

RXR, un cofacteur essentiel à la transformation dans les leucémies aiguës promyélocytaïres

Juliane Halftermeyer, Morgane Le Bras, Hugues De Thé



>La leucémie aiguë promyélocytaire est induite par la formation de protéines de fusion impliquant toujours le récepteur à l'acide rétinoïque, RARα. L'expression de la protéine de fusion PML-RARα est suffisante à la transformation *in vivo*. In vivo, ces oncoprotéines X-RARα sont toujours associées à un autre récepteur nucléaire, RXRα (retinoid X receptor). Ce cofacteur est indispensable à la transformation car il permet à la fois une meilleure fixation du complexe à l'ADN et une forte augmentation du nombre de sites de liaison à l'ADN, ce qui induit alors la régulation de nouveaux gènes. Le complexe PML-RARα:RXRα est sensible aux réxinoïdes. L'étude des partenaires protéiques des oncoprotéines de fusion ouvre ainsi de nouvelles perspectives pharmacologiques.

Institut universitaire d'hématologie, CNRS UMR7212, Inserm U944, Hôpital Saint-Louis, 1, avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France. juliane.halftermeyer@gmail.com

La leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) représente 10 % des leucémies aiguës myéloïdes. Elle est caractérisée par un blocage de la différenciation granulocytaire et une induction de la prolifération cellulaire. Cette maladie est induite par des translocations chromosomiques qui impliquent toujours le gène RARα (retinoid acid receptor alpha), fusionné dans 98 % des cas avec le gène PML (promyelocytic leukemia), entraînant la formation d'une oncoprotéine de fusion PML-RARα. Les 2 % de cas restants sont associés à d'autres translocations générant les fusions PLZF-RARα, NuMA-B-RARα, NPM-RARα ou encore STAT5b-PRKAR1A-RARα [1, 2] (Figure 1A). Actuellement, deux traitements sont utilisés en clinique contre les LAP induites par PML-RARα : l'acide rétinoïque tout-trans (ATRA) et le trioxyde d'arsenic (As₂O₃). Combinés à une chimiothérapie, ces traitements permettent d'obtenir une survie dans 90 % des cas à 5 ans [3].

L'expression de la protéine de fusion est la clé de voûte des processus de transformation cellulaire. Des études récentes montrent toutefois l'importance d'autres protéines telles que les récepteurs nucléaires RXR (retinoid X receptor), cofacteurs indispensables à la liaison de RARα à l'ADN et à la transformation par PML-RARα. Nous allons discuter dans cette revue les rôles de RXRα dans ces processus.

Le complexe RAR : RXR

Les récepteurs nucléaires des acides rétinoïques, les RAR et RXR, présentent une structure divisée en six domaines de A à F. Les RAR possèdent un domaine F de liaison à l'ADN et un domaine C d'activation transcriptionnelle indépendante du ligand ; le domaine D est un domaine de liaison à l'ADN (DBD) composé de deux motifs en doigt de zinc ; le domaine E constitue le domaine de liaison au ligand (LBD, ligand binding domain) et le domaine AF2 d'activation transcriptionnelle dépendante du ligand ainsi que la surface d'auto-/hétérodimérisation (Figure 1B). Les RAR, qui, seuls, lient très faiblement l'ADN, sont toujours associés à RXR, permettant une très forte augmentation de la fixation à l'ADN des RAR. Il existe trois sous-types de RXR, codés par trois gènes distincts. Les RAR sont capables de lier l'acide rétinoïque (AR) sous forme d'ATRA et de 9-cis-AR, alors que les RXR ne sont capables que de lier le dérivé synthétique 9-cis-AR. À ce jour, aucun ligand endogène naturel évident ne leur est connu. Dans la cellule, les RXR peuvent être présents sous forme d'homodimères liant l'AR.

¹PLZF : promyelocytic leukaemia zinc finger protein ; NuMA : nuclear mitotic apparatus protein ; NPM : nucleophosmin/B23 ; STAT5b : signal transducer and activator of transcription 5B PRKAR1A : cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit.

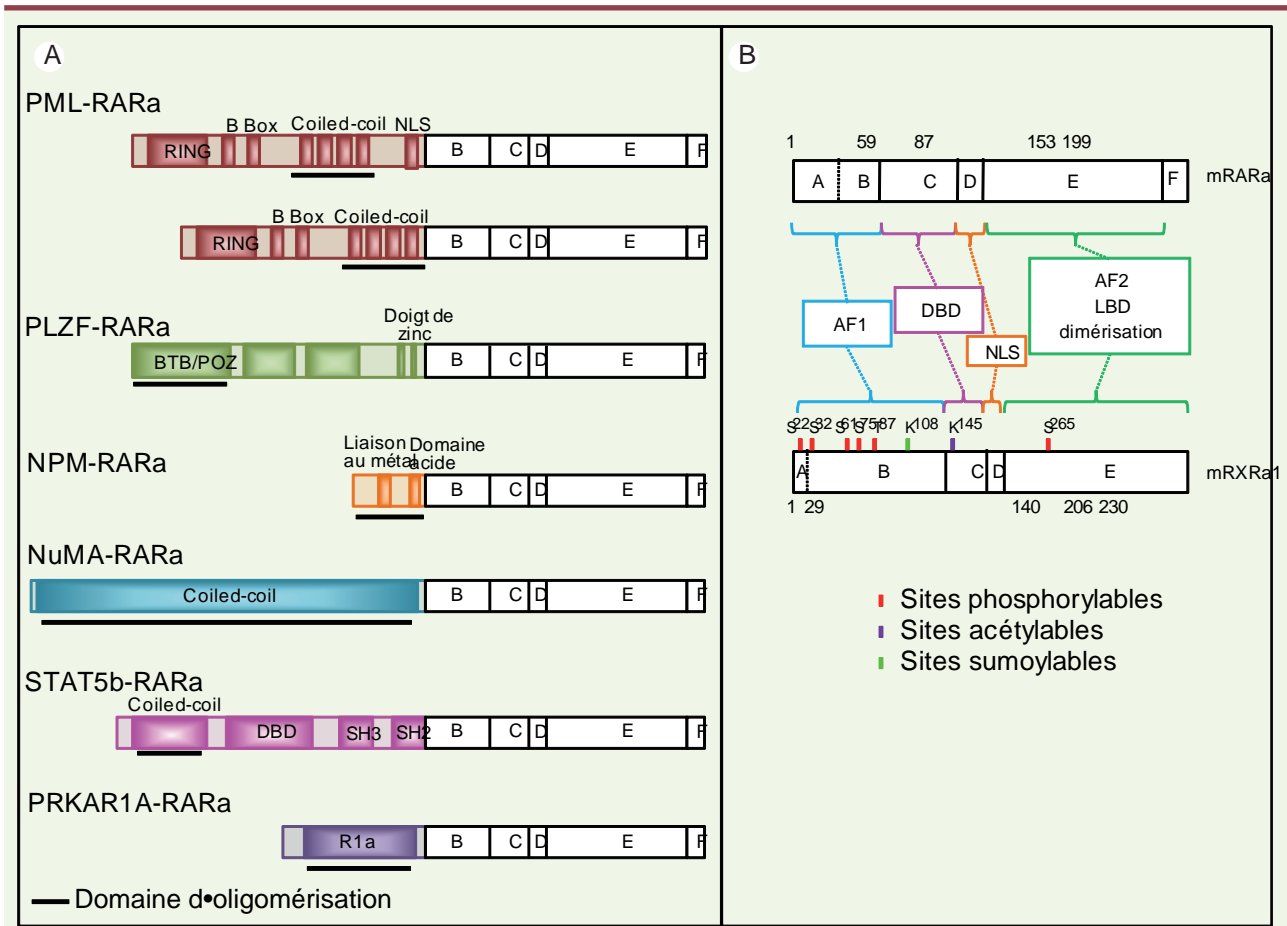


Figure 1. RAR, RXR et les oncoprotéines de fusion induisant la LAP. La LAP est induite par des protéines de fusion impliquant toujours RARa. Une caractéristique commune aux oncoprotéines de fusion PML-RARa, PLZF-RARa, NuMA-RARa et PRKAR1A-RARa est la présence d'un domaine d'oligomérisation. RAR et son partenaire RXR sont des récepteurs nucléaires composés de plusieurs domaines fonctionnels nommés de A à E, ou F pour RAR. Ces protéines sont soumises à de nombreuses modifications post-transcriptionnelles dont de

au niveau de séquences spécifiques, ou, le plus souvent, sous forme de complexes hétérodimériques avec de nombreux autres récepteurs nucléaires tels que TR, VDR, PPAR, LX (pour FXR, RXR4). En conséquence, les RXR jouent un rôle critique dans une grande variété de processus développementaux, de l'implantation de l'embryon à l'organogenèse, ainsi que dans la régulation de la physiologie des surfaces et surtout de liaison des ligands à l'âge adulte. RXRa est le sous-type de plus abondant dans les cellules myéloïdes, et son expression est modifiée de répresseur transcriptionnel à un état activateur via la perte de corépresseurs et le recrutement de complexes coactivateurs tels que p160 rétroïdes dans la cellule. Ils se lient spécifiquement à l'ADN dans le complexe RAR:RXR, RXR agit comme un partenaire transcriptionnellement silencieux de RAR alors que RAR agit comme un activateur transcriptionnel. Les éléments RARE sont composés de deux répétitions directes d'un motif 5'-PuGCA-T séparées par 2 ou 5 nucléotides, mène de « subordination » de RXR par RAR

²TR : récepteur thyroid hormone ; VDR : vitamin D3 receptor ; PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor co-repressor) ou SMRT (silencing mediator of retinoic acid receptor) ; LX : liver X receptor ; FXR : farnesoyl X receptor ; RXR : pregnane X receptor and thyroid hormone receptor).

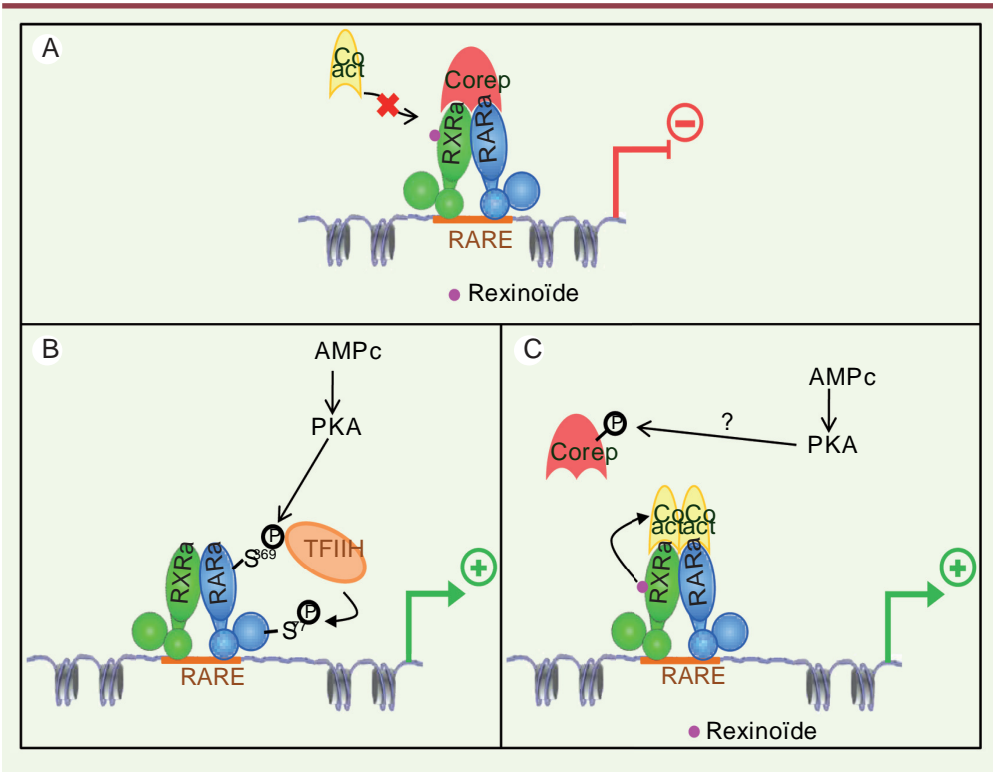


Figure 2. Mécanismes de subordination/desubordination de RXR. A. La présence de réxinoïdes seuls ne permet pas l'activation de l'hétérodimère RXR. La présence d'AMPc permet d'activer la PKA qui va alors être capable de phosphoryler la sérine 369 de RAR entraînant le recrutement du complexe TFIID et la transcription de la séquence RARE. La présence d'AMPc induit par ailleurs une phosphorylation et un décrochage des corepresseurs de l'hétérodimère. Dans ces conditions, la présence de réxinoïdes permet l'activation de l'hétérodimère.

signaux de stress génotoxiques, on observe aussi une phosphorylation par JNK de la sérine 265 dans le domaine AF2 de mRXRa, ce qui entraîne une diminution de la transcription des gènes cibles [44]. RXRa peut être acétylé par le complexe CBP/p300 au niveau de la lysine 145, dans le DBD. Cette acétylation favorise la liaison des hétérodimères à l'ADN, ce qui induit la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire [16]. RXRa peut également être sumoylé au niveau de la lysine 108 dans le domaine [AF1] ceci pouvant alors intervenir dans des processus de répression transcriptionnelle. Ainsi, la réponse transcriptionnelle de l'hétérodimère RXR:RAR est modulée par des modifications post-traductionnelles de RXR.

Il a été montré récemment que la protéine RXRa humaine phosphorylée au niveau de la thréonine 82 et de la sérine 260 (résidus homologues aux thréonine 87 et sérine 265 murines) se comporte comme une onco-

protéine dans les cellules hépatiques. Ces phosphorylations pourraient empêcher l'homodimérisation de RXRa et/ou son hétérodimérisation avec RARb2. Elles pourraient également entraîner une modification de l'interaction au sein du récepteur, bloquant alors la transcription des gènes cibles. Au total, ces expériences mettent en exergue l'importance d'un partenaire transcriptionnel jusqu'alors comme inactif dans les processus de différenciation. Ces phosphorylations pourraient également être impliquées dans la transcription de certains gènes cibles de l'AR et dans les effets antiprolifératifs de ce dernier [12]. En réponse à l'AR, on observe une phosphorylation de la sérine 32 par JNK terminal kinase [16]. Trois résidus du domaine amino-terminal de RXRa, les sérines 61 et 75 et la thréonine 87, sont phosphorylés en réponse à l'AR et à différents stress génotoxiques. Cette étape est nécessaire à la coopération entre RXRa et RAR pour une transcription maximale des gènes cibles. Enfin, en réponse à l'oncoprotéine de fusion PML-RARa peut s'homodi-

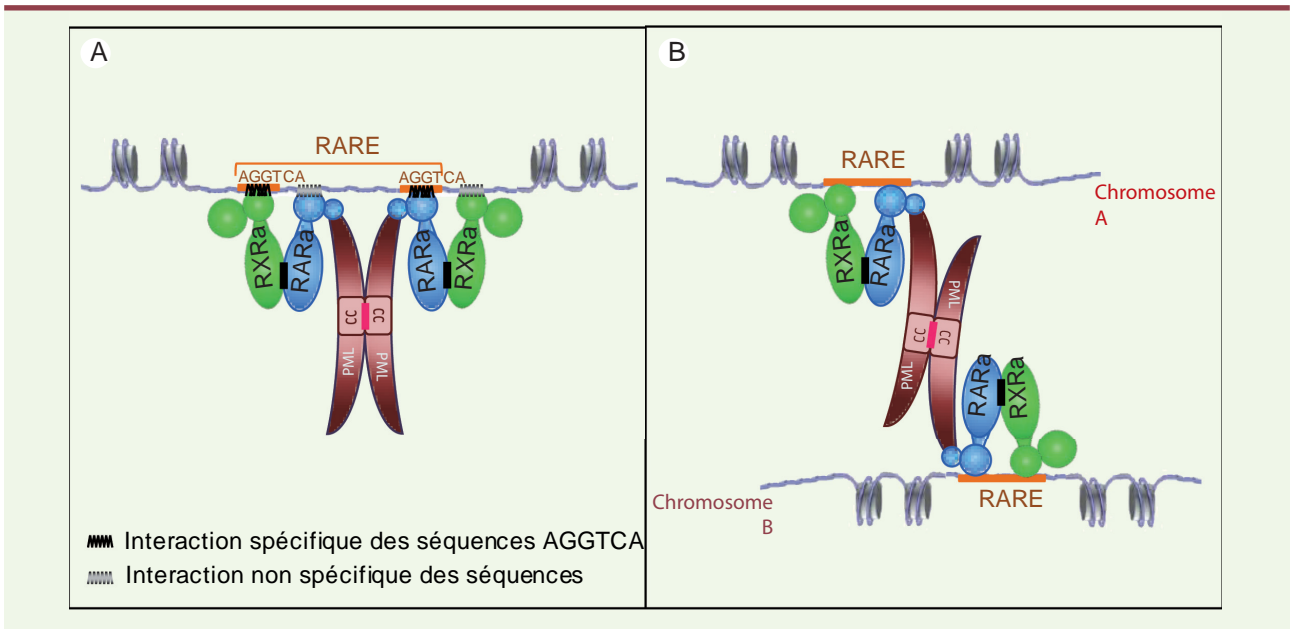


Figure 3. Modèles de liaison des hétérocomplexes PML-RARA:RXRa à l'ADN. A. L'hétérotétramère PML-RARA:RXRa possède quatre domaines de liaison à l'ADN. Ce complexe est alors capable de fixer l'ADN plus fortement que l'hétérodimère en intégrant d'une part ses séquences AGGTCA (hatched lines) et d'autre part des séquences non spécifiques (solid lines). B. De plus, la plasticité de cet hétérocomplexe pourrait permettre une réorganisation de la chromatine dans le noyau, une moitié du complexe liant un chromosome A alors que l'autre partie est sur le chromosome B.

mériser via le domaine coiled-coile PML, permettant la formation d'un complexe capable de lier l'ADN indépendamment de RXR. Cette homodimérisation de PML-RARA participerait au processus de régulation transcriptionnelle en augmentant le recrutement de co-répresseurs plus large que le dimère PML-RARA:RXR (augmentation de la liaison ou du nombre de co-répresseurs sur le complexe) [9]. Pourtant, l'expression d'un dominant négatif, selon une grande partie n'est pas contrôlée par surexpression d'un mutant homodimérique de RARA ne les voies classiques de signalisation de l'AR. Ces nouveaux sites incluent entre autres des régions normalement inconnues par d'autres récepteurs nucléaires leucémiques humaines ou murines : on a donc dans ces cellules VDR ou TR qui contrôlent la différenciation tétramère formé de deux hétérodimères PML-RARA:RXR associées. On peut aussi imaginer la formation via les domaines coiled-coile PML. Cette association permettrait la formation de hétérotétramères fixés sur des chromosomes différents. Cette plasticité de ce complexe permettrait l'association DBD des deux RARA ou entre DBD des deux RXR. Cela implique que certains dimères PML-RARA:RXRa de l'hétérotétramères contiennent ainsi quatre domaines de liaison à l'ADN (deux dans RXRa et deux dans RARA) permettant alors de cibler des régions chromosomiques qui ne coopèrent dans la liaison à l'ADN : les domaines non fixés habituellement pas en contact, modulant alors motifs AGGTCA peuvent contribuer à la stabilisation de la régulation transcriptionnelle de nouveaux gènes des interactions à l'ADN non spécifiques des séquences (Figure 3B) Dans le cas du récepteur à l'œstrogène, Plusieurs études ont montré que la liaison de l'hétérodimère entraîne une réorganisation des territoires PML-RARA:RXRa n'a plus de préférence de structure ou d'orientation et une interaction fonctionnelle entre des au niveau des répétitions AGGTCA : la fixation de PML-RARA associées sur des chromosomes différents été observée dans des cellules de LAP humaines sur des répétitions de ces mécanismes permet à PML-RARA directes espacées de 1 à 20 nucléotides mais aussi sur des répétitions de participer à la régulation de gènes impliqués dans tions inversées ou reversées aussi bien in vivo [9, 21, l'autorenouvellement des progéniteurs et dans la différenciation terminale des cellules myéloïdes.

[24]. Cette « désubordination » de RXRa au sein du complexe. Cette sumoylation, ainsi que d'autres modifications post-traductionnelles (notamment des phosphorylations ou acétylations), pourraient influencer le rôle de RXRa dans la répression et/ou l'activation de ces gènes cibles de PML-RARa. En effet, le traitement par l'ARNi des gènes cibles de PML-RARa entraîne la perte de l'ancrage de PML-RARa et RXRa sur les gènes cibles ainsi que leur dégradation en parallèle de l'activation de ces gènes.

Rôle fonctionnel de RXRa dans l'oncogenèse

L'étude fonctionnelle du rôle de RXRa dans la transformation a été abordée de deux manières complémentaires : soit par l'analyse de mutants de PML-RARa au niveau du site de liaison à RXRa, soit par l'effet d'ARN interférents dirigés contre RXRa. Le mutant de PML-RARa incapable de lier les RXR peut toujours se fixer à l'ADN et répondre à l'AR. Il induit alors un arrêt de la différenciation et immortalise les cellules. Néanmoins, les souris transgéniques correspondantes présentent uniquement un syndrome myéloïde pré-leucémique, sans développement de leucémie. La différence des résultats *in vivo* pourrait être due au niveau d'expression plus élevé du mutant *in vivo*, permettant probablement la fixation de l'ADN par les DBD de RARa et aux corépresseurs d'homo-oligomère [24].

L'étude d'une autre oncoprotéine de fusion induisant la leucémie, STAT5b-RARa a montré que, de la même façon qu'avec PML-RARa, les protéines STAT5b-RARa sont complexées à RXRa, ce qui permet même la fixation à l'ADN d'un mutant de liaison de STAT5b-RARa. L'extinction de RXRa dans des progéniteurs hématopoïétiques murins transformés par Stat5b-RARa entraîne une perte graduelle des propriétés d'autorenouvellement de ces cellules. De manière similaire, l'extinction de RXRa par des ARN interférents dans des lignées de cellules de LAP humaines NB4 (exprimant PML-RARa), résistantes ou non à l'AR, a mis en évidence une inhibition de la prolifération des cellules, une perte de leur capacité clonogénique et l'induction de l'apoptose [25].

In vivo, les protéines RXRa étant majoritairement voire totalement liées à PML-RARa, la titration de RXRa par PML-RARa ou STAT5b-RARa pourrait alors jouer un rôle dans le processus de transformation. En effet, RXRa est indispensable à de nombreuses voies de signalisation cellulaire. En particulier, le niveau d'expression de RXRa dans les cellules myéloïdes influe sur la destinée de ces cellules. Une expression induit une différenciation monocytaire alors qu'une faible expression entraîne une différenciation en granulocytes [27].

À ce titre, les cellules transformées *in vivo* par un mutant de PML-RARa incapable de fixer RXRa présentent des caractéristiques monocytaires après traitement à l'AR. Ceci pourrait refléter la plus grande sensibilité de RXRa du fait de l'absence de dégradation de la protéine complexée à PML-RARa. Par ailleurs, la présence de RXRa dans le complexe PML-RARa permet de traiter des LAP résistantes aux traitements conventionnels de la voie de l'AMPC et des réxinoïdes, ce mécanisme reflétant

RXRa est donc un partenaire essentiel au développement des LAP induites par les oncoprotéines de fusion PML-RARa, STAT5b-RARa, mais aussi Ma-RARa et PRKAR1A-RARa. L'ARNi permet notamment un gain de fonctionnel par l'augmentation du nombre de sites de liaison de PML-RARa à l'ADN, rendant alors possible la régulation de nouveaux gènes. La présence de RXRa dans le complexe explique aussi la différenciation des blastes leucémiques par les réxinoïdes, mais, paradoxalement, son activation n'a pas été associée à des prolongations significatives de la survie (données non publiées). L'action des réxinoïdes sur le devenir des cellules initiateurs de leucémie pourrait être différente de celle de STAT5b-RARa, en particulier s'ils induisent mal la régulation de PML-RARa. Tous ces résultats mettent en évidence l'importance des partenaires des oncoprotéines de fusion dans les processus de transformation de l'ADN. De la même façon, le rôle clé d'une protéine partenaire a été mis en évidence dans les leucémies induites par les oncoprotéines de fusion impliquant MyD118 et l'enzyme Mécine est nécessaire à la formation de LAP, ainsi qu'au maintien de la leucémie par la dépendance d'une oncoprotéine de fusion à ses partenaires protéiques pourrait ainsi être un phénomène général dans le processus leucémogène. Comme avec l'induction des LAP aux réxinoïdes, la détermination de la composition protéique des complexes oncogéniques pourrait ouvrir de nouvelles perspectives pharmacologiques dans d'autres leucémies.

SUMMARY
RXR α is a key member of the oncogenic complex in acute promyelocytic leukemia. Acute promyelocytic leukaemia (APL) is induced by fusion oncoproteins always implying the retinoic acid receptor α . Although PML-RARa and other fusion oncoproteins are able to bind DNA as homodimers, they are always found in association with the nuclear receptor α (retinoic acid X Receptor). Thus, RXR α is an essential cofactor of the fusion protein for the transformation. RXR α contributes to several aspects of

transformation: RARα fusion:RXRα hetero-oligomeric complexes bind DNA with a much greater affinity than RARα fusion homodimers. PML-RARα:RXRα recognizes an enlarged repertoire of DNA target genes than the homodimer alone. Titration of RXRα by the fusion protein may also play a role in the transformation process, as well as post-translational modifications of RXRα in the complex. Finally, RXRα is required for rexinoid-induced APL differentiation. Thus, RXRα is a key member of the oncogenic complex.


CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Melnick A, Licht JD. Deconstructing a disease: RARα, its fusion partners, and the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2009 ; 93 : 3167-215.
- Qiu JJ, Lu X, Zeisig AB. Leukemic transformation by the APL fusion protein PRKAR1A-RARα critically depends on recruitment of RXRα. *Cancer* 2009 ; 115 : 643-52.
- Nasr R, Lallemand-Breitenbach V, et al. In vitro therapy-induced PML/RARα proteolysis and acute promyelocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2009 ; 15 : 6321-6.
- Germain P, Chambon P. *Encyclopedia International union of pharmacology. LXIII. retinoid X receptor*. Pharmacol Ther 2006 ; 58 : 760-72.
- Defacque H, Commes T, Legabre F. Expression of retinoid X receptor alpha is increased upon monocytic cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 ; 396 : 315-22.
- Germain P, Iyer J, Zechel C, Gronemeyer H. Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoid acid receptor signaling. *Nat Rev* 2002 ; 415 : 187-92.
- Altucci L, Rossin A, Hirsch G. Retinoid-triggered differentiation and tumor-selective apoptosis of acute myeloid leukemia by protein kinase A-mediated desubordination of retinoid X receptor. *Cancer Res* 2005 ; 65 : 8754-65.
- Benoit G, Altucci L, Fleury M. RAR-independent RXR signaling induces t(15;17) leukemia cell maturation. *EMBO J* 1999 ; 18 : 7011-8.
- Kamashev D, Vitoux D, De Thé H. PML-RARA-RXR oligomers mediate retinoid and rexinoid cross-talk in acute promyelocytic leukemia cell differentiation. *Exp Hematol* 2004 ; 199 : 1163-74.
- Gaillard E, Bruck N, Breitel P. Phosphorylation by PKA potentiates retinoid acid receptor alpha activity by means of increasing interaction with and phosphorylation by cyclin H. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 103 : 9548-53.
- Adam-Stitah S, Penna L, Chambon P, Rochette-Egly C. Hyperphosphorylation of the retinoid X receptor alpha by activated c-Jun NH2-terminal kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 ; 274 : 18932-41.
- Bastien J, Adam-Stitah S, Plassez M. The phosphorylation site located in the A region of the retinoid X receptor alpha is required for the antiproliferative effect of retinoid acid (RA) and for the activation of RA target genes in HL60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 ; 277 : 28683-9.
- Mann KK, Padovani AM, et al. Genotoxic trioxide inhibits nuclear receptor function via SERJ1/JNK-mediated RXRα phosphorylation. *Cancer Res* 2005 ; 115 : 2924-33.
- Bruck N, Bastien J, et al. Phosphorylation of the retinoid X receptor at the omega loop, modulates the expression of retinoid-acid-target genes with a promoter context specificity. *Cell Signaling* 2005 ; 17 : 1229-39.
- Tarrade A, Bastien J, et al. Retinoid acid and arsenic trioxide cooperate for apoptosis through phosphorylated RXRα. *Cancer Res* 2005 ; 24 : 2277-88.
- Zhao WX; Tian M, Zhang BX, et al. RXRα phosphorylation attenuates the p300-induced acetylation of retinoid X receptor. *Endocrinology* 2007 ; 21 : 2877-85.
- Chen Y, Chen SS, et al. Negative modulation of RXRα transcriptional activity by small ubiquitin-related modifier (SUMO) modification and its reversal by SUMO-specific protease. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 ; 281 : 669-77.
- Shimizu M, Takai K, Moriwaki H. Strategy and mechanism for the prevention of hepatocellular carcinoma: phosphorylated retinoid X receptor alpha is a critical target for hepatocellular carcinoma chemoprevention. *Cancer Sci* 2009 ; 100 : 369-74.
- Minucci S, Maccarana M, et al. Oligomerization of RAR and AML1 transcription factors as a novel mechanism of oncogenic activation. *Mol Cell* 2000 ; 5 : 811-20.
- Sternsdorf T, Phan VT, Maunakea P. Reduced retinoic acid receptor alpha homodimers prime mice for APL-like leukemia. *Cancer Cell* 2006 ; 9 : 81-94.
- Martens JH, Brinkman AB, et al. PML-RARα/RXR alters the epigenetic landscape in acute promyelocytic leukemia. *Cancer Cell* 2010 ; 17 : 173-85.
- Perez A, Kastner P, et al. RAR homodimers: distinct DNA binding properties and heteromeric interactions. *EMBO J* 2003 ; 12 : 3171-82.
- Hu Q, Kwon YS, et al. Enhancing nuclear receptor-induced transcription requires nuclear motor and LSD1-dependent gene networking in interchromatin granules. *Natl Acad Sci USA* 2009 ; 105 : 19199-204.
- Zhu J, Nasr R, et al. RXR is an essential component of the oncogenic PML/RARA complex. *Cancer Cell* 2007 ; 12 : 23-35.
- Zhu J, Gianni M, et al. Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoid acid receptor alpha (RARα) and oncogenic RARα fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 96 : 14807-12.
- Zeisig AB, Kwok C, et al. Recruitment of RXR by homotetrameric RARα fusion proteins is essential for transcriptional activation. *Cancer Cell* 2007 ; 12 : 36-51.
- Taschner S, Koesters C, et al. Down-regulation of RXRα expression is essential for neutrophil development from granulocyte/monocyte progenitors. *Blood* 2007 ; 109 : 971-9.
- Guillemin MC, Raffoux E, et al. Inactivation of cAMP signaling induces growth arrest and differentiation in acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med* 2002 ; 196 : 1373-80.
- Sukhai MA, Thomas M, et al. Evidence of functional interaction between NuMA-RARα and RXRα in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Cancer Res* 2008 ; 27 : 4666-77.
- Nasr R, Guillemin MC, et al. Dedication of acute promyelocytic leukemia-initiating cells through PML-RARA degradation. *Blood* 2008 ; 114 : 1333-42.
- Yokoyama A, Somerville TC, et al. The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis. *Cell* 2005 ; 123 : 207-18.

TIRÉS À PART
J. Halftermeyer



>Depuis 20 ans, grâce à vous vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Tarifs d'abonnement M/S - 2011

Abonnez-vous

à Médecine/Sciences Bulletin d'abonnement page 952 dans ce numéro de

