



HAL
open science

Caractérisation de l'expression et de la fonction du facteur de transcription Nrf3 dans les cellules humaines

Benoît Chénais

► **To cite this version:**

Benoît Chénais. Caractérisation de l'expression et de la fonction du facteur de transcription Nrf3 dans les cellules humaines. 2003. hal-00422895

HAL Id: hal-00422895

<https://hal.science/hal-00422895>

Preprint submitted on 8 Oct 2009

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.

Dr Benoît Chénais

mars 2003

Unité MéDIAN, UMR-6142
CNRS-Université de Reims
UFR Pharmacie
51, rue Cognacq-Jay
51096 Reims cedex

Echange INSERM/IRSC

RAPPORT D'ACTIVITE

**Caractérisation de l'expression et de la fonction du facteur de
transcription Nrf3 dans les cellules humaines**

Equipe d'accueil :

Dr. Volker BLANK

Institut Lady Davis pour la recherche Médicale

Montréal, Québec, Canada.

Caractérisation de l'expression et de la fonction du facteur de transcription Nrf3 dans les cellules humaines

INTRODUCTION

Nrf3 appartient à la famille des protéines « cap'n'collar » (cnc) qui sont des facteurs de transcription de type « basic leucine zipper » (bZIP). La structure typique de ces protéines comprend un domaine d'activation N-terminal, une région basique importante pour la liaison à l'ADN, la fermeture à leucine responsable de la dimérisation avec les petites protéines Maf et le domaine cnc commun à toutes les protéines de la famille. Les protéines cnc forment des dimères avec les petites protéines Maf (MafF, MafG, MafK) pour se lier à l'ADN au niveau de sites de type MARE tels que le site de liaison du facteur NF-E2 [Blank and Andrews, 1997 ; Motohashi *et al.*, 2002]

Les protéines cnc sont impliquées dans le développement des organismes tels que la drosophile où le gène cnc gouverne la morphogenèse de la tête, et le nématode *C. elegans* où la protéine skn-1 est impliquée dans l'embryogenèse précoce. Chez les mammifères, la protéine p45 est importante pour la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire, Nrf1 joue un rôle dans l'embryogenèse et la réponse au stress, Nrf2 est également impliquée dans l'induction des gènes de réponse au stress oxydant, mais la fonction de Nrf3 reste à ce jour inconnue. Bach1 et Bach2 sont deux autres protéines cnc plus distantes qui jouent un rôle dans le métabolisme de l'hème et la différenciation des cellules B et des neurones [voir Motohashi *et al.*, 2002 pour revue].

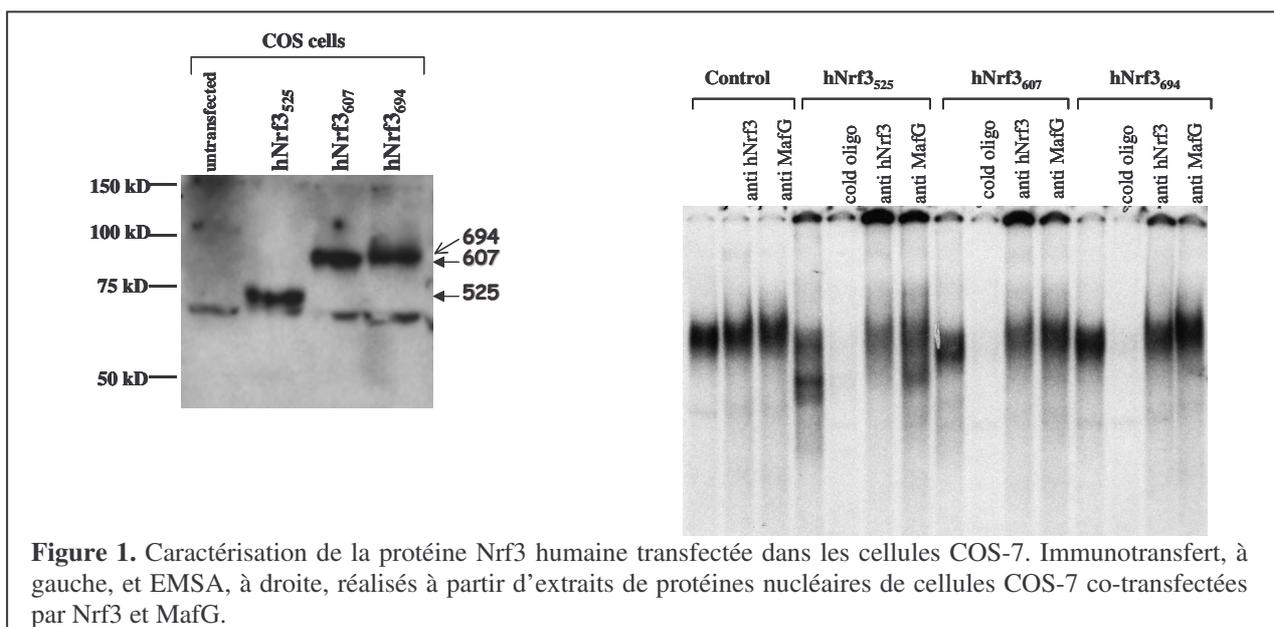
La première séquence, murine, de Nrf3 a été publiée en 1999 par Kobayashi *et al.* et code pour une protéine de 660 acides aminés. Dans le même article les auteurs décrivent une séquence humaine codant pour une protéine de 400 acides aminés, tronquée dans sa région N-terminale. En parallèle, Volker Blank, alors à Boston, a utilisé un système de criblage en double hybride avec une banque d'ADN de placenta humain et la protéine MafG comme hameçon. De cette façon il a isolé une séquence codant pour une protéine de 525 acides aminés, homologue à Nrf3. En utilisant la technique de RT-PCR il a pu compléter la région N-terminale et obtenir une séquence entière codant pour une protéine Nrf3 de 694 acides aminés. Après le clonage, notre projet était de caractériser la protéine Nrf3 humaine, son expression et sa fonction, en particulier dans les cellules de placenta humain.

RESULTATS

1. Caractérisation de la protéine Nrf3 humaine dans un système hétérologue

Afin de caractériser la protéine Nrf3 humaine l'équipe du Dr Volker Blank a développé deux anticorps. Le premier antisérum a été obtenu contre une protéine chimère résultant de la fusion de Nrf3 avec la GST, le second est un anticorps anti-peptide, le peptide antigénique ayant été choisi dans la région la plus spécifique de Nrf3.

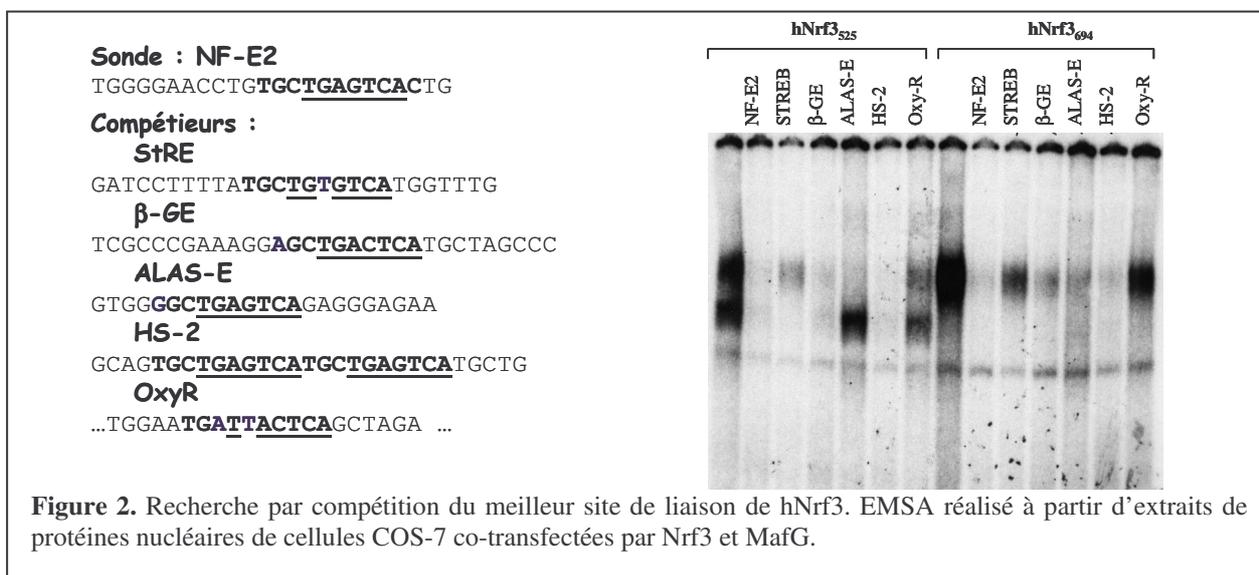
Nous avons utilisé ces anticorps pour des expériences d'immunotransfert avec des extraits de protéines issus de cellules COS-7 transfectés avec l'ADN de Nrf3 en différentes longueurs. Ainsi la forme tronquée de 525 acides aminés migre avec un poids moléculaire apparent d'environ 72 kD, la forme intermédiaire de 607 acides aminés migre à environ 90 kD et la forme entière de 694 acides aminés apparaît juste en dessous de 100 kD (Fig. 1). L'utilisation du sérum pré-immun et des expériences de compétition avec le peptide antigénique ont permis de confirmer la spécificité de notre anticorps.



De façon à montrer la capacité de Nrf3 à lier l'ADN, nous avons co-transfecté des cellules COS-7 avec Nrf3 et MafG. Des expériences de retard de migration électrophorétique (EMSA) ont ensuite été réalisées avec les extraits de protéines nucléaires et la séquence d'ADN du site de liaison NF-E2 comme sonde radiomarquée. Nous avons observé une bande retardée dans les extraits de cellules non-transfectées, qui correspond vraisemblablement à la liaison de facteurs du type AP-1. Lorsque les cellules ont été transfectées avec Nrf3₅₂₅ et MafG, une bande spécifique apparaît. Celle-ci disparaît en présence d'anticorps dirigés contre Nrf3 ou

MafG (Fig. 1) mais pas avec des anticorps dirigés contre d'autres protéines cnc (p45, Nrf2, Nrf1) ou un facteur de transcription différent (ATF4). Dans les extraits de cellules transfectées avec Nrf3₆₀₇ et MafG, le complexe migre plus lentement et la bande apparaît juste sous le complexe de type AP-1. A nouveau cette bande spécifique disparaît en présence d'anticorps dirigés contre Nrf3 ou MafG (Fig. 1). Enfin, lorsque les cellules ont été transfectées par la forme entière de Nrf3, Nrf3₆₉₄, le complexe retardé est plus difficile à mettre en évidence car il migre au même niveau que le complexe de type AP-1. Néanmoins, il peut être spécifiquement déplacé en présence d'anticorps dirigés contre Nrf3 ou MafG (Fig. 1). De plus, nous avons montré que la protéine Nrf3 humaine, au moins dans sa forme tronquée (Nrf3₅₂₅), peut former des dimères et lier l'ADN avec les 3 petites protéines Maf : MafF, MafG et MafK.

Afin de trouver le meilleur site de liaison pour Nrf3 nous avons employé différentes séquences de type MARE comme compétiteurs du site NF-E2, utilisé comme sonde. Ces différentes séquences diffèrent entre-elles par des changements mineurs de un ou deux nucléotides. Les résultats montrent que la séquence dérivée du promoteur du gène codant le récepteur à l'ocytocine (oxyR), qui est la plus différente avec deux bases changées, n'est pas un bon compétiteur de la liaison de Nrf3₅₂₅ ou Nrf3₆₉₄ avec le site NF-E2. La séquence provenant du promoteur de l'ALAS n'est pas efficace dans le cas de Nrf3₅₂₅ mais l'est pour Nrf3₆₉₄. A l'inverse, la séquence de réponse au stress (StRE) semble pouvoir lier Nrf3₅₂₅, mais pas, ou peu, Nrf3₆₉₄. Les séquences NF-E2 simple, comme dans la région enhancer du gène de β -globine de poulet (β -GE), ou répétées en tandem, comme dans le site hypersensible-2 du gène de globine (HS-2), apparaissent comme les meilleurs candidats pour la liaison de Nrf3.



En résumé, nous avons établi la possibilité d'étudier la protéine Nrf3 humaine grâce à nos anticorps, et nous avons montré que Nrf3 peut former des hétérodimères avec les petites protéines Maf et se lier à l'ADN sur des séquences de type MARE/NF-E2.

2. Expression endogène de Nrf3 dans les tissus humains

2.1 Expression de Nrf3 dans le placenta et les lignées de choriocarcinomes

Nrf3 est exprimé de façon endogène dans divers tissus humains tels que le cœur, le cerveau, le poumon, ou le thymus et plus particulièrement dans le placenta [Blank et coll., observations non publiées ; Kobayashi *et al.*, 1999]. Ceci nous a poussé à étudier de façon plus détaillée l'expression de Nrf3 dans ce tissu. Le placenta, à l'interface entre la mère et le fœtus, est composé de plusieurs types cellulaires dont les cytotrophoblastes qui sont des cellules fœtales très importantes pour établir la connexion entre la circulation fœtale et la circulation maternelle.

Grâce à une collaboration avec le laboratoire du Dr Susan Fisher de l'Université de Californie à San Francisco, nous avons obtenu des échantillons de placenta humain à différentes étapes de la gestation. De façon intéressante, nous avons observé par la technique de « northern blot » que l'expression de Nrf3 est plus forte au début de la gestation et décroît à terme (Fig. 3). Afin de préciser dans quelles cellules du placenta Nrf3 est exprimé, les différents types cellulaires ont été dissociés. Ainsi, nous avons trouvé que l'expression de Nrf3 est restreinte aux cytotrophoblastes et, en particulier, que Nrf3 n'est pas exprimé dans les fibroblastes placentaires (Fig. 3). Ces résultats suggèrent que Nrf3 puisse avoir une fonction dans le placenta humain.

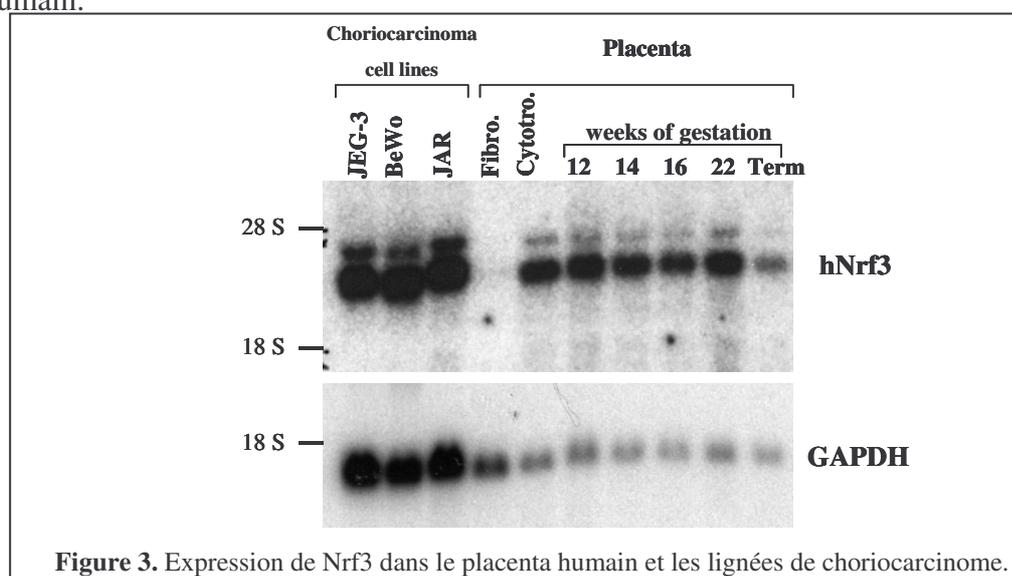


Figure 3. Expression de Nrf3 dans le placenta humain et les lignées de choriocarcinome.

Par ailleurs, nous avons observé que Nrf3 est très fortement exprimé dans les lignées de choriocarcinomes (JAR, JEG-3 et BeWo), qui sont dérivées de tumeurs trophoblastiques (Fig. 3).

Afin de caractériser la protéine Nrf3 humaine, nous avons utilisé ces lignées de choriocarcinome comme source de protéine Nrf3 endogène. Par la technique d'immunotransfert la protéine Nrf3 endogène est apparue avec un poids moléculaire apparent d'environ 120 kD (Fig. 4). Ce poids moléculaire plus important que celui de la protéine Nrf3₆₉₄ transfectée dans les cellules COS-7 peut s'expliquer soit par un phénomène de dégradation de Nrf3 dans les cellules COS-7, soit par une modification post-traductionnelle spécifique de la protéine endogène dans les cellules de choriocarcinome.

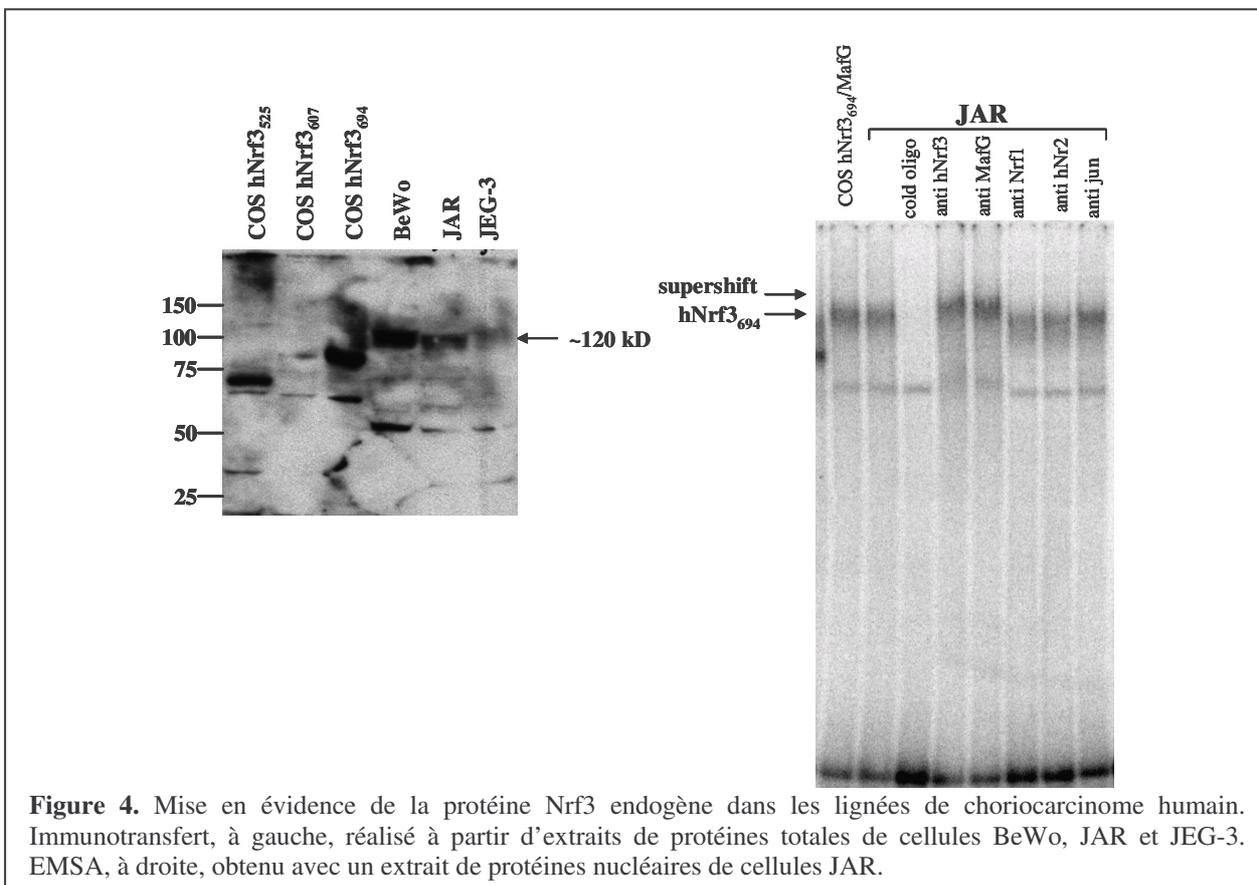


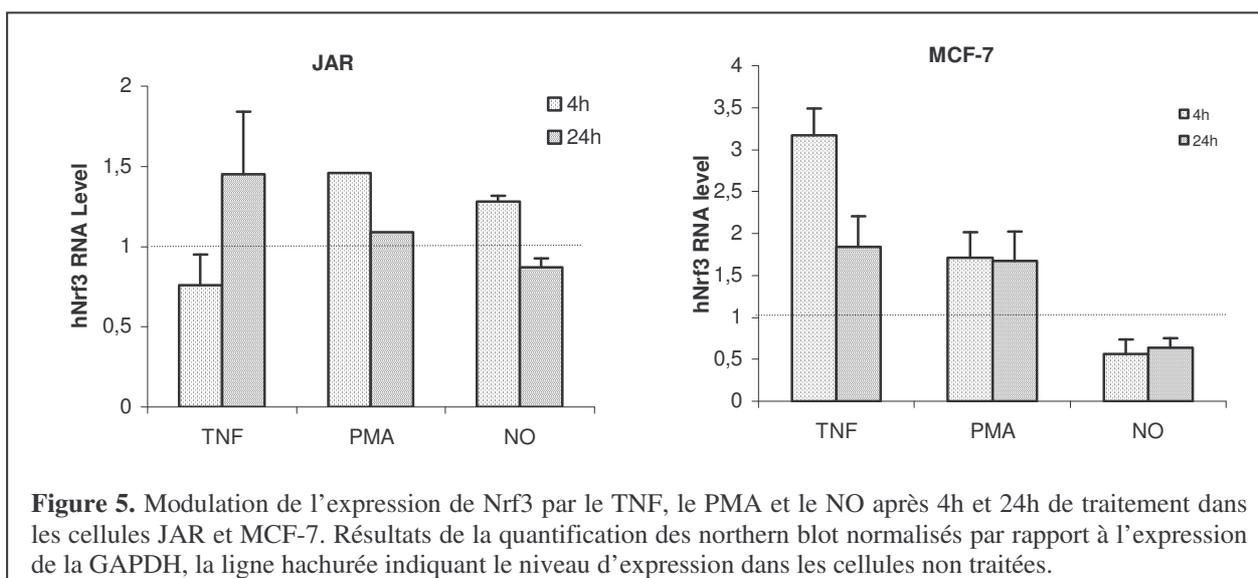
Figure 4. Mise en évidence de la protéine Nrf3 endogène dans les lignées de choriocarcinome humain. Immunotransfert, à gauche, réalisé à partir d'extraits de protéines totales de cellules BeWo, JAR et JEG-3. EMSA, à droite, obtenu avec un extrait de protéines nucléaires de cellules JAR.

Nous avons ensuite montré par EMSA que la protéine Nrf3 endogène peut lier l'ADN, au moins le site NF-E2 utilisé comme sonde. Le complexe retardé peut être déplacé spécifiquement en présence d'anticorps anti-Nrf3 ou anti-MafG, mais pas par des anticorps anti-Nrf1, Nrf2, ou jun (Fig. 4). Ces résultats importants indiquent que la protéine Nrf3 endogène se lie à l'ADN après dimérisation avec MafG.

2.2 Stimulation de l'expression de Nrf3 par le TNF dans divers lignées tumorales humaines

Les esters de phorbol, comme le PMA, sont connus pour être des modulateurs de la prolifération et de la différenciation des cellules de choriocarcinome [Hohn *et al.*, 1998]. Le TNF est présent au niveau du placenta et semble important pour la biologie des trophoplastes au début de la gestation [Argiles *et al.*, 1997]. Le monoxyde d'azote (NO) est lui aussi produit dans le placenta, en particulier au niveau des cytotrophoblastes [Sanyal *et al.*, 2000]. C'est pourquoi nous avons recherché l'effet de ces effecteurs sur l'expression de Nrf3.

Dans la lignée de choriocarcinome JAR, le PMA et le TNF provoquent une légère stimulation de l'expression de Nrf3 après 4h de traitement pour le PMA ou 24h pour le TNF (Fig. 5). Nous avons également recherché l'expression de Nrf3 dans d'autres types cellulaires comme la lignée de cancer du sein MCF-7. Dans les cellules non traitées, Nrf3 est pratiquement indétectable. Par contre son expression est induite en présence de PMA ou de TNF après 4h de traitement. En revanche, NO n'a pas d'effet majeur sur l'expression de Nrf3 dans ces deux lignées tumorales (Fig. 5).



La stimulation de l'expression de Nrf3 par le TNF a été retrouvée dans les autres lignées de choriocarcinome JEG-3 et BeWo ainsi que dans la leucémie aiguë lymphoblastique Jurkat et dans la lignée d'ostéosarcome MG-63. Cet effet du TNF semble spécifique puisque l'expression de Nrf2, un autre facteur cnc, reste inchangée dans ces mêmes cellules.

L'effet stimulateur du TNF a été retrouvé au niveau du taux de protéine Nrf3, au moins dans les lignées de choriocarcinome (Fig. 6). L'augmentation du taux de protéine Nrf3 est corrélée avec une légère augmentation de la liaison à l'ADN (Fig. 6). Il est important de noter que si

cette augmentation de l'expression de Nrf3 est modérée dans les cellules de choriocarcinome (environ 1,5 fois) elle est reproductible.

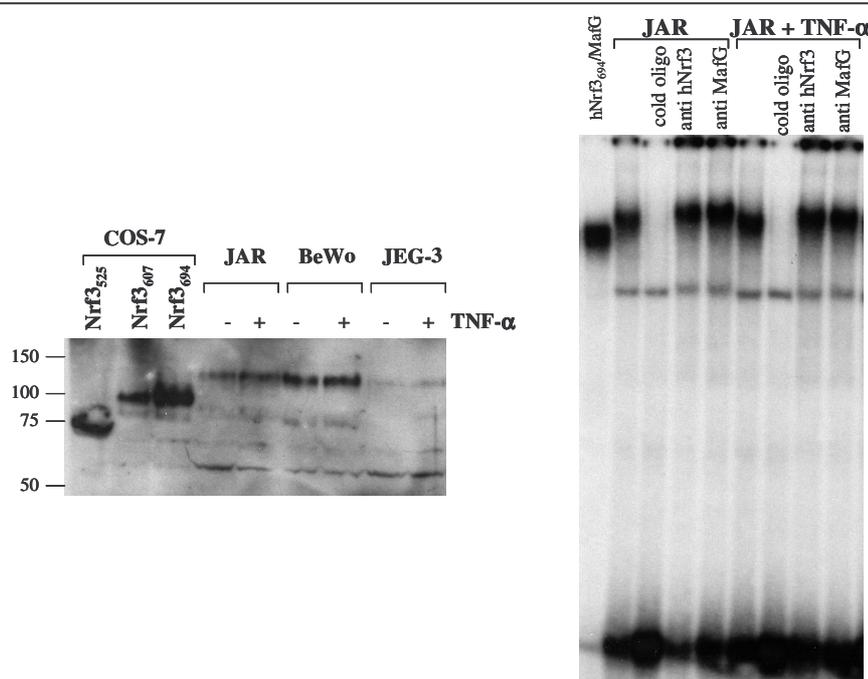
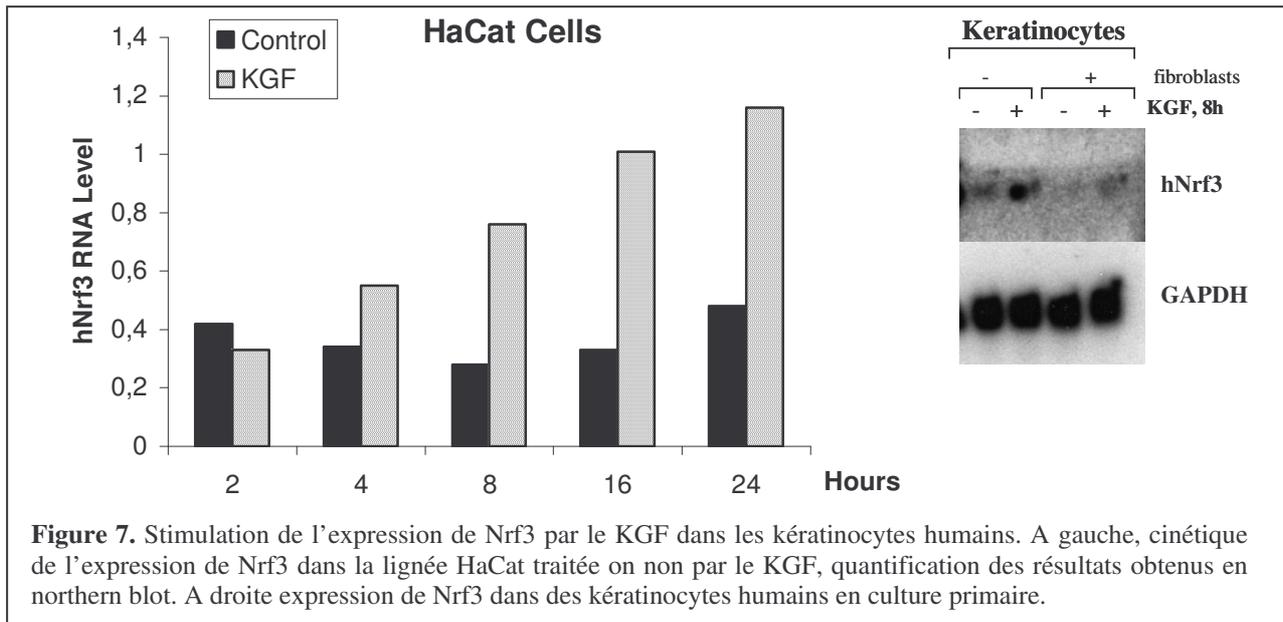


Figure 6. Stimulation de l'expression et de la liaison à l'ADN de la protéine Nrf3 endogène. Immunotransfert, à gauche, réalisé à partir d'extraits de protéines totales de cellules JAR, BeWo et JEG-3 traitées ou non par le TNF pendant 24h. EMSA, à droite, obtenu avec des extrait de protéines nucléaires de cellules JAR traitées ou non par le TNF pendant 24h.

Dans les cellules n'exprimant pas ou très peu Nrf3 au départ comme les cellules MCF-7 ou Jurkat, la stimulation de l'expression par le TNF est plus forte : environ 3 fois au niveau ARN. Bien que la protéine Nrf3 n'ai pas pu être détectée par immunotransfert dans ces cellules, la stimulation de la liaison à l'ADN est également plus importante.

2.3 Expression de Nrf3 dans les kératinocytes humains

Un article récent a montré que Nrf2, et peut-être Nrf3, pourraient être impliqués dans la cicatrisation des blessures dans un modèle murin [Braun *et al.*, 2002]. Les auteurs ont également décrit que l'expression de Nrf3 était inductible par le KGF dans une lignée de kératinocytes humains. Nous avons confirmé ce résultat et montré que le KGF induit l'expression de Nrf3 dans la lignée HaCat de façon dépendante du temps et avec une stimulation maximale de 3 fois après 16h de traitement (Fig. 7). De plus, nous avons montré que le KGF induit l'expression de Nrf3 dans des kératinocytes humain en culture primaire, en présence ou non de fibroblastes (Fig. 7).



En résumé, nous avons montré que Nrf3 est fortement exprimé dans les cytotrophoblastes au début de la grossesse et dans les cellules de choriocarcinome. Nous avons également montré que la protéine Nrf3 endogène forme un dimère avec MafG et se lie à l'ADN sur les sites MARE/NF-E2. Enfin, nos résultats indiquent que l'expression de Nrf3 est stimulée par le TNF dans différents types cellulaires et par le KGF dans les kératinocytes humains.

3. Clonage du promoteur du gène de Nrf3

Afin d'obtenir une explication pour la stimulation de l'expression de Nrf3 par le TNF, nous avons analysé la région promotrice du gène Nrf3 humain. Comme cela est courant, nous avons trouvé de nombreux sites consensus pour plusieurs facteurs de transcription. De façon intéressante il existe un site NF- κ B, un élément de réponse aux antioxydants (ARE) et un élément de réponse à l'AMPc (CRE). Ceci suggère une possible autorégulation du gène Nrf3 par lui-même ou par un autre dimère cnc/Maf.

Nous avons obtenu le clone BAC contenant le gène Nrf3 et cloné par PCR le fragment correspondant au promoteur présumé. Ce fragment a ensuite été inséré dans des vecteurs rapporteurs de type pGL3 contenant le gène de la luciférase. Les constructions ont ensuite été transfectées dans des cellules JAR ou MCF-7. Le résultat préliminaire d'une première expérience semble indiquer que cette séquence promotrice est bien inductible par le TNF. Néanmoins d'autres expériences sont nécessaires afin de confirmer ce résultat et de tirer une conclusion définitive.

4. Recherche des gènes cibles de Nrf3

4.1 approches antisens et interférence d'ARN

Les gènes cibles de Nrf3 étant totalement inconnus nous avons entrepris de les rechercher par analyse d'expression différentielle sur puce à ADN à partir de cellules dans lesquelles l'expression de Nrf3 aurait été bloquée ou, au contraire, forcée. Pour cela nous avons cloné l'ADNc de Nrf3 en position sens et antisens dans un vecteur d'expression pEF1 α neo. Les constructions obtenues ont été transfectées dans des cellules de choriocarcinome JAR et des clones stables ont été sélectionnés en présence de l'antibiotique G418. De cette façon 32 clones résistant au G418 ont pu être obtenus mais soit l'expression de Nrf3 ne s'est pas trouvée changée, soit les clones n'ont pas pu être maintenus en culture.

Cette première approche s'étant révélée infructueuse nous nous sommes tourné vers la technique d'interférence d'ARN utilisant de petits ARN doubles brins (siRNA) spécifiques d'un gène donné et capables d'en bloquer l'expression. Nous avons sélectionnés quatre séquences siRNA spécifiques de Nrf3 humain et tenté de les transfecter dans les cellules JAR. Malheureusement le résultat de la première expérience s'est révélé négatif. Il est probable que les conditions de transfection (agent utilisé, concentration, temps de traitement) n'étaient pas optimales puisque même la transfection du siRNA contrôle dirigé contre la GAPDH n'a pas été efficace. De nouvelles expériences doivent donc être réalisées.

4.2 souris déficientes en Nrf3

En parallèle, l'analyse de souris déficientes en Nrf3 établies par Volker Blank n'a pas permis de tirer de conclusion. En effet ces animaux ne présentent pas de phénotype particulier et se comportent de la même façon que les animaux contrôles face à un stress (absorption d'acétaminophène) ou une infection virale. Par ailleurs, l'étude sur puce à ADN de l'expression des gènes a révélé que quelques gènes voient leur expression augmentée ou diminuée dans les souris déficientes en Nrf3. Néanmoins ces gènes sont, pour la plupart, situés sur le même chromosome que Nrf3 et il est possible que le résultat observé soit le fait d'une interférence avec la cassette néomycine intégrée dans le génome murin à la place du gène Nrf3. L'élimination de cette cassette est maintenant en cours de réalisation.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons donc montré que Nrf3 est fortement exprimé dans les cytotrophoblastes de placenta humain à un stade précoce de la gestation correspondant à l'acquisition par ces cellules d'un phénotype invasif. De même, Nrf3 est exprimé dans les lignées de choriocarcinome, tumeurs dérivées des trophoblastes et connues pour leur potentiel invasif. Dans les cellules de choriocarcinome, nous avons mis en évidence la protéine Nrf3 et montré qu'elle pouvait se lier à l'ADN sous forme de dimère avec MafG. Dans un système hétérologue, nous avons déterminé que la liaison de Nrf3 à l'ADN était spécifique des séquences de type NF-E2 et que Nrf3 pouvait s'associer aussi bien avec MafG que MafF.

Par ailleurs, nous avons montré que l'expression de Nrf3 est inductible, en particulier par le TNF, dans les lignées de choriocarcinome et, surtout, dans des lignées d'origine tissulaire diverse dans lesquelles Nrf3 n'est pas ou peu exprimé en absence de traitement. Ceci nous a conduit à commencer l'analyse du promoteur du gène NRF3, étude que nous continuerons dans le cadre d'une collaboration entre nos deux équipes. La recherche, pour l'instant infructueuse, des gènes cibles et de la fonction de Nrf3 sera également poursuivie, en particulier par l'utilisation des siRNA dans une approche globale, par l'étude de l'expression différentielle des gènes sur puce à ADN, et dans une perspective plus ciblée en analysant la répercussion de l'inhibition de Nrf3 sur l'expression des métalloprotéases et la sensibilité à l'apoptose.

En terme de publication, un article est actuellement en cours de rédaction qui reprend les observations réalisées dans le système hétérologue COS et dans le placenta humain, y compris les lignées de choriocarcinome.

BIBLIOGRAPHIE

Argiles JM, Carbó N and López-Soriano FJ (1997) *Cytokines Growth Factor Rev.* 8:181-188.

Braun S *et al.* (2002) *Mol. Cell. Biol.* 22:5492-5505.

Blank V and Andrews NC (1997) *Trends Biochem. Sci.* 22:437-441.

Hohn HP *et al.* (1998) *Exp. Cell. Res.* 244:249-58.

Kobayashi A *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274:6443-52.

Motohashi H *et al.* (2002) *Gene* 294:1-12.

Sanyal M, Nag TC and Das C (2000) *Am. J. Reprod. Immunol.* 43:70-77.