

Les récepteurs mitochondriaux de la triiodothyronine : import et mécanismes d'action

Chantal Wrutniak-Cabello, Angel Carazo, François Casas et Gérard Cabello

UMR 866 Différenciation cellulaire et croissance, INRA, Université Montpellier 2, Université Montpellier 1, INRA-Supagro, 2 place Pierre Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

Auteur correspondant : Gérard Cabello, cabello@supagro.inra.fr

Reçu le 20 mars 2007

Résumé – Les hormones thyroïdiennes exercent un très grand nombre d'actions physiologiques recouvrant les processus du développement et du métabolisme. La recherche des récepteurs à l'origine de ce large spectre d'influences a conduit à la caractérisation des récepteurs nucléaires de la triiodothyronine (T3) codés par deux gènes *c-erbA α* (TR α) et *c-erbA β* (TR β). Plus récemment, deux formes tronquées de la partie N-terminale du récepteur nucléaire de la T3 TR α 1, de masse moléculaire 43 et 28 kDa, ont été identifiées dans la mitochondrie. Elles sont synthétisées à partir de l'utilisation de sites d'initiation internes de la traduction présents sur le messenger *c-erbA α 1*, puis importées dans la mitochondrie selon un processus atypique par rapport aux connaissances actuelles. Deux séquences d'import mitochondrial ont été identifiées dans la partie C-terminale de ces récepteurs ; de plus, leur extrémité N-terminale, dépourvue de charges négatives, joue un rôle permissif dans l'adressage mitochondrial. Alors que la fonction de la p28 reste inconnue, la p43 est un facteur de transcription T3-dépendant du génome mitochondrial qui agit notamment en hétérodimère avec deux autres formes tronquées de récepteurs nucléaires : mtPPAR et mtRXR. L'activation de la p43 par la T3 induit une stimulation de la synthèse protéique mitochondriale, de l'activité de la chaîne respiratoire et de la mitochondriogenèse. *Via* la signalisation mitochondrie/noyau, cette voie d'action contrôle l'expression de gènes nucléaires impliqués dans la régulation de la prolifération et de la différenciation. En particulier, la surexpression de p43 stimule la différenciation des myoblastes et l'expression de myosine lente en inhibant l'expression de cMyc et en augmentant celles de calcineurine et myogénine. La comparaison des influences respectives des voies d'action nucléaire et mitochondriale de la T3 fait apparaître, selon les effets considérés, une complémentarité (différenciation des myoblastes, mitochondriogenèse), une additivité (différenciation des myoblastes) ou des actions opposées (expression des myosines), induisant ainsi une finesse particulière de la régulation des effets physiologiques de l'hormone.

Mots clés : Hormones thyroïdiennes / récepteurs / mitochondries / transcription mitochondriale / import mitochondrial

Abstract – Triiodothyronine mitochondrial receptors: import and molecular mechanisms.

Thyroid hormone exerts a diversity of physiological influences over developmental and metabolic processes. Searching for receptors able to mediate this extended regulation led to the identification of triiodothyronine (T3) nuclear receptors encoded by two different genes, *c-erbA α* (TR α) and *c-erbA β* (TR β). More recently, two N-terminally truncated forms of the triiodothyronine nuclear receptor TR α 1, with molecular weights of 43 and 28 kDa, have been discovered in mitochondria. Synthesized through the use of internal initiation sites of translation occurring in the TR α 1 transcript, they are addressed into mitochondria according to an atypical process. Two mitochondrial import

sequences have been characterized in the C-terminal part of these proteins; in addition, their N-terminal part, devoid of negative charges, plays a permissive role in this import. Whereas the function of p28 remains unknown, p43 is a T3-dependent transcription factor of the mitochondrial genome, acting through dimeric complexes involving at least two other truncated forms of nuclear receptors, mtRXR and mtPPAR. P43 activation by T3 stimulates mitochondrial protein synthesis, respiratory chain activity and mitochondriogenesis. Through the mitochondrial/nuclear crosstalk, this direct T3 mitochondrial pathway influences the expression of nuclear genes involved in the regulation of cell proliferation and differentiation. In particular, in myoblasts, p43 over-expression stimulates terminal differentiation and induces a preferential expression of slow myosin, by down-regulating c-Myc expression and up-regulating calcineurin and myogenin expression. Comparison of the respective influences of the nuclear and mitochondrial T3 pathways demonstrates either both additivity (myoblast differentiation), complementarity (mitochondriogenesis, myoblast differentiation) or opposite influences (myosin expression), thus indicating that these two pathways introduce a fine-tuning of the hormone influence.

Key words: Thyroid hormones / receptors / mitochondria / mitochondrial transcription / mitochondrial import

Introduction

L'intervention des hormones thyroïdiennes dans la régulation de phénomènes physiologiques aussi complexes que le développement, la croissance ou le métabolisme tissulaire a très tôt posé la question de connaître les mécanismes sous-tendant une telle diversité. La recherche initiale des récepteurs potentiels de la T3 n'a pas contribué à apporter des réponses claires à cette question, avec la mise en évidence de multiples sites de liaison localisés sur la membrane cellulaire, dans le cytosol, les mitochondries ou le noyau.

Dès 1963, les travaux princeps de Tata *et al.* démontraient que les hormones thyroïdiennes stimulent l'activité des ARN polymérase I et II, ce qui établissait l'existence de mécanismes influençant la transcription. Plus récemment, la mise en évidence de la régulation directe ou indirecte de l'expression d'un très grand nombre de gènes par cette hormone apportait une première explication à la diversité d'action des hormones thyroïdiennes. En effet, selon Seelig *et al.*, (1981), auteurs de l'une des premières études d'expression génique différentielle chez le Rat, 8 % des transcrits hépatiques détectables par la technique utilisée étaient soumis à une régulation positive ou négative par l'état thyroïdien. La caractérisation des récepteurs nucléaires de la T3 est paradoxalement issue de travaux concernant le génome du virus de l'érythroblastose aviaire qui ont permis de mettre en évidence l'existence de deux gènes TR α (Sap *et al.*, 1996) et TR β (Weinberger *et al.*, 1996) codant les récepteurs nucléaires de la T3, ainsi qu'une multiplicité de protéines (pour revue, Chassande, 2003) dont l'importance physiologique reste dans bien des cas encore mal connue.

Parallèlement à ces études concernant la voie d'action nucléaire, Segal (1988) apportait les premiers éléments suggérant que certains sites membranaires de liaison des hormones thyroïdiennes pouvaient constituer les médiateurs d'actions très rapides de la T3, notamment via une modification de la signalisation calcique. Ces travaux, repris par l'équipe de Davis, ont permis d'identifier plus récemment l'intégrine $\alpha V\beta 3$ comme un véritable récepteur de la T3 et de la T4 à l'origine d'une activation des MAP kinases (Bergh *et al.*, 2005) modifiant l'activité de certains facteurs de transcription dont les récepteurs nucléaires de l'hormone, le récepteur α des oestrogènes, ou la p53 (Shih *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2004).

Par ailleurs, les travaux de l'équipe de Sterling mettaient en évidence l'existence d'une action rapide de la T3, détectable sur mitochondries isolées, se traduisant par une stimulation de la respiration de l'organelle et une activation des phosphorylations oxydatives (Sterling *et al.*, 1980). La mise en évidence antérieure de sites de liaison spécifiques de la T3 localisés sur la membrane interne mitochondriale (Sterling & Milch, 1975) posait avec acuité la question de l'existence d'une voie d'action directe de la T3 régulant l'activité de l'organelle.

Hormis l'existence de ces sites de liaison longtemps controversés, plusieurs autres éléments nous ont incités à tenter d'identifier les récepteurs mitochondriaux de la T3. Les mitochondries constituent en effet un compartiment majeur d'accumulation intracellulaire de T3 (Sterling *et al.*, 1984; Morel *et al.*, 1996), ce qui posait la question du rôle physiologique de l'hormone dans ce compartiment. De plus, l'une des actions les plus caractéristiques de l'hormone consiste à stimuler la mitochondriogenèse (Gustafsson *et al.*,

1965; Jakovilic *et al.*, 1978); cette influence met en jeu des processus complexes qui nécessitent notamment une stimulation coordonnée de l'expression de gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales et de l'expression du génome de l'organite. Or, la T3 augmente l'abondance des transcrits mitochondriaux dans divers tissus (Mutvei *et al.*, 1989; Wiesner *et al.*, 1992), et dès 1986, les travaux de Martino *et al.* sur mitochondries isolées suggéraient qu'une partie de cette activité transcriptionnelle s'exerçait directement au niveau de l'organite, un résultat confirmé plus récemment (Enriquez *et al.*, 1999). Ces données suggéraient donc l'existence dans la mitochondrie d'un régulateur T3-dépendant de l'expression du génome de l'organite.

Identification des récepteurs mitochondriaux de la T3

À l'issue de travaux préliminaires visant à purifier les récepteurs mitochondriaux, des fragments protéiques étaient systématiquement reconnus dans les extraits finaux par un anticorps dirigé contre la partie C-terminale du récepteur nucléaire de la T3 TR α . Ces données initiales ont conduit à tester l'hypothèse de la présence d'une isoforme TR α dans la mitochondrie. L'utilisation de la technique de marquage de photoaffinité avec un dérivé de la T3 (PAL-T3), qui avait permis d'établir l'hétérogénéité des récepteurs nucléaires de l'hormone (Casanova *et al.*, 1984), a conduit à la mise en évidence de deux protéines de poids moléculaires 43 et 28 kDa fixant la T3 de manière spécifique dans des extraits de mitochondries de foie de rat hautement purifiées. Alors que la protéine de 43 kDa est localisée dans la matrice mitochondriale, la protéine de 28 kDa est présente sur la membrane interne de l'organite. Parallèlement, deux anticorps dirigés contre des séquences différentes du domaine de liaison de la T3 du récepteur nucléaire TR α mettaient également en évidence par *Western blotting* deux protéines de poids moléculaires équivalents et de même localisation intra-mitochondriale. Enfin, après marquage par la PAL-T3 radioactive des protéines présentes dans les extraits mitochondriaux, l'utilisation de ces anticorps a permis d'immunoprécipiter une protéine de 43 kDa marquée à la PAL-T3, démontrant ainsi que la protéine de 43 kDa fixant la PAL-T3 était identique à celle reconnue par les anticorps dirigés contre le TR α . Une telle approche n'a pas été possible pour la protéine de 28 kDa dont la quantité mitochondriale est très faible. Enfin, l'utilisation de la technique de gel retard avec des extraits mitochondriaux hautement purifiés indiquait la présence d'une protéine se fixant de manière spécifique sur un élément de réponse reconnu

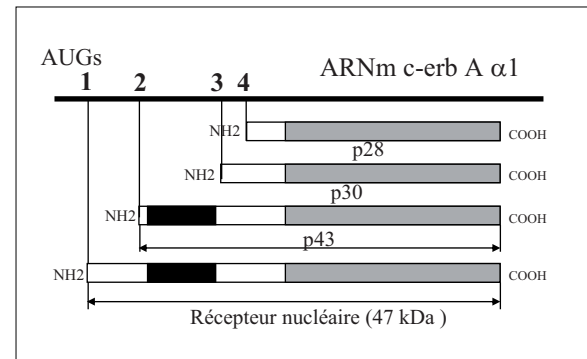


Fig. 1. Le transcrit c-ErbA $\alpha 1$ code quatre protéines via l'utilisation de trois sites d'initiation interne de la traduction : le récepteur nucléaire de la T3 TR α , la p43 localisée dans la matrice mitochondriale, la p30 dont la fonction est très mal connue et la p28 présente sur la membrane interne mitochondriale. Seuls le récepteur nucléaire et la p43 possèdent un domaine de liaison à l'ADN.

■ Domaine de liaison à l'ADN ■ Domaine de liaison de la T3

par les récepteurs nucléaires de la T3. L'ensemble de ces données démontrait donc l'existence de protéines mitochondriales fixant la T3 de poids moléculaires 43 et 28 kDa, immunologiquement apparentées au TR α , qui se lient sur des séquences d'ADN reconnues par ce récepteur nucléaire (Wrutniak *et al.*, 1995).

Parallèlement à cette étude, Bigler *et al.* (1992) démontraient que le transcrit codant le récepteur nucléaire TR α permettait également la synthèse de plusieurs protéines c-ErbA $\alpha 1$, par utilisation de sites d'initiation internes de la traduction, dont deux présentaient des poids moléculaires voisins de ceux identifiés pour les protéines mitochondriales (Fig. 1). L'expression spécifique dans des cellules CV1 des protéines c-ErbA $\alpha 1$ de 43 ou 28 kDa a permis d'établir leur localisation mitochondriale (Wrutniak *et al.*, 1995). Par ailleurs, l'utilisation de la technique de recombinaison homologue chez la souris démontre également que la mutation du codon ATG à l'origine de la synthèse de la protéine c-ErbA $\alpha 1$ de 43 kDa est associée à la disparition de la protéine mitochondriale de même masse moléculaire (Casas *et al.*, données non publiées). Il apparaît ainsi que le transcrit c-ErbA $\alpha 1$ code non seulement un récepteur nucléaire de la T3, mais également deux protéines mitochondriales.

De manière intéressante, les sites d'initiation internes nécessaires à la synthèse de p43 et de p28 sont présents sur tous les transcrits c-ErbA $\alpha 1$, quelles que soient l'espèce étudiée et sa place phylogénique. Ces données suggèrent donc que les récepteurs mitochondriaux de la T3 sont probablement apparus en même temps que les récepteurs nucléaires au cours de l'évolution.

La connaissance de l'origine moléculaire de ces protéines a également permis de caractériser leur affinité pour l'hormone après synthèse *in vitro*, qui est du même ordre que celle du récepteur nucléaire pour la p43 ($2 \times 10^9 \text{M}^{-1}$), plus importante pour la p28 ($3 \times 10^{10} \text{M}^{-1}$).

Adressage dans l'organite des récepteurs mitochondriaux de la T3

Paradoxalement, la p43 et la p28 mitochondriales possèdent, comme le récepteur nucléaire de la T3, un signal de localisation nucléaire. Dans ces conditions comment expliquer la différence d'adressage de ces protéines? Les études réalisées sur mitochondries isolées ont confirmé que seules la p43 et la p28 pouvaient être importées dans la mitochondrie. De plus, les modalités de leur import dans l'organite se sont avérées totalement atypiques : absence de clivage d'un peptide signal et indépendance vis à vis du potentiel de membrane mitochondrial ou de l'hydrolyse de l'ATP (Casas *et al.*, 1999). L'existence de ce mécanisme d'adressage atypique de la p43, actuellement inconnu, a été également mis en évidence sur mitochondries de levures incubées en présence du récepteur (Gouarné *et al.*, données non publiées); ce résultat est d'ailleurs en accord avec la mise en évidence d'un mécanisme d'import similaire utilisé par le facteur de transcription de levure mTF1 (Biswas & Getz, 2002).

L'étude des séquences de la p43 et de la p28 nécessaires à leur import mitochondrial a confirmé le caractère atypique de cet adressage. En effet, il existe deux séquences d'import localisées dans la partie C-terminale de ces protéines : l'hélice 5 d'une part, et la succession des hélices 10 et 11 d'autre part, présentes dans le domaine de liaison de la T3 du récepteur nucléaire. La fusion de l'une ou l'autre de ces séquences à l'extrémité C-terminale d'une protéine cytosolique est en effet suffisante pour induire sa localisation mitochondriale. Cependant, l'extrémité N-terminale des différentes protéines c-ErbA joue un rôle important, en abolissant (présence de charges négatives) ou en permettant (absence de charges négatives) l'import dans l'organite (Carazo *et al.*, soumis). Ces dernières observations sont à rapprocher de travaux antérieurs indiquant que les signaux d'adressage mitochondriaux classiques, localisés dans la partie N-terminale des protéines importées, sont dépourvus de charges négatives (Pfanter & Geissler, 2001).

Ainsi, toutes les protéines issues du transcrit c-ErbA α 1 possèdent à la fois un signal de localisation nucléaire et deux séquences d'import mitochondrial,

mais leur localisation définitive dépend de la nature de leur extrémité N-terminale (Fig. 2).

Activité intra-mitochondriale de la p43

Le fait que la p43 soit localisée dans la matrice mitochondriale où se situe le génome de l'organite et qu'elle possède un domaine de liaison à l'ADN posait la question de son influence sur la transcription mitochondriale. Les premières études de gel-retard indiquaient une fixation de la p43 sur une séquence DR2 présente sur la boucle D du génome mitochondrial où se situent les séquences promotrices de la transcription (Wrutniak *et al.*, 1995). De plus, l'analyse de l'ADN mitochondrial de rat fait également apparaître l'existence de quatre autres séquences TRE (Wrutniak *et al.*, 1998) sur lesquelles la p43 se fixe en gel retard (Casas *et al.*, 1999).

Des tests de transcription *in organello* réalisés sur mitochondries isolées incubées en présence de p43 synthétisée *in vitro* ont permis d'établir que cette protéine stimule la transcription du génome mitochondrial en présence d'hormone, d'une manière aussi efficace que TFam, facteur de transcription constitutif du génome mitochondrial. Cette activité est abolie après délétion du domaine de liaison à l'ADN de la p43, démontrant ainsi que cette activité transcriptionnelle nécessite la liaison du récepteur à l'ADN (Casas *et al.*, 1999). Cette influence est associée à une forte stimulation de la synthèse protéique de l'organite (Casas *et al.*, 1999), de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, et de la mitochondriogenèse (Wrutniak *et al.*, 1995; Grandemange *et al.*, 2005).

Le rôle de la p28 reste encore mal connu. Quelques expériences préliminaires suggèrent une influence très rapide sur la respiration mitochondriale, mais la létalité précoce observée chez les souris transgéniques surexprimant la p28 (8ème jour de vie embryonnaire) suggère une importance physiologique non négligeable au cours du développement (Casas *et al.*, données non publiées).

Hétérodimérisation de la p43 avec d'autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires

La recherche d'autres membres de la superfamille des récepteurs nucléaires dans la mitochondrie a permis d'identifier les formes tronquées de PPAR γ 2 et de RXR α dans la matrice mitochondriale. Mt-PPAR est en effet une forme tronquée de la partie C-terminale du récepteur nucléaire PPAR γ 2. Bien que son origine

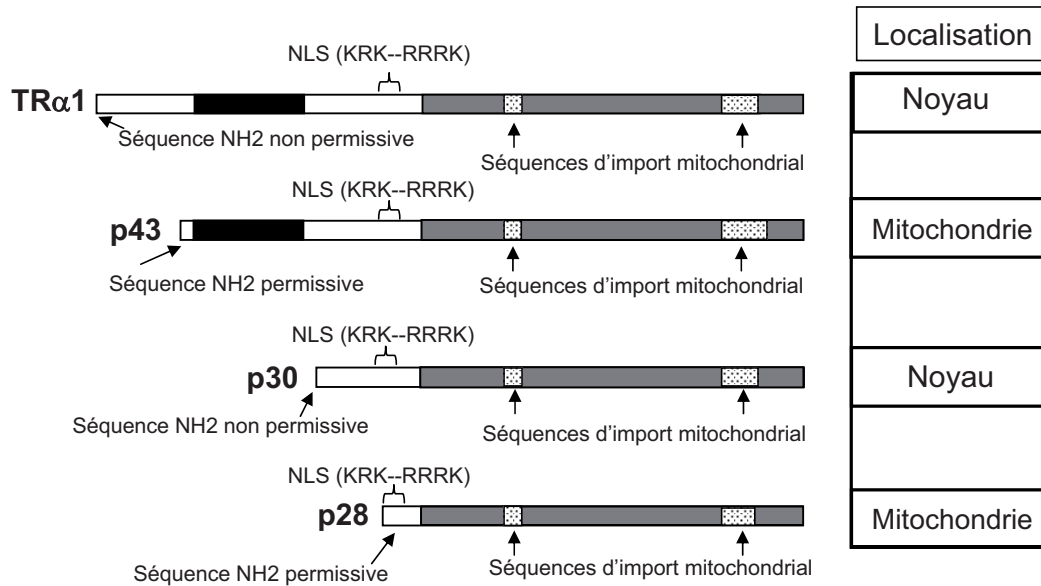


Fig. 2. L'ensemble des protéines codées par le transcrite c-ErbA α 1 possède deux séquences d'import mitochondrial et un signal de localisation nucléaire. La nature de l'extrémité NH2-terminale de chaque protéine, qui permet ou non l'import mitochondrial en fonction de l'absence ou de la présence d'acides aminés chargés négativement, définit la localisation cellulaire de chacune d'entre elles.

moléculaire ne soit pas établie, des expériences de co-immunoprécipitation et de gel-retard ont montré que mt-PPAR s'hétérodimérise avec la p43, et qu'un tel complexe se fixe spécifiquement sur la séquence DR2 présente sur la boucle D du génome mitochondrial (Casas *et al.*, 2000).

Mt-RXR est une forme tronquée de la partie N-terminale du récepteur nucléaire RXR α obtenue après clivage par la m-calpaïne. Seule cette forme tronquée de 44 kDa est importée dans la matrice mitochondriale selon les modalités atypiques décrites pour la p43. Cependant, la forme intégrale de RXR peut également atteindre l'espace intermembranaire de l'organite, où elle est clivée par une enzyme de type calpaïne, avant d'être adressée dans la matrice. Comme son homologue nucléaire, mt-RXR peut agir en facteur de transcription autonome après stimulation par l'acide 9-cis-rétinoïque, ou en hétérodimère avec la p43. Dans ce dernier cas, les tests de gel-retard montrent qu'elle peut se fixer au sein de ce complexe sur l'ensemble des TREs identifiés sur le génome mitochondrial. Les tests de transcription *in organello* établissent également que mt-RXR potentialise l'activité transcriptionnelle de la p43, maximale en présence des deux ligands (Casas *et al.*, 2003).

Ces résultats permettent donc de considérer les gènes TR α et RXR α comme des régulateurs importants de la mitochondriogenèse, *via* l'expression simultanée de récepteurs nucléaires et mitochondriaux susceptibles de stimuler à la fois l'expression de gènes

nucléaires codant des protéines mitochondriales, et l'expression du génome de l'organite (Fig. 2).

Ultérieurement, d'autres membres de la famille des récepteurs nucléaires ont été identifiés dans la mitochondrie : le récepteur des glucocorticoïdes (Demonacos *et al.*, 1996), les récepteurs α et β des oestrogènes (Chen *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004), ou TR3, un récepteur orphelin (Jeong *et al.*, 2003). Cependant, les connaissances les concernant au niveau mitochondrial restent encore très fragmentaires. Il apparaît néanmoins que les mitochondries constituent une cible importante des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires.

De plus, les modalités d'action intra-mitochondriale de ces récepteurs, lorsque celles-ci sont élucidées, semblent très voisines de celles utilisées par leurs homologues nucléaires : fixation à l'ADN sur des séquences spécifiques, formation d'hétérodimères, activité dépendante du ligand. À l'heure actuelle, aucun élément permettant d'établir une interaction de la p43 avec le complexe minimal de transcription mitochondrial n'est disponible. Par contre, la p43 semble interagir avec les complexes enzymatiques mitochondriaux du cycle de l'urée (données non publiées du laboratoire); une telle interaction est susceptible de modifier la conformation de l'ADN sur lequel est fixé le récepteur, et par conséquent l'accessibilité du génome au complexe de transcription. Par ailleurs, les réactions d'acétylation/déacétylation jouent un rôle important au niveau de la transcription

des gènes nucléaires. Or, des données récentes sont susceptibles d'impliquer ces mêmes phénomènes d'acétylation/déacétylation dans la transcription du génome mitochondrial : Tfam, facteur de transcription constitutif du génome de l'organite, est en effet acétylé (Dinardo *et al.*, 2003); de plus, il existe une déacétylase mitochondriale à localisation matricielle, Sirt3, qui régule l'activité de l'organite (Shi *et al.*, 2005).

Conséquences physiologiques de l'activité de ces récepteurs

De toute évidence, la stimulation de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale induite par la p43, associée à la stimulation de la respiration mitochondriale, est impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique. Cependant, l'importance de cette voie d'action ne se résume pas au métabolisme énergétique. En effet, il est actuellement bien établi qu'il existe un véritable dialogue entre l'organite et le noyau, qui permet à la mitochondrie de réguler l'expression de gènes nucléaires impliqués notamment dans la biogenèse mitochondriale, via l'expression du coactivateur transcriptionnel PGC1 α (Poyton & McEwen, 1996; Puigserver, 2005). Cette régulation contrôle notamment l'expression du facteur de transcription mitochondrial Tfam, et de sous-unités de la chaîne respiratoire (Mallon *et al.*, 2007)

Plusieurs voies de signalisation mitochondries-noyau ont été mises en évidence. L'organite est en effet un compartiment important de stockage du calcium, capté en fonction du potentiel de membrane mitochondrial. Il est actuellement bien établi que ces phénomènes de captation et de libération qui fonctionnent de manière indépendante, modifient les *pulses* calciques, et par voie de conséquence l'expression des gènes cibles de la signalisation calcique (Brookes *et al.*, 2004). Par ailleurs, les mitochondries constituent le lieu principal de production des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Hormis l'induction de stress oxydatifs qui surviennent lors d'une accumulation excessive, les ERO constituent des molécules de signalisation qui modulent l'activité de facteurs de transcription tels que NF κ B ou AP-1 (Mazière *et al.*, 1999). Enfin, l'activité mitochondriale modifie les pools d'acides gras qui sont les précurseurs d'agonistes des récepteurs nucléaires PPAR; de plus, les acides gras à chaîne longue influencent la transcription de gènes impliqués dans la régulation glucidique (Gremlich *et al.*, 1997) ou du gène aP2 dans les adipocytes (Ailhaud *et al.*, 1994). Or, des études réalisées sur fibroblastes humains ont permis d'établir que la surexpression de p43 augmente significativement la quantité de EROs intracellulaires (Grandemange

et al., 2005). Par ailleurs, Saelim *et al.* (2005), ont également établi que l'injection de p43 dans l'œuf de xénope augmente la respiration mitochondriale et modifie la signalisation calcique. La voie d'action mitochondriale de la T3 semble donc pouvoir contrôler l'expression d'un certain nombre de gènes nucléaires *via* ces deux types de signalisation.

Parallèlement à l'implication de ces signalisations dans la biogenèse mitochondriale, l'existence d'une régulation par l'organite de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation ou les processus oncogéniques, a été démontrée dans notre laboratoire. Tel est le cas de l'intervention de la p43 dans le développement. La surexpression de ce récepteur mitochondrial dans les myoblastes en culture stimule en effet leur différenciation, en inhibant l'expression de c-Myc (Seyer *et al.*, 2006), un régulateur négatif de la différenciation, et accroît l'expression de calcineurine et de myogénine (Rochard *et al.*, 2000; Seyer *et al.*, en révision) qui potentialisent la différenciation. De plus, elle stimule l'expression des myosines lentes au détriment de celle des myosines rapides, probablement par l'intermédiaire de calcineurine (Seyer *et al.*, en révision). Ces résultats sont d'ailleurs validés sur les souris transgéniques surexprimant la p43 dans le muscle squelettique (Casas *et al.*, en révision). Dans les fibroblastes humains, cette voie d'action contrôle également l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs (inhibition) et d'oncogènes (stimulation), conduisant à l'induction de rhabdomyosarcomes après injection des cellules chez la souris nude (Grandemange *et al.*, 2005).

Existe-t-il une complémentarité entre les voies d'action nucléaire et mitochondriale de la T3 ?

La mise en évidence d'une telle voie d'action et de son importance physiologique soulevait la question de son implication dans les effets physiologiques de la T3, notamment de sa complémentarité avec la voie d'action nucléaire.

Au niveau mitochondrial, comme nous l'avons mentionné ultérieurement, la stimulation simultanée de l'expression de gènes nucléaires codant des protéines de l'organite, *via* les récepteurs nucléaires, et de l'expression du génome mitochondrial, *via* la p43, constitue un élément important impliqué dans la régulation de la mitochondriogenèse (Fig. 3). Cependant, le temps de latence important d'une telle action de la T3, supérieur à 24 heures, suggère que la nécessaire augmentation du nombre de copies de l'ADN de l'organite et des remaniements membranaires intervenant dans ces processus, impliquent des mécanismes indirects efficaces à plus long terme.

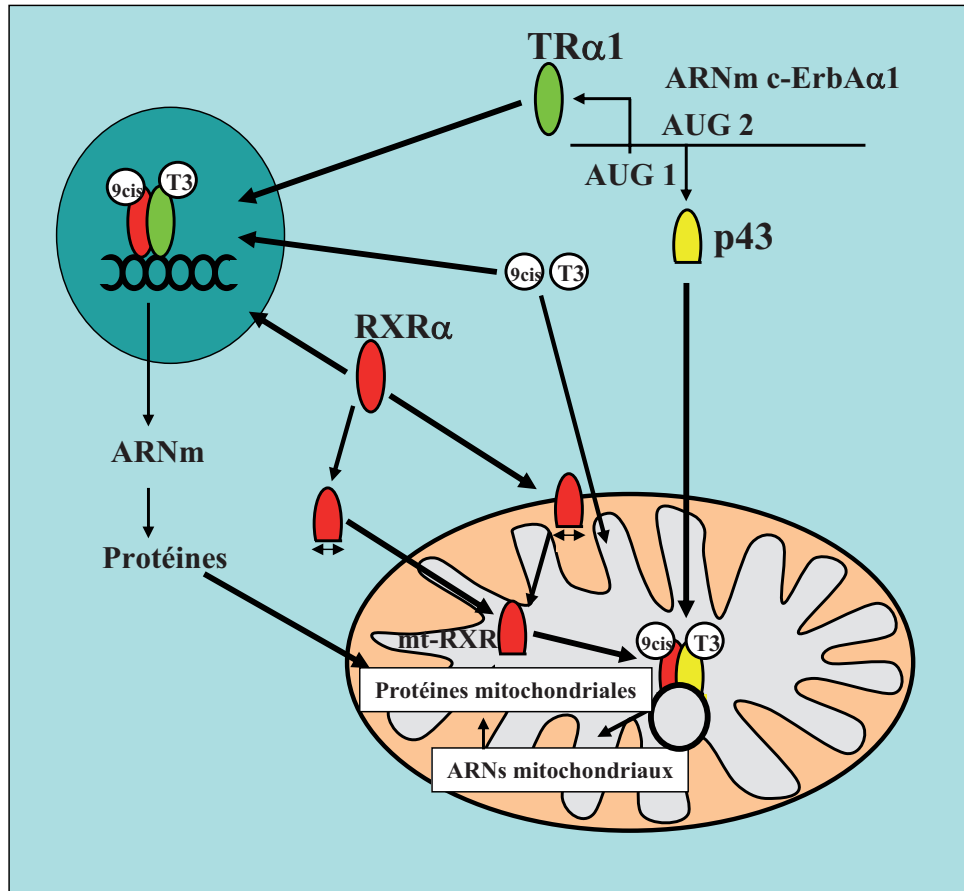


Fig. 3. Les gènes $TR\alpha$ et $RXR\alpha$ pourraient être impliqués dans la coordination de l'expression des gènes nucléaires et mitochondriaux nécessaires aux processus de mitochondriogenèse. Le gène $TR\alpha$ code à la fois un récepteur nucléaire et un récepteur mitochondrial de la T3, qui activent simultanément la transcription au niveau du noyau et de la mitochondrie. Via sa forme intégrale à localisation nucléaire et sa forme clivée à localisation mitochondriale, $RXR\alpha$ pourrait exercer une fonction similaire.

La complémentarité de ces deux voies d'action est également évidente en terme de régulation de la différenciation des myoblastes. En effet, alors que les récepteurs nucléaires de la T3 inhibent l'activité AP-1 (Cassar-Malek *et al.*, 1996), la stimulation de l'activité mitochondriale, via la p43, inhibe l'expression de c-Myc (Seyer *et al.*, 2006), les deux phénomènes induisant la sortie des myoblastes du cycle cellulaire, un élément décisif de la différenciation terminale. De même, chez la souris, les deux voies d'action stimulent l'expression de myogénine, qui joue un rôle clé dans l'induction de la différenciation, et la p43 potentialise l'activité des facteurs myogéniques (Muscat *et al.*, 1994; Rochard *et al.*, 2000). Il est également frappant de constater que chez d'autres espèces, notamment des oiseaux, où les promoteurs de MyoD et myogénine sont dépourvus de TREs, la stimulation de l'expression de myogénine est induite via la p43 (Rochard *et al.*, 2000), démontrant ainsi l'existence de mécanismes al-

ternatifs selon les espèces, impliqués dans la régulation de l'expression de ce facteur myogénique.

Cependant, la voie d'action mitochondriale de la T3 exerce également des influences qui semblent en contradiction avec les effets classiques des hormones thyroïdiennes. Ainsi, la p43 stimule l'expression des myosines de type lent dans les myoblastes (Seyer *et al.* en révision). À l'inverse, il est généralement admis que la T3 favorise l'orientation du phénotype des fibres musculaires vers le type rapide, selon des mécanismes encore mal connus (Ianuzzo *et al.*, 1977). Cependant, des régulations différentes de l'expression des myosines ont été rapportées selon le type de muscle considéré, suggérant que l'équilibre entre ces deux régulations pourrait être à l'origine de ces différences (Izumo *et al.*, 1986).

Ces données permettent donc de conclure que la voie d'action mitochondriale de la T3 peut, dans bien des cas, participer à l'influence de l'hormone

en synergie avec les mécanismes induits par les récepteurs nucléaires. Elle peut cependant s'opposer à d'autres effets physiologiques, créant ainsi une boucle de régulation fine de l'action de la T3.

Conclusions

La mise en évidence de protéines apparentées aux récepteurs nucléaires dans la mitochondrie a ouvert une nouvelle voie de recherche en endocrinologie et la compréhension des mécanismes d'action impliqués semble importante compte tenu des premiers éléments concernant son rôle physiologique. De plus, la caractérisation de formes tronquées de récepteurs nucléaires dans l'organite apporte la démonstration inattendue que les mitochondries constituent une cible importante des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. Ces récepteurs semblent fonctionner dans l'organite selon un mécanisme voisin de celui identifié dans le noyau : hétérodimérisation, fixation sur des séquences spécifiques de l'ADN mitochondrial, activation de la transcription en présence de ligand. Ceci suggère l'existence, au cours de l'évolution, d'une adaptation commune à la présence hormonale de la bactérie initialement phagocytée (la mitochondrie) et de la cellule hôte ancestrale.

Enfin, il s'avère que la voie d'action mitochondriale est parfois complémentaire, parfois contradictoire avec la régulation conférée par les récepteurs nucléaires, introduisant ainsi une finesse de régulation supplémentaire des effets physiologiques de la T3.

Références

- Ailhaud G.P., Abumrad N., Amri E.Z. & Grimaldi P.A., A new look at fatty acids as signal-transducing molecules. *World Rev. Nutr. Diet.*, 1994, 75, 35–45.
- Bergh J.J., Lin H.Y., Lansing L., Mohamed S.N., Davis F.B., Mousa S., Davis P.J., Integrin $\alpha V\beta 3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology*, 2005, 146, 2864–2871.
- Bigler J., Hokanson W. & Eisenman R.N., Thyroid hormone receptor transcriptional activity is potentially autoregulated by truncated forms of the receptor. *Mol. Cell Biol.*, 1992, 12, 2406–2417.
- Biswas T.K. & Getz G.S., Import of yeast mitochondrial transcription factor (Mtf1p) via a nonconventional pathway. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 45704–45714.
- Brookes P.S., Yoon Y., Robotham J.L., Anders M.W. & Sheu S.S., Calcium, ATP, and ROS : a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2004, 287, C817–C833.
- Casanova J., Horowitz Z.D., Copp R.P., McIntyre W.L., Pascual A. & Samuels H.H., Photaffinity labeling of thyroid hormone nuclear receptors : influence of n-butyrate and analysis of the half-lives of the 47000 and 57000 molecular weight receptors forms. *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 12084–12091.
- Casas F., Daury L., Grandemange S., Busson M., Seyer P., Hatier R., Carazo A., Cabello G. & Wrutniak-Cabello C., Endocrine regulation of mitochondrial activity : involvement of Truncated RXR α and c-Erb A $\alpha 1$ protein. *FASEB J.*, 2003, 17, 426–436.
- Casas F., Domenjoud L., Rochard P., Hatier R., Rodier A., Daury L., Bianchi A., Kremarik-Bouillaud P., Becuwe P., Keller J.M., Schohn H., Wrutniak-Cabello C., Cabello G. & Dauça M., A 45 KDa protein related to PPAR $\gamma 2$, induced by peroxisome proliferators, is located in the mitochondrial matrix. *FEBS Letters*, 2000, 478, 4–8.
- Casas F., Rochard P., Rodier A., Cassar-Malek I., Marchal-Victorion S., Wiesner R.J., Cabello G. & Wrutniak C., A variant form of the nuclear T3 receptor c-Erb A $\alpha 1$ plays a direct role in regulation of mitochondrial RNA synthesis. *Mol. Cell Biol.*, 2004, 19, 7913–7924.
- Cassar-Malek I., Marchal S., Rochard P., Casas F., Wrutniak C., Samarut J. & Cabello G., Induction of c-Erb A-AP1 interactions and c-Erb A transcriptional activity in myoblasts by RXR. Consequences for muscle differentiation. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 11392–11399.
- Chassande O., Do unliganded thyroid hormone receptors have physiological functions? *J. Mol. Endocrinol.*, 2003, 31, 9–20.
- Chen J.Q., Delannoy M., Cooke C. & Yager J.D., Mitochondrial localization of ER α and ER β in human MCF7 cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2004, 286, E1011–E1022.
- Davis P.J., Shih A., Lin H.Y., Martino L.J. & Davis F.B., Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 38032–38039.
- Demonacos C.V., Karayanni N., Hatzoglou E., Tsiroyiotis C., Spandidos D.A. & Sekeris C.E., Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones. *Steroids*, 1996, 61, 226–232.
- Dinardo M.M., Musicco C., Fracasso F., Milella F., Gadaleta M.N. & Gadaleta G., Acetylation and level of mitochondrial transcription factor A in several organs of young and old rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 301, 187–191.
- Enriquez J.A., Fernandez-Silva P., Garrido-Perez N., Lopez-Perez M.J., Perez-Martos A. & Montoya J., Direct régulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone. *Mol. Cell Biol.*, 1999, 19, 657–670.
- Grandemange S., Seyer P., Carazo A., Becuwe P., Pesseme L., Busson M., Marsac C., Roger P., Casas F., Cabello G. & Wrutniak-Cabello C., Stimulation of mitochondrial activity by p43 overexpression induces

- human dermal fibroblast transformation. *Cancer Res.*, 2005, 65, 4282–4291.
- Gremlich S., Bonny C., Waeber G. & Thorens B., Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 30261–30269.
- Gustafsson R., Tata JR, Lindberg O. & Ernster L., The relationship between the structure and activity of rat skeletal muscle mitochondria after thyroidectomy and thyroid treatment. *J. Cell Biol.*, 1965, 26, 555–578.
- Ianuzzo D., Patel P., Chen V., O'Brien P. & Williams C., Thyroidal trophic influence on skeletal muscle myosin. *Nature*, 1977, 270, 74–76.
- Izumo S., Nadal-Ginard B. & Madhavi V., All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in highly tissue-specific manner. *Science*, 1986, 231, 597–600.
- Jakovilic S., Swift HH, Gross NJ & Rabinowitz R., Biochemical and stereological analysis of rat liver mitochondria in different thyroid states. *J. Cell Biol.*, 1978, 77, 887–901.
- Jeong J.H., Park J.S., Moon B., Kim M.C., Kim J.K., Lee S., Suh H., Kim N.D., Kim J.M., Park Y.C. & Yoo Y.H., Orphan nuclear receptor Nur77 translocates to mitochondria in the early phase of apoptosis induced by synthetic chenodeoxycholic acid derivatives in human stomach cancer cell line SNU-1. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2003, 1010, 171–177.
- Mallon P.W., Unemori P., Sedwell R., Morey A., Rafferty M., Williams K., Chisholm D., Samaras K., Emery S., Kelleher A., Cooper D.A., Carr A. & SAMA Investigators., In vivo, nucleoside reverse-transcriptase inhibitors alter expression of both mitochondrial and lipid metabolism genes in the absence of depletion of mitochondrial DNA. *J. Infect. Dis.*, 2005, 191, 1686–1696.
- Martino G., Covello C., De Giovanni R., Rilipelli R. & Pitrelli G., Direct in vitro action of thyroid hormones on mitochondrial RNA-polymerase. *Mol. Biol. Repr.*, 1986, 11, 205–211.
- Maziere C., Conte M.A., Degonville J., Ali D. & Maziere J.C., Cellular enrichment with polyunsaturated fatty acids induces an oxidative stress and activates the transcription factors AP1 and NFkappaB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 265, 116–122.
- Morel G., Ricard-Blum S. & Ardail D., Kinetics of internalization and subcellular binding sites for T3 in mouse liver. *Biol. Cell.*, 1996, 86, 167–174.
- Muscat G.E., Mynett-Johnson L., Dowhan D., Downes M., Griggs R., Activation of myoD gene transcription by 3,5,3'-triiodo-L-thyronine : a direct role for the thyroid hormone and retinoid X receptors. *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22, 583–591.
- Mutvei A., Husman B., Andersson G. & Neslon B.D., Control of mitochondrial transcription by thyroid hormone. *Eur. J. Biochem.*, 1989, 180, 235–240.
- Pfanner N. & Geissler A., Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2001, 2, 339–349.
- Poyton R.O. & McEwen J.E., Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu. Rev. Biochem.*, 1996, 65, 563–607.
- Puigserver P., Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha. *Int. J. Obes. (Lond)*, 2005, 29 (Suppl 1), S5–S9.
- Rochard P., Rodier A., Casas F., Cassar-Malek I., Marchal-Victorion S., Daury Y. L., Wrutniak C. & Cabello G., Mitochondrial activity is involved in the regulation of myoblast differentiation through myogenin expression and myogenic factors activity. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 2733–2744.
- Saelim N., John L.M., Wu J., Park J.S., Bai Y., Camacho P. & Lechleiter J.D., Nontranscriptional modulation of intracellular Ca²⁺ signaling by ligand stimulated thyroid hormone receptor. *J. Cell Biol.*, 2004, 167, 915–924.
- Sap J., Munoz A., Damm K., Goldberg Y., Ghysdael J., leutz A., Beug H. & Vennström B., The c-erb A protein is a high affinity receptor for thyroid hormones. *Nature*, 1996, 324, 242–244.
- Seelig S., Liaw C., Towle H.C. & Oppenheimer J.H., Thyroid hormone attenuates and augments hepatic gene expression at a pretranslational level. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 4733–4737.
- Segal J., Adrenergic inhibition of the stimulatory effect of 3, 5, 3'-triiodothyronine on calcium accumulation and cytoplasmic free calcium concentration in rat thymocytes. Further evidence in support of the concept that calcium serves as the first messenger for the prompt action of thyroid hormone. *Endocrinology*, 1988, 122, 2240–2246.
- Seyer P., Grandemange S., Busson M., Carazo A., Gamaleri F., Pessemesse L., Casas F., Cabello G. & Wrutniak-Cabello C., Mitochondrial activity regulates myoblast differentiation by control of c-Myc expression. *J. Cell Physiol.*, 2006, 207, 75–86.
- Shi T., Wang F., Stieren E. & Tong Q., SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 13560–13567.
- Shih A., Lin H.Y., Davis F.B. & Davis P.J., Thyroid hormone promotes serine phosphorylation of p53 by mitogen-activated protein kinase. *Biochemistry*, 2001, 40, 2870–2878.
- Sterling K. & Milch P.O., Thyroid hormone binding by a component of mitochondrial membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, 3225–3229.
- Sterling K., Brenner M.A. & Sakurada T., Rapid effect of triiodothyronine on the mitochondrial pathway in rat liver in vivo. *Science*, 1980, 210, 340–343.
- Sterling K., Campbell G.A., Taliadourous G.S. & Nunez E.A., Mitochondrial binding of triiodothyronine (T3). Démonstration by electron-microscopic radioautography of dispersed liver cells. *Cell Tissue Res.*, 1984, 236, 321–325.
- Tang H.Y., Lin H.Y., Zhang S., Davis F.B. & Davis P.J., Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear

- estrogen receptor. *Endocrinology*, 2004, 145, 3265–3272.
- Tata J.R., Ernster L., Lindberg O., Arrhenius E., Pedersen S. & Herman R., The action of thyroid hormones at the cell level. *Biochem. J.*, 1963, 86, 408–428.
- Weinberger C. Thompson C.C., Ong E.S., Lebo R., Gruol D.J. & Evans R.M., The c-erb A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature*, 1996, 324, 641–646.
- Wiesner R.J., Kurowski T.T. & Zak R., Regulation by thyroid hormone of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of cytochrome-c oxidase in rat liver and skeletal muscle. *Mol. Endocrinol.*, 1992, 6, 1458–1467.
- Wrutniak C., Rochard P., Casas F., Fraysse A., Charrier J. & Cabello G., Physiological importance of the T3 mitochondrial pathway. *Ann. Acad. Sci. New-York*, 1998, 839, 93–100.
- Wrutniak C., Cassar-Malek I., Marchal S., Rascle A., Heusser S., Keller J.M., Fléchon J., Dauça M., Samarut J., Ghysdael J. & Cabello G., A 43 kDa protein related to c-erb A α 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270, 16347–16354.
- Yang S.H., Liu R., Perez E.J., Wen Y., Stevens S.M. Jr, Valencia T., Brun-Zinkernagel A.M., Prokai L., Will Y., Dykens J., Koulen P. & Simpkins J.W., Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, 4130–4135.