

# MRTF-A

En 2001, MERCHER et al. 2001 décrivent une translocation impliquée dans les leucémies aigües mégacaryocytiques. Il s'agit de la translocation d'un gène du chromosome 1 sur le chromosome 22, le gène fusion est nommé One-Twenty-Two-Megakaryocytic-Acute-Leukemia (OTT-MAL). Les fonctions des deux gènes qui ont fusionné est alors inconnue.

En 2002, deux homologues de la myocardine sont identifiés dans le génome humain par D.-Z. WANG et al. 2002 et sont nommés Myocardin-Related Transcription Factor A et B (MRTF-A/B). MRTF-A correspond au gène du chromosome 22 MAL (ou MKL1) et MRTF-B à un gène du chromosome 16 (MAL16 ou MKL2). Un homologue est également découvert chez la souris et nommé Basic, SAP et Coil-coil (BSAC) (SASAZUKI 2002).

Alors que cette protéine sera appelée dans la suite de ce document MRTF-A, elle pourra être identifiée indifféremment comme MAL, MKL1 ou BSAC dans la bibliographie.

## 0.1 MRTF-A, cofacteur de Serum Response Factor

La fonction principale des protéines de la famille des myocardines est l'activation du facteur de transcription Serum Response Factor.

### 0.1.1 Serum Response Factor

Serum Response Factor est un facteur de transcription qui fait partie de la famille MADS (MCM-1, Agamous, Deficiens, SRF). SRF est présent en un seul exemplaire dans le génome humain mais peut être transcrit en 4 isoformes. La protéine SRF comprend un signal de localisation nucléaire (NLS), une boîte MADS composée du site de liaison à l'ADN et d'un domaine de dimérisation, et d'un domaine de transactivation auquel se fixent ses cofacteurs.

Un dimère SRF se fixe sur une séquence consensus de nucléotides sur l'ADN appelée boîte CArG : CC(A/T)<sub>6</sub>GG, ou sur une séquence CArG-like, qui diffère du consensus d'une seule base, avec une affinité plus faible. Le gène srf contenant lui-même deux boîtes CArG, il est sa propre cible, dans une boucle de rétroaction positive.

### 0.1.2 Les cofacteurs de SRF : TCF et MRTF

Serum Response Factor n'est lui-même qu'un transactivateur faible, mais il peut être activé par deux grandes familles de cofacteurs : les Ternary Complex Factors, et les Myocardin-Related Transcription Factors.

Les deux familles ne sont pas concurrentes pour se lier à SRF : la plupart des sites sur l'ADN sont spécifiques de l'une ou l'autre des familles de cofacteurs (ESNAULT et al. 2014). Même lorsque les MRTF sont séquestrées dans le cytoplasme, les TCF ne les remplacent pas sur les sites de liaison à SRF.

Un ChIP-seq sur des fibroblastes 3T3 a estimé que 921 gènes sont susceptibles d'être régulés par MRTF/SRF en réponse au sérum, et 76 gènes par TCF/SRF (ESNAULT et al. 2014), ce qui représente entre 3 et 4% du génome. Les MRTF sont donc un élément important de la régulation transcriptionnelle, et l'acteur principal de la régulation de SRF.

*Les autres cofacteurs de SRF ?*

#### Ternary Complex Factors

Elk1, Net et SAP-1 sont trois coactivateurs de SRF de la même famille, les TCF. Ils possèdent un domaine qui leur permet de se lier à des sites spécifiques sur l'ADN (Ets Binding Sites). Lorsqu'un site Ets et une boîte CArG sont adjacents, ils forment un Serum Response Element (SRE). La formation d'un complexe TCF-SRF sur un SRE déclenche la transcription du gène cible.

Les TCF sont phosphorylées et activées par les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases).

#### La famille Myocardine

Cette famille de cofacteurs de SRF comprend la myocardine, MRTF-A et MRTF-B.

La myocardine se présente sous deux isoformes, une forme cardiaque et une forme spécifique au muscle lisse. Les deux sont exclusivement localisées dans le noyau et sont constitutivement actives, en raison de motifs RPEL déficients ou incomplets.

Les Myocardin-Related Transcription Factors A et B sont exprimées dans un grand nombre de tissus : muscles cardiaques, lisses et squelettiques, neurones, cellules épithéliales, mégacaryocytes ... Contrairement à la myocardine, les MRTF peuvent être séquestrées dans le cytoplasme, ce qui les empêche d'activer SRF et la transcription. La régulation de la localisation de MRTF est assurée par l'actine, qui peut former un complexe avec la partie N-terminale des MRTF.

One-Twenty-Two-Megakaryocytic-Acute-Leukemia (OTT-MAL) est la protéine résultant d'une translocation d'un gène du chromosome 1 à côté du gène MRTF-A. La protéine fusion comprend presque toute la protéine MRTF-A excepté la partie N-terminale.

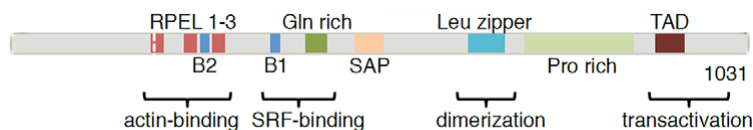


FIGURE 1 – Structure de MRTF-A (SCHARENBERG et al. 2014)

## 0.2 MRTF-A, indépendamment de SRF

### 0.2.1 Transition épithélio-mésenchymateuse et domaine SAP

L'activation de la transcription de la tenascine C en réponse à une stimulation mécanique et à  $TGF\beta$  a été liée à MRTF-A (MAIER et al. 2008). Cependant, cette réponse est indépendante de SRF, ou du domaine liant MRTF-A à SRF (ASPARUHOVA et al. 2011), elle dépend du domaine SAP. S'il est possible que SAP soit capable de lier MRTF-A à l'ADN (ARAVIND et KOONIN 2000), savoir si MRTF-A est capable d'être un facteur de transcription à lui seul, ou s'il a un partenaire facteur de transcription encore inconnu est encore une question ouverte.

### 0.2.2 NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription impliqué dans les voies de signalisation de l'inflammation. MRTF-A et NF- $\kappa$ B peuvent se lier dans le noyau, et s'empêcher l'un l'autre d'activer leurs promoteurs respectifs sur l'ADN (D. WANG et al. 2012). Cette activité dépend uniquement du domaine C-terminal de MRTF-A, où se trouve le domaine TAD. Ainsi l'activation de la voie  $TNF\alpha$ /NF- $\kappa$ B peut être empêchée par l'activation de BMP4/MRTF-A et inversement.

## Structure de MRTF-A

### 0.2.3 Les motifs RPEL

La partie N-terminale de MRTF-A contient trois motifs RPEL consécutifs, qui peuvent se lier aux monomères d'actine (POSERN, MIRALLES et al. 2004, MOUILLERON et al. 2008) avec des affinités variables, les deux premiers motifs se liant plus fortement que le troisième (GUETTLER et al. 2008). La structure détaillée du complexe montre que les trois motifs RPEL se lient à 3 à 5 monomères d'actine selon la concentration en monomères d'actine. (HIRANO et MATSUURA 2011, TREISMAN et al. 2011).

Deux domaines basiques, B2 et B3 sont inclus dans les motifs RPEL et forment un signal de localisation nucléaire (NLS) bipartite (RAJAKYLÄ, Maria K. VARTIAINEN et TREISMAN 2010). Lorsqu'il n'y a pas d'actine sur les motifs RPEL, ce NLS peut se lier au complexe Importine $\alpha/\beta$  (HIRANO et MATSUURA

2011,RAJAKYLÄ, Maria K. VARTIAINEN et TREISMAN 2010) et MRTF-A est importée dans le noyau de la cellule, où se trouve SRF. En présence de suffisamment de monomères, le NLS est recouvert par l'actine liée aux RPEL, MRTF-A reste cytoplasmique (Posern 2002, MIRALLES et al. 2003,POSERN, MIRALLES et al. 2004).

MRTF-A est exportée du noyau par Crm1 (M. K. VARTIAINEN et al. 2007,K. HAYASHI et T. MORITA 2013). *Ces deux articles se contredisent sur la question de la liaison à l'actine : le premier prétend qu'elle est indispensable, le second qu'elle empêche l'export*

Les motifs RPEL sont donc la clé de la régulation de MRTF-A par l'actine : selon la concentration en monomères d'actine, MRTF-A est localisée dans le cytoplasme en cas d'excès et dans le noyau, où se trouve SRF, en cas de manque. Lorsque le domaine RPEL est muté ou absent, la protéine est constitutivement nucléaire (MIRALLES et al. 2003), comme la myocardine, dont les motifs RPEL ne sont plus fonctionnels (GUETTLER et al. 2008).

#### 0.2.4 La région basique et SRF

La région B1 est le site de liaison de MRTF-A à SRF. MRTF-A s'attache préférentiellement à SRF en dimère (MIRALLES et al. 2003). Le complexe MRTF-A-5actines ne peut pas se lier à SRF et l'activer, la présence de MRTF-A dans le noyau n'est donc pas suffisante pour activer SRF, il faut également que la concentration en G-actine dissocie le complexe (M. K. VARTIAINEN et al. 2007).

#### 0.2.5 Leucine zipper et oligomérisation

MRTF-A/B peuvent former des homo ou des hétérodimères (MIRALLES et al. 2003). Un dominant négatif pourra ainsi bloquer une protéine WT dans un hétérodimère non fonctionnel (A. SELVARAJ et R. PRYWES 2003,Bo CEN, Ahalya SELVARAJ et Ron PRYWES 2004, Shijie LI et al. 2005,RAJAKYLÄ, Maria K. VARTIAINEN et TREISMAN 2010). La formation des dimères n'est pas indispensable à la fonctionnalité de MRTF-A, les mutations dans cette région réduisent son efficacité sans l'inhiber totalement (A. SELVARAJ et R. PRYWES 2003). OTT-MAL est également capable de former des hétérodimères avec les MRTF, et donc de perturber leur équilibre.

#### 0.2.6 SAP

Dans les cellules épithéliales, il a été montré qu'un groupe de gènes est activé par MRTF-A et nécessite particulièrement la zone SAP, tout en étant indépendant de SRF (ASPARUHOVA et al. 2011, GURBUZ et al. 2014)

### 0.2.7 TAD

### 0.2.8 Phosphorylation

MRTF-A peut être phosphorylée (MIRALLES et al. 2003, Bo CEN, Ahalya SELVARAJ et Ron PRYWES 2004). Dans les neurones, la phosphorylation de MRTF-A par ERK1/2 est même la voie principale de régulation de son activité, car la protéine est toujours nucléaire, mais elle n'active SRF qu'une fois phosphorylée (K. KALITA et al. 2006). Il existe donc au moins une voie d'activation de MRTF indépendante de la régulation de l'actine.

### 0.2.9 Isoformes

D'après SCHARENBERG et al. 2014, il existe 2 isoformes de MRTF-A chez l'humain, une version longue (MRTF-A\_L) et une courte (MRTF-A\_S). La version longue présente 80 acides aminés avant le premier motif RPEL, contre 15 seulement pour la version courte. Cette dernière contient deux TAD de 9 acides aminés (9aaTAD), un à l'extrémité C-terminale, et un à l'extrémité N-terminale spécifique à cet isoforme. Une surexpression de MRTF-A\_S est observée en réponse à TGF- $\beta$  ou à une contrainte cyclique dans les cellules épithéliales.

## 0.3 En amont de MRTF-A : voie de signalisation et régulation de l'actine

La régulation de l'activité de MRTF-A se fait principalement par sa localisation intracellulaire qui dépend du réservoir d'actine monomérique disponible. Lorsque l'actine G est disponible pour former un complexe pentamérique avec MRTF-A, ce complexe est confiné dans le cytoplasme où il ne peut jouer aucun rôle dans la transcription. Lorsque l'actine G n'est pas disponible, MRTF-A est importée dans le noyau et peut se lier à SRF pour activer la transcription de ses gènes cibles.

L'actine est le point de convergence de d'une grande diversité de signaux extra-cellulaires ou intracellulaires, biochimiques ou mécaniques, qui vont activer ou inhiber MRTF-A et SRF. Ainsi, tout élément qui va perturber la dynamique de l'actine aura des conséquences sur l'activation de MRTF-A : drogues agissant sur l'actine, protéines liées à l'actine (Actin-Binding Proteins, ABP), voies de signalisations, environnement mécanique.

### 0.3.1 Actines mutantes

La surexpression d'actine, même sans changer l'équilibre entre les filaments et les monomères, entraîne l'augmentation des monomères disponibles pour former le complexe avec MRTF-A (MIRALLES et al. 2003, M. K. VARTIAINEN et al. 2007). MRTF-A est alors localisée dans le cytoplasme.

La surexpression d'une actine-NLS (M. K. VARTIAINEN et al. 2007, POSERN, SOTIROPOULOS et TREISMAN 2002) a le même effet. Lorsque l'export est bloqué

par la Leptomycine B, MRTF-A est *de facto* bloquée dans le noyau, mais comme elle reste complexée par l'actine, SRF n'est pas activé.

Les mutants non-polymérisables comme R62D ont le même effet que la sur-expression de l'actine, mais en plus efficace (POSERN, SOTIROPOULOS et TREISMAN 2002, MIRALLES et al. 2003), M. K. VARTIAINEN et al. 2007, COLLARD et al. 2014).

Les mutants qui polymérisent mieux ou qui forment des filaments plus stables déclenchent l'accumulation nucléaire de MRTF-A et l'activation de SRF (POSERN, MIRALLES et al. 2004).

### 0.3.2 Drogues agissant sur l'actine

Les drogues agissant sur l'actine sont très souvent utilisées lors des études sur MRTF-A comme contrôles.

La latrunculine B séquestre les monomères d'actine, empêchant leur incorporation dans les filaments. La liaison Latrunculine-Actine est compatible avec l'incorporation dans le complexe avec MRTF-A (MOUILLERON et al. 2008). L'ajout de latrunculine B permet donc de conserver l'actine hors des filaments et de la rendre disponible pour former un complexe avec MRTF-A, qui est alors séquestré dans le cytoplasme et inactif (M. K. VARTIAINEN et al. 2007, ZHAO et al. 2007, SMITH et al. 2013).

La cytochalasine D coiffe les microfilaments d'actine à leur extrémité + et empêche leur polymérisation et leur dépolymérisation. Contrairement à la latrunculine, elle est incompatible avec la formation du complexe car l'organisation de l'actine dans le complexe actines-RPELs est très différente de l'organisation dans les filaments (TREISMAN et al. 2011). Par conséquent, la cytochalasine séquestre l'actine hors de portée à la fois des filaments et de MRTF-A, qui est alors importée dans le noyau et activée. (MIRALLES et al. 2003, M. K. VARTIAINEN et al. 2007, SMITH et al. 2013) Le Swinholid A séquestre des dimères d'actine et fonctionne de manière semblable. (MIRALLES et al. 2003, M. K. VARTIAINEN et al. 2007)

Le Jasplakinolide augmente la polymérisation de l'actine, diminuant la disponibilité de l'actine monomérique et entraînant l'accumulation de MRTF-A dans le noyau (MIRALLES et al. 2003, M. K. VARTIAINEN et al. 2007, SMITH et al. 2013).

### 0.3.3 Actin-Binding Proteins

L'équilibre dynamique de polymérisation de l'actine dans la cellule est régulée par de nombreuses protéines impliquées dans d'encore plus nombreuses voies de signalisations.

De manière générale, les protéines qui vont favoriser la formation ou la stabilité des filaments, comme la profiline, Arp2/3, les formines mDia (CHAN et al. 2010, BAARLINK, H. WANG et GROSSE 2013) ou l'émerine (HO et al. 2013), seront à l'origine d'une accumulation nucléaire de MRTF-A, car elle vont appauvrir les réserves de monomères d'actine.

Lorsque la voie RhoA est activée, la cofiline est phosphorylée, ce qui l'inactive. L'inactivation de la cofiline stabilise les filaments d'actine, et donc l'accumulation nucléaire de MRTF-A (ZHAO et al. 2007).

La thymosine  $\beta$ , comme la latrunculine, séquestre les monomères d'actine avec une stœchiométrie de 1 :1. Mais contrairement à celle-ci, la thymosine  $\beta$  empêche l'intégration des monomères dans le complexe avec MRTF-A. Lors d'une surexpression de T $\beta$ 4, MRTF-A est donc nucléaire et SRF activé (Tsuyoshi MORITA et Ken'ichiro HAYASHI 2013).

### 0.3.4 La voie RhoA

### 0.3.5 Un cas particulier : MICAL2

## 0.4 En aval de MRTF-A : SRF et gènes cibles

## 0.5 Rôles de MRTF-A

Depuis sa découverte au début des années 2000, de nombreux rôles de MRTF-A ont été mis en évidence dans des types cellulaires et dans des tissus très divers.

### 0.5.1 Embryogenèse

Les MRTF sont exprimées dès le jour 10 du développement de l'embryon (D.-Z. WANG et al. 2002), dans tous les tissus. La délétion de MRTF-B entraîne l'échec de la gastrulation, et donc une fin précoce de l'embryogenèse (Katarzyna KALITA, KUZNIEWSKA et KACZMAREK 2012). Au contraire, 60% des mutants MRTF-A<sup>-/-</sup> sont viables et atteignent l'âge adulte, les autres étant perdus pendant l'embryogenèse car souffrant de défauts cardiaques. Les mutants survivants sont dépourvus de ces anomalies cardiaques, et vivent jusqu'à l'âge adulte (S. LI et al. 2006, SUN et al. 2006). Cependant, les femelles souffrent d'un défaut de formation de la glande mammaire, lié à une apoptose précoce des cellules myoépithéliales qui déclenchent l'éjection du lait. Il apparaît donc que chez la souris, tandis que MRTF-B est indispensable à l'embryogenèse, l'absence de MRTF-A peut être compensée dans la plus grande partie des tissus. Les souris possédant un gène mutant dominant négatif de MRTF-A sont en revanche de plus petite taille, ne bougent pas et ne survivent que quelques jours, principalement à cause des défauts de musculature de leur diaphragme (Shijie LI et al. 2005).

### 0.5.2 Régulation de la masse musculaire

Serum Response Factor a pour gènes cibles un grand nombre de gènes liés au cytosquelette et à la différenciation musculaire.

Lorsque SRF est désactivé dans le muscle squelettique de souris adulte (souris HSA-Cre-ER<sup>T2</sup> :srf<sup>fllox/fllox</sup>), l'hypertrophie compensatoire de ses muscles est bloquée (GUERCI et al. 2012). Les cellules satellites sont moins nombreuses,

et ne fusionnent pas avec les fibres musculaires. Au contraire, un SRF constitutivement actif protège de l'atrophie liée à une immobilisation ou à une dénervation. Suite à une dénervation, MRTF-A est exclus des noyaux des fibres musculaires, et donc incapable d'activer SRF. Un MRTF-A constitutivement nucléaire protège contre l'atrophie induite par la dénervation (COLLARD et al. 2014). C'est donc la régulation de la localisation de MRTF-A dans les fibres musculaires qui régule l'activité de SRF et l'atrophie ou l'hypertrophie en réponse aux contraintes mécaniques.

Dans les myoblastes murins C2C12, un dominant négatif MRTF-B, capable d'interférer avec l'activité des deux MRTF, bloque la différenciation musculaire en myotubes et diminue leur taux de duplication (A. SELVARAJ et R. PRYWES 2003, B. CEN et al. 2003). Les souris DN-MRTF-A montrent d'ailleurs un phénotype myopathique.

### 0.5.3 Transition épithéliale-mésenchymale

La transition épithélio-mésenchymateuse est le processus par lequel des cellules, sous l'influence de signaux extérieurs, vont perdre leur type épithélial (expression de l'E-cadherine, polarisation, organisation en monocouche jointive ...) et acquérir un phénotype mésenchymal (expression de N-cadherine, motilité plus importante, fabrication de matrice extra-cellulaire ...). Plusieurs marqueurs de l'EMT, comme la vimentine ou l'actine du muscle lisse  $\alpha$ Smooth Muscle Actin sont des cibles de SRF.

La conjonction d'un signal biochimique, TGF  $\beta$  (Transforming Growth Factor), et d'un signal mécanique déclenche l'activation de la voie de signalisation RhoA/actine/MRTF-A/SRF. Les signaux mécaniques déclencheurs peuvent être très divers, locaux ou globaux, cycliques ou statiques : membranes étirées cycliquement (MAIER et al. 2008), îlots de fibronectine (GOMEZ et al. 2010, CONNELLY et al. 2010), gels de polyacrylamides de différentes rigidités (HUANG et al. 2012), microbilles magnétiques recouvertes de collagène (CHAN et al. 2010).

Des anomalies dans la transition épithélio-mésenchymateuse ont été liées aux fibroses pulmonaires et hépatiques.

### 0.5.4 Différenciation des mégacaryocytes

Les souris MRTF-A KO ont une genèse anormale des mégacaryocytes, les cellules de la moelle osseuse qui sont à l'origine des plaquettes. Les gènes contrôlant la différenciation de ces cellules sont sous le contrôle de SRF. La thrombopoïétine active la voie RhoA/MRTF-A/SRF.



- 0.5.5 Rythme circadien
- 0.5.6 Système cardio-vasculaire
- 0.5.7 MRTF-A et cancers
- 0.5.8 Réorganisation de la chromatine