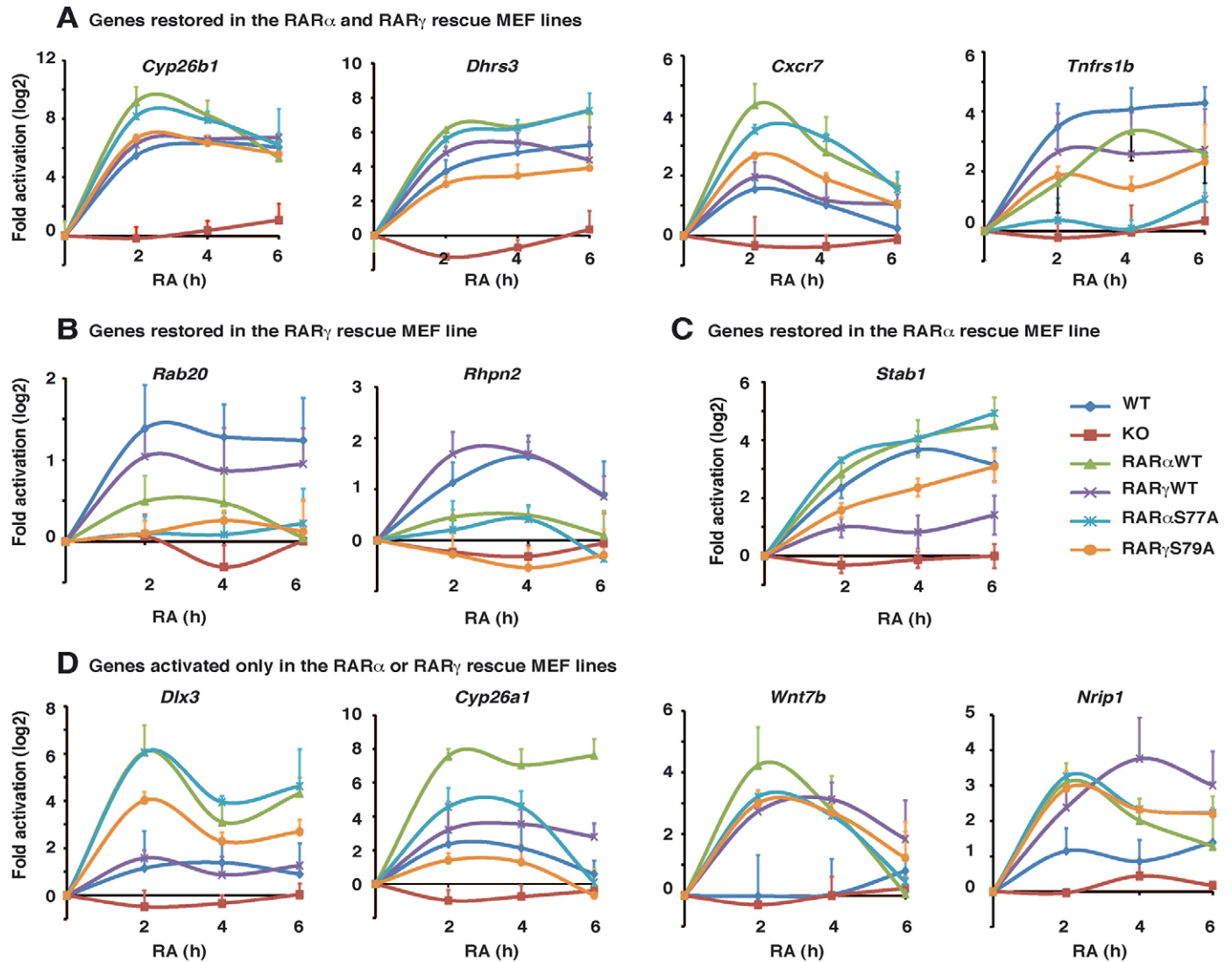


Fig. 7. RT-qPCR analysis of the genes regulated by RA in the different MEF lines that were selected in the RNA-seq experiments. Values are the means \pm s.d. of triplicates from three to five separate experiments.

(supplementary material Table S2; Fig. 8E,F) and RT-qPCR experiments (Fig. 7). The results show that among the upregulated genes that were restored by WT RAR α or by WT RAR γ , only 13% and 20% were not restored by RAR α S77A or RAR γ S79A, respectively, and thus depend on the phosphorylation of the receptors for their activation by RA (Fig. 8E,F). As an example, the *Rab20* and *Rhpn2* genes are controlled by the phosphorylation of RAR γ (Fig. 7B) and the *Tnfrs1b* gene by that of RAR α (Fig. 7A). Reciprocally, other genes were restored only in the cell lines expressing the phospho-mutants, indicating that phosphorylation can also have inhibitory effects. This is exemplified by the *Stab1* gene, which was restored by RAR γ S79A but not by the WT receptor (Fig. 6C). Note that this gene was also restored by RAR α but independently of its phosphorylation state (Fig. 7C). Thus RAR α and RAR γ can regulate the expression of a same gene with distinct phosphorylation requirements.

Similarly, among the genes that were activated only in the WT RAR α and WT RAR γ rescue cell lines (and not in the WT cells), some genes, exemplified by *Cyp26a1*, were not or less efficiently activated in the cell lines expressing the RAR γ and RAR α

phospho-mutants, respectively (Fig. 6D). Reciprocally, other genes such as *Dlx3* were activated only in the RAR γ S79A rescue cell line and not in the WT RAR γ one (Fig. 6D). Note that *Dlx3* was also activated by RAR α but independently of its phosphorylation.

Altogether these results indicate that, depending on the gene, the phosphorylation of RARs can have either positive or negative effects on their activation by RA, increasing the complexity of the transcriptional process.

DISCUSSION

Here we have described a genome-wide analysis of the genes that are transcriptionally regulated by RARs in mouse embryonic fibroblasts, both in the absence and presence of RA. Several studies have reported that expression of certain genes is activated by RA in MEFs (Delacroix et al., 2010) as well as in other cell types (Hua et al., 2009; Mahony et al., 2011; Mendoza-Parra et al., 2011; Ross-Innes et al., 2010; Su and Gudas, 2008). However, the originality of the present study resides in the comparison of WT MEFs with MEFs in which all three RARs or

Table 1. Recapitulation of the genes that are RA-activated in MEFs and their regulation by RAR γ and RAR α and their phosphorylated forms

Gene name	MEF lines: response to RA					
	WT	KO	RAR γ WT	RAR γ S79A	RAR α WT	RAR α S77A
Metabolism						
<i>Cyp26b1</i>	++	–	++	++	++	++
<i>Dhrs3</i>	++	–	++	++	++	++
<i>Cyp26a1</i>	±	–	+	–	+	±
Signaling						
<i>Tnfrsf1b</i>	+	–	+	+	+	–
<i>Cxcr7</i>	+	–	+	+	+	+
<i>Stab1</i>	+	–	–	+	+	+
<i>Rab20</i>	+	–	+	–	–	–
<i>Rhpn2</i>	+	–	+	–	–	–
<i>Wnt7b</i>	–	–	++	++	++	++
<i>Nrip1</i>	–	–	+	+	+	+
<i>Dlx3</i>	–	–	±	+	++	++

one or two individual RAR were knocked out in the triple RAR null background. Such a strategy has the advantage of allowing the characterization of all the RAR-target genes and the analysis of receptor subtypes requirement, without artefactual and redundant RAR subtype responses (Plassat et al., 2000; Rochette-Egly and Chambon, 2001; Rochette-Egly et al., 2000; Taneja et al., 1996). Therefore it allowed us to identify that unliganded and liganded RARs control the expression of different sets of genes: genes involved in adhesion in the absence of ligand and genes involved in signaling in the presence of ligand. In addition, the generation of rescue cell lines expressing RAR α or RAR γ mutated at their N-terminal phosphorylation site allowed the selection of genes that require the phosphorylation of the receptors for their regulation by RA. Finally, the comparison of the WT and triple knockout cells with the different rescue lines highlighted the complexity and the diversity of the transcriptional programs regulated by RARs both in the absence and presence of RA.

A novel ligand-independent function of RARs in the regulation of adhesion genes

We identified several transcripts that were differentially expressed between wild-type and RAR α , - β , - γ knockout MEFs in the absence of ligand. Indeed, we have shown that the inactivation of the three RARs is associated with the downregulation of transcripts associated with genes involved in cell adhesion, such as integrins, laminins, cadherins and collagen. Consequently, the triple RAR knockout cells lost their ability to adhere and migrate on specific substrates. Moreover, given that the adhesion proteins are linked to the cellular cytoskeleton (Miranti and Brugge, 2002; Zamir and Geiger, 2001), they remained compact round cells and displayed a disrupted network of actin filaments, compared to the WT cells.

Another important finding of this study is that, among the adhesion genes that are downregulated in the triple RAR knockout cells, 40% are restored in the RAR α and/or RAR γ rescue cell lines and thus are controlled by a single specific RAR (RAR α or RAR γ) in the absence of ligand. In contrast, 60% are not restored. Remarkably, expression of both RAR α and RAR γ does not restore either the adhesion, migration and morphology of MEFs to WT levels. In fact our results suggest that RAR α and RAR γ cooperate with RAR β , despite this latter RAR being expressed at hardly detectable levels. Consequently, the right adhesion properties of MEFs require the expression of subsets of genes, which are controlled by diverse combinations of RARs.

Remarkably, all the adhesion genes regulated by RARs in the absence of ligand, contain several potential RAR-binding sites in their promoters. However, which sites do RAR α and/or RAR γ occupy and how unliganded RARs maintain the expression of these genes for the proper adhesion and spreading of the cells, will require further investigations. According to the classical model (Dilworth and Chambon, 2001), unliganded and DNA-bound RAR α represses transcription through the recruitment of corepressor complexes that maintain chromatin in a condensed and repressed state. However, recent studies reported that RAR α can mediate substantial levels of transcriptional activation in the absence of ligand through the recruitment of complexes that regulate the methylation of specific promoter regions (Delacroix et al., 2010; Laursen et al., 2012). RAR γ has been also shown to control gene transcription in the absence of ligand (Su and Gudas, 2008) and it has been proposed that this property would reflect its weak ability to bind corepressors (Farboud et al., 2003; Hauksdottir et al., 2003).

In the presence of ligand, RARs control the expression of genes encoding essential proteins involved in cell signaling

We also profiled the genes that are regulated by RA in MEFs. Gene ontology analysis showed that, in these cells, the largest class of target genes are involved in metabolism (*Cyp26b1* and *Dhrs3*) and in signal transduction (*Pfkfb3*, *Tnfrsf1b*, *Cxcr7*, *Adora2b*, *Rab20* and *Rhpn2*). It must be stressed that this repertoire of RA-regulated genes in MEFs is significantly different from that observed in other cell types such as F9 or ES cells (Mahony et al., 2011; Mendoza-Parra et al., 2011; Moutier et al., 2012; Su and Gudas, 2008) (Z.A.T., S.G., A.P., T.Y., Sylvia Urban, B.J., C.K., Irwin Davidson, Andree Dierich, C.R.E., unpublished data). Indeed, most of the developmental genes such as the Hox genes, which are strongly activated in F9 and ES cells, were not activated in MEFs. Such a difference has been attributed to the fact that MEFs and ES cells share only a small subset of RAR-bound genes (Delacroix et al., 2010) because of a silenced chromatin signature in fibroblasts, which correspond to a more differentiated cell type (Delacroix et al., 2010; Kashyap and Gudas, 2010).

The originality of the present study resides in the comparison of WT MEFs with MEFs in which all three RARs or one or two individual RAR were knocked out in the triple RAR null background. Such a strategy provides a means of analyzing each receptor requirement, without redundancies. Consequently, we found that the activation of all the RA-regulated genes was

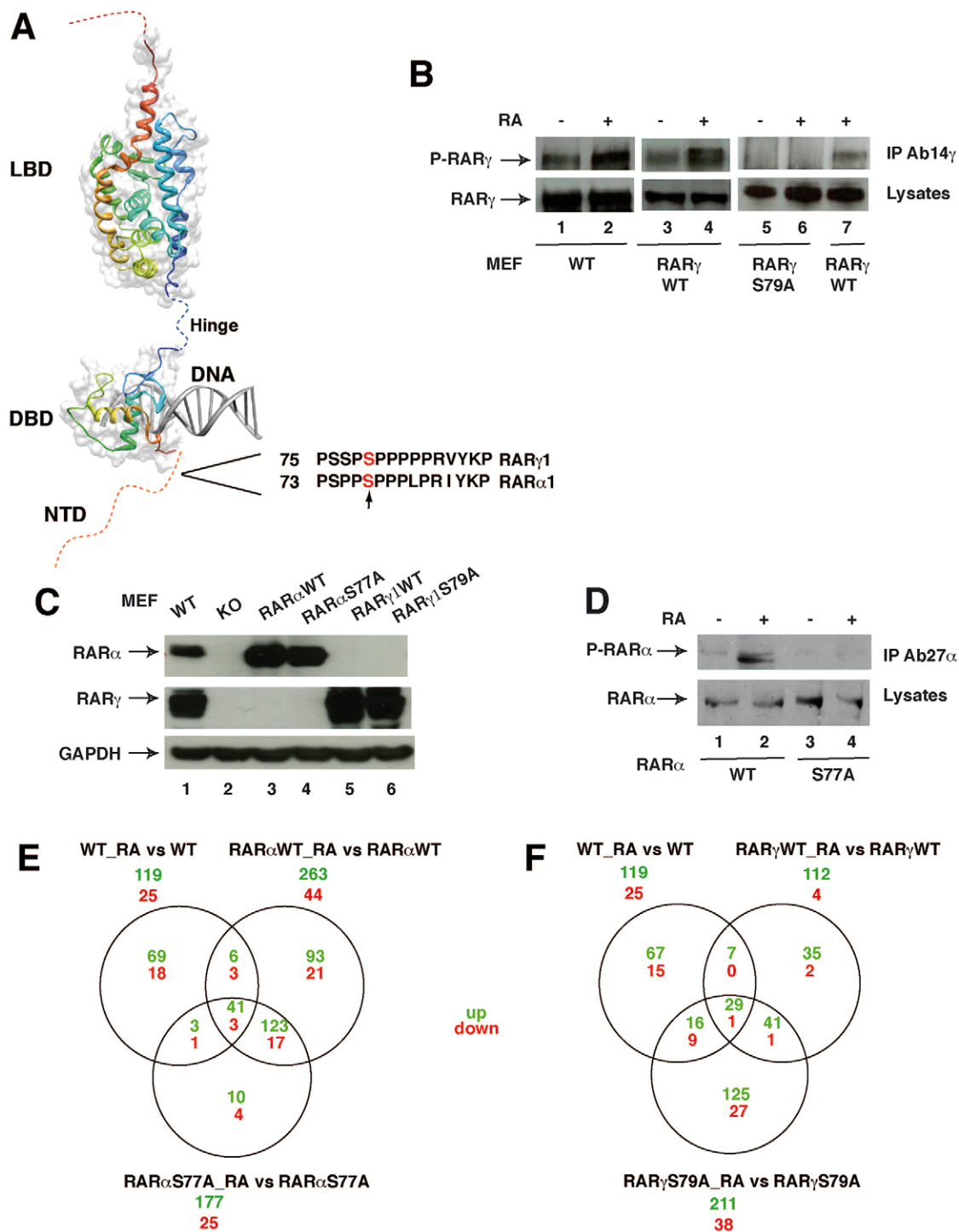


Fig. 8. Influence of RAR phosphorylation on the regulation of their target genes by RA. (A) Schematic representation of RARs showing the phosphorylation site located in the NTD. (B) In WT MEFs, RA induces the phosphorylation of RAR γ as shown by immunoprecipitation with a monoclonal antibody specifically recognizing RAR γ phosphorylated at S79 (P-RAR γ). RAR γ is also phosphorylated in MEFs expressing RAR γ WT but not in MEFs expressing RAR γ S79A. (C) Expression of RAR α (WT and S77A) and RAR γ 1 (WT and S79A) to WT levels in the triple RAR knockout background. (D) RAR α is phosphorylated in MEFs expressing RAR α WT but not in MEFs expressing RAR α S77A, as shown by immunoprecipitation with a monoclonal antibody specifically recognizing RAR γ phosphorylated at S79. (E) Venn diagram comparing the RA-regulated genes in WT MEFs and in MEFs expressing RAR α WT or RAR α S77A in the triple RAR knockout background. (F) Venn diagram comparing the RA-regulated genes in WT MEFs and in MEFs expressing RAR γ WT or RAR γ S79A.

abolished in the triple RAR knockout MEFs, validating that they are RAR-target genes. Taking advantage of cells expressing RAR α or RAR γ in the triple RAR knockout background, we also found that, depending on the gene, their RA regulation can be

mediated by either RAR α or RAR γ (each RAR being able to substitute for the other) or by a single RAR (RAR α or RAR γ). The actual role of RAR β 2 is still unclear since this receptor is also under the control of both RAR α and RAR γ .

Taking into account that the majority of the RA-target genes contain several RAR-binding sites, one can speculate that the activation of the RAR-target genes requires the binding of one or several RAR subtypes at different sites and/or their dynamic and sequential recruitment at a same site (Mendoza-Parra et al., 2011). Overall, these observations complicate the models of gene regulation by RARs and highlight the diversity of the regulatory programs by RARs, depending on the gene and on the feature of the cell type.

In MEFs, phosphorylation of RARs is required for RA activation of specific genes

The fact that RAR α and RAR γ are rapidly phosphorylated in response to RA, brought into question the repertoire of the RA target genes that are regulated by their phosphorylated forms. The comparison of WT MEFs with MEFs expressing the WT RARs or the phospho-mutants in the triple RAR knockout background, allowed us to identify two genes (*Rab20* and *Rhpn2*) that are activated only by the phosphorylated form of RAR γ , and one (*Tnfrsf1b*), which is controlled by the phosphorylated form of RAR α . All these genes encode key proteins involved in cell signaling. Indeed, *Rab20* encodes a GTPase, which associates with and dissociates from membranes and which like all the GTPases of the Rab family is a key regulator of all transport steps between intracellular compartments (Pylypenko and Goud, 2012). *Rhpn2* encodes rhophilin-2, which is a RhoA-GTPase-binding protein and which regulates actin cytoskeleton organization (Peck et al., 2002). *Tnfrsf1b* belongs to the tumor necrosis factor receptor super family and is linked to pro- and anti-apoptotic pathways (Aggarwal, 2003). In contrast, other genes are activated only by the non-phosphorylated form of RAR α or RAR γ and not by the WT receptors, indicating that RAR phosphorylation can also have negative effects on gene expression. These genes, exemplified by *Stab1*, also encode proteins involved in cell signaling.

Thus one can speculate that, in MEFs, the phosphorylated forms of RAR α and RAR γ control the activation of genes that are essential for cell proliferation and/or survival. In contrast, other results from our laboratory indicate that in other cell types such as ES cells, the phosphorylated form of RAR γ regulates other genes, which are involved in development (Z.A.T., S.G., A.P., T.Y., Sylvia Urban, B.J., C.K., Irwin Davidson, Andree Dierich, C.R.E., unpublished data). Thus not only the repertoire of the RA-activated genes, but also their dependency on RAR phosphorylation depends on the cell type.

According to our recent studies, phosphorylation controls the association–dissociation of coregulators involved in transcription, through allosteric control (Chebaro et al., 2013; Samarut et al., 2011). Moreover, we have shown that phosphorylation of the N-terminal serine residue, which is located in the vicinity of the DBD, controls the association–dissociation of coregulators (Lalève et al., 2010) and therefore the recruitment of RARs to some promoters (Bruck et al., 2009; Lalève et al., 2010). Further work is in progress in order to decipher how phosphorylation controls the binding of RARs to specific gene promoters.

In conclusion, the current study increased the repertoire of RAR-target genes and revealed that in the absence of ligand, RARs control the expression of genes associated with cell adhesion and migration. Such findings may have important biological implications during embryonic development (Samarut and Rochette-Egly, 2012). It may also have implications in the migration and invasion properties of carcinoma-associated fibroblasts, especially in the context of breast

cancers characterized by aberrant RA signaling (Goetz et al., 2011; Siletz et al., 2013; Tari et al., 2002). It also revealed new genes that depend on the phosphorylation state of RARs for their activation by RA. Finally it shed light on the diversity and complexity of the regulatory programs by RARs, depending on the gene and on the feature of the cell type.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and reagents

Rabbit polyclonal antibodies against RAR α [RP α (F)], RAR γ [RP γ (F)] and RAR β [RP β (F)] were previously described (Bruck et al., 2009; Lalève et al., 2010; Rochette-Egly et al., 1992). RP α (F) and RP γ (F) were purified on Sulfolink gel columns (Pierce Chemical, Rockford, IL, USA) coupled to the corresponding immunizing peptide (Buchanan et al., 2011; Lalève et al., 2010; Vernet et al., 2006). Mouse monoclonal antibodies against RAR γ 1 [Ab1 γ (A1)] and RAR γ 2 [Ab10 γ (A2)] were previously described (Bastien et al., 2000) as well as mouse monoclonal antibodies recognizing specifically RAR α phosphorylated at S77 (RAR α -P-S77) (Bruck et al., 2009) or RAR γ phosphorylated at S79 (RAR γ -P-S79) (Lalève et al., 2010). The other mouse monoclonal antibodies used were against β -actin (Santa Cruz Biotechnology Inc.), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Millipore) and vinculin (Sigma Aldrich). All-trans retinoic acid was from Sigma Aldrich, and BMS 195614 (RAR α antagonist), BMS 493 (pan RAR reverse agonist), BMS753 (RAR α agonist), BMS961 (RAR γ agonist), MM11253 (RAR γ antagonist) and LE135 (RAR β antagonist) were from Tocris Bioscience.

Cell lines, immunoblotting and immunoprecipitation

Mouse embryo fibroblasts (MEFs) with all three RARs deleted, RAR(α,β,γ)-/-, were as described previously (Altucci et al., 2005; Chapellier et al., 2002) as well as MEFs expressing WT RAR α or RAR α S77A in a RAR(α,β,γ) null background (Bruck et al., 2009). WT RAR γ 1 and RAR γ 1 S79A were subcloned from the pSG5 constructs (Bastien et al., 2000) into a pCA vector with a CAG early promoter coupled to *PGK*/neomycin and reintroduced in the triple RAR knockout cells using Lipofectamine[®] 2000 transfection (Invitrogen). RAR α subcloned into a pCA vector with a CAG early promoter coupled to *PGK*/hygromycin was also introduced into the RAR γ 1 rescue line the X-tremeGENE HP DNA Transfection reagent (Roche). The stable rescue lines were selected with G418 for 10 days and analyzed for the presence of the transgene by qPCR and immunoblotting.

When 80–90% confluent, cells were treated with RA (10^{-7} M; Sigma Aldrich Corporation) after 24 hours in medium containing 1% dextran-charcoal-treated fetal calf serum. Extracts, preparation and immunoblotting were described previously (Bour et al., 2005). Immunoprecipitation was performed with mouse monoclonal antibodies immobilized on Dynabeads[®] Protein G (Invitrogen).

High throughput mRNA sequencing (RNA-seq)

After isolation of total RNA, a library of template molecules suitable for high throughput DNA sequencing was created following the Illumina ‘Truseq RNA sample prep v2’ protocol with some modifications. Briefly, mRNA was purified from 2 mg total RNA using oligo(dT) magnetic beads and fragmented using divalent cations at 94°C for 8 minutes. The cleaved mRNA fragments were reverse transcribed to cDNA using random primers and then the second strand of the cDNA was synthesized using polymerase I and RNase H. The next steps of RNA-Seq library preparation were performed in a fully automated system using an SPRIworks Fragment Library System I kit (ref A84803, Beckman Coulter, Inc.) with the SPRI-TE instrument (Beckman Coulter, Inc.). Briefly, in this system double stranded cDNA fragments were blunted, phosphorylated and ligated to indexed adapter dimers, and fragments in the range of ~200–400 bp were size selected. The automated steps were followed by PCR amplification [30 seconds at 98°C; (10 seconds at 98°C, 30 seconds at 60°C, 30 seconds at 72°C) × 12 cycles; 5 minutes at 72°C]. Then surplus PCR primers were removed by purification using AMPure beads (Agencourt Biosciences Corporation) with a Biomek 3000

instrument (Beckman Coulter, Inc.). DNA libraries were checked for quality and quantified using 2100 Bioanalyzer (Agilent). The libraries were loaded in the flow cell at 11 pM concentration and clusters generated and sequenced in the Illumina HiSeq2000 as single-end 50 base reads.

Image analysis and base calling were performed using CASAVA v1.8.2. Sequence Reads were mapped onto the mm9 assembly of the mouse genome by using Tophat v1.4.1 (Trapnell et al., 2009) and the bowtie v0.12.7 aligner. Only uniquely aligned reads were retained for further analyses. Gene expression was quantified using HTSeq v0.5.3p3 (Anders and Huber, 2010) and gene annotations from Ensembl release 66. Read counts were normalized across libraries with the method proposed by Anders and Huber (Anders and Huber, 2010). Comparisons of interest were performed using the statistical method proposed by Anders and Huber (Anders and Huber, 2010) implemented in the DESeq v1.6.1 Bioconductor package. *P*-values were adjusted for multiple testing by using the Benjamini and Hochberg method (Benjamini and Hochberg, 1995). Only genes with $|\log_2 \text{fold-change}| > 1$ or < -1 and an adjusted *P*-value < 0.05 were considered. Functional analyses of these genes were performed using the Manteia program (<http://manteia.igbmc.fr>).

Motif research

The gene regions located ± 10 kb from the gene limits (Ensembl release 63) were analyzed using regular expression searches to detect perfect consensus 5'-RGK TSA-3' half sites with the different spacings. The potential RAR binding elements were aligned on the same strand to ensure the sense and antisense matches gave homogeneous positions.

Cell adhesion and migration assays

Cell adhesion on ECM proteins was carried out using the CytoSelect 48-well cell adhesion assay (ECM array colorimetric assay; Cell Biolabs). MEFs (60,000 cells) were seeded onto the wells pre-coated with a single ECM protein (collagen I, collagen IV, laminin, fibrinogen, fibronectin and BSA as a negative control). After 1 hour at 37°C, the non-adherent cells are washed away and the attached cells are quantified by colorimetry.

Cell migration was analyzed using the Radius™ CytoSelect 24-Well Cell Migration Assay kit according to the manufacturer's instructions (Cell Biolabs). MEFs were seeded in the wells of the Radius plate, pre-coated with collagen I, laminin or fibrinogen. Once cells formed a monolayer, the assay was initiated by removing the hydrogel spot located in the center of the well, and cell migration was evaluated for 16 hours by phase-contrast time-lapse video microscopy.

Phase-contrast time-lapse video microscopy

MEFs (200,000 cells) were seeded in 12-well cell culture microplates pre-coated with laminin (5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; Roche Applied Science) and rapidly analyzed with a Leica DM IRE2 inverted microscope equipped with phase-contrast optics, a thermostatically controlled heating stage and a Plexiglas incubator (37°C, 5% CO₂). A computer-controlled movable stage was mounted on the microscope, allowing simultaneous recordings from several microscopic fields. Images were obtained sequentially at 2 minute intervals, for a total time of observation of 6 hours. The initial focus (*z*-position) of the individual fields did not change during the recording time. Thus, no auto focusing of the individual fields was necessary. Images were stored using MetaMorph software (Universal Imaging). Two to three microscope fields per well were selected and their *x*, *y*, *z*-positions stored in a computer, with 20 \times magnification.

Immunofluorescence

Cells grown on Lab-Tek® glass chamber slides (Thermoscientific) were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA)–PBS (20 minutes), permeabilized with 0.1% Triton X-100 (15 minutes) and blocked with 1% BSA in PBS (30 minutes). Then the cells were incubated with the primary antibodies, followed by Alexa-Fluor™-448 or -555-conjugated secondary antibodies (Invitrogen). When mentioned, cells were also incubated with fluorescent green CF488 phalloidin (Biotium, Inc. Hayward USA). Nuclei were counterstained with DAPI (Sigma-Aldrich). Cells were analyzed by

fluorescence microscopy using a LEICA upright DM4000B microscope equipped with a Photometrics CoolSnap® camera and software. The objective used was Leica HCX PL APO 63 \times 1.40 LBL.

RNA isolation and RT-qPCR

RNA isolation and RT-qPCR were performed as described previously (Bour et al., 2005). Primer sequences are available upon request.

Acknowledgements

We are grateful to M. Oulad Abdelghani (IGBMC) for the mouse monoclonal antibodies and to the cell culture facilities for help. Special thanks to Amandine Velt (supported by France Genomique) for bioinformatics analysis.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author contributions

Z.A.T., A.P. and D.A. devised and undertook all experimental work and analyzed the data. S.G. performed the RT-qPCR experiments and R.L. generated the rescue cell lines. B.J. performed the RNA-seq experiments and T.Y. and C.K. performed the bioinformatic analysis of the results. C.R.E. analyzed the data and wrote the paper.

Funding

This work was supported by the Agence Nationale pour la Recherche [grant numbers ANR-05-BLAN-0390-02 and ANR-09-BLAN-0297-01 to C.R.E.]; the Association pour la recherche sur le Cancer [grant numbers ARC-07-1-3169 and SL220110603474 to C.R.E.]; the Fondation pour la Recherche Médicale [grant number DEQ20090515423 to C.R.E.]; and the Institut National du Cancer [grant number INCa-PL09-194 and PL07-96099 to C.R.E.]; Fellowships from the Lady Tata Memorial trust and from INCA supported A.P. and Z.A.T., respectively.

Supplementary material

Supplementary material available online at <http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.131946/-DC1>

References

- Aggarwal, B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 745–756.
- 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.
- Altucci, L., Rossin, A., Hirsch, O., Nebbioso, A., Vitoux, D., Wilhelm, E., Guidez, F., De Simone, M., Schiavone, E. M., Grimwade, D. et al. (2005). Retinoid-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.
- Anders, S. and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **11**, R106.
- Bastien, J. and 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., Egly, J. M., Chambon, P. and Rochette-Egly, C. (2000). TFIIH interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7. *J. Biol. Chem.* **275**, 21896–21904.
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc.* **57B**, 289–300.
- Bour, G., Plassat, J. L., Bauer, A., Lalevée, S. and Rochette-Egly, C. (2005). Vinexin beta interacts with the non-phosphorylated AF-1 domain of retinoid receptor gamma (RARgamma) and represses RARgamma-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* **280**, 17027–17037.
- Bourguet, W., de Lera, A. R. and Gronemeyer, H. (2010). Inverse agonists and antagonists of retinoid receptors. *Methods Enzymol.* **485**, 161–195.
- Bruck, N., Vitoux, D., Ferry, C., Duong, V., Bauer, A., de Thé, 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 RAR α and RAR γ proteins in pluripotent and differentiating mouse embryonal carcinoma and mouse embryonic stem cells. *Cell Tissue Res.* **346**, 43–51.
- Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **10**, 940–954.
- Chapellier, B., Mark, M., Bastien, J., Dierich, A., LeMeur, M., Chambon, P. and Ghyselinck, N. B. (2002). A conditional floxed (loxP-flanked) allele for the retinoic acid receptor beta (RARbeta) gene. *Genesis* **32**, 91–94.
- Chebaro, Y., Amal, I., Rochel, N., Rochette-Egly, C., Stote, R. H. and Dejaegere, A. (2013). Phosphorylation of the retinoic acid receptor alpha induces a mechanical allosteric regulation and changes in internal dynamics. *Plos Comput. Biol.* **9**, e1003012.

- Delacroix, L., Moutier, E., Altobelli, G., Legras, S., Poch, O., Choukallah, M. A., Bertin, I., Jost, B. and 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**, 231–244.
- Dilworth, F. J. and Chambon, P.** (2006). Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene* **20**, 3047–3054.
- Farboud, B., Hauksdottir, H., Wu, Y. and Privalsky, M. L.** (2003). Isotype-restricted corepressor recruitment: a constitutively closed helix 12 conformation in retinoic acid receptors beta and gamma interferes with corepressor recruitment and prevents transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2844–2858.
- Gaillard, E., Bruck, N., Brelivet, Y., Bour, G., Lalevée, S., Bauer, A., Poch, O., Moras, D. and Rochette-Egly, C.** (2006). Phosphorylation by PKA potentiates retinoic acid receptor alpha activity by means of increasing interaction with and phosphorylation by cyclin H/cdk7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 9548–9553.
- Germain, P., Chambon, P., Eichele, G., Evans, R. M., Lazar, M. A., Leid, M., De Lera, A. R., Lotan, R., Mangelsdorf, D. J. and Gronemeyer, H.** (2006a). International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacol. Rev.* **58**, 712–725.
- Germain, P., Chambon, P., Eichele, G., Evans, R. M., Lazar, M. A., Leid, M., De Lera, A. R., Lotan, R., Mangelsdorf, D. J. and Gronemeyer, H.** (2006b). International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol. Rev.* **58**, 760–772.
- Germain, P., Staels, B., Daquet, C., Spedding, M. and Laudet, V.** (2006c). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol. Rev.* **58**, 685–704.
- Goetz, J. G., Minguet, S., Navarro-Lérida, I., Lazcano, J. J., Samaniego, R., Calvo, E., Tello, M., Osteso-Ibáñez, T., Pellinen, T., Echarri, A. et al.** (2011). Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell* **146**, 148–163.
- Hauksdottir, H., Farboud, B. and Privalsky, M. L.** (2003). Retinoic acid receptors beta and gamma do not repress, but instead activate target gene transcription in both the absence and presence of hormone ligand. *Mol. Endocrinol.* **17**, 373–385.
- Hua, S., Kittler, R. and White, K. P.** (2009). Genomic antagonism between retinoic acid and estrogen signaling in breast cancer. *Cell* **137**, 1259–1271.
- Kashyap, V. and Gudas, L. J.** (2010). Epigenetic regulatory mechanisms distinguish retinoic acid-mediated transcriptional responses in stem cells and fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **285**, 14534–14548.
- Lalevée, S., Bour, G., Quinternet, M., Samarut, E., Kessler, P., Vitorino, M., Bruck, N., Delsuc, M. A., Vonesch, J. L., Kieffer, B. et al.** (2010). Vinexinβ, an atypical “sensor” of retinoic acid receptor gamma signaling: union and sequestration, separation, and phosphorylation. *FASEB J.* **24**, 4523–4534.
- Laursen, K. B., Wong, P. M. and Gudas, L. J.** (2012). Epigenetic regulation by RARα maintains ligand-independent transcriptional activity. *Nucleic Acids Res.* **40**, 102–115.
- le Maire, A., Teyssier, C., Erb, C., Grimaldi, M., Alvarez, S., de Lera, A. R., Balaguer, P., Gronemeyer, H., Royer, C. A., Germain, P. et al.** (2010). A unique secondary-structure switch controls constitutive gene repression by retinoic acid receptor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 801–807.
- Mahony, S., Mazzoni, E. O., McGuine, S., Young, R. A., Wichterle, H. and Gifford, D. K.** (2011). Ligand-dependent dynamics of retinoic acid receptor binding during early neurogenesis. *Genome Biol.* **12**, R2.
- Mendoza-Parra, M. A., Walia, M., Sankar, M. and Gronemeyer, H.** (2011). Dissecting the retinoid-induced differentiation of F9 embryonic stem cells by integrative genomics. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 538.
- Miranti, C. K. and Brugge, J. S.** (2002). Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat. Cell Biol.* **4**, E83–E90.
- Moutier, E., Ye, T., Choukallah, M. A., Urban, S., Osz, J., Chatagnon, A., Delacroix, L., Langer, D., Rochel, N., Moras, D. et al.** (2012). Retinoic acid receptors recognize the mouse genome through binding elements with diverse spacing and topology. *J. Biol. Chem.* **287**, 26328–26341.
- Peck, J. W., Oberst, M., Bouker, K. B., Bowden, E. and Burbelo, P. D.** (2002). The RhoA-binding protein, rhotillin-2, regulates actin cytoskeleton organization. *J. Biol. Chem.* **277**, 43924–43932.
- Piskunov, A. and Rochette-Egly, C.** (2012). A retinoic acid receptor RARα pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein αQ to activate p38MAPK. *Oncogene* **31**, 3333–3345.
- Plassat, J., Penna, L., Chambon, P. and Rochette-Egly, C.** (2000). The conserved amphipathic α-helical core motif of RARgamma and RARalpha activating domains is indispensable for RA-induced differentiation of F9 cells. *J. Cell Sci.* **113**, 2887–2895.
- Pylypenko, O. and Goud, B.** (2012). Posttranslational modifications of Rab GTPases help their insertion into membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 5555–5556.
- Rochette-Egly, C.** (2003). Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell. Signal.* **15**, 355–366.
- Rochette-Egly, C. and 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**, 909–922.
- Rochette-Egly, C. and Germain, P.** (2009). Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs). *Nucl. Recept. Signal.* **7**, e005.
- Rochette-Egly, C., Gaub, M. P., Lutz, Y., Ali, S., Scheuer, I. and Chambon, P.** (1992). Retinoic acid receptor-beta: immunodetection and phosphorylation on tyrosine residues. *Mol. Endocrinol.* **6**, 2197–2209.
- Rochette-Egly, C., Oulad-Abdelghani, M., Staub, A., Pfister, V., Scheuer, I., Chambon, P. and Gaub, M. P.** (1995). Phosphorylation of the retinoic acid receptor-alpha by protein kinase A. *Mol. Endocrinol.* **9**, 860–871.
- Rochette-Egly, C., Adam, S., Rossignol, M., Egly, J. M. and Chambon, P.** (1997). Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* **90**, 97–107.
- Rochette-Egly, C., Plassat, J. L., Taneja, R. and Chambon, P.** (2000). The AF-1 and AF-2 activating domains of retinoic acid receptor-alpha (RARalpha) and their phosphorylation are differentially involved in parietal endodermal differentiation of F9 cells and retinoid-induced expression of target genes. *Mol. Endocrinol.* **14**, 1398–1410.
- Ross-Innes, C. S., Stark, R., Holmes, K. A., Schmidt, D., Spyrou, C., Russell, R., Massie, C. E., Vowler, S. L., Eldridge, M. and Carroll, J. S.** (2010). Cooperative interaction between retinoid acid receptor-alpha and estrogen receptor in breast cancer. *Genes Dev.* **24**, 171–182.
- 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.
- Samarut, E., Amal, I., Markov, G. V., Stote, R., Dejaegere, A., Laudet, V. and Rochette-Egly, C.** (2011). Evolution of nuclear retinoic acid receptor alpha (RARα) phosphorylation sites. Serine gain provides fine-tuned regulation. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2125–2137.
- Siletz, A., Kniazeva, E., Jeruss, J. S. and Shea, L. D.** (2013). Transcription factor networks in invasion-promoting breast carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Microenviron.* **6**, 91–107.
- Su, D. and Gudas, L. J.** (2008). Gene expression profiling elucidates a specific role for RARgamma in the retinoic acid-induced differentiation of F9 teratocarcinoma stem cells. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 1129–1160.
- Taneja, R., Roy, B., Plassat, J. L., Zusi, C. F., Ostrowski, J., Reczek, P. R. and Chambon, P.** (1996). Cell-type and promoter-context dependent retinoic acid receptor (RAR) redundancies for RAR beta 2 and Hoxa-1 activation in F9 and P19 cells can be artefactually generated by gene knockouts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6197–6202.
- Tari, A. M., Lim, S. J., Hung, M. C., Esteve, F. J. and Lopez-Berestein, G.** (2002). Her2/neu induces all-trans retinoic acid (ATRA) resistance in breast cancer cells. *Oncogene* **21**, 5224–5232.
- Trapnell, C., Pachter, L. and Salzberg, S. L.** (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* **25**, 1105–1111.
- Vernet, N., Dennefeld, C., Rochette-Egly, C., Oulad-Abdelghani, M., Chambon, P., Ghyselinck, N. B. and Mark, M.** (2006). Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. *Endocrinology* **147**, 96–110.
- Zamir, E. and Geiger, B.** (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* **114**, 3583–3590.

Publication 2

The interaction of RAR α with profilin2a controls the architecture of actin filaments

Dina Andriamoratsiresy, Aleksandr Piskunov*, Regis Lutzinger and Cécile Rochette-Egly **

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

*** actual address: Department of Cell Lines Development, The International Biotechnology Center «Generium », Vladimirskaya Street 14, Volginsky, 601125, Russian Federation**

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

ABSTRACT

Nuclear retinoic acid (RA) receptors (RARs) are classically considered as ligand-dependent regulators of transcription. However it becomes increasingly clear that RARs as well as most nuclear receptors are also extra nuclear with non-transcriptional effects. Here we highlighted a novel face of the RAR α subtype. Indeed we found that, in the cytosol of fibroblasts, RAR α interacts with profilin2a (PFN2A), a small actin-binding protein involved in the polymerization of actin filaments. The interaction involves the N-terminal proline-rich motif of RAR α and the SH3-like domain of PFN2a. The most interesting finding is that overexpressing RAR α levels and thereby the number of RAR α -PFN2a complexes in the cytoplasm, alters the morphology of the fibroblasts, their number of stress fibers and their adhesion/migration. Our data indicate that RAR α competes for PFN2a binding, with the other proteins containing a proline rich motif, involved in actin filaments elongation. Therefore a novel role of RAR α might be to control the amount of PFN2a available for filaments elongation and thereby the architecture of a cell.

INTRODUCTION

Retinoic Acid (RA) influences the differentiation, proliferation and apoptosis of a variety of cell types through modifications in the expression of target genes. The effects of RA are mediated by specific nuclear receptors, RA receptors (RARs), which consist of three subtypes α , β and γ and function as ligand-dependent regulators of transcription heterodimerized with other nuclear receptors, the Retinoid X receptors (RXRs) (for reviews see (Bastien and Rochette-Egly, 2004; Rochette-Egly and Germain, 2009; Samarut and Rochette-Egly, 2012)).

RARs depict 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) linked by a flexible hinge peptide (Rochette-Egly and Germain, 2009). According to the canonical model, ligand binding promotes RAR's recruitment to the regulatory regions of their target genes through the DBD. Then, via the dynamic association and dissociation of coregulator complexes at the LBD, RARs pave the way for the recruitment of the transcriptional machinery (Al Tanoury et al., 2013).

However, it is now evident that, the N-terminal domain (NTD), though intrinsically disordered, also plays a role in RARs activity. The interesting point is that the NTD of RARs depicts a proline-rich motif (PRM), which can interact with target proteins (Ball et al., 2005; Freund et al., 2008; Kay et al., 2000). Recently, we reported that the PRM of the RAR γ subtype interacts with vinexin β (Bour et al., 2005b; Lalevee et al., 2010), an adaptor protein with SH3 domains, which controls the transcriptional activity of the receptor (Lalevee et al., 2010).

Here, we undertook to screen the partners of the PRM of the RAR α subtype. We identified profilin2a (PFN2a) as a novel specific partner of the PRM of RAR α . PFN2a is a cytoskeleton actin-binding protein with an SH3-like domain (Haikarainen et al., 2009; Jockusch et al., 2007; Kursula et al., 2008), which drives actin polymerization (Kursula et al., 2008; Pollard, 2016; Suarez et al., 2015). Unexpectedly, we found that the interaction occurs in the cytoplasm of adherent cells such as mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and controls the network of actin filaments. Our results reveal a novel extra nuclear and non-transcriptional mechanism of action of RAR α .

MATERIALS AND METHODS

Plasmids and reagents

The pSG5-based expression vectors for mouse (m) RAR α 1 (WT, S77A, S77E, Δ A and Δ AB) have been previously described (Bour et al., 2005a; Nagpal et al., 1992) as well as the prokaryotic pGEX-2T vectors encoding RAR α 1, RAR β 2 and RAR γ 1 fused to glutathione S-transferase (GST) (Lalevee et al., 2010). The yeast pBTM116mod plasmid encoding N-terminal domain of RAR α S77A fused to the LexA-DNA-binding domain was described in (Bour et al., 2005b). mRAR α 1 in the pCA vector with a CAG early promoter coupled to PGK/hygromycin (Al Tanoury et al., 2014b) was fused in N-terminal to the Flag® epitope tag and used to generate by PCR RAR α Δ D in the same vector.

The cDNA of PFN2a was amplified by PCR from the pCDNA3.1 vector (provided by Drs M. Noda and H. Kitayama (Xu et al., 2007) and inserted into EcoRI/BamHI-digested pGEX-2T and XhoI/BamHI-digested pSG5 containing the epitope B of human estrogen receptor as a tag (pSG5-B10). PFN2a (Y7A/N10D) and PFN2a (Y134S/F140A) in pSG5-B10 were constructed by double PCR amplification.

All constructs were generated using standard cloning procedures and were verified by restriction enzyme analysis and automated DNA sequencing. *All-trans* Retinoic Acid was from Sigma-Aldrich

Antibodies

Rabbit polyclonal antibodies raised against the F region of RAR α (RP α (F)) were described earlier (Bruck et al., 2009) and were purified by application onto sulfolink gel columns (Thermo Scientific Pierce) coupled with the corresponding synthetic peptides (Buchanan et al., 2011; Vernet et al., 2006). Purified and concentrated mouse monoclonal antibodies against the C-terminal region [Ab9 α (F)] and the N-terminal region [Ab10 α (A1)] of RAR α have been described previously (Carrier et al., 2016), as well as antibodies against the epitope B of the N-terminal domain of the estrogen receptor (B10) (Ali et al., 1993). Rabbit polyclonal antibodies against FMNL3 and EVL were from Sigma Aldrich. Mouse monoclonal antibodies against PFN2a were purchased from Proteintech™. Those against VASP and GAPDH were from Cell Signaling Technology® and Millipore™ respectively.

Yeast two-hybrid screening

Yeast two-hybrid screening was performed as previously described (Bour et al., 2005b), using the L40 reporter strain harboring the HIS3 and LacZ reporter genes, both under the control of LexA binding sites. The mouse embryo (12.5 days pc) cDNA library in yeast VP16-AAD fusion vector pASV3 was introduced by lithium acetate transformation into the reporter strain expressing the LexA-RAR α 1 (A/B)(S77A) fusion protein from the pBTM116mod vector. Approximately 2.10^6 yeast transformants were screened for their ability to grow on medium lacking histidine and containing 30 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) (ICN Pharmaceuticals, France) and to express β -galactosidase. After several rounds of replica plating on selective medium, library plasmids were recovered from the positive clones, amplified, subjected to restriction analysis and sequenced.

GST Pull-down Assays

Equimolar amounts of GST and GST fusion proteins expressed in *Escherichia coli* were purified on glutathione-Sepharose 4B beads (Amersham Biosciences) and incubated with COS-1 cell extracts expressing B10-PFN2a as described (Bour et al., 2005b).

Surface Plasmon resonance measurements.

SPR experiments were carried out with a BIAcore T100 instrument and research grade CM5 sensor chips (Altschuh et al., 2006). The ligand (GST-PFN2a) was captured via anti-GST antibodies that were immobilized on the sensor surface using standard amine coupling procedures and following the manufacturer's instructions. Synthetic peptides corresponding to the proline-rich motif of RAR γ or RAR α (with S77 phosphorylated or not) (Table 1) were diluted in running buffer (HBS EP: 10 mM Hepes (pH 7.4), 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005% (v/v) surfactant P20) and injected over the surface in a continuous flow at 25°C (Lalevee et al., 2010).

Cell lines, extracts preparation and immunoprecipitation

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were cultured according to standard procedures. FLAG-RAR α , FLAG-RAR α Δ D and B10-PFN2a were introduced into a third generation lentiviral vector and used to generate stable MEF clones. Stable clones

coexpressing RAR α and B10-PFN2a were also generated by transducing the Flag-RAR α 1WT or Flag-RAR α 1 Δ D lines with the B10-PFN2a vector. In all cases, selection was performed in the presence of 3 μ g/ml puromycin (InvivoGen). Positive clones were checked by immunoblotting.

Cytosolic extracts were prepared and proceeded for immunoblotting as in (Carrier et al., 2016). Immunoprecipitation was performed with mouse monoclonal antibodies immobilized on Dynabeads® Protein G (Invitrogen).

Cell adhesion and migration assays

Cell adhesion on ECM proteins was carried out using the CytoSelect 48-well cell adhesion assay (ECM array colorimetric assay; Cell Biolabs) as previously described (Al Tanoury et al., 2014b). Cell migration was analyzed using the Radius™ CytoSelect 24-Well Cell Migration Assay kit (Cell Biolabs) as described in (Al Tanoury et al., 2014b).

G-Actin/F-actin in vivo assay

The G-actin/ F-actin In vivo Assay Biochem Kit from Cytoskeleton (Denver, CO, USA) was used. The technique is based on the separation of the F-actin from G-actin pool by centrifugation. The fractions are then separated by SDS-PAGE and actin is quantitated by Western blot.

Phase-contrast time-lapse video microscopy

MEFs (200,000 cells) were seeded in 12-well cell culture microplates precoated with laminin (5 mg/cm²; Roche Applied Science) and rapidly analyzed with a Leica DM IRE2 inverted microscope equipped with phase-contrast optics, a thermostatically controlled heating stage and a Plexiglas incubator (37°C, 5% CO₂). A computer-controlled movable stage was mounted on the microscope, allowing simultaneous recordings from several microscopic fields. Images were obtained sequentially at 2 minutes intervals, for a total time of observation of 6 hours. The initial focus (z-position) of the individual fields did not change during the recording time. Thus, no auto focusing of the individual fields was necessary. Images were stored using MetaMorph software (Universal Imaging). Two to three microscope fields per well were selected and their x,y,z-positions stored in a computer, with 206 magnifications.

Immunofluorescence and Proximity ligation assay (PLA)

Cells grown on Lab-Tek® glass chamber slides (Thermoscientific) were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA)-PBS (20 minutes), permeabilized with 0.1% Triton X-100 (15 minutes), blocked with 1% BSA in PBS (30 minutes) and incubated with the primary antibodies. Then the cells were incubated with Alexa-Fluor™-448 or -555-conjugated secondary antibodies (Invitrogen) or with the PLA probes according to the protocol of Duolink II (Eurogentec, Angers, France) (Piskunov and Rochette-Egly, 2011). When mentioned, cells were also incubated with fluorescent green CF488 or violet 655A phalloidin (Biotium, Inc. Hayward USA). Nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenyl indole DAPI (Sigma-Aldrich). Cells were analyzed by fluorescence microscopy (LEICA upright DM4000B microscope equipped with a Leica HCX PL APO 6361.40 LBL objective and a Photometrics CoolSnap® camera and software) or by confocal fluorescence microscopy (LEICA TCS-SP8). A z-dimension series of images was taken every 0,3 µm using LASAF software.

The number of PLA signals and cells in an image were counted, and were statistically analyzed using the Blobfinder V3.2 software from the Centre for Image Analysis at Uppsala University (<http://www.cb.uu.se/Bamin/BlobFinder/>).

LC-MS/MS Analysis

Samples were reduced, alkylated and digested with endoproteinase LysC and trypsin as in (Carrier et al., 2016). Then they were analyzed using an Ultimate 3000 HPLC (Thermo Scientific, San Jose California) coupled in line with a LTQ Velos Pro mass spectrometer via a nano-electrospray ionization source (Thermo Scientific, San Jose California). Briefly, peptides were separated on a C18 nano-column with a linear gradient of acetonitrile and analyzed in a Top 20 CID (Collision Induced Dissociation) data-dependent mass spectrometry. Each sample was analyzed with 3 technical replicates.

Proteins were identified by database searching using SequestHT (Thermo Fisher Scientific) with Proteome Discoverer 1.4 software (Thermo Fisher Scientific) against a *Mus musculus* Swissprot database (Release 2016_02, 16761 entries) in which PFN2a (Q9JJV2) was replaced by the B10 recombinant protein. Precursor and fragment mass tolerance were set at 1Da and 0.5 Da respectively. Trypsin was set as enzyme, and up to 2 missed cleavages was allowed. Oxidation (M) and Deamidation (N, Q) were set as variable modifications, and Carbamidomethylation (C) as fixed modification. Peptides

were filtered with a 1% FDR (false discovery rate) using the Percolator node and rank 1. Proteins were identified with 1 peptide.

RESULTS

PFN2a, a new partner of the N-terminal proline-rich motif of RAR α

In order to identify proteins that interact with the N-terminal domain (NTD) of RAR α , a yeast two-hybrid screen of a mouse embryo cDNA library was performed as previously described (Bour et al., 2005b), using as a bait the NTD (A and B regions) of mouse (m) RAR α (Fig. 1A). Among the positive clones, one contained a 430 kb cDNA insert displaying 96% sequence identity to human PFN2a (NM_053024.3). This DNA fragment encoded a 140 amino acids protein that corresponds to full length PFN2a (Fig. 1B). The encoded protein contained the N- and C-terminal sequence regions that form an SH3-like domain involved in the binding of proline-rich motifs (PRMs).

Using RAR α deletion mutants and recombinant PFN2a fused to the epitope B of the estrogen receptor (B10) as a tag, we corroborated that PFN2a interacts with the NTD of RAR α (Fig. 1C). We also found that the interaction involves the PRM of RAR α . Indeed, addition of an excess of a synthetic PRM oligonucleotide (PI 80) prevented the binding of PFN2a to RAR α (Fig. 1D). Next we showed that the PFN2a/RAR α interaction is specific as the other RAR subtypes RAR β and RAR γ did not interact with PFN2a (Fig. 1E). Note that RAR β and RAR γ also depict a PRM in their NTD but with one amino acid difference (Fig. 1A).

Interestingly, the PRM of RAR α contains a serine residue (S77) that can be phosphorylated *in vitro* and *in vivo* (Bruck et al., 2009; Rochette-Egly et al., 1997) with consequences on the interaction with PRMs (Lalevee et al., 2010). However, substitution of S77 with a glutamic acid (RAR α S77E) or an alanine (RAR α S77A), which mimic the phosphorylated and non-phosphorylated forms, respectively (Fig. 1A) did not affect PFN2a binding (Fig. 1F).

Finally, we investigated whether the SH3-like domain of PFN2a, which encompasses the N and C terminal helices (Haikarainen et al., 2009), is involved in the interaction. The two residues located in the C-terminal helix (Tyr 134 and Phe140) and the two residues in the N-terminal one (Tyr 7 and Asn 10) that were shown to be important for the interaction with PRMs (Haikarainen et al., 2009) (Fig. 1G) were mutated. We found that PFN2a mutated either at the residues located in the N-terminal helix [PFN2a(Y7S/N10D)] or at the C-terminal ones [PFN2a(Y134S/F140A)] have lost their ability to interact with RAR α in GST-pull down experiments (Fig. 1H).

Collectively all these results indicate that the SH3-like domain of PFN2a interacts specifically with the N-terminal PRM of RAR α .

Affinity of the interaction between PFN2a and the PRM of RAR α .

We used Surface Plasmon Resonance (SPR) to measure the equilibrium affinity and kinetic parameters of interaction of PFN2a with synthetic peptides corresponding to the PRM of RAR α (Table 1). Affinity between PFN2a and peptide PI 80 that corresponds to the non-phosphorylated form was calculated with the simple Langmuir 1:1 model and the Biacore T100 evaluation software (v 1.1.1). Affinity was found to be 0,1 mM, a value in the range generally observed for SH3 domains and proline-rich peptides (Ball et al., 2005) (Table 1). Affinity for peptide PI 81 in which S77 is phosphorylated was similar, in line with the *in vivo* results. A 10 times lower affinity was found for peptide PI 121, which corresponds to the PRM of RAR γ , corroborating the specificity of the interaction.

PFN2a interacts with RAR α in the cytosol of adherent cells

PFN2a, though considered to be specific of brain and neuronal cells (Gareus et al., 2006; Witke et al., 1998) is expressed in many other cells (Mouneimne et al., 2012; Murk et al., 2009). Accordingly, we detected significant levels of PFN2a by immunoblotting not only in human SH-SY-5Y neuroblastoma cells and mouse hippocampus HT22 cells (Fig. 2A, lanes 1 and 2) but also in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (Fig. 2A, lanes 4 and 5). In contrast, PFN2a was hardly detectable in undifferentiated mouse embryo carcinoma cells (F9 and P19 cell lines)(Fig. 2A lanes 3 and 6) and in pluripotent mouse embryonic stem cells (mESC), which grow as no-adherent clusters (Fig. 2B, lanes 1 and 2). In fact, the amount of PFN2a increased markedly in these cells upon differentiation and adhesion after RA addition (Al Tanoury et al., 2014a) (Fig. 2B, lane 3). Finally, no PFN2a could be detected in human acute promyelocytic leukemia cells (NB4 cell line), which grow in suspension (Fig. 2A, lane 7). Thus the expression of PFN2a appears to be correlated to the adhesion and spreading characteristics of cells.

Next, the intracellular distribution of PFN2a was analyzed in immunofluorescence experiments. In MEFs, PFN2a was present essentially in the cytoplasm (Fig. 2C), raising the hypothesis that some RAR α might be also present in this cell compartment. Remarkably, immunofluorescence experiments performed with purified and specific

antibodies (Buchanan et al., 2011) showed that RAR α is localized not only in the nucleus but also in the cytosol of MEFs (Fig. 2C).

Next, we explored whether RAR α and PFN2a interact in the cytoplasm, using a proximity ligation assays (PLA), which allows the detection *in situ* of interacting endogenous proteins (Ferry et al., 2011; Piskunov and Rochette-Egly, 2011; Soderberg et al., 2006). Rabbit anti-RAR α and mouse anti-PFN2a antibodies were used followed by species-specific secondary antibodies, called PLA probes, each attached with a unique short DNA strand. When the PLA probes are in close proximity, the DNA strands can be joined through the addition of a circle-forming DNA oligonucleotide, which is amplified using a polymerase. Then the amplified products are revealed with labeled complementary oligonucleotide probes and are easily visible as bright red spots under a fluorescence microscope. As shown in Figure 2D, some RAR α /PFN2a complexes were seen in the cytosol of MEFs. No complexes were found in the nuclei. As visualized by actin staining with fluorescent green CF488 phalloidin, the complexes are localized in the cell body (Fig. 2D).

Increasing the PFN2a/RAR α complexes disrupts the architecture of the actin cytoskeleton

PFN2a, along with a variety of actin elongation factors with proline rich domains, is required for actin polymerization and stress fibers formation (Ferron et al., 2007; Pollard, 2016; Suarez et al., 2015). Therefore we investigated whether RAR α interferes with this process.

We generated stable MEFs overexpressing RAR α either WT (RAR α WT MEFs) or deleted of the D region that contains a NLS (RAR α Δ D MEFs). RAR α Δ D accumulated in the cytoplasm where it colocalized with PFN2a (Fig. 3A lower panels). In contrast, RAR α WT remained nuclear (Fig. 3A, middle panels). The number of RAR α /PFN2a complexes also increased in the cytoplasm of RAR α Δ D MEFs (Fig. 4A lower panels and Fig.4B). That RAR α Δ D interacts with PFN2a in the cytoplasm of MEFs was corroborated in coimmunoprecipitation experiments (Fig. 4C).

Most interestingly, RAR α Δ D MEFs and not RAR α WT MEFs depicted a more elongated morphology with fewer and thinner actin fibers than the WT cells (Fig. 4A, compare the upper and lower panels). Such an observation suggests that increased levels of RAR α and therefore of the PFN2a-RAR α complexes in the cytoplasm would affect the

polymerization of actin. Therefore we compared the ratio between G (globular)-actin and F (filamentous)-actin in the cytosolic extracts of WT and RAR α Δ D MEFs in an *in vivo* assay (G-actin/ F-actin in vivo Assay Biochem Kit). After separation by centrifugation, the amounts of G-actin (in the supernatant) and F actin (in the pellet) were analyzed by immunoblotting and quantified. As shown in Fig. 4D, the G/F ratio was higher in MEFs RAR α Δ D than in WT MEFs, indicating that increased amounts of RAR α in the cytosol interfere with PFN2a-mediated polymerization of actin.

In the cytosol, RAR α competes with the partners of PFN2a.

Given that overexpression of RAR α in the cytoplasm decreases the amount of polymerized actin as well as the network of actin fibers, we investigated whether it affects the interaction of PFN2a with its partners involved in actin elongation.

First we investigated the PFN2a interacting proteins in WT MEFs by immunoprecipitation followed by mass spectrometry (MS) analysis. PFN2a fused to the B10 tag was stably overexpressed in WT MEFs (PFN2a MEFs) and cytosolic extracts were prepared in two replicate experiments. Immunoprecipitation was performed with anti PB10 antibodies (Fig. 5A) and with non-immune IgG as a control. Then the eluates were submitted to proteolytic digestion and MS analysis. After elimination of the background proteins, the proteins identified in the two replicate experiments (Supplemental Table 1) were selected and assigned to functional groups according to enriched Gene Ontology (GO) using the Manteia program (Tassy and Pourquie, 2014). This analysis revealed mainly actin-binding proteins, including proteins with PRMs such as Evl, Vasp, Enah, Palladin, and several formin proteins (Diaph1, Diaph2, Fmn1, Fmnl2, Fmnl3 and Inf2) (Table 2), which are well known to accelerate actin polymerisation by interacting with barbed ends of actin filaments on one hand and with PFN2a on the other end (Bear and Gertler, 2009; Goode and Eck, 2007; Pollard, 2016; Shekhar et al., 2016).

Next, we investigated whether RAR α affects the interaction of PFN2a with some of these partners in Proximity ligation assays. Signals corresponding to PFN2a-Fmnl3 (Fig. 5B upper panels) and PFN2a-Evl (Supplemental Fig. 1, upper panels) complexes were detected in the cell body of WT MEFs. Most interestingly, these complexes were less abundant in RAR α Δ D MEFs, suggesting that RAR α would compete with Fmnl3 and Evl for binding PFN2a and thus for actin assembly (Fig. 5B and supplemental Fig. 1). A few

number of PFN2a-Vasp complexes were also detected but they were not affected in RAR α Δ D MEFs (Supplemental Fig. 2).

Altogether these results indicate that increased amounts of RAR α in the cytosol compete with other proteins with PRMs for binding to PFN2a.

It is worth noting that overexpression of B10-PFN2a in RAR α Δ D MEFs restored the number of PFN2a-FMNL3 (Fig. 5B) and PFN2a-Evl complexes (Supplemental Fig. 1) to WT levels. It also restored the WT morphology of the cells (Fig. 5B and supplemental Figures 1-3), the WT network of actin fibers as well as the WT G actin/F actin ratio (Fig. 3E).

The PFN2a-RAR α complexes impact the adhesion of MEFs

Through its ability to drive actin polymerization, PFN2a is well known to regulate cell adhesion (Mouneimne et al., 2012). As an increase in the PFN2a-RAR α complexes is associated with alterations of the actin cytoskeleton, we examined whether it correlates with changes in the adhesion of MEFs. We compared the ability of WT and RAR α Δ D MEFs to attach to different extracellular matrix (ECM) proteins (collagen I, collagen IV, laminin, fibrinogen and fibronectin) with in vitro adhesion assays. All cell types attached as efficiently to laminin, collagen I and collagen IV. However MEFs RAR α Δ D attached less well to fibronectin and fibrinogen (Fig. 6). Overexpression of PFN2a in RAR α Δ D MEFs restored the adhesion to WT levels (Fig. 6).

DISCUSSION

This work reveals a new face of RAR α : It interacts out of the nucleus, with PFN2a, a small (MW = 12-16 kDa) G-actin-binding protein. PFN2a is expressed in all eukaryotes and is a major coordinator of actin filament growth. Indeed, PFN2a associated with G actin binds to the PRMs of filaments elongation proteins such as formins and Ena/VASP, and accelerates the elongation of the filaments (Bear and Gertler, 2009; Goode and Eck, 2007; Pollard, 2016). *In fine*, filaments assemble in protrusive (lamellipodia, filopodia) and contractile (stress fibers of non muscle cells) structures, which play a central role in cell morphology, cell migration and cell adhesion (Blanchoin et al., 2014; Tojkander et al., 2012).

The most important finding of this work is that RAR α forms complexes with PFN2a, out of the nucleus, in the cell body of adherent fibroblasts. In addition, increasing the levels of RAR α and thereby the number of RAR α /PFN2a complexes in the cytosol alters actin polymerization, stress fibers, cell morphology and cell adhesion. How does RAR α interfere with these processes? From our results, we favor the hypothesis that RAR α competes with the elongation proteins for PFN2a binding. Indeed, like formins and Ena/Vasp proteins, RAR α binds to the SH3-like domain of PFN2a through a PRM (Kursula et al., 2008). By competing with formins and/or Ena/Vasp for binding PFN2a, RAR α would prevent the delivery of the actin subunits to the filaments, thereby blocking elongation.

It must be pointed out that a fine-tuned and dynamic equilibrium between the pools of profilin and trackers bound at the barbed ends of F-actin is required for the right regulation of all actin-based processes. Accordingly, a number of recent studies demonstrated that increased levels of profilin disrupt several F-actin networks in diverse cell types (Pernier et al., 2016; Rotty et al., 2015; Suarez et al., 2015). Therefore a novel role of RAR α might be to control the amount of PFN2a available for filaments elongation. Such a process is specific for the RAR α subtype, as the other RARs do not interact with PFN2a due to two different amino acids in their PRM (Fig. 1a).

Then the question is why RAR α is excluded from the nucleus. It is worth noting that several nuclear receptors have been reported to be both nuclear and extranuclear (Poulard et al., 2012). Post-translational modifications, such as phosphorylation or sumoylation processes have been proposed to promote the exclusion of RARs from the

nucleus (Al Tanoury et al., 2013). Future experiments will be required to solve this question. It must be stressed that several cancer cells are characterized by aberrant signaling pathways with consequences on the phosphorylation and other modifications of RAR α (Carrier et al., 2016). This raises the question whether, in such cells, the amount of cytosolic RAR α and thereby of PFN2a-RAR α complexes might be increased or decreased with consequences on adhesion. Similarly, one cannot exclude that in neuronal cells, which depict RAR α /PFN2a complexes, altered levels of cytosolic RAR α would affect their growth and plasticity in neuronal diseases (Aoto et al., 2008; Michaelsen-Preusse et al., 2016).

In conclusion, this work highlights that RAR α is not only a nuclear transcription factor, but also a protein that can control the architecture of a cell through its interaction with actin-binding proteins.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Drs Makoto Noda and Hitoshi Kitayama for the generous gift of the profilin IIA expression vector and to Nathalie Bruck for the yeast double hybrid experiments. We thank Samia Gaouar for help. This work was supported by funds from CNRS, INSERM and by funds raised by CRE from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-09-BLAN-0297-01, www.agence-nationale-recherche.fr), the Association pour la recherche sur le Cancer (SL220110603474 and PJA20141201746, www.fondation-arc.org), the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, DEQ20090515423, www.frm.org), and the Institut National du Cancer (PL09-194, www.e-cancer.fr). 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 and the Canceropole Grand Est supported the Proteomics Platform. The Lady TATA Memorial Trust and FRM supported AP. The Ligue Nationale contre le Cancer supported DA.

REFERENCES

- 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 RAR γ 2 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., Lutz, 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.
- Ali, S., Lutz, Y., Bellocq, J.P., Chenard-Neu, M.P., Rouyer, N., and Metzger, D.** (1993). Production and characterization of monoclonal antibodies recognising defined regions of the human oestrogen receptor. *Hybridoma* **12**, 391-405.
- Altschuh, D., Oncul, S., and Demchenko, A.P.** (2006). Fluorescence sensing of intermolecular interactions and development of direct molecular biosensors. *J Mol Recognit* **19**, 459-477.
- Aoto, J., Nam, C.I., Poon, M.M., Ting, P., and Chen, L.** (2008). Synaptic Signaling by All-Trans Retinoic Acid in Homeostatic Synaptic Plasticity. *Neuron* **60**, 308-320.
- Ball, L.J., Kuhne, R., Schneider-Mergener, J., and Oschkinat, H.** (2005). Recognition of proline-rich motifs by protein-protein-interaction domains. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 2852-2869.
- Bastien, J., and Rochette-Egly, C.** (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* **328**, 1-16.
- Bear, J.E., and Gertler, F.B.** (2009). Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end. *Journal of Cell Science* **122**, 1947-1953.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., and Plastino, J.** (2014). Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. *Physiol Rev* **94**, 235-263.
- Bour, G., Gaillard, E., Bruck, N., Lalevee, S., Plassat, J.L., Busso, D., Samama, J.P., and Rochette-Egly, C.** (2005a). Cyclin H binding to the RAR α activation function (AF)-2 domain directs phosphorylation of the AF-1 domain by cyclin-dependent kinase 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16608-16613.
- Bour, G., Plassat, J.L., Bauer, A., Lalevee, S., and Rochette-Egly, C.** (2005b). Vinexin {beta} Interacts with the Non-phosphorylated AF-1 Domain of Retinoid Receptor {gamma} (RAR{gamma}) and Represses RAR{gamma}-mediated Transcription. *J Biol Chem* **280**, 17027-17037.
- 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 RAR α 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 RAR α and RAR γ proteins in pluripotent and differentiating mouse embryonal carcinoma and mouse embryonic stem cells. *Cell Tissue Res* **346**, 43-51.
- Carrier, M., Joint, M., Lutz, R., Page, A., and Rochette-Egly, C.** (2016). Phosphoproteome and Transcriptome of RA-Responsive and RA-Resistant Breast Cancer Cell Lines. *PLoS One* **11**, e0157290.
- Ferron, F., Rebowksi, G., Lee, S.H., and Dominguez, R.** (2007). Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *EMBO J* **26**, 4597-4606.

- 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.
- Freund, C., Schmalz, H.G., Sticht, J., and Kuhne, R. (2008). Proline-rich sequence recognition domains (PRD): ligands, function and inhibition. *Handb Exp Pharmacol*, 407-429.
- Gareus, R., Di Nardo, A., Rybin, V., and Witke, W. (2006). Mouse profilin 2 regulates endocytosis and competes with SH3 ligand binding to dynamin 1. *J Biol Chem* **281**, 2803-2811.
- Goode, B.L., and Eck, M.J. (2007). Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem* **76**, 593-627.
- Haikarainen, T., Chen, W.Q., Lubec, G., and Kursula, P. (2009). Structure, modifications and ligand-binding properties of rat profilin 2a. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **65**, 303-311.
- Jockusch, B.M., Murk, K., and Rothkegel, M. (2007). The profile of profilins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **159**, 131-149.
- 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.
- Kursula, P., Kursula, I., Massimi, M., Song, Y.H., Downer, J., Stanley, W.A., Witke, W., and Wilmanns, M. (2008). High-resolution structural analysis of mammalian profilin 2a complex formation with two physiological ligands: the formin homology 1 domain of mDial1 and the proline-rich domain of VASP. *J Mol Biol* **375**, 270-290.
- 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.
- Michaelsen-Preusse, K., Zessin, S., Grigoryan, G., Scharkowski, F., Feuge, J., Remus, A., and Korte, M. (2016). Neuronal profilins in health and disease: Relevance for spine plasticity and Fragile X syndrome. *P Natl Acad Sci USA* **113**, 3365-3370.
- Mouneimne, G., Hansen, S.D., Selfors, L.M., Petrak, L., Hickey, M.M., Gallegos, L.L., Simpson, K.J., Lim, J., Gertler, F.B., Hartwig, J.H., *et al.* (2012). Differential remodeling of actin cytoskeleton architecture by profilin isoforms leads to distinct effects on cell migration and invasion. *Cancer Cell* **22**, 615-630.
- Murk, K., Buchmeier, S., Jockusch, B.M., and Rothkegel, M. (2009). In birds, profilin-2a is ubiquitously expressed and contributes to actin-based motility. *J Cell Sci* **122**, 957-964.
- Nagpal, S., Saunders, M., Kastner, P., Durand, B., Nakshatri, H., and Chambon, P. (1992). Promoter context- and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. *Cell* **70**, 1007-1019.
- Pernier, J., Shekhar, S., Jegou, A., Guichard, B., and Carlier, M.F. (2016). Profilin Interaction with Actin Filament Barbed End Controls Dynamic Instability, Capping, Branching, and Motility. *Dev Cell* **36**, 201-214.
- Piskunov, A., and Rochette-Egly, C. (2011). A retinoic acid receptor RARalpha pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein alphaQ to activate p38MAPK. *Oncogene*.
- Pollard, T.D. (2016). Actin and Actin-Binding Proteins. *Csh Perspect Biol* **8**.
- Poulard, C., Treilleux, I., Lavergne, E., Bouchekioua-Bouzaghrou, K., Goddard-Leon, S., Chabaud, S., Tredan, O., Corbo, L., and Le Romancer, M. (2012). Activation of rapid oestrogen signalling in aggressive human breast cancers. *Embo Mol Med* **4**, 1200-1213.

- Rochette-Egly, C., Adam, S., Rossignol, M., Egly, J.M., and Chambon, P.** (1997). Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* **90**, 97-107.
- Rochette-Egly, C., and Germain, P.** (2009). Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors. *Nuclear Receptor Signaling* **7**, e005.
- Rotty, J.D., Wu, C.Y., Haynes, E.M., Suarez, C., Winkelman, J.D., Johnson, H.E., Haugh, J.M., Kovar, D.R., and Bear, J.E.** (2015). Profilin-1 Serves as a Gatekeeper for Actin Assembly by Arp2/3-Dependent and -Independent Pathways. *Dev Cell* **32**, 54-67.
- 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.
- Shekhar, S., Pernier, J., and Carlier, M.F.** (2016). Regulators of actin filament barbed ends at a glance. *Journal of Cell Science* **129**, 1085-1091.
- Soderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstrale, K., Leuchowius, K.J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L.G., et al.** (2006). Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods* **3**, 995-1000.
- Suarez, C., Carroll, R.T., Burke, T.A., Christensen, J.R., Bestul, A.J., Sees, J.A., James, M.L., Sirotkin, V., and Kovar, D.R.** (2015). Profilin Regulates F-Actin Network Homeostasis by Favoring Formin over Arp2/3 Complex. *Dev Cell* **32**, 43-53.
- Tassy, O., and Pourquie, O.** (2014). Manteia, a predictive data mining system for vertebrate genes and its applications to human genetic diseases. *Nucleic Acids Res* **42**, D882-891.
- Tojkander, S., Gateva, G., and Lappalainen, P.** (2012). Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci* **125**, 1855-1864.
- Vernet, N., Dennefeld, C., Rochette-Egly, C., Oulad-Abdelghani, M., Chambon, P., Ghyselinck, N.B., and Mark, M.** (2006). Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. *Endocrinology* **147**, 96-110.
- Witke, W., Podtelejnikov, A.V., Di Nardo, A., Sutherland, J.D., Gurniak, C.B., Dotti, C., and Mann, M.** (1998). In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *EMBO J* **17**, 967-976.
- Xu, J., Shi, S., Matsumoto, N., Noda, M., and Kitayama, H.** (2007). Identification of Rgl3 as a potential binding partner for Rap-family small G-proteins and profilin II. *Cell Signal* **19**, 1575-1582.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: PFN2a, a new partner of the N-terminal PRM of RAR α

A. Schematic representation (not to scale) of the LexA-RAR α (A/B) protein used as a bait in the yeast two-hybrid experiments. The PRM of RAR α with S77 substituted with alanine or glutamic acid residues is shown as well as the PRMs of RAR γ and RAR β . B. Alignment of the protein sequence deduced from our isolated mouse clone with those of human PFN2a and PFN2b.

C. Coimmunoprecipitation experiments performed with extracts from COS-1 cells transfected with the B10-PFN2a vector along with RAR α WT, Δ A or Δ AB and monoclonal antibodies raised against the B10-tag. Immunocomplexes were resolved by SDS-PAGE and incubated with R α (F) and B10 antibodies. Lanes 1-6 correspond to 5% of the amount of immunoprecipitated extracts.

D. The peptide PI 80 corresponding to the PRM of RAR α abrogates the interaction of B10-PFN2a with GST-RAR α .

E. RAR α but not RAR γ nor RAR β interacts with PFN2a in GST pull down experiments performed with COS-1 cells extracts overexpressing B10-PFN2a.

F. Coimmunoprecipitation experiments performed with anti-B10 antibodies and transfected COS-1 cells extracts, showing that substitution of serine 77 by a glutamic acid or an alanine does not affect the interaction of RAR α with PFN2a

G. Amino acid sequence of the N-terminal and C-terminal ends of PFN2a. The mutations affecting the interaction with proline rich ligands are shown. H. *In vitro* pulldown experiments show that the PFN2a mutants (Y7S/N10D) and (Y134S/F140A) do not interact with GST-RAR α .

Figure 2. PFN2a interacts with RAR α in the cytoplasm of MEFs

A. immunoblotting experiments showing that PFN2a is expressed in human SH-YH-5H neuroblastoma cells, mouse HT22 hippocampus cells and MEFs but not in cells which grow in suspension such as undifferentiated mouse embryo carcinoma cells (P19 and F9 cell lines) and acute promyelocytic leukemia cells (NB4 cell line).

B. Immunoblots showing that PFN2a is hardly detectable in pluripotent mES cells growing as aggregates (lanes 1 and 2) but is well expressed when the cells become differentiated and adherent after RA treatment (lane 3).

C. Immunofluorescence experiments showing that PFN2a (red) is present mainly in the cytoplasmic compartment of MEFs. RAR α (green), while essentially nuclear, is also present in the cytoplasm. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). The merge images overlapping the blue, green and red fluorescence are shown. Scale bar: 10 μ m.

D. PLA (Proximity Ligation Assay) showing the PFN2a/RAR α complexes (red) in MEFs. Nuclei were counterstained with Dapi (blue) and the actin network with green 488 phalloidin. The merge between blue, green and red is also shown. Scale bar: 20 μ m.

Figure 3: Overexpressed RAR α Δ D concentrates in the cytosol of MEFs

Representative fluorescence images of WT, RAR α WT and RAR α Δ D MEFs immunostained for endogenous PFN2a (red) and RAR α (green). Nuclei were counterstained with DAPI and the actin network with violet 655A phalloidin. The merge between red, green, blue and violet is shown. Scale bar: 10 μ m.

Figure 4: Increasing the PFN2a/RAR α complexes in the cytosol disrupts the architecture of the actin cytoskeleton

A. PLA showing that, in RAR α Δ D MEFs, the number of PFN2a-RAR α complexes (red) is increased compared to WT MEFs. The stress fibers stained with green 488 phalloidin are also less abundant and thinner. Scale bar: 20 μ m.

B. Quantification of the PFN2a-RAR α complexes in WT, RAR α WT and RAR α Δ D MEFs. Data are shown as mean \pm SEM of at least 5 experiments. Significance is indicated as *** p <0,0001.

C. Immunoblotting and coimmunoprecipitation experiments of cytosolic extracts showing that overexpressed RAR α Δ D accumulates in the cytoplasm where it interacts with PFN2a.

D. Analysis of the F-actin/G-actin ratio in WT, RAR α WT and RAR α Δ D MEFs. PFN2a overexpression in RAR α Δ D MEFs restores the F/G ratio to WT levels. Values are mean \pm SEM of at least 5 experiments.

Figure 5: In the cytosol, RAR α competes with the PFN2a interacting proteins

A. Coimmunoprecipitation experiments showing the overexpression of B10-PFN2a in the cytosol of MEFs (lanes 1-3). Overexpressed B10-PFN2a interacts with formins such as Fmnl3 (lanes 4-6).

B. PLA showing that the number of PFN2a/Fmnl3 complexes (red) is decreased in RAR α Δ D MEFs compared to WT MEFs. The stress fibers stained with green 488 phalloidin are also less abundant in RAR α Δ D MEFs. Overexpression of B10-PFN2a in RAR α Δ D MEFs restored the WT number of PFN2a-Fmnl3 complexes, the WT morphology and the WT network of actin fibers. Scale bar: 20 μ m.

Figure 6: Increasing the PFN2a-RAR α complexes decreases MEFs adhesion

The adhesion of WT MEFs and RAR α Δ D MEFs on different substrates is shown. Values are the mean \pm SEM of duplicates from three separate experiments. Overexpression of PFN2A restores the adhesion of RAR α Δ D MEFs to WT levels.

Peptide	Amino Acid sequence	Description	Affinity for PFN2a
PI 80	EEIVSPPPLPRIYK	Non phosphorylated PRD of RAR α	0,1 mM
PI 81	EEIVSPPPLPRIYK P	PRD of RAR α phosphorylated at S77	0,1 mM
PI 121	EEMVPSSPSPPPPRVYK	Non phosphorylated PRD of RAR γ	1 mM

Table 1: SPR analysis of the interaction between GST-PFN2a and synthetic peptides corresponding to the PRM of RAR α and RAR γ . GST and GST-PFN2a were immobilized on a sensor chip. Peptides were injected at different concentrations ($0,5-5 \times 10^{-4}$ M) for 60 s. GST signal [relative units (RU)] was subtracted from the GST-PFN2a signals. Nonlinear curve fitting of the equilibrium responses vs peptide concentration was used to derive equilibrium K_d values.

Accession	Protein name	Annotation
Formins Q6ZPF4 A2APV2 O08808 O70566 Q0GNC1 Q6P9Q4	FMNL3 FMNL2 Diaph1 Diaph2 Inf2 Fhod1	Formin-like protein 3 Formin-like protein 2 Protein diaphanous homolog1 Protein diaphanous homolog2 Inverted formin-2 FH1/FH2 domain containing protein 1
Ena/VASP P70460 Q03173 P70429	Vasp Enah Evl	Vasodilator-stimulated phosphoprotein Protein enabled homolog Ena/VASP-like protein
Arp 2/3 complex Q99JY9 Q9WV32 Q9JM76 Q7TMB8	Actr3 Arpc1b Arpc3 Cyfip1	Actin-related protein 3 Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B Actin-related prorein 2/3 complex subunit 3 Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1
Wiskott-Aldrich syndrome -like proteins Q91YD9 Q8R5H6 Q8BH43 Q8VHI6 Q6PEV3	Wasl Wasf1 Wasf2 Wasf3 Wipf2	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein WAS protein family member 1 WAS protein family member 2 WAS protein family member 3 WAS/WASL-interacting protein family member 2
Capping protein P47757	Capzb	F-actin-capping protein subunit beta
Severing proteins P18760 Q9R0P5	Cfl1 dstn	Cofilin-1 Destrin
Cross-linking proteins Q9ET54 Q8BTM8 Q8VHX6 Q99KW3 Q08093 Q9DAW9	Palld Flna Flnc Triobp Cnn2 Cnn3	Palladin Filamin-A Filamin-C TRIO and F-actin binding protein Calponin 2 Calponin 3
Myosins E9Q634 F8BQV6 Q8VDD5	Myo1e Myo10 Myh9	Unconventional Myosin-le Unconventional Myosin X Myosin-9
Rho Guanine Nucleotide Exchange Factors Q61210 Q8C033 Q8CBW3 P62484	Arhgef1 Arhgef10 Abi1 Abi2	Rho guanine nucleotide exchange factor 1 Rho guanine nucleotide exchange factor 10 Abl interactor 1 Abl interactor 2
Scaffold proteins Q91XC0 Q9ERG0 Q9R059	Ajuba Lima1 Fhl3	LIM domain-containing protein Ajuba LIM domain and actin-binding protein 1 Four and a half LIM domains protein 3

Table 2 : PFN2a interacting proteins that were identified in WT MEFs by mass spectrometry after immunoprecipitation in two replicate experiments

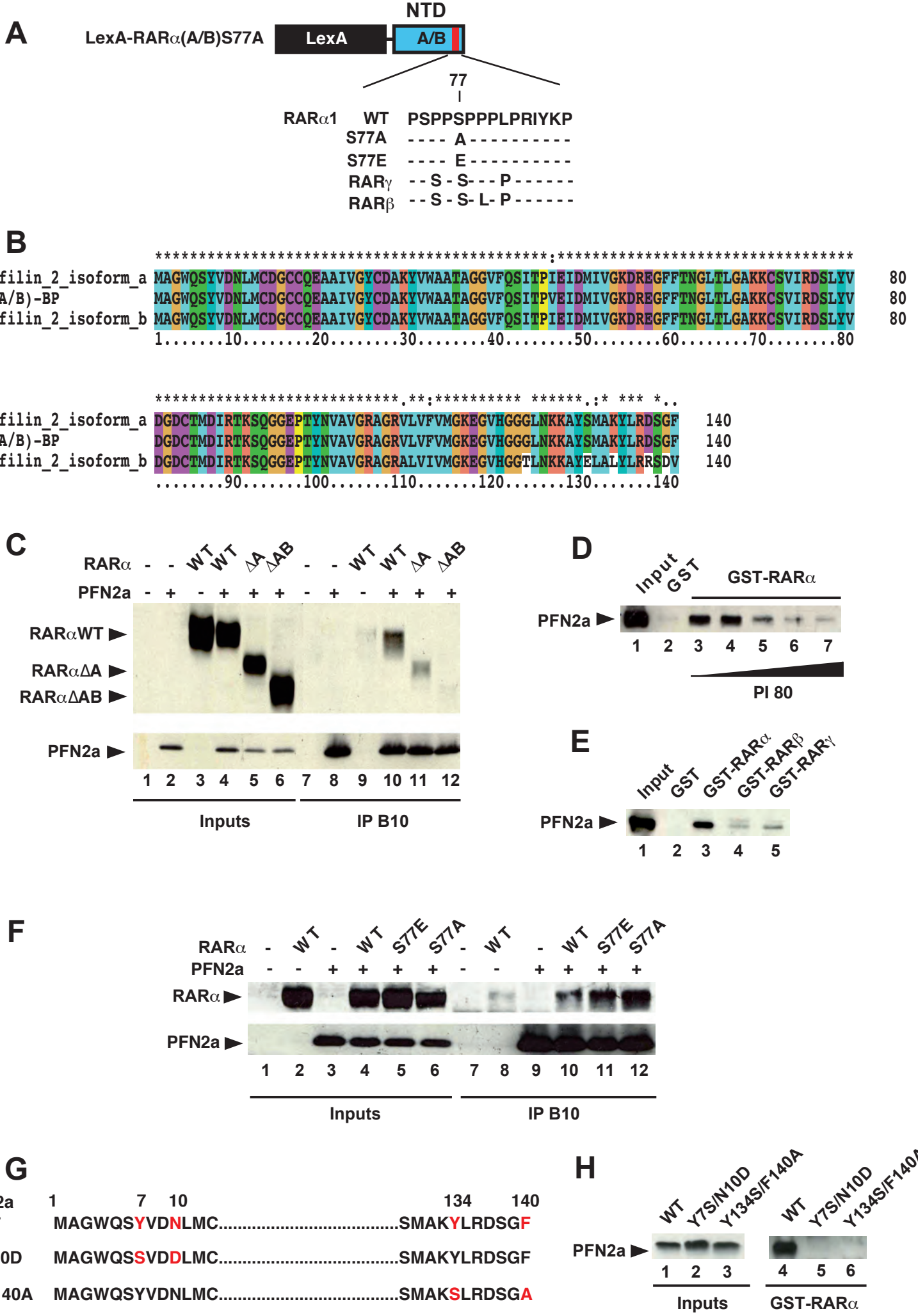
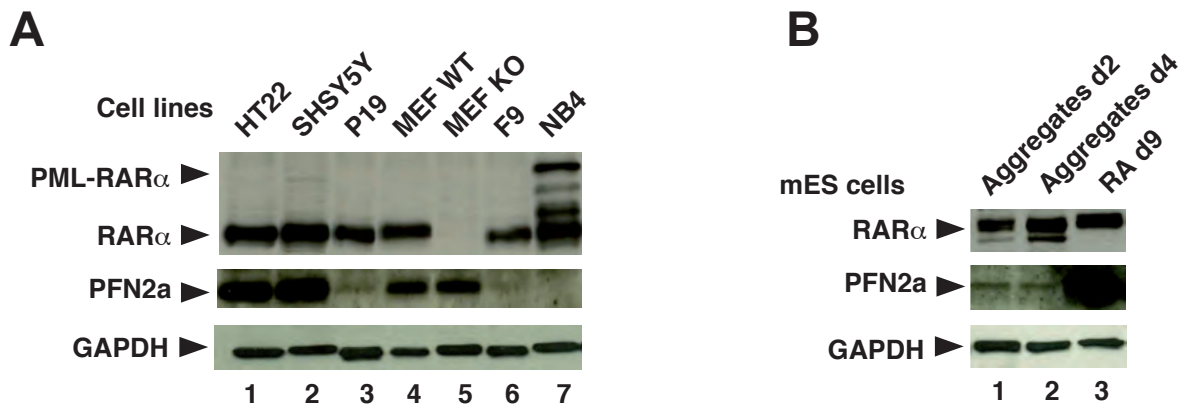
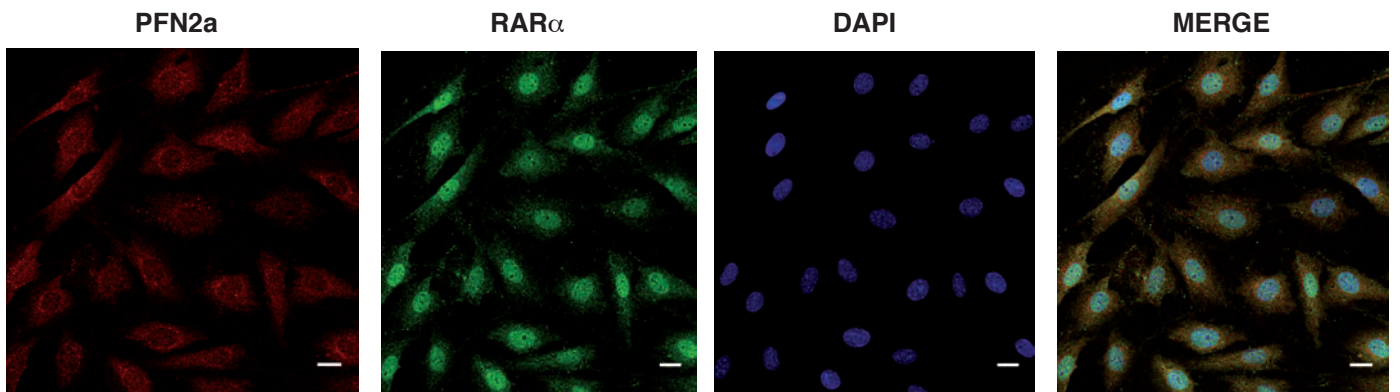


Figure 1



C MEF WT



D MEF WT- PLA

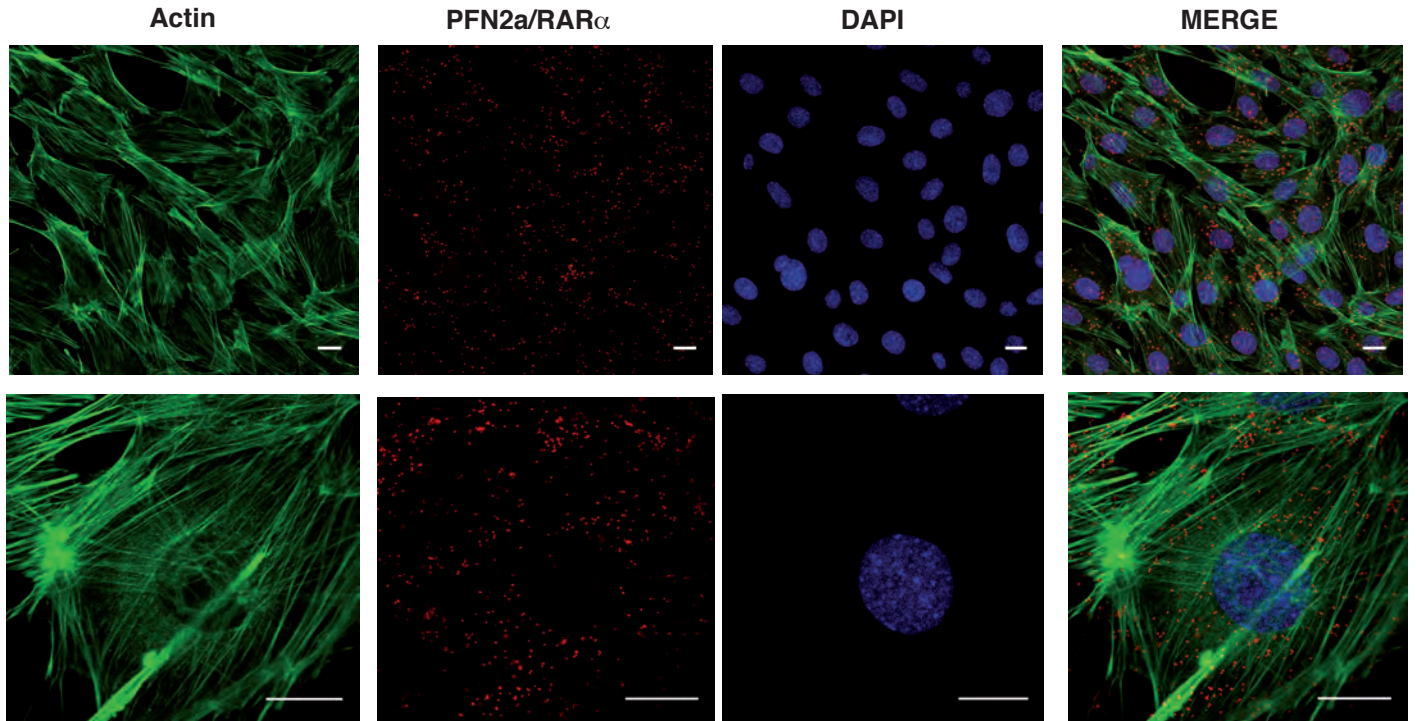


Figure 2

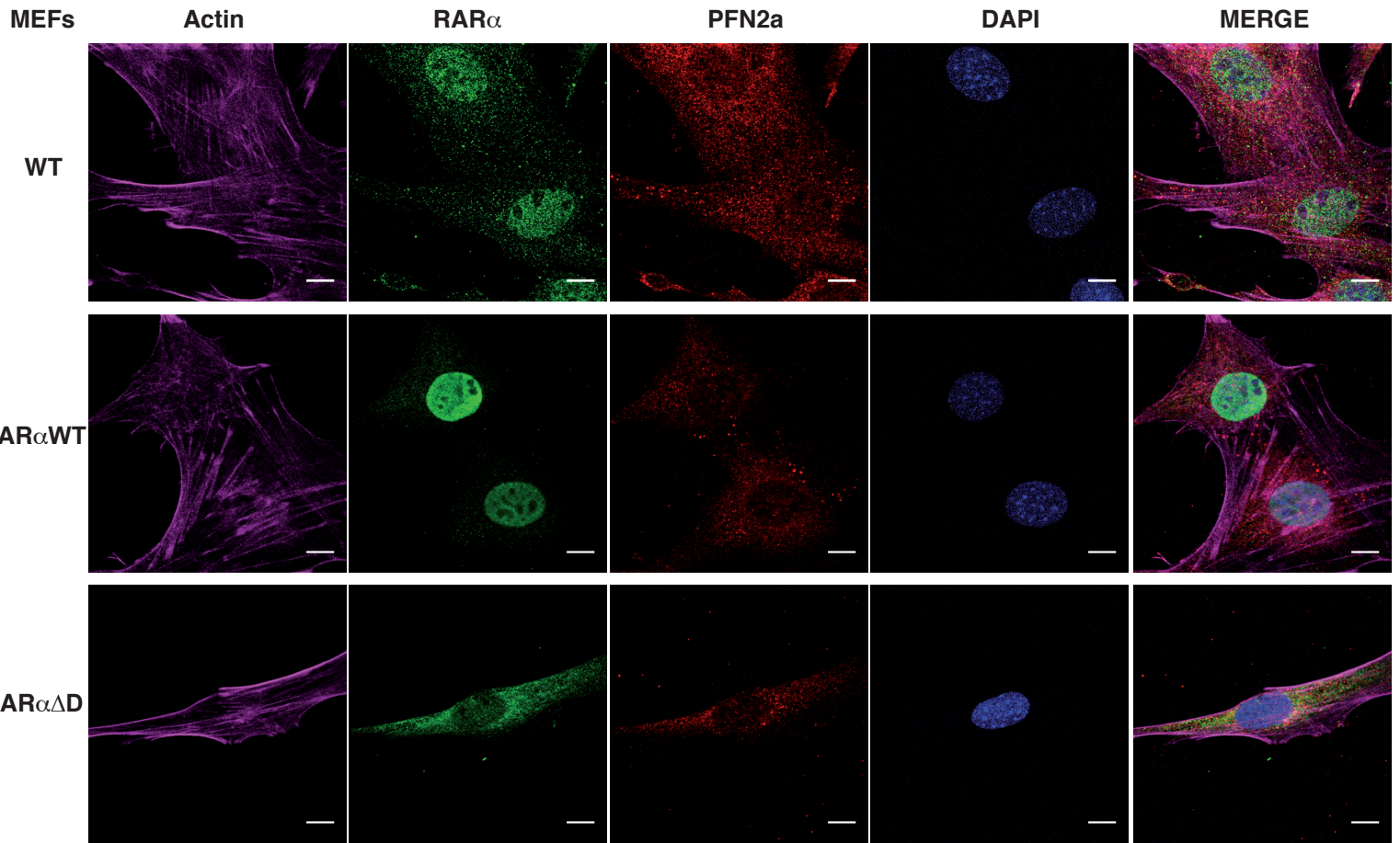


Figure 3

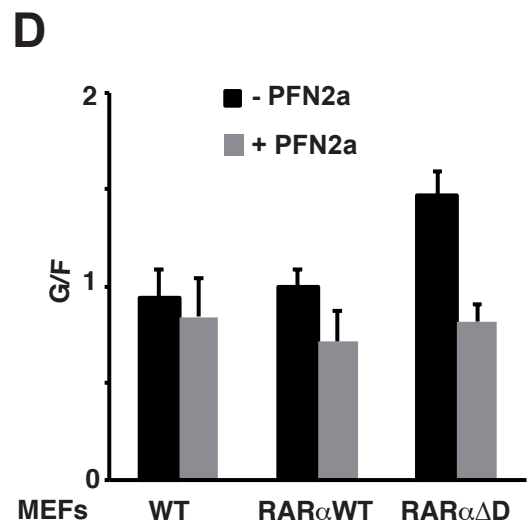
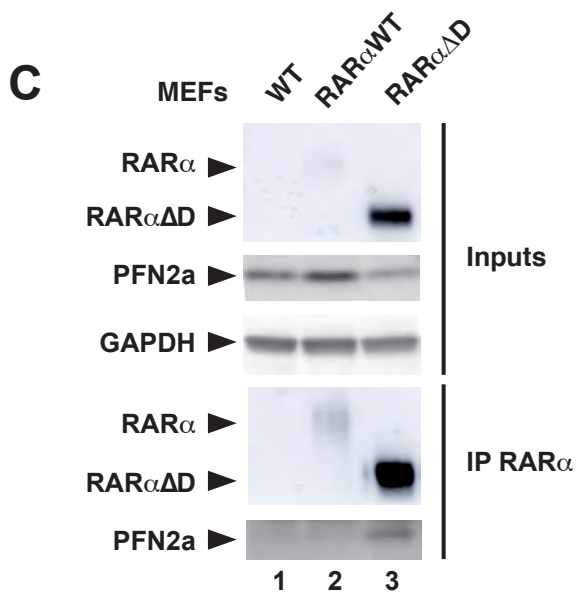
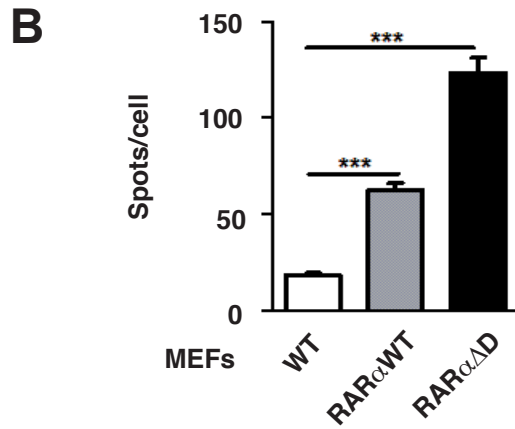
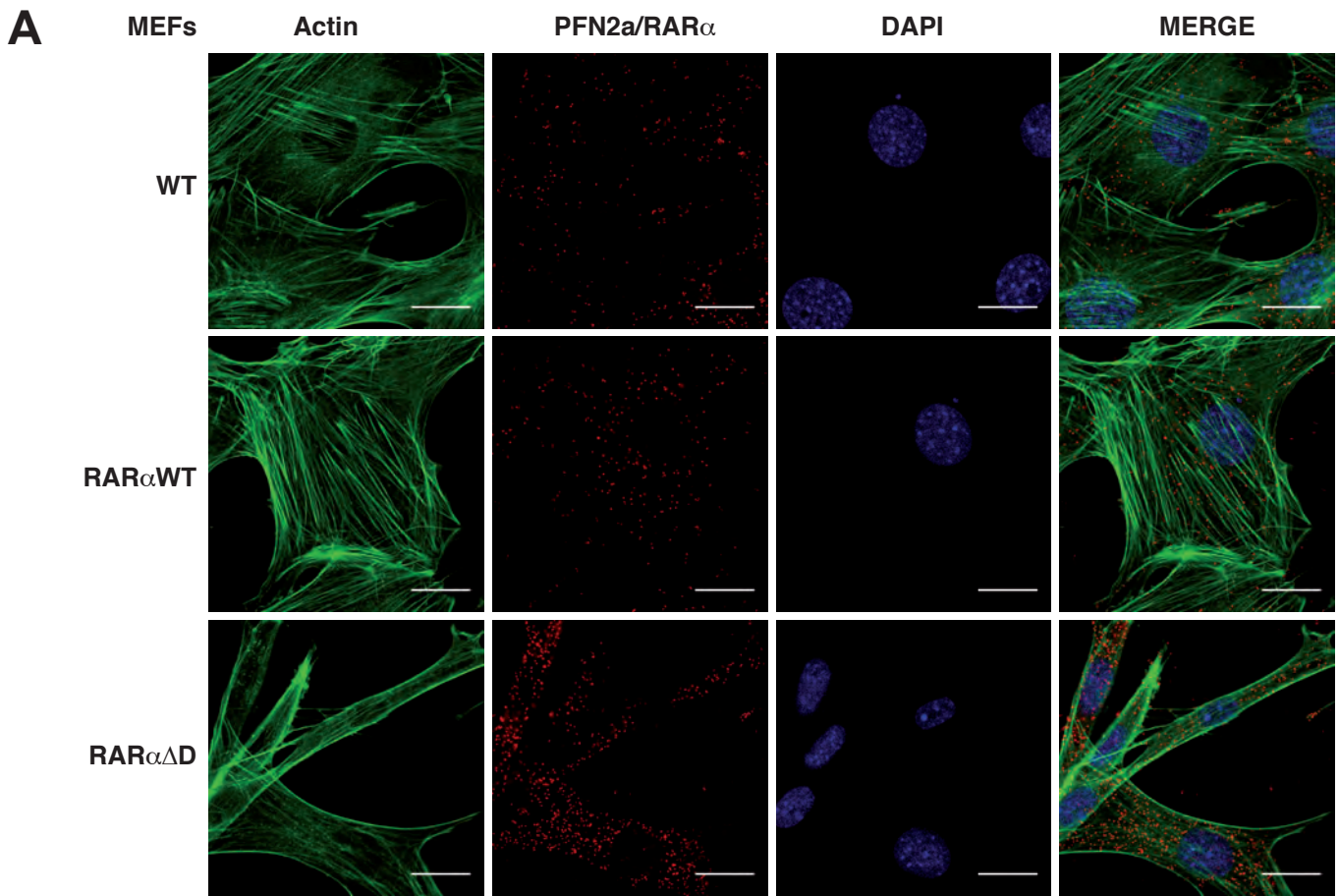


Figure 4

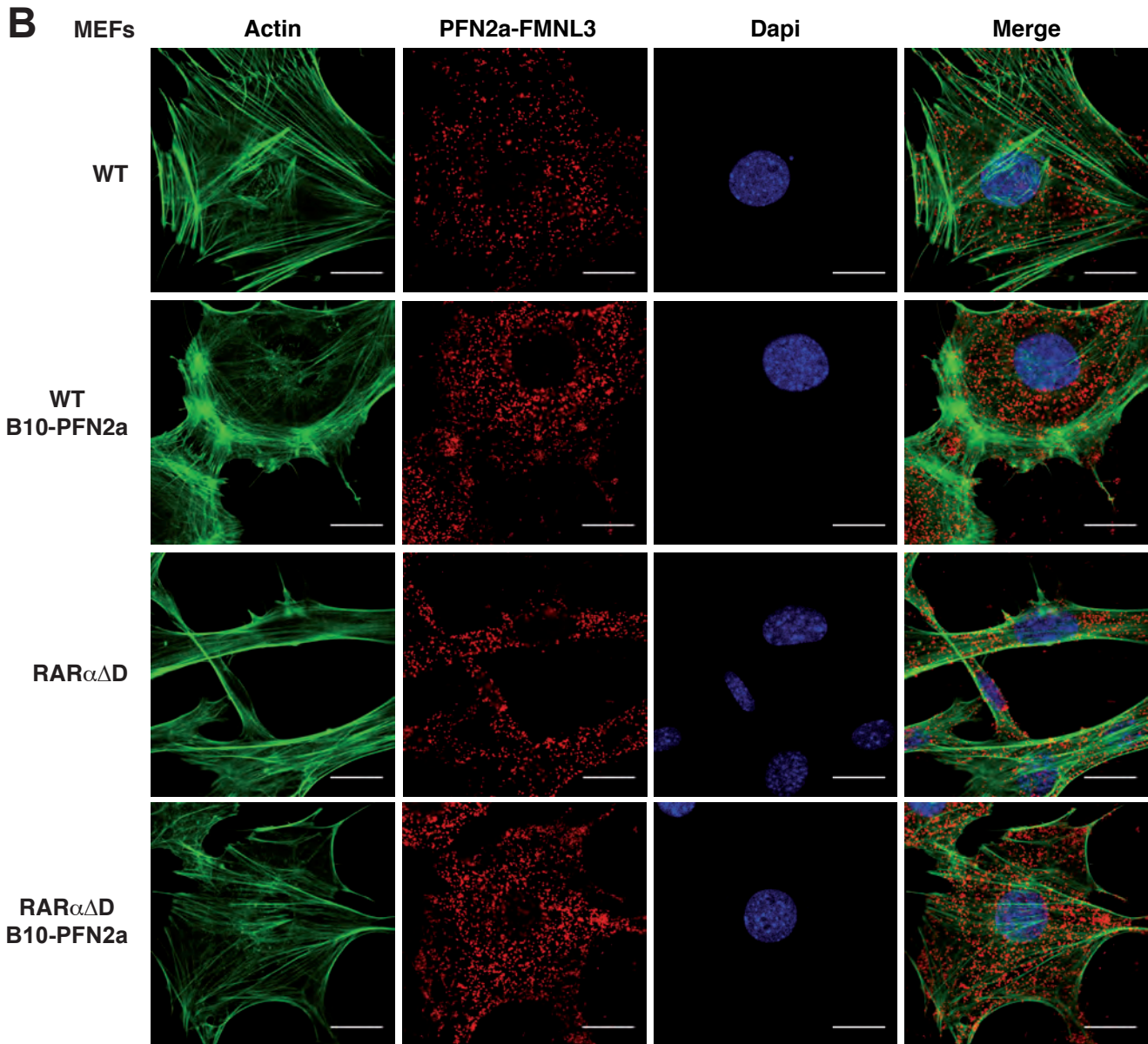
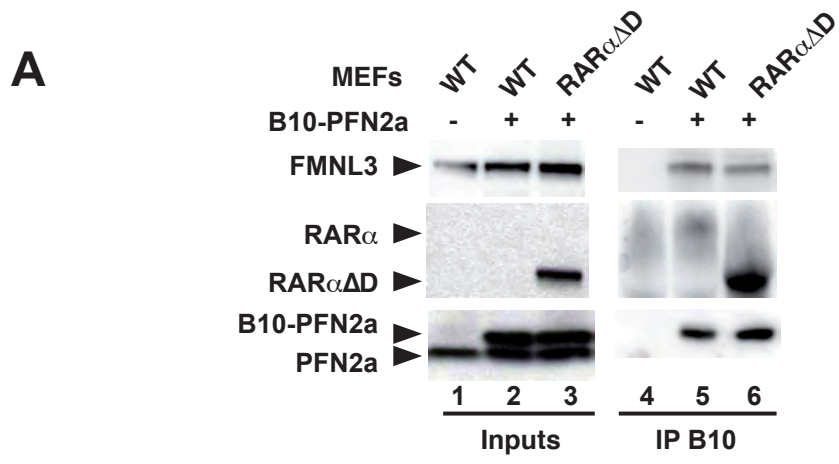


Figure 5

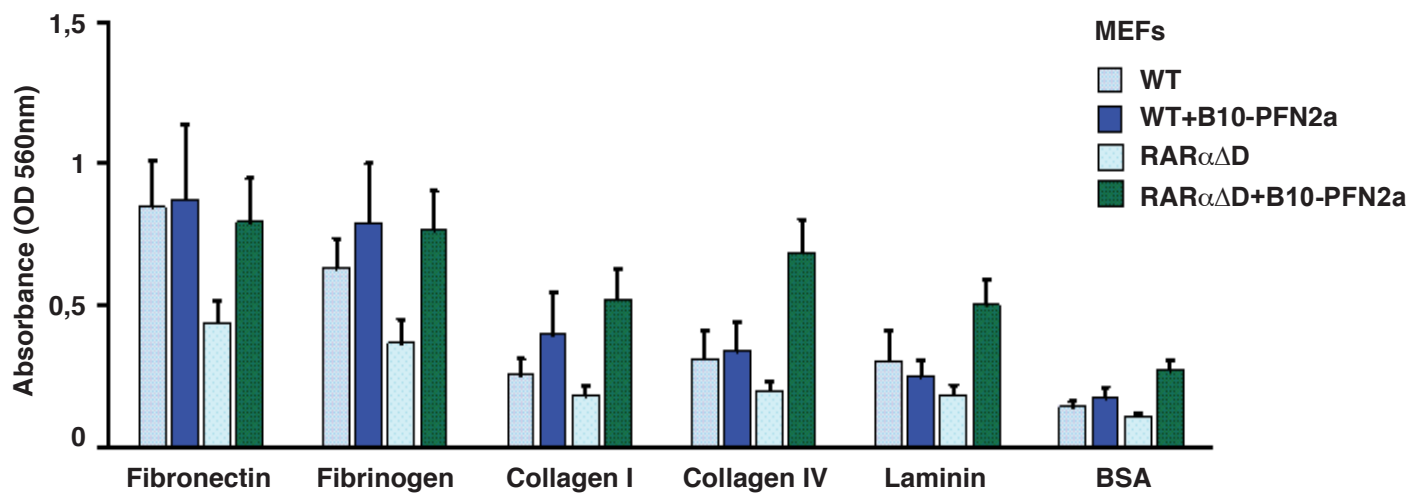


Figure 6

Supplemental data

Supplemental Table 1: List of the PFN2a interacting proteins identified in the cytoplasmic extracts of MEFs overexpressing B10-PFN2a in replicate experiments R1 (sheet 1) and R2 (sheet 2). Only the proteins identified with one peptide with high confidence were selected. Sheet 3 shows the proteins identified in the two replicates after elimination of the background.

Supplemental Figure 1

PLA showing that the number of PFN2a/Evl complexes (red) is decreased in RAR α Δ D MEFs compared to WT MEFs. The stress fibers stained with green 488 phalloidin are also less abundant in RAR α Δ D MEFs. Overexpression of B10-PFN2a in RAR α Δ D MEFs restored the WT morphology and the WT network of actin fibers. Scale bar: 20 μ m.

Supplemental Figure 2

PLA showing that only a few PFN2a/Vasp complexes (red) are detected in WT MEFs. These complexes are not affected in RAR α Δ D MEFs, though the stress fibers stained with green 488 phalloidin are less abundant. Overexpression of B10-PFN2a in RAR α Δ D MEFs restored the WT morphology and the WT network of actin fibers. Scale bar: 20 μ m.

Supplemental Figure 3

A. In RAR α Δ D MEFs, the number of PFN2a-RAR α complexes (red) is increased and the stress fibers stained with green 488 phalloidin are less abundant and thinner. Overexpression of B10-PFN2a in RAR α Δ D MEFs restored the WT morphology and the WT network of actin fibers. Scale bar: 20 μ m.

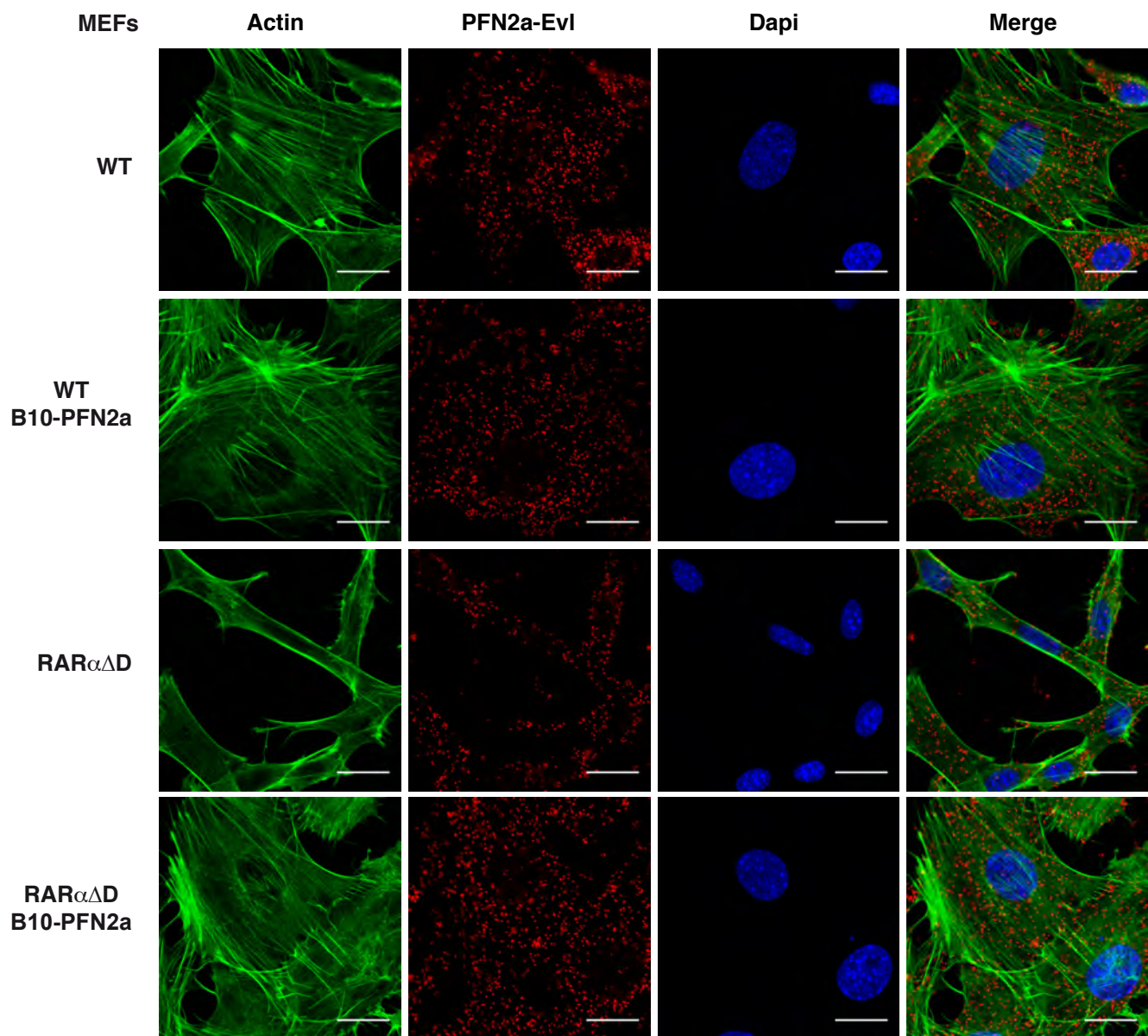


Figure S1

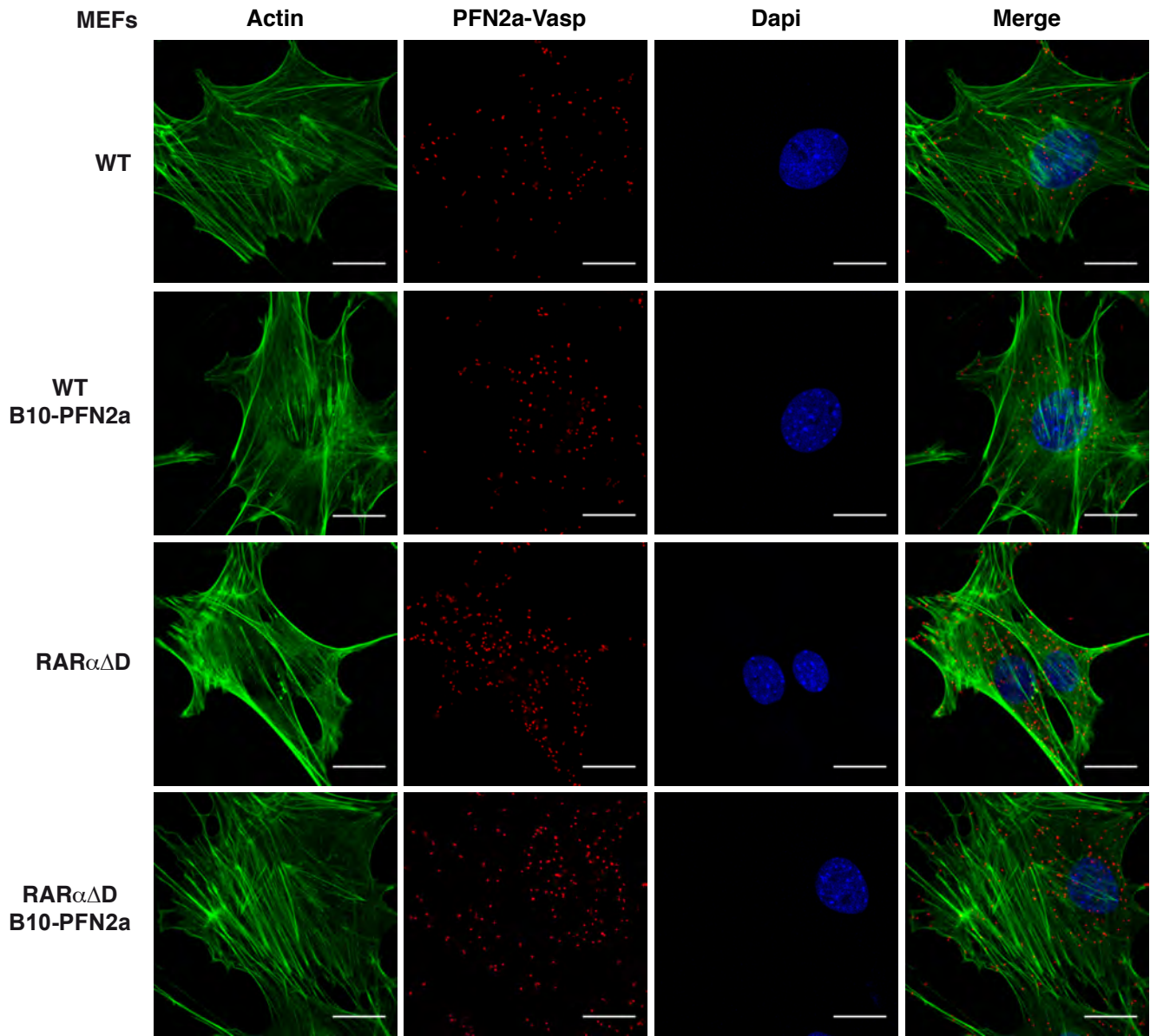


Figure S2

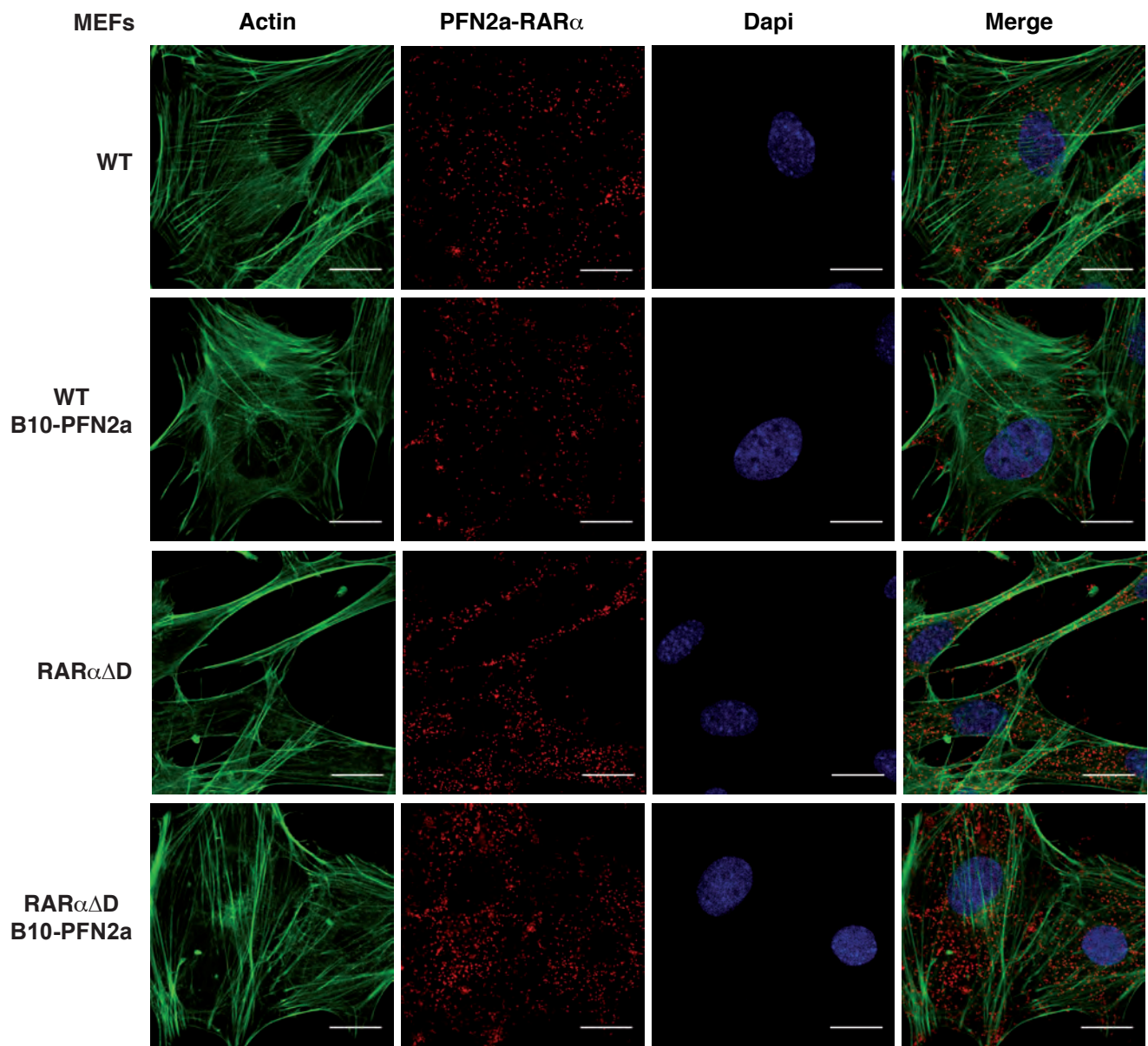


Figure S3

Nouveau rôle dans l'adhésion des fibroblastes

Résumé

Les récepteurs de l'acide rétinoïque, RAR α , β et γ sont des facteurs de transcription dépendants du ligand qui contrôlent l'expression de gènes spécifiques. Cependant, il s'avère depuis peu que les RAR ont aussi des effets non-transcriptionnels extranucléaires.

Durant ma thèse, j'ai observé que (1) les fibroblastes invalidés pour tous les RAR ont un cytosquelette d'actine perturbé et ont perdu leurs propriétés d'adhésion (2) RAR α interagit via son motif riche en proline N-terminal avec la profiline 2a (PFN2a) qui est un régulateur critique de l'élongation des filaments d'actine du cytosquelette.

J'ai montré que : (1) Les RAR contrôlent la morphologie, l'adhésion et la migration des MEF via la régulation transcriptionnelle de l'expression de gènes codant pour des protéines d'adhésion (2) Dans le cytoplasme, RAR α forme avec PFN2a des complexes dont le nombre contrôle le réseau d'actine et l'adhésion des MEF via un mécanisme non transcriptionnel.

Ces observations mettent en exergue l'importance de la combinaison des effets génomiques et non-génomiques des RAR dans l'adhésion des cellules et ouvrent de nouvelles possibilités de dérégulation du fonctionnement des RAR dans certaines pathologies.

Mots clés : Récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR), profiline 2a, dynamique du cytosquelette d'actine, interaction protéique, immunoprécipitation, proximity ligation assay (PLA), immunofluorescence, spectrométrie de masse, RNA-Seq, transcription, adhésion, migration.

Abstract

Retinoic acid receptors, RAR α , β and γ are ligand-dependent transcription factors that control the expression of specific genes. However, growing evidence indicates that RARs also have extranuclear and non transcriptional effects.

During my thesis, I observed that (1) fibroblasts invalidated for all RARs depict a disrupted actin cytoskeleton and have lost their adhesion properties (2) RAR α interacts through its N-terminal proline rich motif with profilin2a (PFN2a) a critical regulator of actin filaments elongation.

I have shown that: (1) RARs control the morphology, adhesion and migration of MEFs via controlling at the transcriptional level the expression of adhesion genes (2) In the cytosol, RAR α forms complexes with PFN2a. The number of these complexes controls the actin network and the adhesion of MEFs via a non-transcriptional mechanism.

These observations highlight the importance of the combined genomic and non-genomic effects of RARs in cell adhesion, and open new avenues for RARs deregulations in certain pathology.

Keywords: Retinoic acid receptors (RAR), profilin 2a, actin cytoskeleton dynamics, protein interaction, immunoprecipitation, proximity ligation assay (PLA), immunofluorescence, mass spectrometry, RNA-Seq, transcription, adhesion, migration.