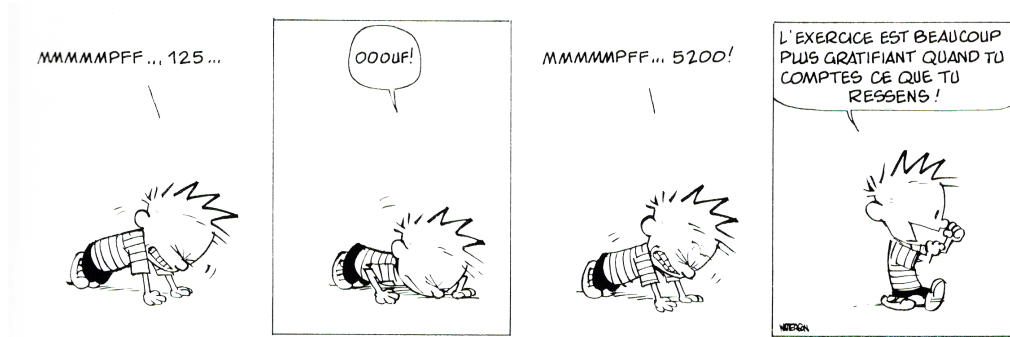


# Chapitre 1

## MRTF-A



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

En 2001, MERCHER, BUSSON-LE CONIAT 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 sont alors inconnues.

En 2002, deux homologues de la myocardine, une protéine impliquée dans la différenciation des muscles cardiaque et lisses, 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 cette thèse MRTF-A, elle pourra être identifiée indifféremment comme MAL, MKL1 ou BSAC dans la bibliographie.

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

### 1.1.1 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.

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 au sein de son promoteur, il est sa propre cible, dans une boucle de rétro-action positive.

### 1.1.2 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 au total 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.

### 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

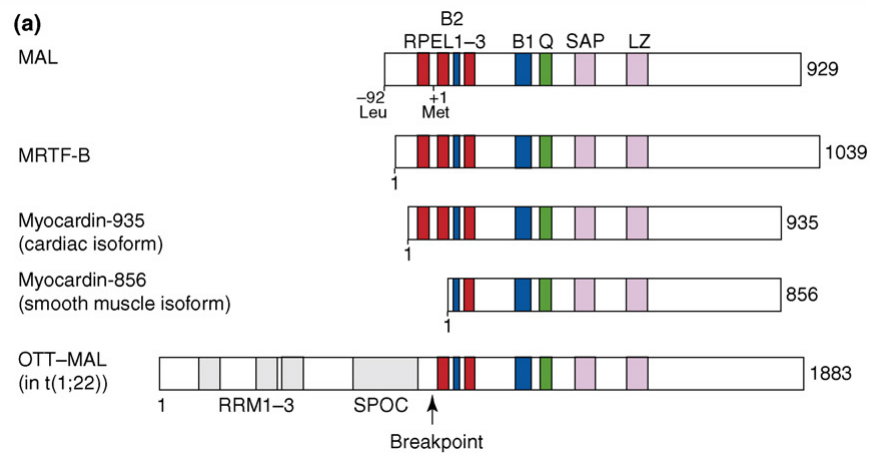


FIGURE 1.1 – La famille de la myocardine d’après POSERN et TREISMAN 2006

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.

### **D'autres manières de réguler SRF**

Si ces deux familles de cofacteurs sont les principales voies de régulation de SRF, il possède encore d'autres coactivateurs et corépresseurs, dont je ne parlerai pas ici (POSERN et TREISMAN 2006). Des micro-ARN peuvent également réguler l'activité au niveau des ARN messagers transcrits (CHEN et al. 2006). SRF peut aussi être clivé en deux parties non fonctionnelles (DREWETT et al. 2001), phosphorylé de sorte qu'il soit incapable de se lier aux MRTF ni à l'ADN (IYER et al. 2003), ou être séquestré dans le cytoplasme (LANGE et al. 2005).

## **1.2 MRTF-A, indépendamment de SRF**

Le principal partenaire des MRTF est SRF, cependant, de nouveaux partenaires minoritaires sont apparus récemment.

### **1.2.1 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 une question ouverte. Les données de ESNAULT et al. 2014 vont cependant dans le sens d'une absence d'effet indépendant de SRF, montrant que la question est encore controversée.

### **1.2.2 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.

## 1.3 Structure de MRTF-A

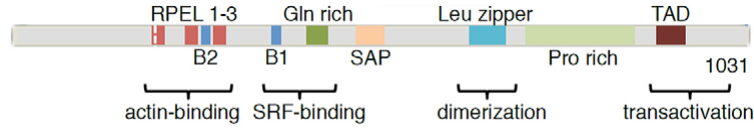


FIGURE 1.2 – Structure de MRTF-A (SCHARENBERG et al. 2014)

### 1.3.1 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, Stéphane MOUILLERON et al. 2008) avec des affinités différentes, 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, Stéphane MOUILLERON et al. 2011).

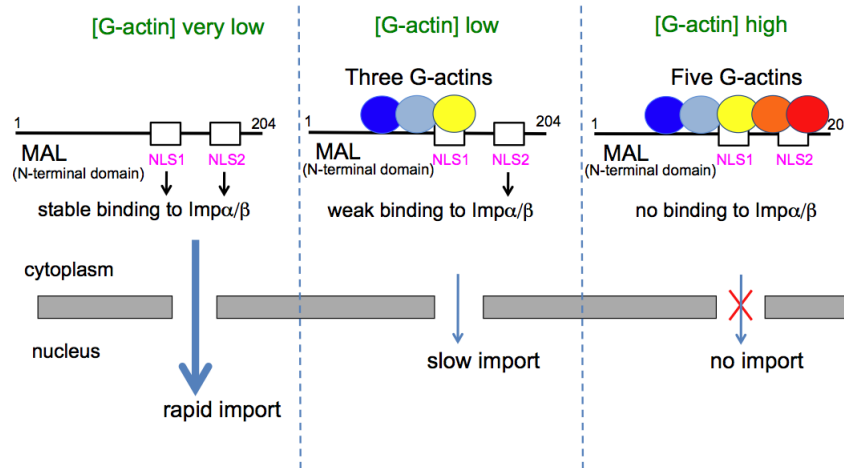


FIGURE 1.3 – D'après HIRANO et MATSUURA 2011

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 d'actine, leur liaison aux domaines RPEL recouvre le

NLS et MRTF-A reste cytoplasmique (POSERN, SOTIROPOULOS et TREISMAN 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). Cependant, ces deux articles se contredisent sur la question de la liaison à l'actine : le premier observe qu'une surexpression de l'actine augmente la vitesse d'export, le second montre que la liaison entre Crm1 et MRTF-A est empêchée lorsque MRTF-A est liée à l'actine. Récemment, RAJAKYLÄ, VIITA et al. 2015 ont découvert par une élégante expérience de FRET que la protéine Ddx19 est indispensable à MRTF-A pour changer de conformation préalablement à son import (voir figure 1.6). Une explication possible qui serait compatible avec les deux observations apparemment contradictoires concernant l'export serait que pour être exportée, MRTF-A doit retrouver sa configuration repliée, et qu'elle ne puisse le faire qu'en se liant à l'actine. Elle devrait ensuite perdre tout ou partie des actines liées à ses RPEL pour se lier à Crm1 et être exportée. En particulier, sur la figure 1.3, le NES se situerait plus à droite encore que le NLS2. La conformation à 3 actines laisserait donc plus facilement apparaître le NES.

La drogue anti-cancéreuse CCG1423 se lie aux motifs RPEL de MRTF-A, MRTF-B et de la myocardine, et bloque leur import dans le noyau (Ken'ichiro HAYASHI et al. 2014).

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 pas fonctionnels (GUETTLER et al. 2008).

### 1.3.2 La région basique et SRF

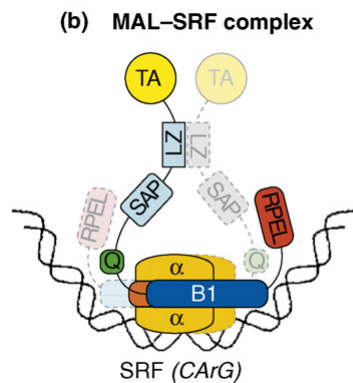


FIGURE 1.4 – D'après POSERN et TREISMAN 2006

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 soit suffisamment faible pour que le complexe soit dissocié (M. K. VARTIAINEN et al. 2007).

### 1.3.3 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.

### 1.3.4 TAD

SRF n'est lui-même qu'un transactivateur faible, c'est pourquoi il a besoin de ses cofacteurs pour démarrer la transcription de ses gènes cibles. Le TAD de MRTF-A a pour fonction d'aider SRF lors de cette étape.

### 1.3.5 Phosphorylation

MRTF-A peut être phosphorylée par ERK1/2 (MIRALLES et al. 2003, Bo CEN, Ahalya SELVARAJ et Ron PRYWES 2004). MUEHLICH et al. 2008 montrent qu'un mutant non phosphorylable est incapable de se lier à l'actine et est constitutivement nucléaire, car il ne peut pas être exporté. Les données de K. KALITA et al. 2006 montrent également que MRTF-A doit être phosphorylée pour se lier à SRF et activer la transcription.

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).

### 1.3.6 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

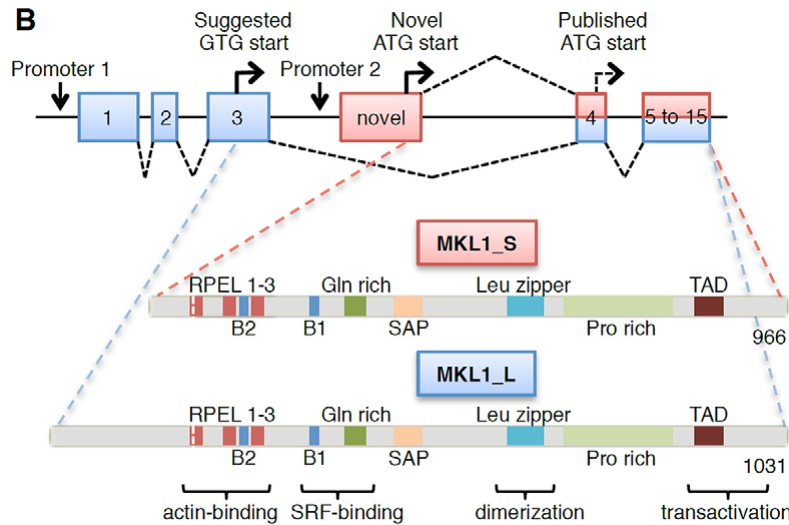


FIGURE 1.5 – D’après SCHARENBERG et al. 2014 : les deux isoformes de MRTF-A

réponse à TGF- $\beta$  ou à une contrainte cyclique dans les cellules épithéliales. Elle est liée à une expressions de gènes cibles qui seraient spécifiques à cet isoforme, en particulier des gènes codant pour des protéines de la matrice extra-cellulaire.

### 1.3.7 Conformations

La conformation de MRTF-A en complexe avec cinq actines est très différente de la conformation de MRTF-A liée à l’importine  $\alpha$  (HIRANO et MATSUURA 2011, Stéphane MOUILLERON et al. 2011). Ddx19 est une protéine capable de remodeler des complexes protéine-ARN, dont le rôle principal est de contribuer à l’export des ARN messagers. Des expériences de FRET ont montré que Ddx19 est indispensable à l’import de MRTF-A dans le noyau. En effet, elle peut également changer la conformation de MRTF-A, la faisant passer d’une configuration repliée à une configuration dépliée qui permet son attachement à l’importine  $\alpha/\beta$ .

## 1.4 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 essentiellement 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



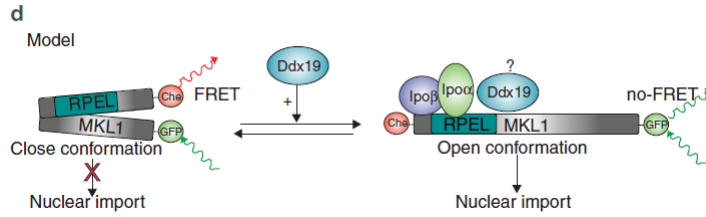


FIGURE 1.6 – Modèle proposé par RAJAKYLÄ, VIITA et al. 2015

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 d'une grande diversité de signaux extracellulaires 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, voies de signalisation, environnement mécanique.

#### 1.4.1 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 surexpression 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).

Récemment, des expériences avec des actines R62D-NLS, localisées exclusivement dans le noyau, ont montré que les formines mDia1 activent SRF en réponse au sérum en polymérisant l'actine nucléaire (BAARLINK, H. WANG et GROSSE 2013).

### 1.4.2 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 (Stephane 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 (Stéphane MOUILLERON 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 Swinholide A séquestre des dimères d'actine et fonctionne de manière analogue. (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).

### 1.4.3 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 signalisation.

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 elles vont appauvrir les réserves de monomères d'actine.

Les thymosines  $\beta$  séquestrent les monomères d'actine avec une stoechiométrie de 1 : 1. Mais elles empêchent l'intégration des monomères dans le complexe avec MRTF-A. Lors d'une sur-expression de T $\beta$ 4, MRTF-A est donc nucléaire et SRF activé (Tsuyoshi MORITA et Ken'ichiro HAYASHI 2013).

### 1.4.4 La voie RhoA

RhoA (Ras homolog gene family, member A) est une protéine de la famille des petites GTPases dont le rôle est de réguler le cytosquelette d'actine. Ce rôle fait de RhoA une voie de signalisation importante pour MRTF-A.

RhoA a deux cibles principales : ROCK (Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase 1) et les formines mDia (mammalian Diaphanous). La phosphorylation de ROCK entraîne la phosphorylation de LIMK (LIM domain kinase) qui désactive la cofiline. L'activation des formines et le blocage de la cofiline concourent à la formation de filaments d'actine plus longs et plus nombreux et à la réduction des réserves de monomères d'actine (ZHAO et al. 2007).

La voie RhoA peut être activée par un grand nombre de signaux biochimiques ou mécaniques. ILK (Integrin Linked Kinase) associée à une stimulation mécanique (MAIER et al. 2008), les androgènes (SCHMIDT et al. 2012), la thrombopoïétine (SMITH et al. 2013), le sérum (SOTIROPOULOS et al. 1999) et les hormones du rythme circadien (GERBER et al. 2013) activent la voie de signalisation RhoA/actine/MRTF-A/SRF. Une déformation mécanique constante (ALBINSSON 2004, ZHAO et al. 2007, CHAN et al. 2010) ou cyclique (KUWAHARA et al. 2010), un substrat dur (HUANG et al. 2012) sont des signaux mécaniques qui vont également activer la voie RhoA.

#### 1.4.5 Un cas particulier : MICAL2

La signalisation par MRTF-A/B est importante pour le développement des neurones (Katarzyna KALITA, KUZNIEWSKA et KACZMAREK 2012), cependant contrairement aux fibroblastes et aux myoblastes, les neurones font l'expérience de contraintes et de réorganisation du cytosquelette beaucoup plus limitées. Il n'y a que rarement formation de fibres de stress dans les neurones par exemple. La polymérisation d'actine dans ces cellules n'est pas suffisante pour déclencher la voie MRTF-A de la même manière que dans d'autres types cellulaires.

Les protéines de la famille MICAL sont capables d'oxyder la méthionine 44 de l'actine, ce qui l'empêche de faire partie d'un filament. Cette oxydation peut avoir lieu sur l'actine déjà recrutée dans un filament, causant sa dépolymérisation (HUNG, PAK et TERMAN 2011). L'actine oxydée est également sélectivement exportée du noyau, une actine mutante M44Q constitutivement oxydée est confinée dans le cytoplasme (LUNDQUIST et al. 2014).

MICAL2 est un membre de cette famille particulièrement présent dans le noyau, où il peut contrôler la dépolymérisation de l'actine nucléaire. L'expression d'un mutant dominant négatif de MICAL2 cause l'apparition de longs filaments d'actine dans le noyau, car son activité de dépolymérisation des filaments est interrompue (LUNDQUIST et al. 2014).

L'activation de MICAL2 ou sa surexpression entraîne ainsi paradoxalement une accumulation nucléaire de MRTF-A : l'actine du noyau est oxydée, dépolymérisée puis expulsée du noyau, réduisant ainsi la réserve globale d'actine disponible dans le noyau (LUNDQUIST et al. 2014).

Lorsque une atrophie musculaire est causée par la dénervation, MICAL2 est sous-exprimée dans les fibres musculaires, ce qui participe au maintien de concentrations importantes d'actine monomérique dans le noyau et donc à l'exclusion de MRTF-A (COLLARD et al. 2014).

MICAL2 est donc une voie d'activation de MRTF-A indépendante de RhoA, et donc l'activité se concentre sur le réservoir d'actine nucléaire de la cellule.

## 1.5 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.

### 1.5.1 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 (qui agit également sur MRTF-B, car les deux protéines peuvent former des dimères) exprimé spécifiquement dans le muscle 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).

### 1.5.2 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>flax/flax</sup>), l'hypertrophie compensatoire de ses muscles est bloquée (GUERCI et al. 2012). Au contraire, un SRF constitutivement actif protège de l'atrophie liée à une perte d'activité. Suite à une dénervation, MRTF-A est exclue des noyaux des fibres musculaires, et donc incapable d'activer SRF. Une MRTF-A constitutivement nucléaire protège contre l'atrophie induite par la dénervation (COLLARD et al. 2014). Ceci suggère que 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.

### 1.5.3 Transition épithéliale-mésenchymateuse

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 apico-basale, organisation en monocouche jointive ...) et acquérir un phénotype mésenchymateux (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.

### 1.5.4 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.

### 1.5.5 Rythme circadien

Les plantes, les animaux et même certains organismes unicellulaires possèdent une horloge biologique d'environ 24h, calquée sur l'alternance jour/nuit. Un certain nombre de processus biologiques dépendent des hormones produites par cette horloge dans le cerveau et propagées dans le sang vers l'ensemble des organes, comme le rythme veille/sommeil, la température corporelle, le péristaltisme de l'intestin, la sécrétion des hormones de croissance ...

SRF fait partie des facteurs de transcription dont la régulation est sensible au rythme circadien et contient dans ses cibles un certain nombre de gènes régulant le rythme circadien (ESNAULT et al. 2014). Une stimulation par ajout de sérum permet de réinitialiser l'horloge biologique.

Dans le foie de rats et de souris, la polymérisation de l'actine est maximale au lever du jour (fin de période d'activité pour les rongeurs nocturnes) et minimale au crépuscule (GERBER et al. 2013). De manière synchronisée, les MRTF sont nucléaires et SRF est activé au lever du jour, et les MRTF sont cytoplasmiques et SRF désactivé au coucher du soleil. Le niveau d'expression de l'actine et de MRTF ne varie pas au cours de la journée. Chez l'humain, espèce diurne, ce rythme est inversé mais également présent.

### 1.5.6 MRTF-A et cancers

Le rôle de MRTF-A dans l'invasion, les métastases et la prolifération cancéreuse est complexe. Dans l'exemple du cancer du sein, on a attribué à MRTF-A un rôle antiprolifératif en tant que facteur de transcription de l'Eplina $\alpha$  (Epithelial protein lost in Neoplasm), protéine qui est inversement corrélée avec la mortalité et l'invasion cancéreuse (Laura LEITNER et al. 2010). Cependant, dans les cancers du sein sensibles aux œstrogènes, l'activation de MRTF-A favorise la transition vers un type insensible au contrôle hormonal (KERDVEL et al. 2014) et MRTF et SRF sont nécessaires à l'adhésion, à la motilité et à l'invasion dans des lignées issues de cancers du sein et de mélanomes (MEDJKANE et al. 2009). CCG1423 est d'ailleurs une drogue anti-cancéreuse qui bloque la voie RhoA/MRTF/SRF.

L. LEITNER et al. 2011 montre bien le rôle complexe que peut avoir la régulation d'un élément du cytosquelette dans différents contextes : MRTF-A augmente l'adhésion dans deux types cellulaires, des cellules épithéliales non-invasives et des cellules tumorales de cancer du sein, mais l'effet sur la motilité est opposé dans les deux types. Dans les cellules mammaires épithéliales, l'augmentation de l'adhésion causée par la surexpression de MRTF-A cloue les cellules sur place : l'adhésion est trop forte et les cellules ne sont plus capables de se détacher pour avancer. Inversement, l'adhésion était le facteur limitant dans les cellules tumorales. Avec la surexpression de MRTF-A, elles adhèrent mieux et se déplacent plus efficacement.

L'activation de la voie RhoA/MRTF/SRF est liée à l'agressivité des tumeurs de la prostate (SCHMIDT et al. 2012), et une mutation du premier intron de MRTF-A a été identifiée dans des triplets homozygotes dont deux ont développé un lymphome de Hodgkin (BJORKHOLM et al. 2013), sans qu'un lien précis soit établi.

### Le cas particulier d'OTT-MAL

OTT-MAL est une protéine issue de la fusion d'un gène du chromosome 1 également nommé RBM15, qui régule le facteur de transcription RBPJ (recombination signal binding protein for immunoglobulin  $\kappa$  J region), et MRTF-A sur le chromosome 22, qui régule SRF. La présence de cette mutation a été reliée à des leucémies à mégacaryoblastes (MERCHER, BUSSON-LE CONIAT et al. 2001). La protéine fusion est toujours localisée dans le noyau et active SRF (DESCOT et al. 2008), elle peut former des hétérodimères avec MRTF-A et donc interférer avec les protéines saines. Mais c'est l'activation de RBPJ qui est déterminante pour ses propriétés oncogènes dans les mégacaryocytes (MERCHER, RAFFEL et al. 2009).

### 1.5.7 Réorganisation de la chromatine

En plus de son rôle de régulateur de la transcription des cibles de SRF, plusieurs effets de MRTF-A sur l'organisation de la chromatine ont été mis en

évidence récemment. L'activation de MRTF-A et de différents mutants montre une augmentation de l'acétylation de l'histone H3, de la quantité d'euchromatine et de l'activité transcriptionnelle (FLOURIOT et al. 2014). Cette fonction de MRTF-A nécessite son domaine C-terminal. Les fibroblastes 3T3 cultivés sur des motifs de grande taille montrent une plus grande quantité de MRTF-A dans le noyau, associée à une histone déacétylase HDAC3 séquestrée dans le cytoplasme et une plus grande activité transcriptionnelle (JAIN et al. 2013).

L'histone méthyltransférase SMYD3 coopère avec MRTF-A, sans interaction direct, pour réguler la transcription du gène MYL9 codant pour la Myosin Light Chain (LUO et al. 2014).

## 1.6 Résumé

En résumé, dans la cellule, SRF peut être régulé par l'intermédiaire de la localisation de MRTF-A. Cette localisation est déterminée par la quantité de monomères d'actine qui sont disponibles dans le cytoplasme et dans le noyau pour se lier à MRTF-A. Lorsque MRTF-A est liée à l'actine, elle ne peut pas être importée dans le noyau, mais elle peut en être exportée. Elle est alors séquestrée dans le cytoplasme. Lorsque MRTF-A n'est pas liée à l'actine, elle peut alors être importée dans le noyau, et ne peut plus en être exportée. Elle est alors séquestrée dans le noyau, et elle peut activer SRF.

La voie RhoA, qui active ROCK et les formines mDiA, contrôle le niveau de polymérisation de l'actine, son activation conduit à l'accumulation de MRTF-A dans le noyau.

L'accumulation nucléaire de MRTF-A se fait par deux moyens : il faut la faire entrer dans le noyau, et l'empêcher d'en sortir. La polymérisation de l'actine contrôlée par RhoA dans le cytoplasme permet à MRTF-A d'être importée dans le noyau. La polymérisation de l'actine contrôlée par RhoA dans le noyau, ou l'activité de MICAL-2 qui dépolymérise et expulse l'actine nucléaire, permettent d'empêcher MRTF-A de sortir du noyau.

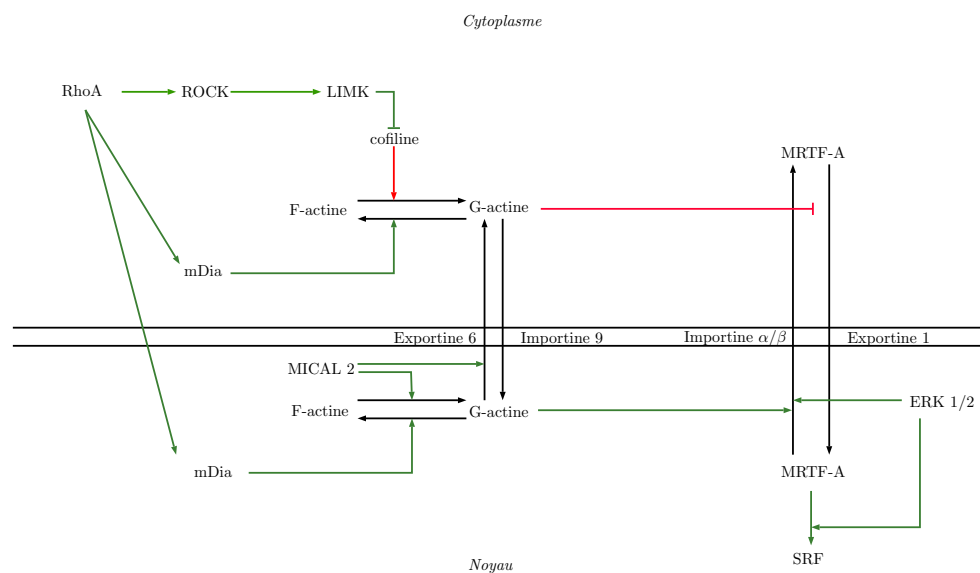


FIGURE 1.7 – Schéma récapitulatif non exhaustif des voies de signalisation activant MRTF-A