



**Étude de l'interaction de protéines nucléaires:
RevErb α /N-Cor par des techniques de fluorescence
(anisotropie et microscopie)**

Anaïs Vaissière

► To cite this version:

Anaïs Vaissière. Étude de l'interaction de protéines nucléaires: RevErb α /N-Cor par des techniques de fluorescence (anisotropie et microscopie). Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 1, 2014. Français. NNT: . tel-01161796

HAL Id: tel-01161796

<https://theses.hal.science/tel-01161796>

Submitted on 9 Jun 2015

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.

LABORATOIRE CENTRE DE BIOCHIMIE STRUCTURALE

UNIVERSITE MONTPELLIER I

FINANCEMENT PAR LES LABORATOIRES SERVIER

THESE

Pour l'obtention du grade de Docteur en sciences de l'Université de Montpellier 1

Présentée par

Anaïs VAISSIERE

**ETUDE DE L'INTERACTION DE PROTEINES
NUCLEAIRES : REV-ERB α /N-COR PAR DES
TECHNIQUES DE FLUORESCENCE (ANISOTROPIE ET
MICROSCOPIE)**

Sous la direction de Catherine Royer et de Gilles Ferry

Soutenue le 11 Décembre 2014 devant le jury composé de :

Didier Marguet	Rapporteur
Maïté Coppey-Moisan	Rapporteur
Vincent Cavaillès	Président du jury
Natacha Rochel	Examinatrice
Jean Boutin	Membre invité
Sylvie Berger	Membre invité

REMERCIEMENTS

Mon voyage en biophysique a commencé lors de mon master 2 avec un stage de six mois dans les laboratoires Servier. Sous la direction de Jean Boutin, Gilles Ferry et Sylvie Berger, j'ai découvert ce qui deviendrait mon sujet de recherche pendant ces trois dernières années. Je commence par remercier Sylvie de m'avoir encadré pendant ces six mois et d'avoir continué à me suivre pendant ces trois années. Je remercie Jean et Gilles de m'avoir fait confiance et d'avoir accepté de financer mon travail de thèse. La microscopie de fluorescence était un monde étrange pour moi qui suis biologiste de formation et je remercie Cathy Royer de m'avoir initié à cela et d'avoir accepté de m'encadrer pendant ces trois années. J'ai apprécié de travailler avec toi de par la liberté et l'autonomie que tu me laissais pour mener cette recherche. Ton départ pour les Etats-Unis n'était pas évident au départ, mais très formateur en fin de compte et j'ai eu l'opportunité d'interagir d'avantage avec Emmanuel Margeat, Nathalie Declerck et Caroline Clerte qui m'ont toujours bien conseillé, écouté et aidé quand j'en avais besoin. J'ai apprécié travailler avec chacun d'entre vous. Merci à Caroline de m'avoir formé sur le microscope, cette machine était effrayante pour moi, je n'osais même pas la toucher! Un grand merci à Jérôme Hottin et Elodie LeMonnier pour votre amitié et votre soutien au cours de ces nombreuses journées et soirées où le microscope faisait des siennes. Merci à Jérôme d'avoir adapté le programme d'analyse Igor à un mode 2 canaux et 2 couleurs, ta joie de vivre et ton optimisme ont rendu tous mes petits tracas beaucoup moins dramatique que ce que je m'imaginais !

Je tiens à remercier particulièrement Vincent Cavallès pour avoir accepté de faire partie de mes comités de thèse, ainsi que de mon jury de thèse. Merci également pour les essais de gènes rapporteurs à la luciférase, pour ton temps et ton aide, j'en profite également pour remercier Sandrine Bonnet qui m'a beaucoup aidé pour la culture cellulaire et les transfections transitoires. Merci à Didier Marguet d'avoir accepté de faire partie de mes comités de thèse, ainsi que d'être un de mes rapporteurs. Je remercie également tous les membres de mon jury : Maïté Coppey-Moisan et Natacha Rochel, d'avoir accepté de juger mon travail et également pour tous vos conseils et vos remarques qui me permettront de m'améliorer.

Ce travail de thèse a nécessité une mise en place assez importante en biologie moléculaire pour la construction des plasmides. Je remercie Frédéric Allemand sans qui le projet n'aurait jamais pu commencer. Pour ta bonne humeur très communicative et ton sens de l'humour, ce fût un plaisir de travailler avec toi. Merci également à Pierre-Emmanuel Milhet, Patrice Rassam et Cédric Godfroy pour leur formation et leur aide en culture cellulaire eucaryotes.

A mon arrivée au CBS, je n'étais pas vraiment familière avec toutes les techniques de fluorescence, je remercie particulièrement tous les membres de l'équipe de William Bourguet. Cette équipe travaillant sur les récepteurs nucléaires, chaque membre a apporté quelque chose à mon travail, un conseil, un peptide, une interprétation ou une perspective. Merci à Albane LeMaire pour m'avoir formé en anisotropie de fluorescence, sur l'appareil ainsi que sur l'interprétation des données. Merci également pour le peptide NCor5 qui a enrichi mon étude. Un énorme merci à Deborah Harrus ancienne post-doctorante de cette équipe qui m'a soutenu tout au long des trois ans. Pour son écoute, ses conseils ainsi que les nombreux peptides qu'elle a pu me fournir, je lui suis reconnaissante. La partie anisotropie n'aurait certainement pas été la même sans ton aide précieuse.

Merci à Vanessa Delfosse pour ta formation sur Pymol grâce à laquelle j'ai pu avoir une discussion riche et pleine de jolies structures colorées !

Pour leur contribution et leur aide à un moment de ma thèse, je tiens à remercier Jean-Bernard Fiche, Alessandro Valéri et Stéphanie Dejardin. Merci également à Patrice Dosset d'avoir adapté le programme PaTrack pour mon étude. Je remercie enfin tous les membres du CBS permanents et non permanents, j'ai apprécié de travailler dans ce laboratoire dans laquelle il règne une ambiance très familiale.

Je passe maintenant à un registre plus personnel en remerciant tous les membres de l'aquarium anciens et actuels ! Mélissa Birol, Selma Dahmane, Fataneh Fatemi, Hussein Nasrahlla et Désirée Salas. Merci pour tout ce que vous êtes, de m'avoir intégré naturellement, de m'avoir supporté moi et mon humeur massacrant de certains jours et pour tout ce qui est extérieur au labo, j'ai apprécié plus que vous imaginez ces trois années avec vous. Je remercie aussi les non membres de l'aquarium Soraya Bounhour, Tiago Cordeiro, Laurent Fernandez, Maryia Georgieva, Ewelina Guca, Fatima Herranz, François Lecorre (avec Coralie), Linnea Olofsson, Laura Oudjedi (avec Gilles), Jad Rouhana, Zhanna Santybayeva et Nathalie Sibille. Merci à tous pour votre soutien, vous m'avez tous apporté quelque chose à un moment donné, même si j'ai rencontré la plupart d'entre vous trop tard !

Une de mes plus belles surprises a été de te retrouver Sarah à Montpellier au cours d'un covoiturage ! Tu as toujours répondu présente pour me motiver, me changer les idées, continuer à me faire faire un peu d'exercice. Malgré nos emplois du temps respectifs et tes nombreuses nuits, tu étais là dans les bons comme les mauvais moments. Je vous remercie Guillaume et toi parce que vous voir est toujours un bonheur !

Je remercie également Lisa Bruyand, Héléne Renard et Benjamin Fould de Servier pour votre soutien et tout ce que vous m'avez apporté : Formation Excell et motivation pour commencer une thèse en me disant que ça ne pouvait être que du positif, vous aviez raison !

Enfin, je remercie ceux sans qui je ne serais pas là, ma famille entière ! Il est difficile de vous exprimer toute ma reconnaissance et mon affection. Mes Oncles et Tantes, mes cousins et cousines. Les proches de mes parents, sans oublier mes grands-parents sans qui rien n'aurait été possible.

Parce que vous faites partis de la famille depuis très longtemps maintenant, Jade, Julie, Lucile, Margaux et Rémi, je vous remercie à tous de faire partie de nos vies et d'y rester !

Papa, je te dois ce que je suis et ce que je fais. Merci de m'avoir soutenu dans toutes mes entreprises, tant financièrement que humainement, j'ai eu beaucoup de chance de pouvoir réaliser mes projets.

Cathy, merci pour ton aide sur l'orthographe, tu as eu beaucoup de courage de lire tout ça et je t'en remercie. Sans oublier que tu as été l'une des premières à lire ma thèse.

Clara, ces quelques lignes ne suffiront pas à exprimer combien je te suis reconnaissante d'exister ! Merci pour les pauses café que tu prenais avec moi, merci pour les conversations, les films, les séries, la musique et pour tout ce que tu es.

Antoine, tu es MA rencontre de Montpellier, je n'aurais pas pu imaginer passer au travers de tout ça sans ton aide et ta présence. Pour tes nombreuses relectures, cet art que tu as de m'apaiser, de me faire rire et les bons conseils que tu m'as donné tant scientifiquement que personnellement MERCI.

Enfin pour terminer, une forte pensée pour une personne qui m'est impossible de ne pas citer. Elle m'a transmise toutes ses valeurs, m'a appris à ne pas me décourager et à toujours aller de l'avant : ma Maman. Cette thèse je te la dédie, c'est en partie ton œuvre.

ABBREVIATIONS

ADN = Acide désoxyribo nucléique
ADNc = Acide désoxyribo nucléique codant
AF1 ou AF2 = Activation Function = Domaine de transactivation
ARN = Acide Ribo Nucléique
Bcc = Cross correlated brightness (Brilliance croisée)
Boîte NR = Surface d'interaction des récepteurs nucléaires avec les coactivateurs
ChIP = Immunoprécipitation de la chromatine
CO = Monoxyde de Carbone
CoA = Co Activateur
CoR = Co Répresseur
C-ter = Partie ou queue carboxy terminale
Da = Dalton (g/mol)
DAD = Deacetylase-Activation-Domain
DBD = Domaine de liaison à l'ADN
DMSO = DiMethylSulfOxyde
EDTA = Ethylene Diamine Tetra acetic Acid
FCCS = Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy
FCS = Fluorescence Correlation Spectroscopy
FP = Protéines fluorescentes
FRET = Fröster Resonance Energy Transfer
HAC = Histone ACetylase
HDAC = Histone DeACetylase
HRE = Eléments de Réponse aux Hormones
G6Pase = Glucose 6 Phosphatase
GST-pull down = Glutathione Sulfo Transferase
ID = Interaction Domain
IP = Immunoprécipitation
LBD = Domaine de liaison au ligand
LXR = Liver X Receptor
Motif CoRNR = Motif CoRepressor Nuclear Receptor
NA = Ouverture numérique
NCor = Nuclear CoRepressor
N&B = Number and Brightness
NO = Monoxyde d'azote
N-ter = Partie ou queue amine terminale
PEPCK = PhosphoEnol Pyruvate CarboxyKinase
PPAR = Récepteur active par les proliférateurs de peroxisome

PR = Récepteurs à la progestérone
RAR = Retinoid Acid Receptor
RD = Repression Domain = Domaine de répression
RN = Récepteurs Nucléaires
ROI = Région d'intérêt
RORE = Retinoic acid-related Orphan Receptor Element
RXR = Retinoid-X-Receptor
SMRT = Silencing Mediator (corepressor) for Retinoid-hormone
TAE = Tris Acetate EDTA
Tif2 = Transcription Intermediary Factor 2
TR = Thyroid hormone Receptor
TRP = Temps de résidence par pixel (Dwell time)
SVF = Sérum de veau fœtal

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

Figure 1.1 Représentation schématique de l'organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs nucléaire.....	6
Figure 1.2 Illustration des différents modes de liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN.....	7
Figure 1.3 Représentation schématique de trois différentes conformations du domaine de liaison au ligand de récepteurs nucléaires.....	8
Figure 1.4 Représentation schématique de l'organisation des récepteurs nucléaires sous deux conformations.....	9
Figure 1.5 Représentation schématique du gène de rat codant pour r-erbA α -1, r-erbA α -2 et RevErb α	10
Figure 1.6 Comparaison de la séquence déduite d'acides aminés de RevErb α avec d'autres membres de la super famille des RNs aux hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes.....	11
Figure 1.7 Représentation schématique de l'organisation de la protéine RevErb α	12
Figure 1.8 Séquence ADN représentant les zones de fixation de RevErb α dans les régions promotrice des gènes cibles du récepteur nucléaire.....	12
Figure 1.9 Représentation schématique du mode d'action des HATs et des HDACs dans la compaction ou la décompaction de la chromatine.....	14
Figure 1.10 Représentation schématique de l'organisation des corépresseurs NCor et SMRT.....	15
Figure 1.11 Alignement des séquences d'acides aminés des domaines ID1 et ID2 des 2 corépresseurs NCor et SMRT.....	16
Figure 1.12 Structure cristalline du complexe RevErb α LBD avec le peptide NCor ID1.....	18
Figure 1.13 Représentation schématique du mode d'action du complexe corépresseur RevErb α / NCor-HDAC3 sur la compaction de la chromatine et l'activité transcriptionnelle.....	19
Figure 1.14 Structure du LBD de RevErb β non lié et lié à une molécule d'hème.....	21
Figure 1.15 Représentation schématique et générale de l'organisation du complexe corépresseur.....	22
Figure 1.16 Voie métabolique de la néoglucogenèse.....	23

CHAPITRE 2

Figure 2.1 Diagramme de Jablonski.....	32
Figure 2.2 Représentation du principe de l'anisotropie de fluorescence et des résultats obtenus.....	33
Figure 2.3 Exemple de courbe obtenue lors d'une analyse d'anisotropie de fluorescence.....	34
Figure 2.4 Représentation du système étudié et des paramètres importants pour le choix du fluorophore.....	35
Figure 2.5 Comparaison des deux méthodes de réalisation de compétitions.....	37

Figure 2.6 Principe de la microscopie confocale.....	39
Figure 2.7 Représentation du principe de l'excitation 2-photons.....	41
Figure 2.8 Représentation des coefficients d'absorption d'échantillons biologiques et de l'eau dans le proche infrarouge.....	41
Figure 2.9 Représentation de la variance obtenue en fonction du type d'échantillon analysé.....	43
Figure 2.10 Etapes de construction d'une courbe d'autocorrélation.....	45
Figure 2.11 Analyse des fluctuations de l'intensité de fluorescence pour la construction d'une courbe d'autocorrélation.....	46
Figure 2.12 Exemple de courbe d'autocorrélation de deux espèces en solution marquées par 2FPs différentes.....	48
Figure 2.13 Représentation schématique du montage utilisé en microscopie de fluorescence.....	55
Figure 2.14 Illustration des filtres d'émission utilisés afin de maximiser la collecte des photons d'émission des 2 FPs.....	56
Figure 2.15 Spectres d'excitation et d'émission monophotonique et biphotonique des 2FPs mCherry et Cerulean.....	57
Figure 2.16 Représentation des différentes étapes de synthèse du plasmide mCherry-RevErb α	58
Figure 2.17 Représentation des différentes étapes de synthèse du plasmide Cerulean-NCor.....	59

CHAPITRE 3

Figure 3.1 Illustration du traitement des données brutes d'anisotropie de fluorescence et normalisation.....	62
Figure 3.2 (A) Courbes d'anisotropie représentant l'interaction de RevErb α -LBD avec les différents peptides corépresseurs marqués d'une sonde fluorescente. (B) Compétitions représentant l'interaction de RevErb α -LBD avec le peptide corépresseur NCor5 non marqué d'une sonde fluorescente.....	64
Figure 3.3 Compétitions représentant l'interaction de RevErb α -LBD avec les peptides corépresseurs, non marqués d'une sonde fluorescente, issus de NCor.....	65
Figure 3.4 Compétitions représentant l'interaction de RevErb α -LBD avec les peptides corépresseurs, non marqués d'une sonde fluorescente, issus de SMRT.....	66
Figure 3.5 Effet de l'hème à différentes concentration sur l'interaction de RevErb α -LBD avec le peptide NCor ID1 marqué d'une sonde fluorescente.....	68
Figure 3.6 Effet des ligands SGN et SD7, à différentes concentrations, sur l'interaction de RevErb α -LBD avec le peptide NCor ID1 marqué d'une sonde fluorescente.....	70
Figure 3.7 Effet de l'hème à différentes concentration sur l'interaction de RevErb α -LBD avec le peptide SMRT ID1 marqué d'une sonde fluorescente.....	71
Figure 3.8 Effet des ligands SGN et SD7 sur l'interaction de RevErb α -LBD avec le peptide SMRT ID1 marqué d'une sonde fluorescente.....	72
Figure 3.9 Effet des ligands Hème, SGN et SD7 sur l'interaction de RevErb α -LBD avec le peptide NCor5 marqué d'une sonde fluorescente.....	73

Figure 3.10 Histogramme représentant les valeurs de K_D pour l'association du LBD de RevErb α avec les trois peptides NCor ID1, SMRT ID1 et NCor marqués d'un fluorophore avec ou sans ligand SGN, SD7 ou l'hème.....	75
Figure 3.11 Structure cristallographique du LBD de RevErb α lié au peptide NCor ID1.....	77
Figure 3.12 Illustration détaillée des liaisons permettant la fixation du peptide NCor ID1 dans la poche de liaison des corégulateurs du LBD de RevErb α	78
Figure 3.13 Illustration de la fixation du peptide NCor ID1 dans la poche hydrophobe du LBD de RevErb α	79
Figure 3.14 Alignements de structures cristallographiques représentant l'interaction de différents RNs en complexe avec les peptides corépresseurs NCor ID1, NCor ID2 et SMRT ID2.....	80
Figure 3.15 Représentation de l'organisation structurale du RevErb β -LBD en présence ou en absence d'hème.....	81
Figure 3.16 Représentation des hélices α_3 des RNs RevErb α lié à NCor ID1 et RevErb β lié à une molécule d'hème.....	82
Figure 3.17 Représentation de l'alignement des structures RevErb α -LBD / NCor ID1 avec RevErb β /Hème.....	82

CHAPITRE 4

Figure 4.1 Spectres d'excitation et d'émission monophotonique et biphotonique des 2FPs mCherry et Cerulean.....	87
Figure 4.2 Courbe d'autocorrélation illustrant l'intervalle de temps permettant de choisir le TRP approprié.....	88
Figure 4.3 Représentation du traitement d'un noyau exprimant la protéine mCherry-RevErb α	89
Figure 4.4 Représentation du traitement d'une zone d'intérêt (ROI) sélectionnée spécifiquement à l'intérieur d'un noyau exprimant la protéine mCherry-RevErb α	90
Figure 4.5 Illustration des filtres d'émission utilisés afin de maximiser la collecte des photons d'émission des 2 FPs.....	91
Figure 4.6 Représentation du traitement d'un noyau exprimant la protéine Cerulean-NCor.....	92
Figure 4.7 Représentation du traitement d'une zone d'intérêt (ROI) sélectionnée spécifiquement à l'intérieur d'un noyau exprimant la protéine Cerulean-NCor.....	93
Figure 4.8 Histogrammes représentant la répartition des différents paramètres (Nombre de molécules, vraies brillances, concentration molaire et G01, G02) obtenues pour le complexe mCherry-NLS-Cerulean.....	96
Figure 4.9 Représentation du traitement d'un noyau exprimant la protéine mCherry-NLS-Cerulean (contrôle positif).....	97
Figure 4.10 Histogrammes représentant la dispersion des valeurs de Bcc et le pourcentage de complexes formés pour la protéine mCherry-NLS-Cerulean (contrôle positif).....	99
Figure 4.11 Représentation du traitement d'une zone d'intérêt (ROI) sélectionnée spécifiquement à l'intérieur d'un noyau exprimant les protéines mCherry-Tif2 et Cerulean-ER α	101

Figure 4.12 Histogrammes représentant la répartition des différents paramètres (Nombre de molécules, vraies brillances, concentration molaire et G01, G02) obtenues pour les protéines mCherry et Cerulean (contrôle négatif).....	102
Figure 4.13 Histogrammes représentant la dispersion des valeurs de Bcc et le pourcentage de complexes formés pour les protéines mCherry et Cerulean (contrôle négatif).....	103
Figure 4.14 Histogrammes représentant la répartition des différents paramètres (Nombre de molécules, vraies brillances, concentration molaire et G01, G02) obtenues pour le complexe mCherry-RevErb α / Cerulean-NCor.....	105
Figure 4.15 Représentation du traitement d'un noyau exprimant les protéines mCherry-RevErb α et Cerulean-NCor.....	106
Figure 4.16 Histogrammes représentant la dispersion des valeurs de Bcc et le pourcentage de complexes formés pour le complexe protéique mCherry-RevErb α et Cerulean-NCor.....	107
Figure 4.17 Illustration de la répartition des protéines formant de gros complexes ou agrégats.....	108
Figure 4.18 Histogrammes représentant la répartition des différents paramètres (Nombre de molécules, vraies brillances, concentration molaire et G01, G02) obtenues pour le complexe mCherry-RevErb α / Cerulean-NCor en présence d'hème.....	110
Figure 4.19 Représentation du traitement d'un noyau exprimant les protéines mCherry-RevErb α et Cerulean-NCor en présence d'hème.....	111
Figure 4.20 Histogrammes représentant la dispersion des valeurs de Bcc et le pourcentage de complexes formés pour le complexe protéique mCherry-RevErb α et Cerulean-NCor en présence d'hème.....	112
Figure 4.21 Histogrammes représentant la répartition des différents paramètres (Nombre de molécules, vraies brillances, concentration molaire et G01, G02) obtenues pour le complexe mCherry-RevErb α / Cerulean-NCor en présence de SGN.....	114
Figure 4.22 Représentation du traitement d'un noyau exprimant les protéines mCherry-RevErb α et Cerulean-NCor en présence de SGN.....	115
Figure 4.23 Histogrammes représentant la dispersion des valeurs de Bcc et le pourcentage de complexes formés pour le complexe protéique mCherry-RevErb α et Cerulean-NCor en présence de SGN.....	116
Figure 4.24 Histogrammes représentant la répartition des différents paramètres (Nombre de molécules, vraies brillances, concentration molaire et G01, G02) obtenues pour le complexe mCherry-RevErb α / Cerulean-NCor en présence de SD7.....	118
Figure 4.25 Représentation du traitement d'un noyau exprimant les protéines mCherry-RevErb α et Cerulean-NCor en présence de SD7.....	119
Figure 4.26 Histogrammes représentant la dispersion des valeurs de Bcc et le pourcentage de complexes formés pour le complexe protéique mCherry-RevErb α et Cerulean-NCor en présence de SD7.....	120
Figure 4.27 Histogrammes représentant la répartition des différents paramètres (Nombre de molécules, vraies brillances, concentration molaire et G01, G02) obtenues pour le complexe mCherry-RevErb α / Cerulean-SMRT.....	122
Figure 4.28 Représentation du traitement d'un noyau exprimant les protéines mCherry-RevErb α et Cerulean-SMRT.....	123
Figure 4.29 Histogrammes représentant la dispersion des valeurs de Bcc et le pourcentage de complexes formés pour le complexe protéique mCherry-RevErb α et Cerulean-SMRT.....	124

Figure 4.30 Histogrammes représentant le pourcentage de complexes formés : mCherry-RevErb α / Cerulean-NCor avec ou sans hème ($e_1 - e_2 < 0.2$).....	128
Figure 4.31 Histogrammes représentant le pourcentage de complexes formés : mCherry-RevErb α / Cerulean-NCor avec ou sans hème (Cellules homogènes).....	129
Figure 4.32 Histogrammes représentant le pourcentage de complexes formés : mCherry-RevErb α / Cerulean-NCor avec ou sans SGN ($e_1 - e_2 < 0.2$).....	130
Figure 4.33 Histogrammes représentant le pourcentage de complexes formés : mCherry-RevErb α / Cerulean-NCor avec ou sans SGN (Cellules homogènes).....	131
Figure 4.34 Histogrammes représentant le pourcentage de complexes formés : mCherry-RevErb α / Cerulean-NCor avec ou sans SD7 ($e_1 - e_2 < 0.2$).....	132
Figure 4.35 Histogrammes représentant le pourcentage de complexes formés : mCherry-RevErb α / Cerulean-NCor avec ou sans SD7 (Cellules homogènes).....	133
Figure 4.36 Représentation des moyennes de Bcc (G0x) obtenues pour les contrôles positifs et négatifs et pour l'interaction de RevErb α /NCor en absence et en présence des différents ligands hème, SGN et SD7 pour toutes les noyaux analysés.....	134
Figure 4.37 Représentation des moyennes de Bcc (G0x) obtenues pour les contrôles positifs et négatifs et pour l'interaction de RevErb α /NCor en absence et en présence des différents ligands hème, SGN et SD7. Les cellules sont triées selon leur homogénéité et leurs brillances.....	134
Figure 4.38 Représentation des moyennes de pourcentages de complexes formés pour les protéines RevErb α et NCor en absence et en présence de ligands (hème, SGN et SD7).....	135

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2

Tableau 2.1 Compilation de tous les peptides utilisés au cours des essais d'anisotropie de fluorescence.....	30
--	----

CHAPITRE 3

Tableau 3.1 Compilation de tous les peptides utilisés au cours des essais d'anisotropie de fluorescence.....	62
Tableau 3.2 Tableau récapitulatif des constantes d'affinité (K_D) obtenues pour l'interaction du RevErb α -LBD avec les peptides NCor et SMRT marqués et non marqués d'un fluorophore.....	66
Tableau 3.3 Tableau récapitulatif des constantes d'affinité (K_D) obtenues pour l'interaction du RevErb α -LBD avec les peptides NCor ID1 fluorescéine, SMRT ID1 Rhodamine 110 et NCor5 Atto647N en présence et en absence de ligands (hème, SGN et SD7).....	73
Tableau 3.4 Tableau récapitulatif des structures utilisées pour la cristallisation et l'étude par anisotropie de fluorescence.....	76
Tableau 3.5 Tableau récapitulatif des valeurs de K_D pour l'association du LBD de RevErb α avec les peptides NCor ID1, SMRT ID1 ou NCor5 en présence ou en absence de ligands SGN, SD7 ou hème.....	84

Abstract

Nuclear receptors are members of ligand-inducible factors that regulate the transcription of many genes. Nuclear receptor RevErb α constitutively inhibits the transcription of target genes via the recruitment of the corepressor complex NCor-HDAC3 (Nuclear CoRepressor and Histone DeAcetylase 3). This complex plays an important role in circadian clock and glucogenesis via regulation of the transcription of the G6P (Glucose-6-Phosphate) and PEPCK (PhosphoEnol Pyruvate Carboxy Kinase) genes, both coding for proteins involved in glucogenesis, which is central to type 2 diabetes. Here we have investigated the interaction of the nuclear receptor RevErb α with two corepressors: NCor and SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Receptors). We choose to study the interaction of the RN with SMRT because of sequences similarity between the two corepressors and also because they are most of the time interacting with the same nuclear receptor. On the other hands, several studies reveled that SMRT and RevErb α are not interacting *in vivo*. But peptides from this proteins associate *in vitro*. To study these interactions, we use two complementary fluorescence techniques: Number & Brightness and fluorescence anisotropy to investigate the effect of several ligands on this interaction. Three ligands will be tested: heme which is reported to be the natural ligand of RevErb α and two synthetics and non-naturals ligands of RevErb α (SGN and SD7). By fluorescence anisotropy (*in vitro*) we confirmed an interaction between RevErb α and an NCor peptide and reveal the effect of the three ligands on this interaction. We also study the interaction between RevErb α and several peptides from NCor corresponding to the necessary domains for it binding to RevErb α . We succeed to determine affinity constants for these interactions. We demonstrate, as well the destabilizing effect of heme binding to RevErb α on it interaction with NCor *in vitro*. We also confirm an interaction between RevErb α and a SMRT peptide corepressor. In order to confirm the functional relevance of these results, we used 2 photons 2 colors Cross Number and Brightness (N&B), an imaged-based fluorescence fluctuation technique (Digman *et al*, 2008) to study specific interactions of RevErb α with NCor and SMRT full length *in cellulo* as well as the effect of several ligands above mentioned. We show for the first time a specific interaction between RevErb α and SMRT corepressor full length *in cellulo*. The ultimate goal of those studies is to identify ligands that enhance the recruitment of the corepressor complex NCor/HDAC3 by RevErb α , thus leading to a decrease expression of the target gene. Such a ligand could be of interest in the quest to decrease blood glucose levels in type 2 diabetes.

Résumé

Les récepteurs nucléaires sont membres d'une famille de protéines activées par des ligands et qui régulent la transcription de nombreux gènes. Le récepteur nucléaire RevErb α est constitutivement inhibiteur de la transcription de gènes cibles via le recrutement du complexe corépresseur NCor-HDAC3 (Nuclear CoRepressor et Histone DeAcetylase 3). Ce dernier joue un rôle important dans le contrôle de l'horloge circadienne et de la glucogénèse via la régulation de la transcription des gènes codant pour les enzymes G6Pase (Glucose-6-Phosphatase) et PEPCK (PhosphoEnol Pyruvate Carboxy Kinase). Celles-ci sont impliquées dans la glucogénèse qui est dérégulée en cas de diabète de type 2. Ce travail est basé sur l'investigation de l'interaction du récepteur nucléaire RevErb α avec deux corépresseurs : son partenaire établi NCor et SMRT (Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Receptors). Malgré ce qui est rapporté dans la littérature, c'est-à-dire que SMRT et RevErb α n'interagissent pas fonctionnellement *in vivo*, nous avons choisi d'étudier cette interaction à cause de la similarité de séquences entre les deux corépresseurs, mais également parce que des peptides issus de SMRT se lient à RevErb α *in vitro*. Afin d'étudier ces interactions, nous avons utilisé deux techniques complémentaires basées sur l'émission de fluorescence : l'anisotropie de fluorescence *in vitro* et la N&B *in cellulo*. L'effet de trois ligands a également été étudié sur ces interactions : l'hème qui est rapporté comme étant le ligand naturel de RevErb α et deux ligands synthétiques de RevErb α (SGN et SD7). Grâce à l'anisotropie de fluorescence, nous avons confirmé et quantifié l'interaction entre le domaine de liaison au ligand (LBD) de RevErb α et un peptide NCor contenant le domaine d'interaction majeur pour RevErb α et nous avons déterminé l'effet des trois ligands sur cette interaction. Nous avons également quantifié l'interaction entre RevErb α et d'autres peptides provenant de NCor et correspondant aux autres domaines d'interaction nécessaires pour sa liaison à RevErb α . Nous avons déterminé que l'hème et le SD7 ont un effet déstabilisateur, alors que le ligand SGN améliore la stabilité des complexes *in vitro*. Nous avons également confirmé une interaction entre RevErb α et deux peptides corépresseurs issus de SMRT. Afin d'étudier les interactions des protéines pleine taille dans un contexte plus fonctionnel, nous avons utilisé le 2-photons-2-couleurs Number & Brightness. C'est une technique de microscopie basée sur la fluctuation de l'intensité de fluorescence pour étudier les interactions spécifiques de RevErb α avec NCor et SMRT pleine taille *in cellulo* ainsi que l'effet des ligands, précédemment mentionnés, sur ces interactions. Nous démontrons pour la première fois l'interaction spécifique de RevErb α avec SMRT pleine taille *in cellulo*. La continuité de ce travail pourrait être ciblée sur l'identification de ligands qui augmenteraient le recrutement de complexe corépresseur NCor-HDAC3 sur RevErb α , menant ainsi à la diminution de l'expression des gènes cibles. En définitive, un ligand tel que celui-ci pourrait être d'un grand intérêt dans la recherche de la diminution de glucose dans le sang dans les cas de diabète de type 2.

REMERCIEMENTS	3
ABREVIATIONS	5
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX.....	13
ABSTRACT	15
RESUME	16
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	5
I. RECEPTEURS NUCLEAIRES : GENERALITES	5
1) <i>Historique et découverte des récepteurs nucléaires</i>	5
2) <i>Structure des récepteurs nucléaires</i>	6
a) Structure générale des récepteurs nucléaires.....	6
b) Agoniste / Antagoniste	8
II. LE COMPLEXE REVERBA / NCOR	9
1) <i>Le récepteur nucléaire RevErba</i>	9
a) Organisation structurale de RevErba	10
b) Liaison de RevErba aux régions promotrices	12
2) <i>Le corépresseur NCor</i>	13
a) Implication des histones pour la répression de la transcription.....	14
3) <i>Mécanisme d'action du complexe répresseur RevErba / NCor-HDAC3</i>	15
a) Interaction RevErba / NCor	15
b) Cristallisation du domaine de liaison au ligand de RevErba avec le peptide ID1 de NCor.....	17
4) <i>Implication du complexe RevErba-NCor/HDAC3 dans le rythme circadien</i>	18
a) Le rythme circadien.....	18
b) Implication de l'hème dans le complexe répresseur	19
c) Implication du complexe corépresseur dans le diabète	23
III. BUT DU PROJET.....	24
1) <i>Les ligands connus</i>	24
a) Le SGN114	24
b) SD7	25
2) <i>Approche du sujet</i>	26
a) L'anisotropie de fluorescence (<i>in vitro</i>).....	26
b) Number & Brightness (<i>in cellulo</i>)	26
CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES.....	29
I. METHODOLOGIE POUR LES ETUDES D'INTERACTION <i>IN VITRO</i>	30
1) <i>Purification du LBD de RevErba</i>	30
2) <i>Peptides utilisés</i>	30
3) <i>Principe de la fluorescence</i>	31
4) <i>Anisotropie de fluorescence</i>	33
a) Principe de la technique.....	33
b) Méthodologie et traitements des données.....	36
II. PRINCIPE DE LA MICROSCOPIE DE FLUCTUATION DE FLUORESCENCE	38
1) <i>La microscopie confocale</i>	38
2) <i>La microscopie biphotonique</i>	40
3) <i>FCS & FCCS</i>	42
a) Notions de variance	43
b) La fonction d'autocorrélation	44

c) La corrélation croisée	46
III. METHODOLOGIE POUR LES ETUDES D'INTERACTION <i>IN CELLULO</i>	49
1) Principe de la technique de Number and Brightness (N&B)	49
2) Méthodes d'analyse des données	52
3) Matériels utilisés.....	55
a) Montage du microscope et filtres	55
b) Protéines fluorescentes mCherry et Cerulean.....	56
c) Construction des plasmides mCherry-RevErba et Cerulean-NCor	57
d) Culture cellulaire	59
i. Congélation / Décongélation des cellules Cos7	59
ii. Transfections transitoires	59
CHAPITRE 3 : RESULTATS : ETUDE <i>IN VITRO</i> DES INTERACTIONS ENTRE LE DOMAINE DE LIAISON DU LIGAND DE REVERBA ET DES PEPTIDES COREGULATEURS PAR ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE	61
I. L'INTERACTION DE REVERBA AVEC DIFFERENTS PEPTIDES COREPRESSEURS.....	63
1) Interaction entre RevErba-LBD et des peptides SMRT et NCor comportant un seul domaine ID.....	63
II. EFFET DE L'HEME ET DES LIGANDS NON-NATURELS SUR L'INTERACTION REVERBA / NCor	67
1) Effet de l'hème sur le complexe RevErba / NCor	67
2) Effets des ligands SGN et SD7 sur le complexe RevErba / NCor	69
III. ETUDE DE L'EFFET DE L'HEME ET DES LIGANDS SUR LE COMPLEXE REVERBA / SMRT	70
1) Effet de l'hème sur l'interaction RevErba / SMRT	71
2) Effet des ligands SGN et SD7 sur l'interaction RevErba / SMRT	71
IV. ETUDE DE L'EFFET DE L'HEME ET DES LIGANDS SUR LE COMPLEXE REVERBA / NCor5.....	73
V. CONCLUSIONS ET DISCUSSION	74
CHAPITRE 4 : RESULTATS DE MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE <i>IN CELLULO</i>	85
I. VALIDATION DES PROTEINES FLUORESCENTES UTILISEES	86
1) La protéine mCherry-RevErba.....	87
2) Protéine Cerulean-NCor	91
II. VALIDATION DE LA TECHNIQUE	94
1) Contrôle positif : mCherry-NLS-Cerulean	95
2) Contrôle positif : mCherry-Tif2/Cerulean-ERa	100
3) Contrôle négatif : solution de mCherry et Cerulean.....	101
III. INTERACTION <i>IN CELLULO</i> DE REVERBA ET NCor PLEINE TAILLE	103
1) Interaction de mCherry-RevErba et Cerulean-NCor en absence de ligands.....	104
2) Interaction de mCherry-RevErba et Cerulean-NCor en présence de ligand	109
a) Effet de l'hème, ligand naturel de RevErba, sur la formation de complexes	110
b) Effet du SGN, ligand non naturel de RevErba, sur la formation de complexes	113
c) Effet du SD7, ligand non naturel de RevErba, sur la formation de complexes	117
IV. INTERACTION <i>IN CELLULO</i> DE REVERBA ET SMRT PLEINE TAILLE	121
V. CONCLUSIONS ET DISCUSSION	124
CHAPITRE 5 : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	137
ANNEXES.....	143
BIBLIOGRAGHIE.....	171

INTRODUCTION GENERALE

Les mécanismes de transcription sont des phénomènes hautement régulés par de nombreux facteurs, notamment par les récepteurs nucléaires. Ces derniers peuvent agir en tant qu'activateurs de transcription en présence d'un coactivateur ou en tant qu'inhibiteurs avec un corépresseur. Ce travail de thèse s'est articulé principalement autour de deux protéines nucléaires particulières, le récepteur nucléaire RevErb α et son corépresseur NCor. La particularité de ce récepteur nucléaire est qu'il est inhibiteur constitutionnel de transcription, c'est-à-dire qu'il ne sera jamais activateur. En effet, un domaine responsable du recrutement des coactivateurs est absent chez RevErb α . D'autre part, ce complexe est impliqué dans la régulation du rythme circadien et de nombreuses voies métaboliques notamment dans la glucogénèse. Le couple RevErb α / NCor régule la transcription des gènes codant pour les enzymes G6Pase et PEPCK. Ces dernières participent à la synthèse de glucose qui, dans le cas d'un diabète de type 2, s'accumule dans le sang. Le but de ce projet est, entre autre, d'identifier des ligands favorisant l'interaction entre RevErb α et NCor et ainsi diminuer la transcription des gènes codant pour les enzymes G6Pase et PEPCK et donc de diminuer l'accumulation de glucose dans le sang.

J'ai commencé à travailler sur ce projet lors de mon stage de maîtrise dans l'institut de Recherche Servier. Le but du projet consistait en la mise au point de plusieurs techniques biophysiques permettant l'identification rapide et efficace des composés qui interagissent non spécifiquement avec la protéine RevErb α . La continuité du projet était donc de tester les composés, identifiés par les techniques biophysiques, sur le complexe protéique RevErb α / NCor et de vérifier si leur interaction est spécifique et comment elle affecte la liaison des protéines ainsi que l'activité transcriptionnelle. C'est donc avec cet objectif que j'ai intégré le Centre de Biochimie Structurale (CBS) et que j'ai commencé à mettre en place les outils nécessaires à la mise en place du projet.

Les techniques permettant la mise en évidence d'une interaction sont nombreuses, qu'elles soient *in vitro* (FRET, anisotropie de fluorescence, colocalisation par immunofluorescence, etc...) ou *in vivo* (double hybride, immunoprécipitation, CoIP, GST-pull down, etc...). Cependant, le but du projet n'est pas de prouver une interaction mais de la caractériser et de la quantifier. Pour cela les techniques d'anisotropie de fluorescence et de microscopie à fluctuations de fluorescence (Number and Brightness : N&B) ont été choisies. La première permet de tester l'interaction entre le domaine de liaison au ligand du récepteur nucléaire et différents peptides issus du corépresseur NCor *in vitro*. Des constantes d'affinités précises ont été déterminées permettant d'identifier les parties indispensables à l'interaction. D'autre part, cette étape sert de criblage de ligands, une vingtaine ont été testés et trois sont présentés dans ce manuscrit : l'hème rapporté comme étant le ligand naturel de RevErb α et deux ligands synthétiques, SGN et SD7, identifiés au cours de criblages haut débit. Lors du travail d'anisotropie de fluorescence, nous nous sommes intéressés au corépresseur SMRT car nous avons identifié qu'un peptide SMRT interagissait de manière plus importante avec RevErb α que le même peptide issu de NCor. Ce dernier est pourtant rapporté comme étant le seul corépresseur fonctionnellement capable d'interagir avec RevErb α . Cependant, une si forte affinité avec un peptide SMRT révèle que l'interaction de ce corépresseur avec le récepteur nucléaire pourrait être spécifique. Nous avons donc décidé d'apporter plus d'informations sur l'interaction de SMRT avec RevErb α *in vitro* et *in cellulo*. La technique de microscopie de fluctuations de fluorescence a permis de vérifier l'interaction des protéines pleine taille ainsi que l'effet des ligands. Cette méthode est adaptée à l'observation de cellules vivantes eucaryotes et nécessite l'expression des protéines d'intérêts marquées par des protéines fluorescentes. Le N&B fournit ainsi une carte spatiale de la localisation des complexes dans le noyau cellulaire. D'autre part, les informations retirées de cette technique permettent de calculer le pourcentage de complexes formés en présence et en absence de ligand. Les différences sont plus facilement mises en évidence de cette manière et leur effet peut être

directement visualisé. Enfin, pour compléter cette étude, des tests sur l'activité transcriptionnelle du complexe avec et sans ligand permettront d'apporter une information fonctionnelle en plus des observations structurales que nous avons pu déterminer par l'anisotropie et la microscopie de fluorescence. C'est ainsi qu'il a été établi une collaboration avec Vincent Cavaillès, de l'Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM) pour l'élaboration de tests rapporteurs à la luciférase. Ces travaux ne seront pas présentés dans ce manuscrit car ils sont en cours de réalisation.

Ma première année de thèse a été consacrée à la mise en place des deux techniques de fluorescence. Premièrement, j'ai construit les plasmides nécessaires à la microscopie de fluorescence. Le but était de synthétiser les protéines d'intérêts (RevErba et NCor) marquées en N-ter par deux protéines fluorescentes (mCherry et RevErba). J'ai été aidée dans cette étape par Frédéric Allemand, ingénieur de recherche au CBS. Les plasmides synthétisés et leur séquence vérifiée, j'ai déterminé les paramètres de transfection adéquats ainsi que les conditions d'imagerie pour la microscopie N&B. L'expression des protéines d'intérêts dans les cellules s'effectue par transfection transitoire, ce qui engendre une concentration protéique intracellulaire importante. La microscopie de fluorescence est une technique très sensible et nécessite donc un paramétrage particulier et précis. En effet, cette première année a été, entre autres, axée sur la recherche des paramètres de transfection optimaux afin d'obtenir une concentration de protéine adéquate pour l'identification d'une interaction. En parallèle de ce travail, les contrôles positifs et négatifs en microscopie ont été testés et validés. Le montage microscopique étant déjà en place lors de mon arrivée au laboratoire, j'ai donc pu déterminer directement les paramètres d'imagerie : la longueur d'onde d'excitation optimale des deux protéines fluorescentes, les filtres adéquats à la collecte maximale des photons d'émission, la puissance du laser, le nombre d'images qu'il était nécessaire de réaliser et enfin le temps de résidence par pixel. La validité des protéines fluorescentes a également été testée lors de cette première année. Il a été établi que la mCherry et la Cerulean pouvaient être excitées efficacement et qu'elles n'établissaient pas de recouvrement spectral à la détection, ce qui est un avantage certain et qui a permis d'établir de manière spécifique l'interaction entre les deux protéines.

En parallèle du travail *in cellulo* qui a été réalisé, j'ai également effectué des essais *in vitro* en anisotropie de fluorescence. La protéine, correspondant au domaine de liaison au ligand de RevErba, était purifiée par Servier qui me l'envoyait. Nous avons rencontré quelques soucis de solubilité et de conservation de la protéine, ce qui m'a amenée à apprendre, en deuxième année, comment la purifier. Le but de ce manuscrit étant d'identifier l'effet de ligands sur l'interaction RevErba / NCor, il était nécessaire d'identifier un peptide corépresseur présentant une affinité qui permette de déterminer les effets stabilisateur ou déstabilisateur des ligands sur l'interaction des protéines d'intérêts. Pour cela, nous avons décidé de tester l'interaction entre le récepteur nucléaire et un peptide corépresseur, correspondant au domaine essentiel et nécessaire de NCor pour sa liaison à RevErba. Plusieurs peptides et fluorophores ont été testés à cette occasion avant de finalement choisir celui présenté dans ce manuscrit. J'ai été aidé par les membres de l'équipe de William Bourguet au CBS qui m'ont fourni les peptides corépresseurs présentés dans ce manuscrit. C'est ainsi que l'interaction de RevErba avec un peptide corépresseur issu de SMRT a été étudiée. L'affinité déterminée entre ces deux protéines nous a poussés à mieux caractériser ce mécanisme de fixation et à étudier ce corépresseur ainsi que l'effet des ligands.

Durant ma deuxième année de thèse, j'ai testé l'effet d'une vingtaine de ligands sur l'interaction des peptides corépresseurs NCor et SMRT avec le domaine de liaison au ligand de RevErba en anisotropie de fluorescence. Certains problèmes ont été identifiés, à savoir que quelques ligands émettaient de la fluorescence non spécifique, de ce fait le signal d'anisotropie de fluorescence était faussé. Il a donc été décidé de réaliser une normalisation des courbes afin de s'affranchir des effets indésirables des ligands et de ne visualiser que leur effet stabilisant ou déstabilisant de l'interaction. Une partie de l'année a donc été consacrée aux traitements des données d'anisotropie. Une fois l'effet des ligands testé en anisotropie de fluorescence, ils ont été étudiés en microscopie de fluorescence. J'ai d'abord commencé par tester l'interaction des protéines pleine taille en absence de ligand. Celle-ci étant positive et spécifique, les ligands, ayant été identifiés pour avoir un effet sur l'interaction, ont été étudiés sur les protéines pleine taille.

C'est au cours de la troisième année que tous les peptides corépresseurs de NCor et SMRT ont été testés pour leur interaction avec le domaine de liaison au ligand de RevErb α . Ces domaines, isolés sur les corépresseurs, correspondent aux séquences rapportées comme étant nécessaire à l'interaction du récepteur nucléaire avec son corépresseur et stabilisant la liaison du complexe. Enfin des expériences de compétitions ont été réalisées afin de vérifier l'influence des fluorophores sur l'interaction des peptides en anisotropie de fluorescence. Concernant la microscopie de fluorescence, cette dernière année a été consacrée exclusivement à l'accumulation de statistiques. Nous nous sommes donc concentrés sur trois ligands (Hème, SGN et SD7) identifiés en anisotropie de fluorescence comme modifiant significativement l'affinité du complexe domaine de liaison au ligand de RevErb α / Peptide NCor. Un grand nombre de cellules a été imagé dans différentes conditions afin de permettre l'identification d'un effet spécifique des ligands sur l'interaction.

Le traitement et l'exploitation des données, collectées en microscopie pendant ces trois années de thèse, ont été un élément clé de ce travail. La technique de N&B utilisée ici est plutôt novatrice et encore peu utilisée. Il est vrai qu'une interaction spécifique est facilement identifiable par cette méthode, à condition que les paramètres d'observations et d'imagerie aient été soigneusement choisis en amont. Cependant, la détermination du pourcentage de complexes formés est plus délicate et nécessite de prendre en compte l'oligomérisation et l'expression des protéines, la santé des cellules etc... Tous ces paramètres ont été identifiés au cours de ces trois années et seront détaillés dans ce manuscrit. En outre, l'identification précise de l'effet d'un ligand requiert des statistiques importantes afin d'isoler spécifiquement l'action de celui-ci sur l'interaction.

La suite de ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres :

- Le premier présente en détail les protéines RevErb α , NCor et SMRT, leurs effets sur l'activité transcriptionnelle de gènes cible, leurs modes de liaisons ainsi que leurs modes d'action. L'hème, ligand naturel de RevErb α , sera présenté dans ce chapitre. Le but du projet sera présenté ainsi que les méthodes mises en place pour cela.
- Le deuxième expose, en détail, les deux techniques principales utilisées dans ce travail. Leur mise en place, le matériel utilisé et le traitement des données seront présentés dans ce chapitre.
- Le troisième présentera les résultats obtenus *in vitro* en anisotropie de fluorescence. La discussion sera principalement axée sur l'aspect structural de l'interaction en présence et en absence de ligand et plus particulièrement en présence d'hème dont les effets paraissent opposés *in vitro* et *in vivo*.
- Enfin, le quatrième présente les résultats obtenus *in cellulo* en N&B. Nous démontrons l'efficacité de la technique dans l'identification d'une interaction spécifique et mettons au point une méthode de calcul pour la détermination du pourcentage de complexes formés, prenant en compte l'état d'oligomérisation des protéines.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

I. Récepteurs nucléaires : Généralités

1) Historique et découverte des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires (RN) sont une famille de protéines qui régulent l'expression des gènes en se liant à leur région promotrice. Ces RN régulent l'activité transcriptionnelle en s'associant avec des ligands ou hormones, entraînant le recrutement de coactivateur ou corépresseur (corégulateurs). La découverte et surtout l'identification ainsi que la classification de ces protéines au sein de cette super famille aura nécessité des années.

Tout débuta par des travaux focalisés sur les hormones lipophiles, comprenant les hormones stéroïdiennes, rétinoidiennes et thyroïdiennes, toutes ayant la capacité de diffuser au travers des membranes afin d'atteindre leur cible à l'intérieur de la cellule. Ces hormones ont été isolées au début du siècle d'après leurs capacités à affecter le développement, la différenciation cellulaire ou la physiologie. Alors que les mécanismes de translocation entre milieu extra et intra cellulaire sont encore évasifs, le développement de ligands (hormones) radio marqués en 1966 permet l'identification de protéines de liaison. Ce radio marquage démontre une translocation de ces molécules du cytoplasme vers le noyau. La mise en évidence de cette diffusion dirigée soulève de nombreuses questions, notamment de savoir s'il existe une connexion entre un contrôle transcriptionnel et une réponse physiologique de la cellule en réponse à la présence de ces hormones (Jensen *et al*, 1966).

Dans le milieu des années 1970, il est démontré que les hormones stéroïdiennes sont adressées spécifiquement à leurs tissus cibles et se lient avec une très forte affinité aux récepteurs nucléaires. Ces études biochimiques, révélant la capacité de ces hormones à traverser les membranes lipidiques, ont ainsi abouti en 1985, à la proposition d'un modèle d'action. Celui-ci suppose que la liaison de l'hormone à son récepteur entraîne un changement allostérique de ce dernier, permettant ainsi au complexe hormone-récepteur de se lier à des zones bien spécifiques de la chromatine et de réguler la transcription (Yamamoto 1985).

Suite à cela, un gros travail d'identification des ADNc codant pour ces différents récepteurs a permis leur classification en trois grandes classes de récepteurs nucléaires.

- Type I : Les récepteurs aux hormones stéroïdiennes, incluant les récepteurs aux progestérones, œstrogène, androgène et glucocorticoïde (Green *et al*, 1986)
- Type II : Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes, incluant les récepteurs à l'acide rétinique (RAR et RXR) et à la vitamine D3 (Giguere *et al*, 1987)
- Type III : Les récepteurs dits orphelins, c'est-à-dire les récepteurs dont le ligand ou l'hormone n'est pas connu (McKenna *et al*, 1999).

Les gènes codant pour ces 3 types de récepteurs nucléaires sont localisés sur 2 loci : le c-erbA α , porté par le chromosome 17 et le c-erbA β localisé sur le chromosome 3 (Sap *et al*, 1986 ; Weinberger *et al*, 1986).

Le clonage de ces premiers récepteurs est une grande étape, démontrant la capacité de ligands très différents à interagir avec des récepteurs structuralement similaires. Après cela, de nombreux récepteurs nucléaires avec leurs hormones associées ou pas (RN orphelins) ont été identifiés. C'est ainsi que leur structure générale ainsi que leurs fonctions ont pu être établies.

2) Structure des récepteurs nucléaires

a) Structure générale des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription reconnus en tant que protéines modulaires, c'est-à-dire organisées en plusieurs domaines et dont la structure générale sera commune à d'autres protéines de la même famille. Ces protéines présentent un minimum d'organisation structurale permettant leur stabilité ainsi que leur propre repliement. Les différents domaines sont généralement composés de structures secondaires : hélices α et feuillets β (Giovanni *et al*, 2004). Ces récepteurs nucléaires sont classiquement composés de 6 domaines ou régions (de A à F) (Figure 1.1).

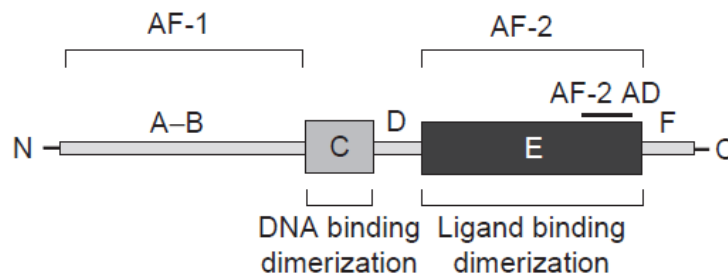


Figure 1.1 : Représentation schématique de l'organisation structurale et fonctionnelle générale des récepteurs nucléaires (Bourguet *et al*, 2000).

- Les régions A et B correspondent au domaine de transactivation 1 (AF1). Il participe à l'activation de la transcription.
- Le domaine C correspond au domaine de liaison à l'ADN (DBD). Il est le domaine le plus conservé et comporte également 2 structures en doigts de zinc permettant la liaison à l'ADN. Ce domaine est également porteur de la séquence d'adressage au noyau (NLS) du récepteur nucléaire, elle est localisée entre les acides aminés 198-226 à l'intérieur des motifs en doigts de zinc (Chopin-Delannoy *et al*, 2003).
- La région D est un domaine de liaison permettant de relier le domaine AF1 avec le domaine AF2 (région E).
- La région E, correspondant au domaine de transactivation 2 (AF2), est beaucoup moins conservée que le domaine AF1 et permet la liaison des ligands ainsi que la transactivation ligand dépendant. Cette région correspond au domaine de liaison du ligand (LBD) et d'activation ligand dépendant. Le LBD permet la dimérisation des récepteurs, il est composé de 12 hélices α et le positionnement de l'hélice H12 va déterminer l'activité du récepteur (activation ou inhibition de la transcription).
- La région F n'est pas présente dans tous les récepteurs et sa fonction n'est que peu connue.

Les domaines de transactivation sont des domaines permettant l'interaction du récepteur nucléaire avec les corégulateurs et les ligands. La liaison d'un coactivateur (CoA) entraîne l'activation de la transcription des gènes cibles, alors que celle d'un corépresseur (CoR) aboutit à l'inhibition de la transcription (Gronemeyer *et al*, 1995).

Dans un premier temps, le récepteur nucléaire dimérise grâce au domaine AF2 (LBD) et se lie

à l'ADN au niveau des promoteurs des gènes cibles par les motifs en doigts de zinc contenu dans le DBD comportant des séquences spécifiques appelées Elément de Réponse aux Hormones (HRE). Ces séquences sont organisées en 2 motifs consensus de 6 paires de bases : AGAACA, reconnu principalement par les récepteurs des hormones stéroïdiennes, ou AGG/TTCA, reconnu par l'ensemble des autres récepteurs (y compris RevErb α). L'arrangement de ces séquences ainsi que leur espacement de 0 à 5 paires de bases, confère la spécificité de liaison des récepteurs nucléaires. Ces derniers se lient à ces séquences HRE sous forme monomérique, homodimérique ou hétérodimérique. La disposition des séquences pour l'interaction d'un dimère s'organise en palindrome, palindrome inversé (pour les RNs de type 1) ou en répétition directe (pour les RNs de type 2) en présence ou en absence de ligand (Figure 1.2) (Tsai *et al*, 1994).

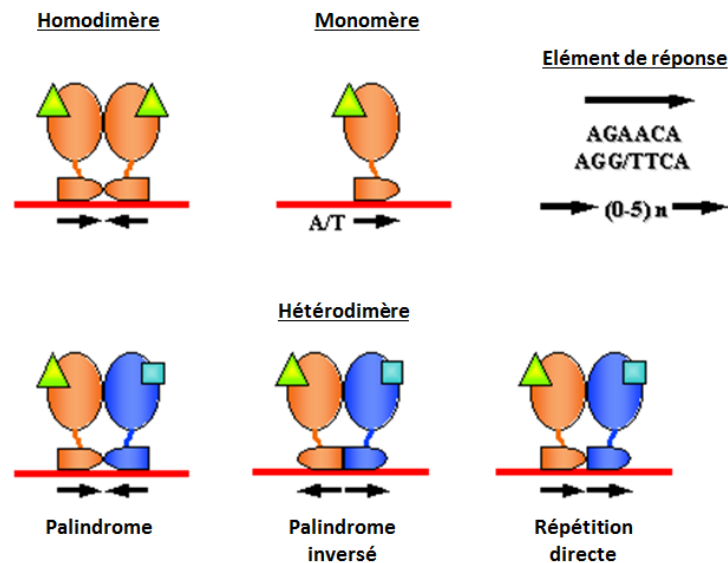


Figure 1.2 : Illustration des différents modes de liaison des récepteurs nucléaires à l'ADN. Les RNs peuvent se fixer sous forme monomérique, homodimérique ou hétérodimérique à des séquences consensus spécifiques (HRE = Elément de réponse aux hormones, représentées par des flèches) de 6 pb espacées de 0 à 5 pb. Ces séquences HRE peuvent être disposées en palindrome, en palindrome inversé ou en répétition directe conférant la spécificité de liaison des récepteurs nucléaires sur ces séquences consensus.

En absence de ligand, le récepteur nucléaire adopte une conformation bien particulière, notamment concernant l'hélice α H12 qui reste libre (Figure 1.3 A). Une fois le récepteur lié à l'ADN, il peut agir en tant qu'agoniste (Figure 1.3 B) en améliorant la transcription des gènes, ou bien en tant qu'antagoniste (Figure 1.3 C) en inhibant la transcription des gènes cibles.

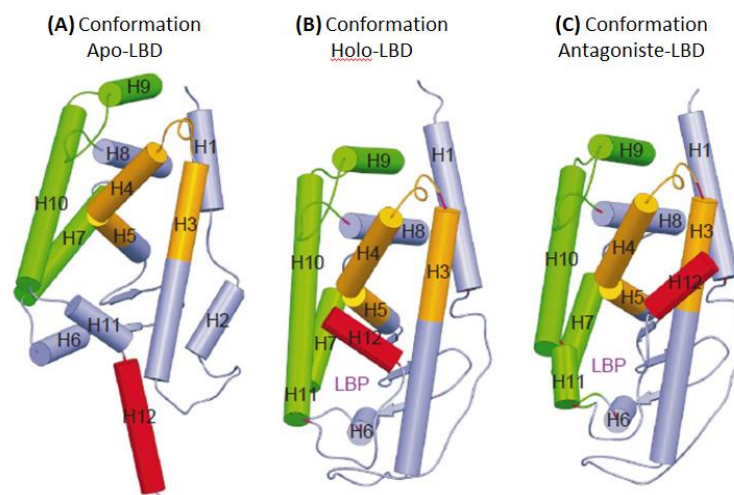


Figure 1.3 : Représentation schématique de trois différentes conformations du domaine de liaison au ligand de récepteurs nucléaires. **(A)** LBD du récepteur X rétinolique (RXR) dans sa forme non lié à un ligand (apo). **(B)** LBD du récepteur à l'acide rétinolique (RAR) dans sa forme lié au ligand agoniste. **(C)** LBD de RAR dans sa forme liée à un antagoniste. Les hélices α (H1 à H12) sont représentées en cylindres. Les feuillets β sont illustrés en flèches plates. Les différentes régions du LBD sont colorées suivant leur fonction. La surface de dimérisation est colorée en vert. Les sites de fixation des corégulateurs sont représentés en orange. L'hélice H12 est indiquée en rouge. Les autres éléments sont représentés en mauve (Bourguet *et al*, 2000).

b) Agoniste / Antagoniste

L'activation de la transcription est possible lors de la fixation d'un ligand (aussi appelé agoniste qui peut être une hormone, un facteur de croissance...) induisant un changement conformationnel du récepteur. C'est ainsi que l'hélice α H12 se repositionne définissant ainsi une surface d'interaction des récepteurs nucléaires pour les coactivateurs (Figure 1.4 **A**) (McKenna *et al*, 1999). La fixation de ces protéines coactivatrices est spécifique de par la séquence qu'ils contiennent, LxxLL commune à tous les CoAs et permet leur liaison aux récepteurs nucléaires (Heery *et al*, 1997). Suite à la fixation du ligand et au repositionnement de l'hélice H12, le coactivateur est recruté permettant l'acétylation des histones ce qui prépare les promoteurs des gènes cibles pour la transactivation par décondensation de la chromatine correspondante (McKenna *et al*, 1999).

Ces récepteurs peuvent également agir comme des inhibiteurs de transcription en absence de ligand ou en présence d'antagoniste. Cette activité inhibitrice est due à la capacité des récepteurs nucléaires à recruter des corépresseurs et d'établir une liaison spécifique créant ainsi un complexe corépresseur qui, de par le repositionnement de l'hélice H12 n'aura plus la capacité de lier un coactivateur (Figure 1.4 **B**). Ce complexe répressif situé au niveau des promoteurs des gènes cibles va affecter la structure de la chromatine et entraîner une compaction de celle-ci, rendant l'accès au gène impossible pour la transcription. L'hélice H12 contenue dans le domaine AF2 a donc une grande importance. En effet c'est le positionnement de cette hélice qui va déterminer l'activation ou l'inhibition de la transcription par le récepteur nucléaire. De plus, celle-ci contient des résidus indispensables à l'activation de la transcription.

Le travail de cette thèse porte sur l'interaction entre un récepteur nucléaire (RevErba) et son corépresseur (NCoR).

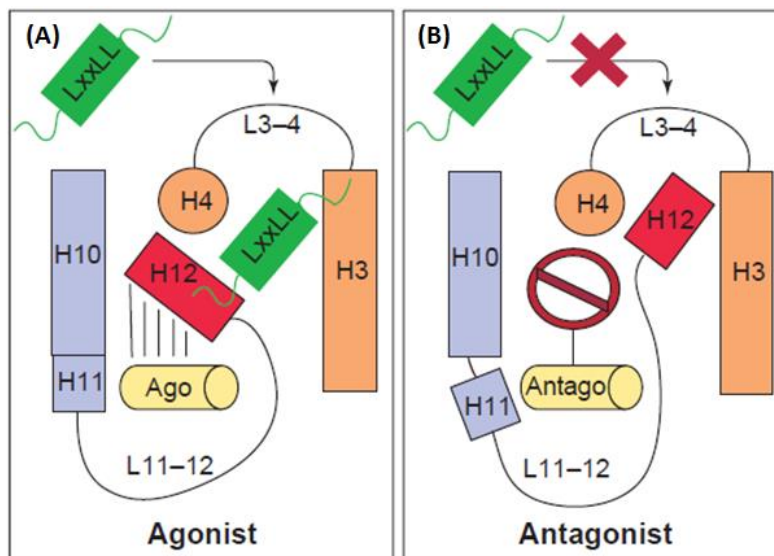


Figure 1.4 : Représentation schématique de l'organisation des récepteurs nucléaires sous 2 conformations. **(A)** Conformation agoniste, le RN est lié à un ligand agoniste entraînant le recrutement d'un coactivateur (LxxLL), résultant en l'activation de la transcription. **(B)** Conformation antagoniste, le RN est lié à un corépresseur entraînant un repositionnement de l'hélice H12 qui empêche la fixation du coactivateur résultant en l'inhibition de la transcription (Bourguet *et al*, 2000).

Ce travail de doctorat est basé sur l'étude de l'interaction du récepteur nucléaire RevErb α avec son corépresseur NCor. Ce RN est sensiblement différent dans sa conformation et sa structure aux récepteurs nucléaires classiques, par conséquent, le mécanisme d'action est également modifié. L'implication de ce complexe de protéine dans plusieurs voies métaboliques en fait également un couple idéal à étudier pour le traitement de nombreuses pathologies telles que le diabète.

II. Le complexe RevErb α / NCor

1) Le récepteur nucléaire RevErb α

En 1989, un ADNc codant pour un nouveau membre de la super famille des récepteurs à hormones thyroïdiennes / stéroïdiennes a été isolé à partir de cellules GH3 de rat (cellules issues d'une tumeur hypophysaire somatotrope¹) (Lazar *et al*, 1989). Ce nouveau membre des récepteurs nucléaires est RevErb α . Il est exprimé dans de nombreux tissus (le foie, le cervelet), et est particulièrement abondant dans les muscles et le tissu adipeux. Le gène codant pour cette protéine est situé sur le chromosome 17, locus c-erbA α codant également pour d'autres récepteurs nucléaires. Toutes les protéines isolées à partir de ce gène sont des RNs ayant la capacité de lier l'hormone thyroïdienne (T3). Celles-ci sont composées des 2 domaines classiques communs aux récepteurs nucléaires. Le DBD est caractérisé par une région riche en cystéine hautement conservée qui permet l'interaction spécifique à l'ADN via des motifs en doigts de zinc et la dimérisation du récepteur. Le LBD en C-ter est responsable de la liaison du ligand. Cependant, précédant la découverte de RevErb α , 2 ADNc (r-erbA α -1 et r-erbA α -2) provenant du même gène c-erbA α ont été isolés et étudiés. Étonnamment, les 2 protéines provenant de ces ADNc, produit d'un épissage alternatif du gène, possèdent une queue carboxy-terminale (C-ter) altérée. Par conséquent, elles n'ont pas la capacité de

¹Les cellules somatotropes sécrètent des hormones de croissance (GH) dans l'hypophyse.

lier les hormones thyroïdiennes ou rétinoidiennes, mais elles peuvent se lier aux séquences spécifiques de l'ADN des gènes cibles, exactement comme les autres récepteurs (Lazar *et al*, 1989). Le fait que ces 2 protéines et RevErb α soient issues de la transcription du même gène, laisse présager que la structure de RevErb α sera similaire à celle des 2 autres protéines. Cette structure particulière aura donc des conséquences sur le mode d'action de RevErb α .

a) Organisation structurale de RevErb α

L'ADNc de RevErb α de rat a une taille de 2.3 kb et code pour une protéine de 56 kDa. Cet ADNc est issu de la transcription bidirectionnelle du gène c-erbA (Lazar *et al*, 1989). La figure 1.5 ci-dessous décrit l'organisation du gène codant pour les 3 protéines qui possèdent une séquence commune de 269 nucléotides en C-ter.

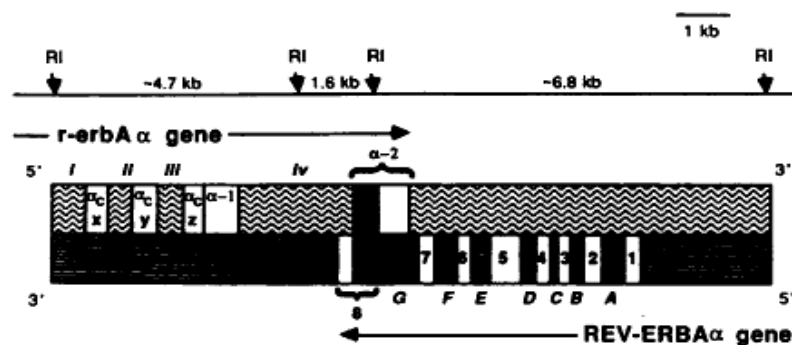


Figure 1.5 : Représentation schématique du gène de rat codant pour r-erbA α -1, r-erbA α -2 et RevErb α . Les exons sont indiqués en blanc, excepté la séquence de 269 nucléotides commune aux 3 protéines, qui est exonique dans tous les cas. Les introns et les séquences intergéniques sont indiqués en noirs (lettres capitales). La partie supérieure code pour les protéines r-erbA α -1, r-erbA α -2 et la partie inférieure code pour la protéine RevErb α (Lazar *et al*, 1989).

L'ADNc de RevErb α est codé par 8 exons et 7 introns, les 2 doigts de zinc du DBD sont codés par 2 exons différents (3 et 4). La séquence protéique déduite de RevErb α contient des régions similaires hautement conservées chez tous les membres de la famille des récepteurs hormonaux (Figure 1.6). Tout comme les autres membres de cette famille, le degré de similarité du DBD (Figure 1.6 A) est plus élevé que celui du LBD (Figure 1.6 B), démontrant l'appartenance de RevErb α à cette super famille. De plus, l'alignement des séquences (figure 1.6) démontre une forte région de similarité (partie soulignée). La séquence FFRR est caractéristique des récepteurs aux hormones thyroïdiennes / stéroïdiennes.

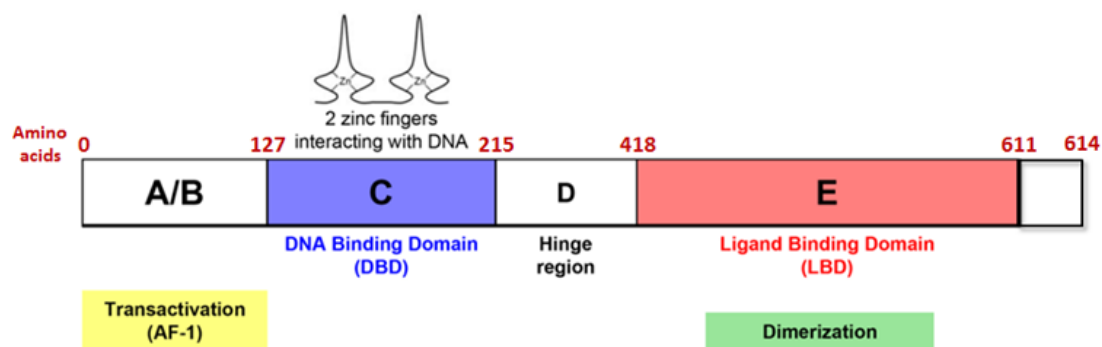


Figure 1.7 : Représentation schématique de l'organisation de la protéine RevErb α . Les régions de A à E sont conservées, en revanche, il manque le domaine de transactivation AF2 (hélice H12). Les motifs en doigts de zinc permettent la fixation de RevErb α aux régions promotrices des gènes cibles (DBD).

Pour étudier une potentielle régulation transcriptionnelle, différents mutants de RevErb α ont été réalisés. Puis des tests de gènes rapporteurs à la luciférase ont étudié la répression transcriptionnelle de tous ces mutants. Il a été mis en évidence que la région C terminale (dans le LBD) de RevErb α est très importante pour la répression de la transcription, en particulier les acides aminés 200 à 289. Par contre, RevErb α pleine taille sous forme monomérique n'a pas d'effet sur l'activité transcriptionnelle (Harding and Lazar 1995).

b) Liaison de RevErb α aux régions promotrices

Afin de comprendre le mécanisme d'action de RevErb α , sa fixation à l'ADN a été étudiée plus en détail. Dans un premier temps, un site spécifique de liaison présent sur l'ADN a été identifié parmi une banque de données, issue des recherches sur les récepteurs nucléaires (Harding and Lazar 1993). Ces séquences particulières sont appelées éléments de réponse sur l'ADN (RORE = Retinoic acid-related Orphan Receptor Element). Une séquence RORE = 5'-AGGTCA-3'. Ce sont des séquences consensus hexamériques répétées en tandem dans le promoteur des gènes cibles et séparées par 2 paires de bases (Figure 1.8).

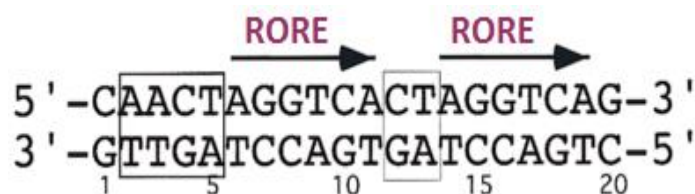


Figure 1.8 : Séquence ADN représentant les zones de fixation de RevErb α dans les régions promotrice des gènes cibles du récepteur nucléaire. Les flèches indiquent les 2 sites hexamériques répétés (RORE). Les zones encadrées représentent la séquence en 5' et les 2 paires de bases servant d'espaceur (Zhao *et al*, 1998).

Le mécanisme de fixation de RevErb α a été étudié avec des gels retard, mettant en évidence le fait que ce récepteur se fixe en fait sur 2 demi-sites hexamériques séparés par 2 paires de bases. Ces séquences sont alors appelées Rev-DR2 (Harding and Lazar 1995). Ce sont des séquences directes répétées (DR) spécifiques sur lesquelles RevErb α se lie en tant qu'homodimère (Figure 1.8).

Malgré sa capacité à se lier sous forme monomérique, RevErb α est capable d'inhiber la transcription uniquement lorsqu'il est lié sous forme homodimérique à l'ADN (Harding and Lazar 1995). De plus, la stabilité du récepteur est 5 à 10 fois plus importante lorsqu'il est sous forme homodimérique. La structure cristallographique du DBD de RevErb α lié à deux séquences ROREs directement répétées de 2.3 Å de résolution a, par la suite, confirmé cette fixation homodimérique et

a apporté quelques informations techniques sur la liaison de RevErb α à l'ADN (Zhao *et al*, 1998). Le DBD de RevErb α est composé de 66 résidus (123-216). Les 2 paires de bases séparant les séquences ROREs permettent un bon positionnement des modules en doigts de zinc sur l'ADN. Elles confèrent également une bonne fixation des 2 sous-unités de RevErb α ainsi que des contacts favorables pour la formation d'un complexe efficace tout au long d'un segment de 10 paires de bases. Les 2 sous-unités de RevErb α sont superposables au niveau du centre du DBD, mais adoptent des conformations différentes au niveau de la partie C-ter. Ces différentes conformations proviennent du rôle de la partie C-ter dans la dimérisation des 2 sous-unités de RevErb α . De ce fait, ces récepteurs nucléaires sont spécifiques, l'inhibition de la transcription se produira uniquement si les récepteurs sont sous forme dimérique liés à 2 séquences ROREs (séquence Rev-DR2) au niveau des promoteurs des gènes cibles.

RevErb α permettrait donc une régulation très fine de la transcription (Harding and Lazar 1995). Cependant le récepteur nucléaire seul n'est pas suffisant pour inhiber la transcription. Cette répression implique l'existence de facteurs interactants supplémentaires qui sont requis pour la répression ligand indépendante (Baniahmad *et al*, 1992).

2) Le corépresseur NCor

C'est en 1995, qu'une protéine de 270 kDa associée à l'hétérodimère TR / RXR, liée à l'ADN est identifiée (TR = Thyroid hormone Receptor et RXR = Retinoid-X-Receptor). Cette protéine, dont l'ADNc a été isolé, correspond au corépresseur NCor (Nuclear CoRepressor). Des gels retardés ont montré que plusieurs récepteurs nucléaires sont capables de se lier à NCor (TR et RAR). Des tests de gènes rapporteurs à la luciférase mettent en évidence que le corépresseur NCor a une activité inhibitrice de la transcription lorsqu'il est lié aux récepteurs nucléaires et en absence de ligands ou d'hormones. (Hörlein *et al*, 1995). La protéine NCor présente une organisation classique commune à tous les corépresseurs. C'est une grosse protéine comportant 4 domaines de répression (RD) en N-ter, et un domaine d'interaction (ID) pour les récepteurs nucléaires en C-ter (Yoon *et al*, 2003). La répression de la transcription par NCor est, entre autre, médiée par ces 4 domaines de répression (RD1 à RD4) (Figure 1.9). Ils permettent le recrutement de composants additionnels pour la formation d'un complexe répresseur (Cowger and Torchia 2006). Parallèlement aux études sur NCor, c'est également en 1995 qu'un autre corépresseur SMRT (Silencing Mediator (corepressor) for Retinoid-hormone) a été identifié. C'est par des expériences de double hybride² que SMRT a été retrouvé associé au complexe hétérodimérique RXR / RAR. Des tests de gènes rapporteurs à la luciférase ont démontré que comme tous les autres corépresseurs, SMRT a une activité inhibitrice de la transcription lorsqu'il est lié aux récepteurs nucléaires qui sont fixés à l'ADN et en absence de ligands (Chen and Evans 1995). Les 2 corépresseurs NCor et SMRT sont similaires dans leur organisation et leur mode d'action. Ils sont hautement conservés chez les mammifères et peuvent interagir avec les mêmes récepteurs nucléaires. Cependant, ces derniers préfèrent un corépresseur plutôt que l'autre (Hu and Lazar 2001). Il est donc intéressant de les étudier tous les 2 afin de déterminer si une fixation préférentielle de l'un ou de l'autre pour RevErb α existe. Des mutants de RevErb α ont donc été générés et par immunoprécipitation, la liaison de RevErb α avec les 2 CoRs a été prouvée. C'est ainsi qu'il a été démontré que NCor et SMRT sont capables de se lier à plusieurs RNs en solution, mais ils sont très sélectifs quant à la liaison au récepteur sur l'ADN *in vivo*. En effet, des tests de gènes rapporteurs à la luciférase démontrent que RevErb α est capable d'inhiber la transcription en présence de NCor mais pas en présence de SMRT. NCor et SMRT, bien que très homologues dans leur domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires, n'ont donc pas des fonctions redondantes mais contribuent en fait à la répression transcriptionnelle de leurs gènes cibles de manière spécifique

² La technique de double hybride permet d'identifier des interactions protéine-protéine. Elle est basée sur la capacité des domaines de liaison à l'ADN et d'activation de la transcription du facteur de transcription Gal4 à fonctionner de manière indépendante. Dans le système du double hybride, ces deux domaines sont séparés et chacun est fusionné aux protéines d'intérêt. Ainsi, c'est l'interaction entre les deux protéines qui permettra de reconstituer un facteur de transcription actif. Il y aura alors transcription de gènes rapporteurs.

(Zamir *et al*, 1997).

SMRT n'est pas un corépresseur naturel de RevErb α , seul NCor a la capacité de s'associer à RevErb α et de former un complexe répressif de transcription *in vivo*. Il est à présent important de connaître les autres acteurs intervenant dans cette répression de la transcription et comment ils s'associent au complexe RevErb α / NCor.

a) Implication des histones pour la répression de la transcription

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN génomique est condensé avec les histones à l'intérieur des nucléosomes (unité primaire de la chromatine). Les histones entraînent la compaction ou la décompaction de la chromatine menant respectivement à l'inhibition ou à l'activation de la transcription. C'est ainsi que l'activité transcriptionnelle est régulée par des modifications post traductionnelles des histones. Ce sont les groupements acétyls qui jouent un rôle majeur dans le remaniement de la chromatine. L'acétylation des résidus de lysine, situés dans la partie N-terminal de l'histone (partie accessible), est catalysée par les histones transférases (HAT) et entraîne la décompaction de la chromatine. Au contraire, la déacétylation de ces résidus lysine est catalysée par les histones déacétylases (HDAC) et entraîne la compaction de la chromatine (Figure 1.9) (Kuo and Allis 1998).

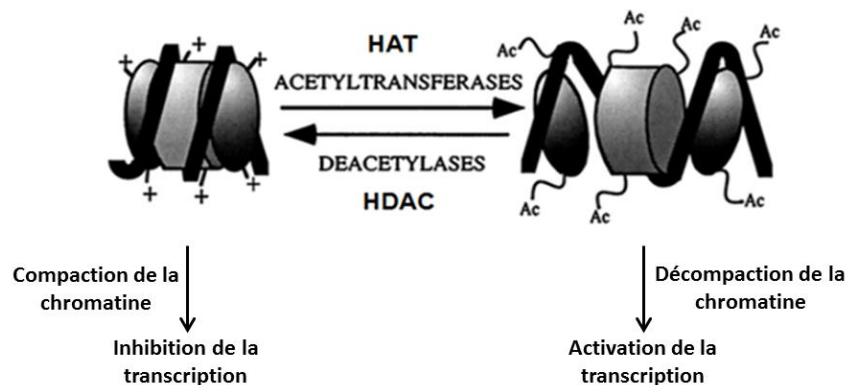
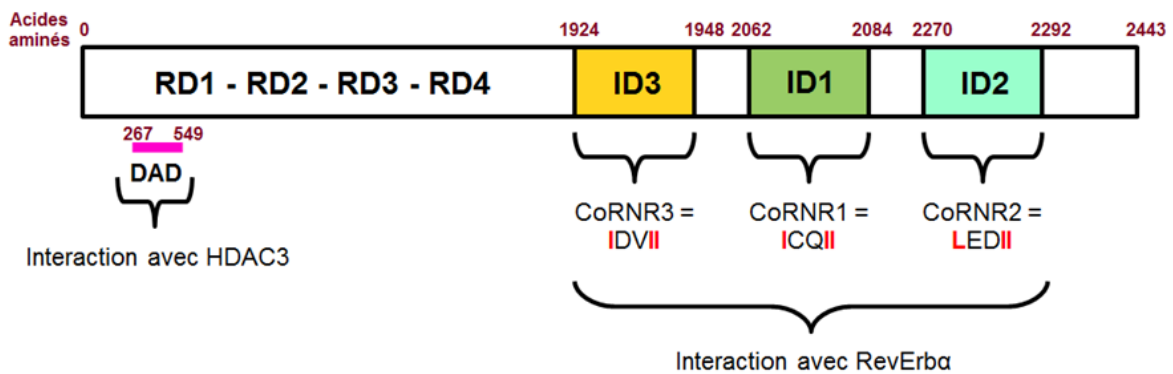


Figure 1.9 : Représentation schématique du mode d'action des HATs et des HDACs dans la compaction ou la décompaction de la chromatine. Les HATs transfèrent des groupements acétyls sur les résidus de lysine en N-ter de l'histone et entraînent la décompaction de la chromatine et donc l'activation de la transcription. Au contraire, les HDACs enlèvent ces groupements acétyls entraînant la compaction de la chromatine et donc l'inhibition de la transcription.

Des immunoprécipitations des 2 corépresseurs NCor et SMRT ont révélé que ceux-ci sont retrouvés dans un même complexe protéique. L'analyse de ce dernier a abouti à l'identification de l'histone déacétylase 3 (HDAC3) qui est retrouvé associé à NCor et à SMRT (Li *et al*, 2000). Il a par la suite été prouvé par des tests de gènes rapporteurs à la luciférase suivis de western blot, que HDAC3 est recruté par RevErb α avec NCor pour réprimer la transcription des gènes cibles. D'autre part, une délétion du HDAC3 par ARN interférents entraîne une diminution importante de la répression de la transcription. Ceci démontre que non seulement HDAC3 fait partie du complexe répresseur, mais qu'il participe activement à cette répression de la transcription (Ishizuka and Lazar 2003).

L'identification des régions d'interaction entre HDAC3 et NCor a été étudiée par immunoprécipitation en réalisant des mutants de NCor. C'est ainsi qu'il a été démontré que des délétions de la séquence protéique de NCor n'altèrent pas son interaction avec HDAC3. Cependant, il a été identifié que la liaison est plus forte pour la région d'acides aminés 267 à 549. De plus, en absence de cette région, l'activité déacétylase est abolie et la répression de la transcription est inhibée (Wen *et al*, 2000). Ce domaine est nommé DAD (deacetylase-activation-domain), il est également retrouvé dans le corépresseur SMRT (Guenther *et al*, 2001).

(A) Organisation structurale du CoR NCor



(B) Organisation structurale du CoR SMRT

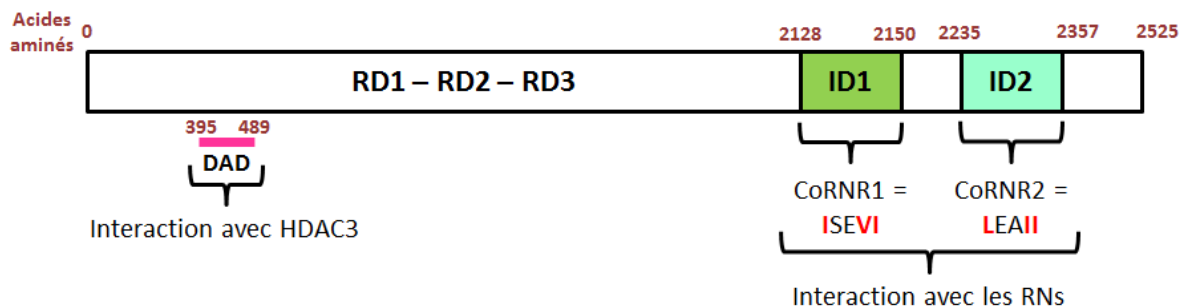


Figure 1.10 : Représentation schématique de l'organisation des corépresseurs NCor (A) et SMRT (B). Les domaines de répressions (RD1 à RD4) sont représentés en N-ter. Le domaine DAD porte une partie de l'activité déacétylase pour les 2 CoRs et intervient dans la liaison avec HDAC3. Les domaines d'interactions (ID1, ID2 et ID3) en C-ter permettent la liaison aux récepteurs nucléaires dans le cas de SMRT ou à RevErba dans le cas de NCor.

Une partie de l'activité déacétylase et par conséquent de l'activité répressive de la transcription est portée par les corépresseurs. A présent que RevErba ainsi que son complexe corépresseur associé NCor-HDAC3 sont bien caractérisés, la question se pose de savoir exactement comment ce complexe s'assemble et se lie à l'ADN (région promotrice) afin de réprimer la transcription des gènes cibles.

3) Mécanisme d'action du complexe répresseur RevErba / NCor-HDAC3

a) Interaction RevErba / NCor

La liaison entre les récepteurs nucléaires et leurs corégulateurs est un sujet largement étudié. La boîte NR est la surface d'interaction des récepteurs nucléaires avec les coactivateurs. Chaque boîte NR présente un motif commun : LxxLL nécessaire et suffisant à la liaison des NRs (Heery *et al*, 1997). La surface d'interaction des corégulateurs (CoAs ou CoRs) est similaire de par leur séquences de liaison aux récepteurs nucléaires, mais suffisamment distincte pour permettre au ligand de fonctionner comme un commutateur. La spécificité d'interaction des corépresseurs avec les récepteurs nucléaires est déterminée individuellement par les interactions spécifiques de ces derniers avec les domaines IDs des CoRs. La partie responsable de l'interaction à l'intérieur des IDs

est appelée motif CoRNR (CoRepressor Nuclear Receptor) (Hu and Lazar 1999). Les corépresseurs SMRT et NCor possèdent 2 CoRNRs :

- Le CoRNR1 (motif IxxII dans l'ID1)
- Le CoRNR2 (motif LxxII dans l'ID2) (Figure 1.11) (Seol *et al*, 1996).

		CoRNR box					
ID1	hN-CoR	2067	IT LADH	ICQII	TQDF	ARNQV	
	hSMRT		VT LAQH	ISEVI	TQDY	TRHHP	
ID2	hN-CoR	2271	PA SNLG	LEDII	RKAL	MGSFD	
	hSMRT		AS TNMG	LEAII	RKAL	MGKYD	

Figure 1.11 : Alignement des séquences d'acides aminés des domaines ID1 et ID2 des 2 corépresseurs NCor et SMRT humains. Les domaines ID1 et ID2 contiennent les motifs CoRNR 1 et 2 dont le motif I/LxxII est hautement conservé. Les résidus hydrophobes conservés sont représentés en gras (Hu and Lazar 1999).

Ces motifs sont hautement conservés chez tous les corépresseurs, de la même manière que la boîte NR est préservée chez les coactivateurs. De façon générale, les récepteurs présentent différentes affinités pour l'ID1 ou l'ID2 (Hu and Lazar 2001). La préférence des NRs pour NCor ou SMRT est due à des différences dans l'ID1, mais pas dans l'ID2. La haute spécificité des interactions des récepteurs nucléaires avec les corépresseurs suggèrent que la répression est régulée par la validité des combinaisons : récepteur-CoRNR-CoR. Il a effectivement été révélé que RevErb α interagit exclusivement avec le CoRNR1, mais pas avec le CoRNR2. D'autre part, le peptide CoRNR2 de NCor et SMRT interagit sans distinction avec les récepteurs nucléaires. En effet, seuls 14 acides aminés (2274-2287) de l'ID2 de NCor sont suffisants pour son interaction avec différents NRs. Ces 14 acides aminés sont hautement conservés entre NCor et SMRT avec seulement 2 acides aminés de différence, suggérant que l'ID2 ne médie pas la spécificité de liaison du CoR avec les NRs (Hu and Lazar 2001). Ces domaines d'interaction des corépresseurs (ID) ont été étudiés en détails, c'est ainsi qu'en 2000, un troisième domaine ID3 a été identifié uniquement dans NCor et pas dans SMRT.

Le motif commun à tous les CoRNR (I/LxxII) est retrouvé dans cette séquence de NCor (Figure 1.10) (Webb *et al*, 2000). Une recherche a ensuite été menée pour vérifier si les 3 motifs CoRNR (ID1, ID2 et ID3) sont nécessaires à la fixation de RevErb α . Une mutation des ID2 et / ou ID3 n'abolit pas la liaison entre RevErb α et NCor mais entraîne une baisse d'affinité (Kim *et al*, 2010). En revanche, il a été démontré par FRET³ et par double hybride qu'une ou des mutations dans le domaine ID1 (en dehors du motif CoRNR) diminue très fortement l'interaction entre les 2 protéines. Mais une mutation d'un des résidus isoleucine du CoRNR1 (IxxII) abolit complètement cette interaction et entraîne également la perte de l'inhibition de la transcription (Phelan *et al*, 2010).

Afin de tester l'importance de certains domaines dans RevErb α pour son interaction avec NCor, de nouveaux tests en double hybride ont été réalisés. Il apparaît que le LBD de RevErb α (région E) est nécessaire à son interaction avec NCor. L'absence de ce domaine abolit effectivement la liaison du récepteur nucléaire avec le corépresseur (Downes *et al*, 1996). Il a par la suite été tenté de délimiter le domaine d'interaction spécifique à l'intérieur du LBD. Mais les essais n'ont pas été concluants suggérant que le LBD entier est nécessaire pour l'interaction du RN avec NCor. Des ChIPs suivies de gels retards ont également précisés que la stoechiométrie de fixation du complexe sur l'ADN est de 2 molécules de RevErb α pour une molécule de NCor (Zamir *et al*, 1997).

³Le FRET (Fröster Resonance Energy Transfer) permet de détecter la proximité de deux molécules et donc de visualiser directement leur interaction par un transfert d'énergie de fluorescence.

b) Cristallisation du domaine de liaison au ligand de RevErb α avec le peptide ID1 de NCor

La cristallisation de RevErb α associé à NCor a nécessité de nombreuses années. La purification de la protéine RevErb α entière est assez compliquée puisqu'elle présente une faible solubilité. La protéine NCor quant à elle est très grosse et le complexe entier des 2 protéines pleine taille est impossible à obtenir. Cependant, en 2010, la structure du domaine de liaison au ligand de RevErb α associé au peptide ID1 de NCor est publiée. Le LBD pleine taille de RevErb α (281-614) ayant des problèmes de solubilité, une délétion a été effectuée : 281-614 Δ 324-422. La perte du domaine riche en proline entre les hélices α 1 et α 3 a permis de purifier cette partie du récepteur. Ce mutant du LBD de RevErb α a été cristallisé avec le peptide NCor ID1 (2045-2065) (Figure 1.12 A).

Malgré la délétion et l'absence d'hélice H12, la structure globale du domaine de liaison au ligand de RevErb α est semblable à tous les autres LBD des récepteurs nucléaires. Il est juste composé de 11 hélices au lieu de 12, et forme un feuillet beta anti parallèle avec le peptide NCor ID1. Ce feuillet beta établit un nouveau réseau moléculaire permettant à la partie C-ter de RevErb α de s'associer avec la partie N-ter du peptide corépresseur NCor. C'est un feuillet beta classique établissant des liaisons hydrogènes avec ses partenaires et finissant par la liaison entre l'Isoleucine 2049 de NCor avec la Leucine 607 de RevErb α . Le haut degré de stabilité atteint par le peptide NCor ID1 lié à RevErb α est reflété par le fait que la structure de 21 résidus du peptide NCor est très bien définie. Le peptide NCor ID1 lié à RevErb α adopte une structure en hélices α qui se lie co-axialement dans l'espace traditionnellement réservé à la fixation d'un coactivateur ou à l'hélice α 12 du domaine AF2 dans un récepteur nucléaire activé (Figure 1.12 B). De plus, le peptide NCor ID1 est stabilisé dans le sillon hydrophobe du LBD de RevErb α par un repositionnement de l'hélice H3 de ce dernier. De ce fait, la liaison du peptide au récepteur est protégée et stabilisée. Tout ceci mène à dire que, bien que les structures au sein des RNs soient différentes, en particulier RevErb α , le mécanisme d'action reste le même et les RNs agissent de la même manière lors de la fixation d'un corépresseur (Phelan *et al*, 2010). Afin de bien comprendre le fonctionnement exclusivement répresseur de transcription de ce complexe, il est nécessaire de prêter attention à la formation du feuillet beta antiparallèle. Des travaux réalisés sur l'association du récepteur nucléaire RAR α avec les corépresseurs NCor et SMRT ont révélé que l'activité basale répressive du RN est conféré par un brin beta qui forme un feuillet beta antiparallèle avec des résidus spécifique du domaine ID1 de NCor ou SMRT. La liaison d'un ligand agoniste induit la transition du brin beta en hélice α permettant la formation de l'hélice H11 qui provoque la relâche du corépresseur et le repositionnement de l'hélice H12 entraînant le recrutement du coactivateur (Le Maire *et al*, 2010). Ce même principe s'applique au complexe RevErb α / NCor, l'ID1 du corépresseur forme un feuillet beta antiparallèle avec l'hélice H11 ce qui permet la stabilisation du complexe. Cependant, même en absence de fixation de NCor et de la formation de l'hélice α H11, l'absence de l'hélice H12 ne permettra pas le recrutement d'un coactivateur. Le récepteur nucléaire RevErb α ne sera donc jamais activateur de transcription.

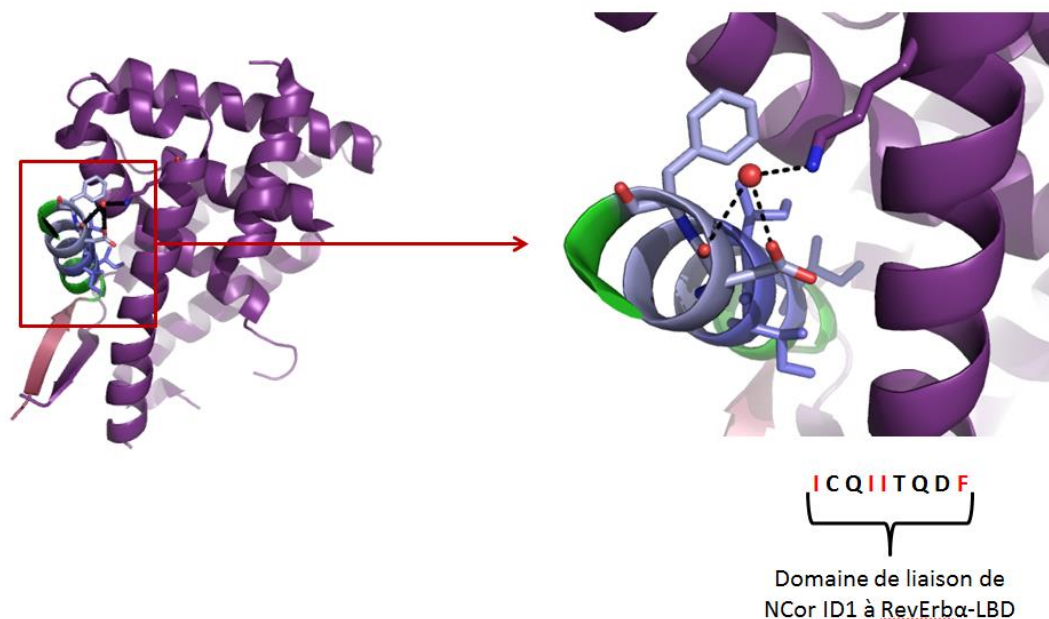


Figure 1.12 : **(A)** Structure cristalline du complexe LBD de RevErb α (281-614 Δ 324-422) avec le peptide NCor ID1 (2045-2065). RevErb α est représenté en violet alors que NCor est en bleu et vert. La formation du feuillet beta est bien représentée, sa formation stabilise le complexe et confère une partie de l'activité répressive de la transcription des gènes cibles. **(B)** Vue rapprochée de l'interaction entre les hélices H3 et H4 de RevErb α et le motif CoRNR1 de NCor. La partie bleue représente la zone hautement conservée et nécessaire à l'interaction, les résidus isoleucine indispensables à l'interaction des 2 protéines sont représentés en rouge (Phelan *et al*, 2010).

Cette structure (Figure 1.12) confirme le fait que ce complexe est un répresseur constitutif de la transcription. A présent que ces protéines ainsi que leur mode de liaison et d'action sont bien déterminées, il est important de connaître exactement les gènes qu'elles régulent. Ce complexe est actif dans de nombreuses régulations métaboliques. Le complexe répresseur RevErb α / NCor est en fait un des acteurs majeurs de la maintenance du rythme circadien.

4) Implication du complexe RevErb α -NCor/HDAC3 dans le rythme circadien

a) Le rythme circadien

La physiologie et le comportement des organismes au travers du règne animal est adapté à des cycles jours / nuits de 24 heures, c'est le rythme circadien et il est régulé par des oscillateurs circadiens (Yang *et al*, 2006). L'horloge endogène circadienne permet de réguler quotidiennement divers comportements et processus physiologiques tels que l'activité locomotrice, les cycles de sommeil ainsi que les habitudes de consommation alimentaire. Le rythme circadien est régulé par un système d'horloge interne qui synchronise ces variations quotidiennes. Celui-ci est également impliqué dans la régulation de nombreuses voies métaboliques (métabolisme du glucose et des lipides) et des sécrétions endocrinienne (insuline...) (Panda *et al*, 2002). La régulation de ce rythme circadien dépend de plusieurs activateurs ou répresseurs transcriptionnels, engagés également dans une autorégulation transcriptionnelle. Les protéines Clock et Bmal1 sont une paire d'activateurs transcriptionnels qui contrôle l'expression des gènes *Period* (Per1, 2 et 3), des gènes *Cryptochrome* (Cry1 et 2) ainsi que de RevErb α (Reppert and Weaver 2002). Le complexe protéique Per-Cry inhibe la

transcription de ses propres gènes, alors que RevErb α réprime l'expression de Bmal1. Il a également été mis en évidence que les niveaux d'ARNm de RevErb α suivent les variations du rythme circadien (Basalobre *et al*, 1998). Il est donc évident qu'un lien entre désordre circadien et réponse métabolique altérée existe, suggérant que le rythme circadien et la régulation métabolique sont étroitement liés (Duez and Stael 2009).

En effet, plusieurs données confirment l'implication du complexe RevErb α / NCoR-HDAC3 dans la régulation de l'horloge circadienne. Il a notamment été démontré que le récepteur nucléaire réprime fortement l'activité basale du gène Bmal1 via 2 sites de liaison monomériques (séquences ROREs) dans la région promotrice. Une immunoprécipitation du promoteur de Bmal1 dans les cellules hépatiques, révèle la présence simultanée de RevErb α et de NCoR-HDAC3. Ces données démontrent une nouvelle fonction du complexe répresseur RevErb α / NCoR-HDAC3 dans la régulation des gènes impliqués dans le rythme circadien (Yin and Lazar 2005).

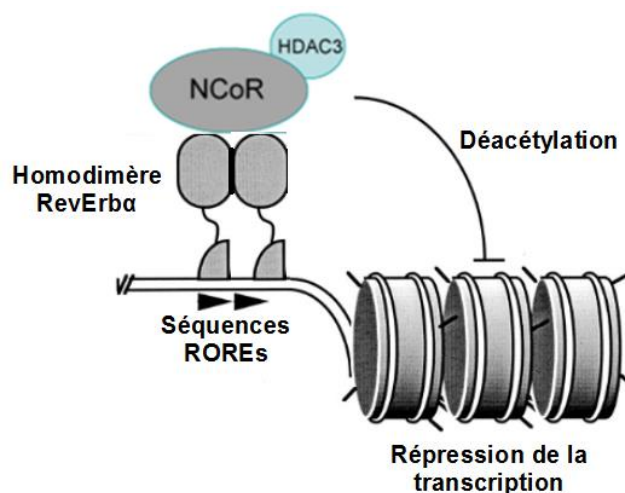


Figure 1.13 : Représentation schématique du mode d'action du complexe corépresseur RevErb α / NCoR-HDAC3 sur la compaction de la chromatine et l'activité transcriptionnelle. RevErb α se fixe en tant que homodimère sur les séquences ROREs (dans les régions promotrice de l'ADN des gènes cibles). Une fois fixé à l'ADN, le complexe répresseur NCoR-HDAC3 est recruté sur l'homodimère RevErb α . HDAC3 déacétyle les histones et entraîne la compaction de la chromatine. C'est ainsi que la transcription est inhibée.

b) Implication de l'hème dans le complexe répresseur

Comme il a été précisé précédemment, l'horloge circadienne régule l'homéostasie⁴ métabolique chez les mammifères. Plusieurs études de l'expression des gènes ont permis de mettre en évidence que les gènes impliqués dans le métabolisme du glucose, des lipides ou de la biosynthèse de l'hème présentent tous un profil d'expression circadien (Panda *et al*, 2002). L'hème est d'ailleurs un des acteurs permettant la régulation circadienne. En effet, celui-ci a été identifié comme groupe prosthétique⁵ d'une des protéines régulant l'horloge circadienne qui est PER2. Il est également impliqué dans la corégulation de sa biosynthèse ainsi que dans le rythme circadien (Kaasik and Lee 2004). Étant donné que l'homologue de RevErb α chez la drosophile a été identifié comme

⁴ L'homéostasie est la capacité que peut avoir un système quelconque (ouvert ou fermé) à conserver son équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes qui lui sont extérieures. L'homéostasie est la maintenance de l'ensemble des paramètres physico-chimiques de l'organisme qui doivent rester relativement constants (glycémie, température, taux de sels dans le sang etc...).

⁵ Un groupe prosthétique est une molécule organique non protéique maintenue dans une structure protéique au moyen de liaisons covalentes permanentes ou de liaisons faibles (liaisons ioniques, liaisons hydrogènes). Au centre en général, un ou plusieurs atomes métalliques comme le fer ou le soufre.

liant l'hème, ce qui a pour effet d'augmenter la stabilité de la protéine (Rosny *et al*, 2006), des études ont été menées chez RevErb α humain. C'est ainsi qu'en 2007, l'hème a effectivement été identifié comme jouant un rôle au sein du complexe RevErb α / NCor.

Lorsque le LBD de RevErb α (281-614) est incubé en présence d'hème, une coloration rouge de la protéine en solution est obtenue. Cette couleur disparaît lorsque l'histidine 602 de RevErb α est mutée en phénylalanine (RevErb α H602P). De plus, une analyse en spectrométrie de masse du LBD de RevErb α , révèle la présence d'hème, ce qui n'est pas le cas lorsque l'histidine 602 est mutée. Effectivement, une différence de masse de 615 Da, correspondant au noyau porphyrinique de l'hème, est observée entre la protéine sauvage et la protéine mutée sur l'histidine 602. Celle-ci a été choisie suite aux études réalisées chez la drosophile (Reinking *et al*, 2005). Les séquences protéiques étant hautement conservées entre les 2 espèces, c'est naturellement le résidu correspondant chez l'humain qu'il a été choisi de tester pour la liaison à l'hème. Ceci prouve donc que l'hème se fixe au LBD de RevErb α et que l'histidine 602 joue un rôle critique dans cette liaison.

Pour compléter cette étude, des tests de gènes rapporteurs à la luciférase ont étudié l'effet de la présence ou de l'absence d'hème sur la transcription du gène Bmal1. Il se trouve que la protéine RevErb α H602F ne réprime pas la transcription autant que la protéine sauvage peut le faire. Une culture cellulaire en absence d'hème entraîne une augmentation importante de la transcription du gène Bmal1 (gène cible de RevErb α). De plus, une ChIP démontre que RevErb α H602F ne permet pas la précipitation du complexe NCor-HDAC3, contrairement à RevErb α sauvage. Afin de vérifier que l'absence d'hème entraîne la perte de la liaison entre RevErb α et le complexe NCor-HDAC3, des cultures cellulaires en absence d'hème suivies d'une immunoprécipitation de RevErb α ont été effectuées. Effectivement, le complexe corépresseur NCor-HDAC3 n'est pas retrouvé associé à RevErb α . L'ajout d'hème permet en revanche de rétablir cette interaction, il se pourrait donc que la liaison réversible de l'hème régule l'activité transcriptionnelle de RevErb α (Yin *et al*, 2007).

Ces données permettent donc de proposer que l'hème joue un rôle important dans la régulation de la transcription des gènes associés au complexe RevErb α / NCor. A partir de là, RevErb α n'est plus considéré comme un récepteur nucléaire orphelin. L'hème est rapporté comme étant le ligand physiologique de RevErb α . C'est ainsi que, basées sur les études précédentes, de nouvelles données ont été apportées sur le fonctionnement du complexe répresseur. Il a été déterminé par ITC (Isothermal Calorimetry) que :

- L'hème se lie au LBD de RevErb α
- L'affinité de la liaison entre l'hème et le LBD de RevErb α est de 2-3 μ M
- La stœchiométrie de la liaison est d'une molécule d'hème pour une molécule de RevErb α
- La liaison de l'hème au LBD de RevErb α est réversible
- Par CD (Dichroïsme circulaire), il a été établi que la liaison de l'hème au LBD de RevErb α entraîne une augmentation de la température de fusion (T_m).

Ces résultats suggèrent un changement conformationnel de la protéine lors de la fixation de l'hème au LBD ou une stabilisation de la structure tertiaire. Au cours de cette étude, il a également été confirmé que l'hème est indispensable à l'association du complexe RevErb α / NCor-HDAC3 ainsi qu'à la répression de la transcription. Cependant, au cours de la même étude, il a été démontré que bien qu'il stabilise l'interaction de RevErb α avec NCor pleine taille, paradoxalement, il déstabilise la liaison entre le LBD de RevErb α et le peptide NCor ID1 (Raghuram *et al*, 2007). Il se peut que ce ligand altère la conformation du LBD de RevErb α de manière à prévenir l'interaction du peptide NCor en absence de contact additionnel avec d'autres régions d'une ou plusieurs protéines (Phelan *et al*, 2010). Cela reste donc à vérifier, quel est l'effet réel de l'hème sur l'interaction entre RevErb α et NCor, et quel rôle joue-t-il dans la régulation de la transcription ?

En 1994, une protéine homologue à RevErb α a été identifiée chez le poulet. Cette protéine, nommée RevErb β , est très similaire à RevErb α . Son ligand naturel est l'hème, tout comme RevErb α , et l'étude de la liaison de celui-ci à la protéine peut apporter des informations quant au mode de fixation du ligand. En effet, par alignement de séquence, si la zone de fixation de l'hème pour

RevErb β est connue, la liaison du ligand à RevErb α devrait être similaire. L'ADNc de RevErb β a été isolée chez l'humain par utilisation d'une banque d'ADNc de poulet. C'est ainsi qu'un fragment de 2.2 kb codant pour une protéine de 576 acides aminés et composée de 8 exons a été isolé. La séquence ADN de RevErb β présente 75 % d'identité avec celle de RevErb α . Comme chez tous les autres récepteurs nucléaires, le DBD est hautement conservé. Au niveau protéique, les mêmes domaines sont présents (un DBD et un LBD), excepté le domaine AF2 (comme pour RevErb α) qui est absent. Cette protéine fait donc partie de la super famille des récepteurs nucléaires (Bonnelye *et al*, 1994). D'autre part, RevErb β se lie sur les séquences ROREs retrouvées dans la région promotrice des gènes cibles, sa liaison à l'ADN entraîne une inhibition de la transcription. Il se lie d'ailleurs sur les mêmes séquences que RevErb α . Cependant, RevErb α et RevErb β ne sont pas retrouvés exprimés dans les mêmes organes. L'ARNm de RevErb β est fortement exprimé dans le foie, les testicules, les glandes thyroïdiennes et parathyroïdiennes, le cortex surrénal et l'épithélium intestinal. Il est également retrouvé faiblement exprimé dans la rate et le thymus (Enmark *et al*, 1994). Donc malgré le fait que les séquences de fixation aux régions promotrices de ces 2 protéines *in vitro* soient identiques, leurs fonctions ne sont pas redondantes. RevErb β a également été identifié comme ayant la capacité de lier l'hème, ainsi que de réprimer la transcription des gènes cibles en présence de cette molécule, exactement comme RevErb α (Raghuram *et al*, 2007).

En parallèle des études de liaison de l'hème à RevErb α et / ou RevErb β , la structure d'un cristal de 1.9 Å de résolution, présentant le LBD de RevErb β lié à l'hème, a été obtenu (Pardee *et al*, 2009). Ce cristal de RevErb β apporte quelques informations sur le mode de liaison de l'hème. Deux structures cristallines ont été résolues présentant le domaine de liaison au ligand de RevErb β lié (Figure 1.14 B) et non lié à une molécule d'hème (Figure 1.14 A).

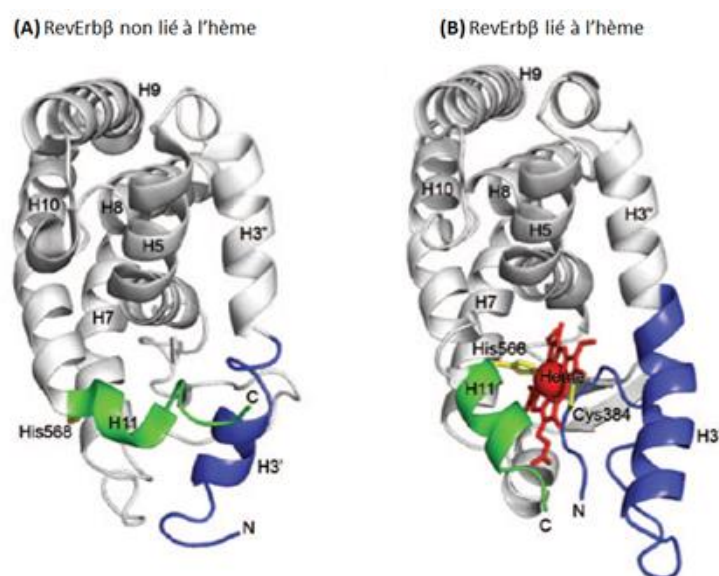


Figure 1.14 : Structure cristallographique du LBD de RevErb β non lié (A) et lié à l'hème (B). L'hème est représenté en rouge. L'hélice H11 est colorée en vert, alors que l'hélice H3 est en bleue. Ce sont dans ces hélices que sont localisées la cystéine 384 (H3) et l'histidine 568 (H11) responsables de la liaison de l'hème (Pardee *et al*, 2009).

C'est ainsi qu'il a été précisé que l'hème interagit avec les résidus Cystéine 384 et Histidine 568⁶ et qu'il est stabilisé dans la poche hydrophobe de liaison des ligands par des liaisons de types Van der Waals. Cependant, une mutation de l'un de ces résidus ou même des 2 n'abolit pas la liaison de l'hème au récepteur, contrairement à ce qui est observé pour RevErb α lorsque l'histidine 602 est mutée. Les hélices H3, 7 et 11 sont principalement impliquées dans la liaison de ce ligand. Ce sont

⁶ Il a été identifié par alignement de séquence, l'histidine 568 de RevErb β correspond à l'histidine 602 de RevErb α .

elles qui protègent le cœur hydrophobe de RevErb β dans sa forme non liée. C'est donc le repositionnement de ces hélices qui va permettre la liaison de l'hème dans cette poche hydrophobe. D'autre part, la liaison de l'hème au récepteur nucléaire RevErb β est dépendante de son état d'oxydoréduction. L'hème dans son état oxydé (contenant un atome de fer Fe³⁺) établit un pont disulfure avec la cystéine 384, permettant ainsi la stabilisation de l'hème. Par contre, l'hème dans son état réduit (contenant un atome de fer Fe²⁺) n'établit pas de pont disulfure, rendant sa liaison au récepteur nucléaire plutôt instable. Cependant, cet état de réduction va permettre la fixation de gaz diatomique (monoxyde d'azote NO ou de carbone CO). Par des tests de gènes rapporteurs à la luciférase, l'effet de ces gaz a été étudié sur l'activité transcriptionnelle des gènes régulés par RevErb α et RevErb β . Il se trouve que l'ajout de NO entraîne une diminution du recrutement du corépresseur NCor et donc diminue l'inhibition de la transcription. Les effets d'un ajout de CO sont moindres, mais vont dans le même sens (Pardee *et al*, 2009).

D'autre part, un alignement des structures cristallographique de RevErb β -LBD / Hème avec RevErb α -LBD / Peptide NCor-ID1 explique pourquoi *in vitro* l'hème déstabiliserait la fixation du peptide NCor ID1 à RevErb α . Comme expliqué précédemment, la liaison de l'hème remodèle l'organisation du domaine de liaison au ligand de RevErb α produisant potentiellement des encombrements stériques empêchant donc la liaison du peptide NCor ID1 lorsque l'hème est déjà lié. En présumant que l'hème lié à RevErb α provoquerait les mêmes changements structuraux et les mêmes encombrements stériques, cela expliquerait le fait qu'aucune structure cristalline du complexe RevErb α -LBD / Hème / Peptide NCor ID1 n'ait pu être obtenue. Le rôle que joue l'hème sur la régulation de la transcription par RevErb α est donc encore incertain et dépendant de beaucoup de paramètres. Des études plus approfondies doivent être menées en particulier sur des protéines pleine taille *in cellulo*.

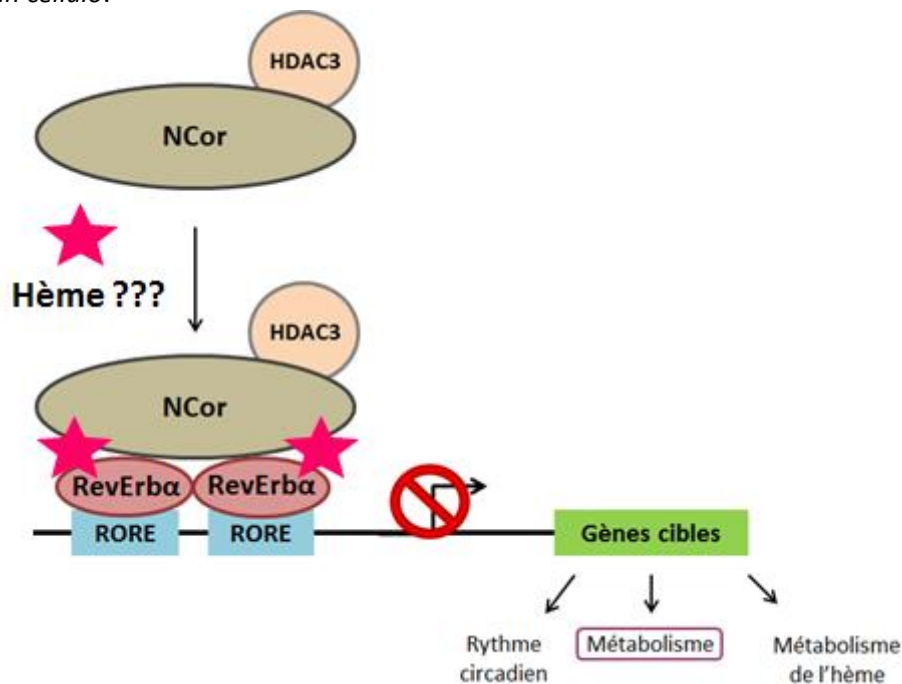


Figure 1.15 : Représentation schématique et générale de l'organisation du complexe corépresseur. RevErb α se fixe en tant qu'homodimères sur les séquences ROREs (dans les régions promotrices des gènes cibles), l'hème fixé à RevErb α (stœchiométrie : une molécule d'hème pour une molécule de RevErb α) permettrait le recrutement du complexe NCor-HDAC3. L'assemblage de ce complexe protéique entraîne l'inhibition de la transcription des gènes cibles impliqués dans le rythme circadien, le métabolisme et le métabolisme de l'hème (Yin *et al*, 2010).

Le rôle majeur du complexe RevErb α / NCor dans la régulation de l'horloge circadienne a clairement été exposé. Comme il a été précisé, ce dernier régule la transcription de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans de nombreuses voies métaboliques telles que le

métabolisme du glucose (Figure 1.15).

c) Implication du complexe corépresseur dans le diabète

La néoglucogenèse est la voie métabolique permettant la synthèse du glucose à partir de précurseurs non glucidiques. Cette synthèse de glucose est permanente. Elle permet de garder un taux de glycémie constant, notamment en période de jeûne ou lorsque les réserves en glucides diminuent. La néoglucogenèse permet la conversion du pyruvate en glucose par différentes enzymes métaboliques. Les enzymes G6Pase (Glucose-6-Phosphatase) et PEPCK (PhosphoEnol Pyruvate Carboxykinase) sont particulièrement intéressantes car elles font partie des gènes métaboliques contrôlés par l'horloge circadienne (Figure 1.16) (Panda *et al*, 2002).

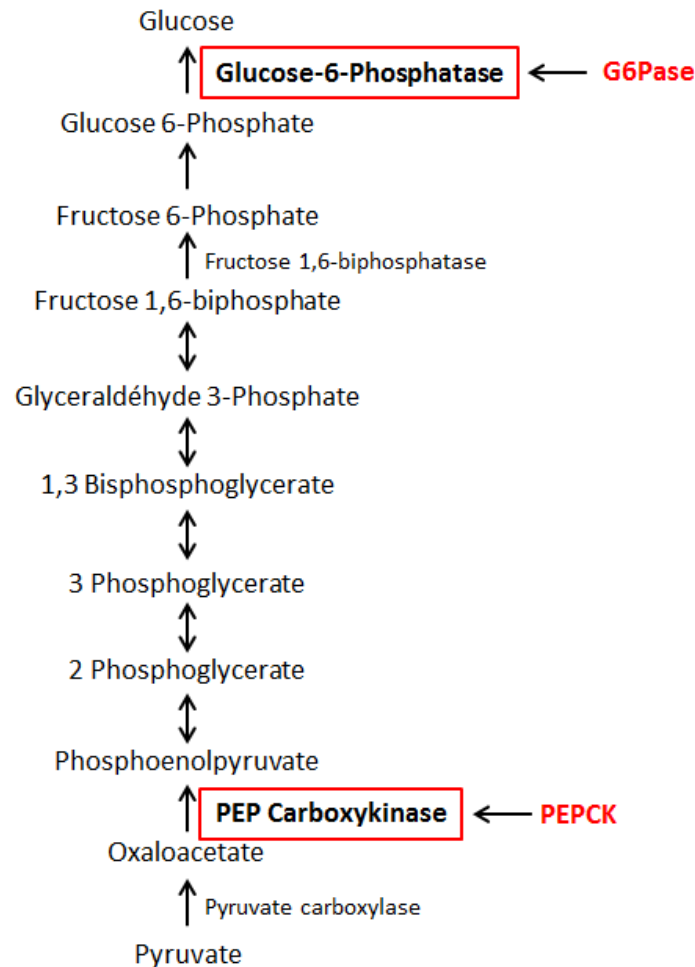


Figure 1.16 : La néoglucogenèse est la voie de synthèse du glucose. Encadrées en rouge les enzymes G6Pase et PEPCK intervenant dans la formation du glucose. Les gènes codant pour ces enzymes sont des gènes cibles du complexe répresseur RevErb α / NCor.

C'est ainsi que l'action du complexe RevErb α / NCor a été testé sur l'expression des gènes codant pour les enzymes G6Pase et PEPCK. Par l'utilisation d'ARN interférents, RevErb α est délesté des cellules. L'expression des gènes codant pour les enzymes G6Pase et PEPCK est alors significativement augmentée. Par ailleurs, une surexpression de RevErb α pleine taille entraîne une diminution de l'expression des enzymes G6Pase et PEPCK. Par ChIP, il a également été mis en évidence que RevErb α se situait à proximité des sites de liaisons potentiels ROREs en présence de NCor. Une délétion du site distal RORE sur les gènes codant pour la G6Pase et la PEPCK inhibe

l'activité répressive de RevErb α . D'autre part, la présence de l'hème abolit l'expression des gènes hépatiques glucogéniques codant pour les enzymes G6Pase et PEPCK ainsi que la production de glucose (Yin *et al*, 2007). Ces informations démontrent une fois de plus le rôle de l'hème dans la répression de la transcription des gènes cibles en association avec le complexe RevErb α / NCor. Ceci prouve également l'implication du complexe répresseur dans la régulation de la synthèse de glucose. C'est ainsi qu'est venue l'idée que ce complexe pourrait être une cible thérapeutique intéressante dans le traitement du diabète.

Il existe plusieurs types de diabètes, les plus répandus sont les diabètes de type 1 et 2. Le diabète de type 1, ou diabète insulino-dépendant est marqué par une carence en insuline. Le diabète de type 2, ou diabète non insulino-dépendant est caractérisé par un excès de glucose dans le sang, dû à une mauvaise régulation de celui-ci. Il n'existe à ce jour malheureusement pas de traitement pour éradiquer cette maladie.

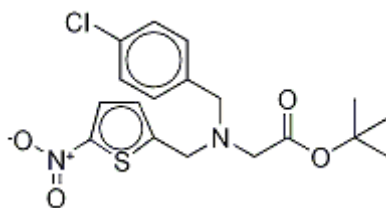
III. But du projet

Le diabète de type 2 est dû à une dérégulation de la néoglucogenèse. En effet, le but de cette voie métabolique est la synthèse de glucose. Or l'accumulation de ce dernier dans le sang est une conséquence du diabète de type 2. L'idée de ce projet est de cibler les 2 enzymes G6Pase et PEPCK intervenant dans cette voie métabolique (Figure 1.16). Le but est de diminuer la transcription des gènes codant pour ces enzymes afin de diminuer leur quantité, et par conséquent de diminuer la synthèse de glucose. Afin de réaliser cela, il a été choisi de cibler le complexe répresseur RevErb α / NCor. Ce dernier une fois formé est responsable de l'inhibition de la transcription, le but est de favoriser l'association du complexe NCor-HDAC3 avec RevErb α . Cette interaction aura pour conséquence l'inhibition de la transcription des gènes codant pour les enzymes G6Pase et PEPCK et par conséquent, entraînera la diminution de la synthèse de glucose et donc son accumulation dans le sang en cas de diabète de type 2.

Pour favoriser cette association, l'intervention d'un ligand qui stabilisera le complexe répresseur RevErb α / NCor-HDAC3 est nécessaire. Ces ligands sont sélectionnés à partir d'un criblage haut débit sur leur capacité à associer le complexe RevErb α / NCor. Les ligands sur lesquels est focalisé le travail suivant ont été étudiés et déjà publiés. Mais leurs études ne portent pas forcément sur la transcription des gènes codant pour les enzymes G6Pase et PEPCK, ou bien leurs actions ont été étudiées sur d'autres récepteurs nucléaires que RevErb α . La partie qui suit présente les ligands non naturels de RevErb α étudiés au cours de ce projet.

1) Les ligands connus

a) Le SGN114

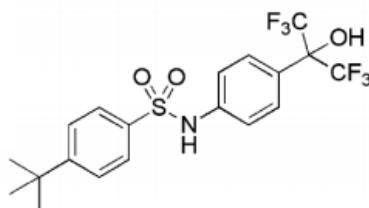


Ce ligand est le {1,1-diméthylethyl N-[(4-chlorophényl)méthyl]-N-[(5-nitro-2-thienyl)méthyl]glycinate} = SGN114. Sa liaison au complexe RevErb α / NCor a été démontrée par FRET (Meng *et al*, 2008). Son affinité à ce complexe est estimée par cette méthode à 250 nM et il

permet l'augmentation du recrutement du corépresseur NCor sur RevErb α de 70 %. Aucune activité similaire n'a été identifiée sur les autres récepteurs nucléaires testés (ROR α , LXR α ou β). Les effets du ligand SGN114 ont été étudiés sur la transcription du gène Pai1. Ce gène code pour une protéine régulé transcriptionnellement par le complexe RevErb α / NCor. Par des essais de gènes rapporteurs à luciférase, il a été mis en évidence qu'en présence du ligand SGN114, une inhibition de la transcription du gène Pai1 de 30 % supplémentaire est observée. Il a également été déterminé que ce ligand affecte la transcription des gènes Bmal1, Per2 ainsi que celle de RevErb α (Meng *et al*, 2008)

Ces données démontrent une action inhibitrice de la transcription augmentée par la présence du ligand SGN114.

b) SD7



Ce ligand est le 4-tert-butyl-N-[4-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxypropan-2-yl)phenyl]benzenesulfonamide = SD7 conçu par synthèse chimique. Son activité a principalement été étudiée sur les récepteurs nucléaires de la famille des ROR (ROR α et ROR γ) ainsi que sur LXR. Ce ligand a été synthétisé dans le but d'inhiber la transcription par ROR α . Ce dernier a la capacité (contrairement à RevErb α) de recruter des coactivateurs pour activer la transcription des gènes cibles. Le but de ce travail a été d'identifier des ligands ayant la capacité de se lier à ROR α ainsi que d'inhiber la transcription de ses gènes cibles. Le SD7 se lie effectivement à ROR α avec une affinité de 2,47 μ M. Il est également capable d'inhiber la transcription du gène de ROR α . D'autre part, des essais de gènes rapporteurs à la luciférase ont identifiés le SD7 comme ligand antagoniste de ROR α ainsi que de ROR γ . De plus, une ChIP permet de démontrer que la présence du ligand SD7 entraîne la diminution de la capacité de ROR α à recruter un coactivateur (SRC-2) sur le promoteur du gène codant pour l'enzyme G6Pase entraînant donc la diminution de la transcription de ce gène (Kumar *et al*, 2011). Il est intéressant de tester l'interaction de ce ligand avec RevErb α .

Le but de ce travail de doctorat a été dans un premier temps de confirmer, ou démontrer, respectivement la capacité de ces 2 ligands (SGN et SD7) à se lier au complexe RevErb α / NCor et à en modifier l'affinité. Dans un deuxième temps, les interactions entre RevErb α et des corégulateurs, ainsi que les effets éventuels des ligands sur ces associations, ont été étudiés dans un contexte cellulaire. Enfin, l'activité de ces ligands sur la transcription du gène codant pour l'enzyme G6Pase sera étudiée. Ce travail se décompose donc en 3 grandes études :

- Une étude *in vitro* qui est axée sur l'étude structurale du complexe par anisotropie de fluorescence.
- Une étude *in cellulo* qui est axée sur une étude du complexe par microscopie de fluorescence. Plus particulièrement, c'est une technique de fluctuations de fluorescence : Number & Brightness (N&B) qui a été utilisée.
- Une étude *in cellulo* de l'activité transcriptionnelle d'un des gènes cibles du complexe (G6Pase) sera effectuée par des tests de gènes rapporteurs à la luciférase. Ce travail est en cours de réalisation et ne sera pas présenté dans ce manuscrit.

2) Approche du sujet

a) L'anisotropie de fluorescence (*in vitro*)

Dans une première partie, l'anisotropie de fluorescence s'appliquant *in vitro* permet d'effectuer le criblage d'une vingtaine de ligands pour leurs effets sur l'interaction RevErb α / NCor. C'est ainsi que l'identification de ligands ayant un effet stabilisateur ou déstabilisateur sur cette association a été possible. D'autre part, cette technique permettra d'étudier en détail les domaines d'interactions (IDs) spécifiques de NCor à RevErb α . La détermination de constantes d'affinités associées a permis de mettre en évidence l'effet quantitatif de ces ligands sur l'interaction. Le criblage de ligands est un gros avantage de cette technique. Par contre, le travail s'effectue sur des fragments de protéine uniquement et non sur les protéines pleine taille. L'anisotropie de fluorescence est basée sur les changements de diffusion rotationnelle des molécules fluorescentes en solution. Elle permet d'une part la démonstration d'une interaction et d'autre part la quantification de cette interaction (par la détermination de constante d'affinité = K_D). De ce fait, aucun changement de polarisation ne pourra être observé si les espèces présentes en solution sont de taille trop importante. C'est pour cette raison que seuls les peptides IDs de NCor marqués par un fluorophore ont été utilisés. Par ailleurs, seul le domaine de liaison au ligand de RevErb α a pu être purifié et utilisé *in vitro*, la protéine entière étant insoluble. L'anisotropie de fluorescence des peptides marqués *in vitro* et titrés par la protéine RevErb α en absence et en présence des ligands a donc permis la sélection de quelques ligands qui ont été testés sur les protéines pleine taille *in cellulo* dans une deuxième partie.

b) Number & Brightness (*in cellulo*)

Le N&B est une technique de microscopie de fluorescence s'appliquant sur cellules vivantes (*in cellulo*). Elle a été mise en place dans une seconde partie afin de tester si l'effet des ligands, observé par anisotropie de fluorescence *in vitro*, s'avère être similaire dans les cellules vivantes. C'est ainsi que leur effet sur le nombre de complexes formés ainsi que sur la stœchiométrie des protéines a pu être déterminé. C'est grâce à cette partie que la confirmation d'un effet stabilisateur de l'interaction entre RevErb α et NCor pourra être prouvée. Ce sera potentiellement un ligand à étudier plus en détail quant à son rôle sur la transcription des gènes cibles (G6Pase et PEPCK). Une dernière partie de ce travail de doctorat sera justement consacrée à l'identification des effets des ligands sur la transcription du gène codant pour l'enzyme G6Pase par des tests de gènes rapporteurs à la luciférase. Cette troisième et dernière partie permettra également de valider les résultats obtenus en microscopie, mais ne sera pas présenté dans ce manuscrit puisqu'elle est en cours de réalisation.

Le N&B est une technique de microscopie de fluorescence basée sur les fluctuations de fluorescence des molécules d'intérêts. Celles-ci sont, dans le cas présents les protéines RevErb α et NCor marquées avec des protéines fluorescentes (FPs) spectralement différentes. Cette technique de microscopie est dérivée du FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) et du FCCS (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy). Le N&B s'applique en général sur cellules vivantes, typiquement une centaine d'images seront prises présentant une carte spatiale (ensemble de pixels) de l'intensité de fluorescence pour chaque protéine. En outre, cette technique permet d'obtenir des images de la répartition cellulaire des protéines, de leur stœchiométrie et de leur interaction. Cela représente le gros avantage de cette technique de N&B, en plus du fait qu'elle s'applique sur cellules vivantes.

Le signal d'intensité de fluorescence est décomposé pour chaque pixel de l'image en brillance moléculaire (B) et en nombre de molécules (N) en utilisant l'amplitude des fluctuations de l'intensité autour de la moyenne pour les 100 images prises. De ce fait, plusieurs paramètres pourront être déterminés :

- Le nombre de molécules permettra d'avoir accès à la concentration molaire de chacune des protéines dans des zones cellulaires bien déterminées.
- La brillance moléculaire permettra d'avoir accès à la stœchiométrie des protéines.

Sachant que le but ici est de déterminer si les ligands testés favorisent ou pas l'interaction entre RevErb α et NCor, la stœchiométrie permettra la mise en évidence des différences d'efficacité des ligands. D'autre part, le signal d'intensité de fluorescence est cross corrélé spatialement et temporellement. Une corrélation croisée positive étant la preuve que 2 protéines interagissent, cette technique permettra de prouver clairement l'interaction entre ces 2 protéines.

Enfin une partie *in cellulo* est en cours afin d'étudier l'activité transcriptionnelle du complexe RevErb α / NCor sur un des gènes cible codant pour l'enzyme G6Pase. La technique de gènes rapporteurs à la luciférase permettra d'étudier l'effet de ce complexe avec ou sans ligand sur l'activité transcriptionnelle de ce gène cible. Cette dernière partie finira de couvrir tous les aspects de ce projet en ajoutant à l'étude structurale (anisotropie de fluorescence et N&B) une étude fonctionnelle sur l'activité réelle de ce complexe sur la transcription en présence et en absence de ligand.

Dans ce manuscrit une première partie *in vitro* est d'abord abordée par anisotropie de fluorescence. Cette partie a permis d'effectuer un criblage de différents ligands et d'identifier ceux ayant un effet stabilisateur de l'interaction entre RevErb α et NCor. Dans une deuxième partie, les ligands sélectionnés lors de la première partie ont été testés. Leur effet sur l'interaction des protéines pleine taille *in cellulo* a été alors confirmé ou pas. La technique de N&B complète les informations obtenues dans la première partie. De par le fait que ces protéines soient pleine taille et qu'elles sont étudiées dans leur contexte naturel (*in cellulo*) une information plus réaliste sur leur comportement physiologique a pu être apporté. Enfin, une dernière partie sera consacrée à l'étude de l'effet des ligands sur la transcription d'un des gènes cibles du complexe codant pour l'enzyme G6Pase par des tests de gènes rapporteur à la luciférase.

Ce travail présente une amorce de voie de recherche d'un traitement contre le diabète de type 2.

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

Les techniques biochimiques permettant de mettre en évidence une interaction entre 2 protéines sont nombreuses : les tests de double hybride, les IP ou encore les pull down. Cependant, le but de ce travail n'a pas été simplement de déterminer s'il existe une interaction entre RevErb α et NCor, mais de quantifier cette interaction afin d'aller plus loin dans la compréhension de ce mécanisme de liaison et des différents acteurs (ligands) pouvant jouer sur la stabilité du complexe. L'utilisation de la technique d'anisotropie de fluorescence, basée sur la diffusion rotationnelle de molécules marquées d'un fluorophore, a permis de déterminer des constantes d'affinité. Un fragment de la protéine RevErb α , correspondant au LBD de cette dernière, ainsi que différents peptides, issus des 2 CoR SMRT et NCor, marqués d'un fluorophore ont été utilisés. Les affinités de la protéine pour des domaines correspondant aux ID1, 2 ou 3 des 2 CoRs ont été déterminées et l'effet des ligands a été étudié sur cette interaction. Cette partie apporte une compréhension globale du mécanisme de fixation de RevErb α avec les CoRs ainsi qu'avec les ligands. Cependant, l'anisotropie de fluorescence présente des limites pour la taille des molécules étudiées. De plus, des expériences par anisotropie se pratiquent surtout *in vitro*, ce qui nécessite des protéines purifiées et nous limite donc aux constructions de RevErb α et des corégulateurs pouvant être produits et purifiés.

Afin d'étudier les complexes de protéines entières et dans un milieu cellulaire, la microscopie de fluorescence quantitative a été utilisée. La technique de microscopie mise en place est le N&B, basée sur l'observation des fluctuations de l'intensité de fluorescence de molécules marquées d'une FP dans un petit volume confocal. Son principe découle de 2 autres techniques de microscopie de fluorescence : le FCS et le FCCS. Ces méthodes sont basées sur la capacité à mesurer les fluctuations de fluorescence de molécules présentes dans le volume d'excitation. Ces techniques possèdent une grande sensibilité (de l'ordre du nano molaire) et le FCCS permet d'identifier des interactions spécifiques. Cependant, les fluctuations d'intensité de fluorescence seront moyennées pour de trop fortes concentrations et donc l'approche par le FCS ne sera plus adaptée pour la mise en évidence d'une interaction.

C'est ainsi qu'une méthode alternative a été développée, le scanning N&B. Celle-ci est basée sur un scanning ultra-rapide et répété de l'image, permettant le calcul du nombre de particules et leur brillance moléculaire à chaque pixel de l'image. En mode deux canaux, le cross-N&B permet de mesurer la covariance du signal d'intensité de fluorescence dans les deux canaux et donc la complexation entre deux types de molécules marquées avec deux fluorophores différents. Elle est très similaire sur le principe au FCCS, excepté qu'elle génère une carte d'intensité de fluorescence représentant la répartition des complexes moléculaires à l'intérieur de la cellule. Cette méthode exploite la corrélation de l'amplitude de fluctuation de fluorescence de 2 couleurs (2 protéines fluorescentes différentes) et permet de détecter la présence de complexes moléculaires ainsi que leur stœchiométrie (Digman *et al*, 2008). De ce fait, l'effet des ligands a pu être étudié sur la formation des complexes permettant de confirmer ce qui a été observé en anisotropie de fluorescence.

I. Méthodologie pour les études d'interaction *in vitro*

1) Purification du LBD de RevErba

Le plasmide permettant d'exprimer le LBD de RevErba a été fourni par la société pharmaceutique Servier. C'est un plasmide pET23 Ampicilline résistant permettant d'exprimer le LBD de RevErba (P281-Q614 Δ342-413), étiqueté avec 6 histidines en N-ter de RevErba. Ce plasmide est nommé pET23-6xHis-RevErba. La délétion d'une partie de la protéine permet une meilleure solubilité de celle-ci qui a tendance à agréger. Le LBD de RevErba est purifié par chromatographie d'affinité sur une colonne histidine-trap.

Une première étape consiste à faire exprimer le plasmide pET23-6xHis-RevErba dans des bactéries compétentes E. Coli. L'expression de la protéine d'intérêt (RevErba-LBD) est induite par l'ajout d'IPTG qui permet sa production en grande quantité. Les bactéries sont ensuite lysées afin de libérer les protéines 6xHis-RevErba-LBD. Un lysat cytoplasmique de bactéries est ainsi préparé et passé sur colonne de purification « Piège histidine ». L'étiquette des 6 histidines, exprimée en N ter de RevErba-LBD, permet la purification de la protéine. En effet, la colonne utilisée est composée de billes de sépharoses sur les quelles sont fixés des molécules de Nickel qui ont la particularité de lier l'histidine. Seules les protéines d'intérêt sont retenues sur cette colonne et leur élution est permise par l'ajout d'imidazole qui casse les liaisons Histidine-Nickel.

C'est ainsi que le LBD de RevErba a été purifié et que les essais en anisotropie ont pu être effectués.

2) Peptides utilisés

Une seule protéine a été utilisée c'est le LBD de RevErba P281-Q614 Δ342-413 purifié par chromatographie d'affinité comme expliqué précédemment. Cette protéine a une masse de 31528,5 g/mol et un coefficient d'extinction molaire (ξ) de 15595 L.mol⁻¹.cm⁻¹. C'est presque la même protéine qui a été utilisée lors de la cristallisation du LBD de RevErba (P281-Q614 Δ324-422) avec le peptide NCor ID1 (Phelan *et al*, 2010).

Plusieurs peptides ont été testés et sont décrits dans ce tableau:

Peptide	Séquences Acides aminés	Fluorophore	Masse (g/mol)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
NCor ID1	RLITLADHICQITQDFAR	Fluorescéine	2559,91	490	525
NCor ID2	DPASNLGLEDIRKALMGSD	Fluorescéine	2594,81	490	525
NCor ID3	KTTITAANFIDVITRQIASDKDAR	Fluorescéine	3094,41	490	525
SMRT ID1	RVVTLAQHISEVITQDYTR	Rhodamine 110	2708,5	554	627
SMRT ID2	TNMGLEAIRKALMGKYDQWEE	Fluorescéine	2929,31	490	525
NCor5	QVPRTHRLITLADHICQITQDFARNQVPSQASTS TFQTSPSALSSTPVRTKTSSRYSPESQSQTVLHPR PGPRVSPENLVDKSRGSRPGKSPERSHIPSEPYEP ISPPQGPVAVHEKQDSMLLSQRGVDPAEQRS RSPGSISYLPFFTKLESTSPMVKSKKQEIFRKLNS SGGGSDSDMAAAQPGTEIFNLPAVTTSGAVSSRS HSFADPASNLGLEDIRKALMGSDDKVEDHGV VMSHPVGIMPGSASTSVVTSSEARRDE	Atto647N	28860	643	665

Tableau 2.1: Compilation de tous les peptides utilisés au cours des essais d'anisotropie de fluorescence. La boîte CoNRN est surlignée en rose et les acides aminés indispensables à l'interaction, à l'intérieur du motif CoNRN, entre RevErba et NCor sont représentés en gras.

Les peptides utilisés pour ce travail, référencés dans le tableau 2.1, ont été fournis par l'équipe de William Bourguet au CBS. Ils ont été commandés à la société EZbiolab qui les synthétise chimiquement et les purifie à 98% minimum. Le peptide NCor ID1 marqué à la fluorescéine est le principal peptide qui a été étudié dans la suite de ce manuscrit avec le peptide SMRT ID1 marqué à la rhodamine 110. L'interaction de ces deux peptides avec RevErb α -LBD ont été testés en présence et en absence de ligands. Cependant, les marquages sont différents ce qui rend les résultats difficiles à comparer. Pour cette raison, le peptide NCor ID1 marqué à la rhodamine 110 a été commandé à la société EZbiolab, malheureusement les résultats avec ce peptide ne sont pas du tout exploitables. Le delta d'anisotropie obtenu n'est pas suffisant pour pouvoir déterminer précisément des constantes d'affinité fiables et l'effet des ligands n'est pas être visible non plus sur cette interaction. Finalement, il a été décidé de continuer avec les peptides NCor ID1 marqué Fluorescéine et SMRT ID1 marqué rhodamine 110 et afin de pouvoir comparer l'affinité de ces deux peptides en absence de fluorophore, des compétitions d'anisotropie ont été réalisées.

Concernant le peptide NCor5 contenant les 2 motifs CoRNR1 et CoRNR2, il a été synthétisé par Albane LeMaire, travaillant dans l'équipe de William Bourguet au CBS. Le fragment NCor5 de 2670 acides aminés (GLN 2059-GLU 2325) est issu de la souris. L'alignement des séquences indique une grande similarité entre les peptides et surtout les domaines IDs sont conservés. Suite à l'expression de la protéine dans des bactéries E. Coli BL21 Rosetta, celle-ci est purifiée sur colonne de nickel permettant de retenir le peptide NCor5 qui est marqué en N ter par une étiquette de 6 histidines. La protéine est élué par clivage du site Tev⁷ ajouté dans ce but. L'étiquette histidines est ainsi éliminée et le peptide NCor5 est purifié de cette façon.

Les ligands SGN et SD7 ont été synthétisés chimiquement et identifiés par criblage haut débit, ils sont reçus sous forme de poudre. L'hème utilisé provient de la compagnie Sigma-Aldrich (Annexes 1), il est également reçu sous forme de poudre. Les trois ligands sont dans un premier temps dilués dans du DMSO 100% dans lequel ils sont conservés. Ils sont ensuite amenés à la concentration désirés soit dans du tampon anisotropie, soit dans du milieu DMEM supplémenté en sérum (Annexes 1).

3) Principe de la fluorescence

La fluorescence est la propriété d'une molécule à absorber un rayonnement lumineux et à restituer l'énergie absorbée sous forme de rayonnement de lumière d'énergie plus faible. Le diagramme de Jablonski (Figure 2.1) permet de comprendre ce phénomène à partir des niveaux énergétiques de la molécule. Une fois le photon d'excitation absorbé, la molécule passe d'un état fondamental S_0 à un état plus excité S_1 , suite à quoi elle se désexcite non radiativement pour descendre à des niveaux plus bas de l'état excité, avant d'émettre un photon d'énergie plus faible pour retourner au niveau fondamental. La durée de vie de l'état excité dépend des fluorophores et de l'environnement mais est généralement de l'ordre de la nanoseconde. Plus celui-ci sera court et plus le fluorophore pourra être considéré comme un bon émetteur.

⁷ La protéase Tev correspond au domaine catalytique de la protéine Nla (Nuclear Inclusion a) qui est une endopeptidase et qui a une masse de 27kDa. La séquence très spécifique reconnue par la Tev est largement utilisée pour cliver les protéines de fusion, notamment lors de purification de protéine.

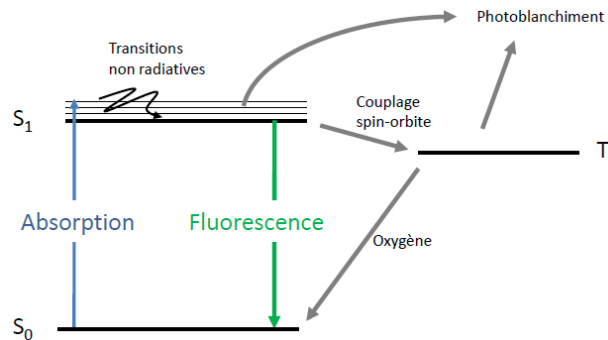


Figure 2.1 : Diagramme de Jablonski. Le fluorophore absorbe un photon d'excitation l'emmenant de son état fondamental S_0 à un état excité S_1 , puis redescend à l'état S_0 en émettant un photon de fluorescence. Depuis l'état S_1 la molécule peut passer dans un état triplet T dans lequel elle n'émet plus de photons. L'oxygène présent dans l'environnement permet de réduire la durée de vie de cet état mais est également responsable du photoblanchiment de la molécule.

Une fois excité, la molécule peut émettre de la fluorescence (passage à l'état S_0) ou bien elle peut émettre de la phosphorescence. Ce phénomène se produit lorsque la molécule, après excitation, passe à un autre niveau d'excitation et ne revient pas directement à l'état S_0 . En effet, par couplage spin-orbite, la molécule peut passer de son état excité à l'état triplet. Selon les fluorophores la durée de vie dans cet état peut durer de quelques microsecondes à plusieurs centaines de millisecondes, pendant lesquelles la molécule cesse d'émettre des photons. Le passage de l'état triplet à l'état S_0 s'accompagne d'émission de phosphorescence.

Le temps de vie d'un fluorophore représente le temps moyen que prend une molécule après absorption d'un photon à revenir à son état d'origine (S_0). En effet, les processus d'absorption, de conversion interne ou encore de relaxation vibrationnelle sont plus rapides que l'émission de fluorescence. Donc le temps de retour à l'état d'origine S_0 dépend du temps passé dans l'état vibrationnel le plus bas en S_1 . D'autre part, ce temps de vie est dépendant de l'environnement et de la composition du milieu (température, viscosité...). D'autre part, les mesures de fluorescence de polarisation sont basées sur les mouvements rotationnels des espèces en solution. La polarisation de fluorescence peut être considérée comme une compétition entre les mouvements moléculaires et le temps de vie des fluorophores en solution. Dans le cas où la lumière linéaire polarisée est utilisée pour exciter un ensemble de fluorophores, seuls ceux alignés sur le même plan de polarisation seront excités. Deux scénarios sont possibles pour l'émission :

- Dans le cas où le temps de vie du fluorophore excité est plus long que le temps de rotation de la molécule qui lui est lié, les molécules en solution seront orientées aléatoirement et subiront des mouvements rotatifs durant le processus d'émission et résulte de cela l'émission de lumière, par le fluorophore, dépolarisée.
- Dans le cas où le temps de vie du fluorophore est plus court que le temps de rotation de la molécule, alors les molécules excitées restent alignées durant le processus d'émission et résulte en l'émission d'une lumière polarisée.

C'est pour cela que le choix des fluorophores est très important, ils doivent être choisis de façon à être adapté à ce qui est étudié. Le photoblanchiment est la perte définitive de la fluorescence de la molécule. La molécule est alors engagée dans une réaction photochimique qui va empêcher son retour à un état excitable.

4) Anisotropie de fluorescence

a) Principe de la technique

Les mesures d'anisotropie de fluorescence (AF) sont basées sur le principe de l'excitation photo sélective d'un fluorophore par une lumière polarisée. L'émission de cette lumière polarisée apporte des informations sur les mouvements rotationnels de la molécule marquée. La théorie de l'AF est basée sur l'observation que lorsqu'une petite molécule fluorescente, très mobile en solution, est excitée par une lumière linéaire polarisée, la lumière émise est largement dépolarisée à cause des petites molécules, très mobiles, ayant une vitesse de rotation très rapide en solution durant le temps de vie du fluorophore (Figure 2.2). En revanche, si le fluorophore est associé à une grosse molécule, ou complexe, son volume moléculaire augmente entraînant le ralentissement de sa vitesse de rotation. De ce fait, la lumière émise sera dans le même plan que l'énergie d'excitation, elle sera donc polarisée (Figure 2.2). Les états libres et liés du fluorophore possèdent chacun une valeur spécifique de polarisation, cette valeur est haute pour les états liés et faible pour les états libres. La mesure de la polarisation est une moyenne de ces deux valeurs de polarisation, permettant une mesure directe de la fraction de fluorophore libre et lié. La valeur de polarisation d'une molécule est proportionnelle à sa vitesse de rotation. La polarisation est donc directement reliée à la taille moléculaire. Des changements de cette dernière peuvent résulter de l'association ou la dissociation de molécules, de la dégradation de l'échantillon ou bien de changement conformationnel.

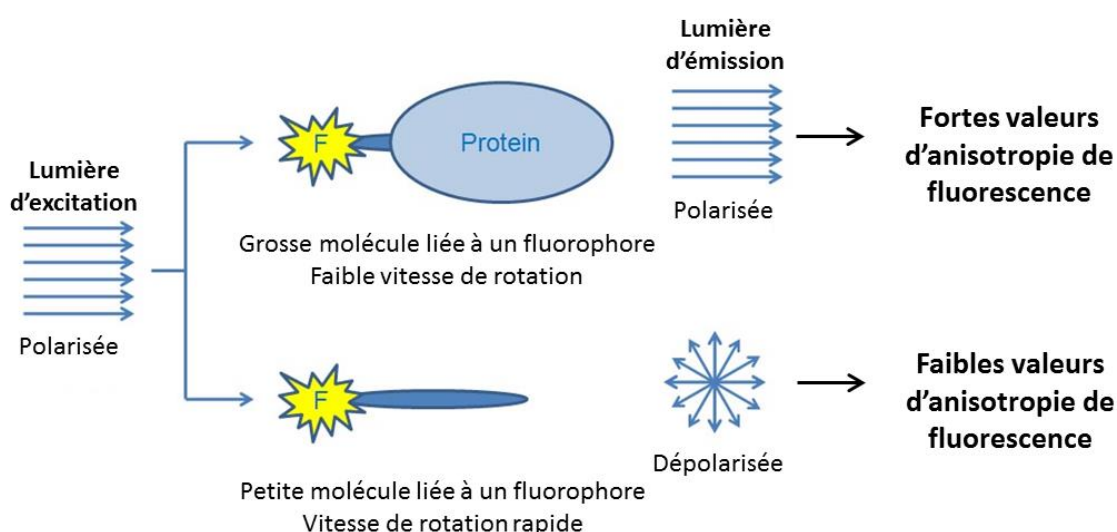


Figure 2.2: Représentation du principe de l'anisotropie de fluorescence et des résultats obtenus. Une lumière d'excitation polarisée vient exciter l'échantillon composé de petites et de grosses molécules. La vitesse de rotation du fluorophore sera différente selon que la particule à laquelle il est associé sera grosse ou petite. De grosses particules ou complexe ralentiront son mouvement rotationnel aboutissant à l'émission d'une lumière polarisée, alors que de petites molécules lui permettront, au contraire, une vitesse de rotation rapide résultant en l'émission d'une lumière dépolarisée. De fortes valeurs d'anisotropie mettront donc en évidence l'existence de grosses particules ou complexe. Au contraire les petites molécules seront révélées par de faibles valeurs d'anisotropie.

Les petites molécules ont une vitesse de rotation très rapide durant l'état d'excitation et d'émission résultant en l'émission de faibles valeurs de polarisation ou d'anisotropie (Figure 2.3). Au contraire, les grosses molécules, qui représentent dans notre cas la liaison des 2 protéines RevErb α et NCor, ont une vitesse de rotation très lente durant l'excitation et l'émission résultant en l'émission de faibles valeurs de polarisation ou d'anisotropie (Figure 2.3). De ce fait, la formation de complexes pourra être suivie et mesurée directement grâce à cette technique. Plus de complexes sont formés et plus de fortes valeurs d'anisotropie seront obtenues.

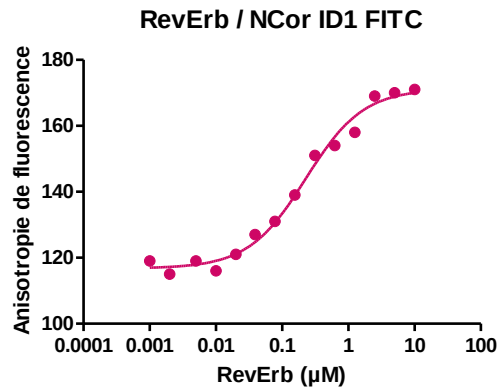


Figure 2.3: Exemple de courbe obtenue lors d'une analyse d'anisotropie de fluorescence. La concentration de la protéine, qui est variable, est indiquée en abscisse. Les ordonnées indiquent les valeurs d'anisotropie de fluorescence brutes. La formation de complexes est ainsi suivie, les faibles valeurs d'anisotropie sont obtenues pour le peptide fluorescence seul. L'ajout de protéines permet la formation de complexe peptide-fluorescent / Protéine. Le plateau d'anisotropie maximum est atteint lorsque 100% des complexes ont été formés.

C'est ainsi que pourront être étudiés :

- L'interaction entre RevErb α -LBD et un peptide NCor.
- L'effet de plusieurs ligands, y compris le ligand naturel de RevErb α qui est l'hème, sur la formation de ce complexe.

Cependant, le choix d'un fluorophore adapté est capital pour la visualisation de différences de polarisation entre l'état lié (RevErb α -LBD / Peptide NCor) et l'état non lié (Peptide marqué d'un fluorophore). Le but est d'obtenir un delta d'anisotropie suffisamment important pour visualiser la formation de complexe RevErb α -LBD / Peptide NCor. Ceci pourra être possible uniquement si la différence entre l'émission de lumière de la molécule liée et non liée est suffisamment importante. Le choix du fluorophore est dépendant de la taille des molécules / protéines / peptides utilisés, du temps de rotation de la molécule liée au fluorophore et du temps de rotation du complexe formé. Le temps de vie du fluorophore sera adapté en fonction de ces différents paramètres. Dans le but de suivre une interaction entre 2 protéines, l'une étant marquée et l'autre non, le temps de vie du fluorophore (t_f) doit être supérieur au temps de rotation de la protéine marquée (t_r) afin de laisser le temps à cette dernière de subir plusieurs mouvements de rotation qui entraîneront l'émission d'une lumière non polarisée : $t_f > t_r$ (Figure 2.4). Cependant, le temps de vie du fluorophore doit être inférieur au temps de rotation du complexe (t_{rc}) : $t_f < t_{rc}$ (Figure 2.4). Dans le cas où le temps de vie du fluorophore est supérieur au temps de rotation du complexe, entre l'excitation et l'émission de lumière, le complexe aura subi plusieurs mouvements rotationnels aboutissant à l'émission d'une lumière dépolarisée rendant impossible le suivi de la formation du complexe. En conclusion, le temps de vie du fluorophore doit être compris entre le temps de rotation de la protéine marquée du fluorophore et le temps de rotation du complexe (Figure 2.4):

$$t_r < t_f < t_{rc}$$

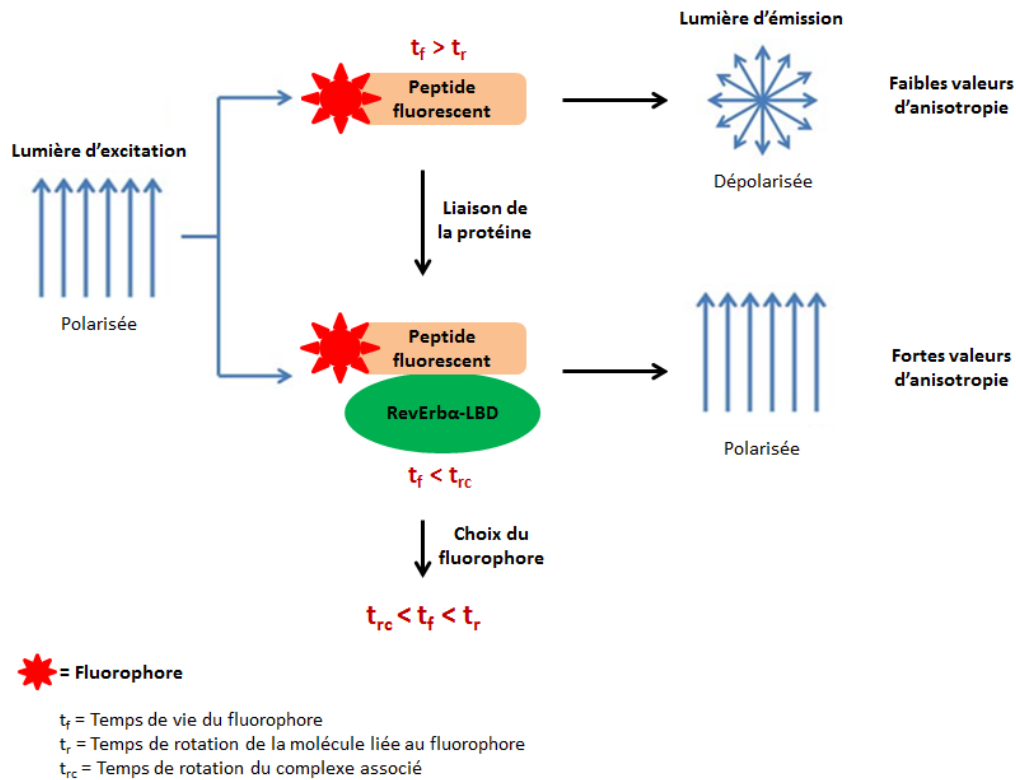


Figure 2.4 : Représentation du système étudié et des paramètres importants pour le choix du fluorophore.

Le temps de vie du fluorophore doit être supérieur au temps de rotation du peptide marqué d'un fluorophore afin d'observer l'émission d'une lumière dépolarisée. En revanche, le temps de vie du fluorophore doit être inférieur au temps de rotation du complexe associé afin de visualiser l'émission de lumière polarisée. Si $t_r < t_f < t_{rc}$, alors la différence des valeurs d'anisotropie, entre le peptide marqué d'un fluorophore seul et le complexe, sera suffisamment importante pour suivre la formation de complexes ainsi que de visualiser l'effet des ligands sur cette interaction.

Dans notre cas, nous avons étudié l'association de RevErbα-LBD (31 kDa) avec différents peptides (environ 3 kDa) issus des 2 corépresseurs NCor et SMRT. Les peptides sont marqués d'un fluorophore en Nter, ils sont de petite taille et par conséquent ont un mouvement rotationnel rapide en solution. La liaison de la protéine non marquée au peptide marqué d'un fluorophore diminue ces mouvements aboutissant en l'augmentation des valeurs d'anisotropie et permet d'obtenir un delta d'anisotropie suffisamment important pour suivre la formation de complexes. Deux fluorophores ont été utilisés : la fluoescéine et la rhodamine 110 ayant tous deux un temps de vie de 4 nano secondes et qui permet d'optimiser la différence entre les faibles et les fortes valeurs d'anisotropie obtenues ainsi que de visualiser l'effet des ligands sur l'interaction.

Le calcul de la polarisation de fluorescence (P) est le suivant :

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

Un autre terme pour représenter le degré d'émission de lumière polarisée est l'anisotropie (r) qui est définie comme suit :

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Où $I_{\parallel}$ représente l'intensité d'émission parallèle au plan d'excitation et $I_{\perp}$ est l'intensité d'émission perpendiculaire au plan d'excitation. La différence entre la polarisation et l'anisotropie de

fluorescence est définie par la présence d'une deuxième intensité perpendiculaire dans le dénominateur. La définition de l'anisotropie prend en compte une seconde émission perpendiculaire possible qui est orientée selon l'axe de propagation. L'anisotropie est une représentation plus précise des phénomènes physiques car elle prend en compte la contribution de tous les degrés de mouvements rotationnels possibles et reflète l'orientation des molécules. C'est donc l'anisotropie de fluorescence qui sera utilisée dans la suite de ce manuscrit.

L'utilisation de peptides marqués est également un des inconvénients de la technique d'anisotropie de fluorescence. En effet, le travail avec des protéines pleine taille n'est pas possible car la visualisation de différences d'émission de lumière entre les protéines non liées et liées serait négligeable. Comme expliqué précédemment, les grosses molécules sont peu mobiles en solution et aboutissent en l'émission d'une lumière polarisée. Dans le cas où la protéine marquée d'un fluorophore émet une lumière polarisée, le suivi de la formation de complexes ne sera pas possible. L'utilisation d'un fluorophore possédant un temps de vie très important est une solution pour palier à cela. Cependant, il est très difficile de suivre l'interaction entre 2 protéines de taille supérieure à 30kDa en anisotropie de fluorescence, car le temps de vie du fluorophore devra être très long, entraînant des imprécisions sur les mesures effectuées. En revanche, si la molécule marquée est très petite, son interaction avec n'importe quelle molécule quelle que soit sa taille sera possible, les changements d'émission de lumière polarisée ou non polarisée seront très importants.

C'est pour cela que le travail suivant a été effectué avec le LBD de la protéine RevErb α et des petits peptides issus des CoR NCor et SMRT qui sont marqués par un fluorophore.

b) Méthodologie et traitements des données

La protéine RevErb α -LBD est conservée dans du tampon B et les peptides sont conservés dans du DMSO 100% à forte concentration (2 μ M). Le peptide NCor ID1 est hydrophobe et se dégrade assez vite en milieu aqueux. C'est pour cela que les dilutions des peptides se font toujours en présence de 2.5% de DMSO minimum afin d'éviter leur dégradation précoce.

Les mesures s'effectuent dans des plaques Corning 384 de 384 puits. Le volume final de solution dans chaque puits est de 60 μ L. Les peptides marqués d'un fluorophore, présents à une concentration constante de 4nM, sont titrés par la protéine RevErb α -LBD à concentration croissante. RevErb α -LBD est ajouté dans le premier puits à une concentration de 10 μ M et est dilué de demi à chaque puits. Les dilutions se font systématiquement dans du tampon anisotropie (Annexes 1) toujours en présence de 2,5% de DMSO. Les ligands sont ajoutés à une concentration de 100 ou 20 μ M final, toujours en présence de 2,5% de DMSO et dans un volume final de 60 μ L.

Les compétitions consistent à évaluer la fixation des peptides non marqués à la protéine. Pour cela, un peptide marqué d'un fluorophore (SMRT ID1 rhodamine 110) est titré par des concentrations croissantes de protéine RevErb α -LBD en présence du peptide d'intérêt non marqué. Connaissant la constante d'affinité de la protéine pour le peptide marqué d'un fluorophore, il est possible de déterminer celle du peptide non marqué et de déterminer ainsi si l'effet des fluorophores est négligeable sur l'interaction. D'autre part, la réalisation de compétitions permet de comparer directement sans éléments perturbateurs l'interaction entre RevErb α -LBD et différents peptides issus des CoR NR SMRT et NCor non marqués.

Les valeurs brutes d'anisotropie sont analysées par le logiciel BioEqs développé par Catherine Royer et Joseph Beechem dans les années 1990 (Royer and Beechem 1992). Celui-ci est basé sur un calcul numérique de la population des espèces en solution et d'un ajustement non-linéaire des paramètres d'interaction. Il permet de déterminer l'énergie libre du complexe (ΔG) à partir du modèle de fixation adapté, c'est à dire 2 éléments (Protéine et peptide fluorescent) et 3 espèces (formation de complexes : protéine seule, protéine + peptide et peptide seul). Les ligands n'interviennent pas dans le calcul d'affinité entre la protéine et le peptide fluorescent. La constante d'affinité (K_D), permettant d'évaluer la formation de complexe et l'influence des ligands sur

l'interaction, est déterminé à grâce à la valeur d'enthalpie libre par le calcul suivant :

$$K = \exp\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right)$$

La constante d'affinité K est exprimée en molaire et l'enthalpie libre en Joule/mol. La température (T) est en degré Kelvin et la constante des gaz parfait (R) en Joules.mol⁻¹.K⁻¹

Les compétitions d'anisotropie réalisées ici sont inhabituelles. En général, c'est la protéine (présente à une concentration constante pour laquelle 50% du complexe est formé) qui est titrée par des concentrations croissantes de peptide marqué d'un fluorophore en présence de peptide non marqué (à concentration constante) (Figure 2.5 A). Cette méthode a été utilisée dans un premier temps, cependant, les erreurs obtenues sur l'ensemble des résultats étaient assez importantes rendant les résultats peu fiables. La faible stabilité en solution des peptides, marqués ou non marqués, peut expliquer les résultats obtenus. Comme expliqué précédemment, les peptides à forte concentration dans un milieu aqueux sont peu stables et peuvent avoir tendance à s'agréger ou bien à se coller à la paroi des puits faussant les résultats obtenus. Pour pallier à ces inconvénients une autre méthode de compétition a été utilisée. Elle consiste en la titration d'un peptide marqué d'un fluorophore (à 4nM) par la protéine RevErb α -LBD, à concentration croissante, en présence du peptide non marqué à concentration constante (100, 50 ou 10 μ M). De ce fait, trois courbes sont réalisées, en présence de 100, 50 ou 10 μ M de peptide non marqué (Figure 2.5 B). Connaissant l'affinité du peptide marqué d'un fluorophore pour la protéine RevErb α -LBD, celle du peptide non marqué peut être déterminée. Les trois courbes obtenues permettent d'obtenir le même K_D de fixation pour le peptide non marqué quel que soit sa concentration. Cette méthode permet de s'affranchir des erreurs provoquées par la variation de concentration du peptide marqué d'un fluorophore (dans un cas classique de compétitions).

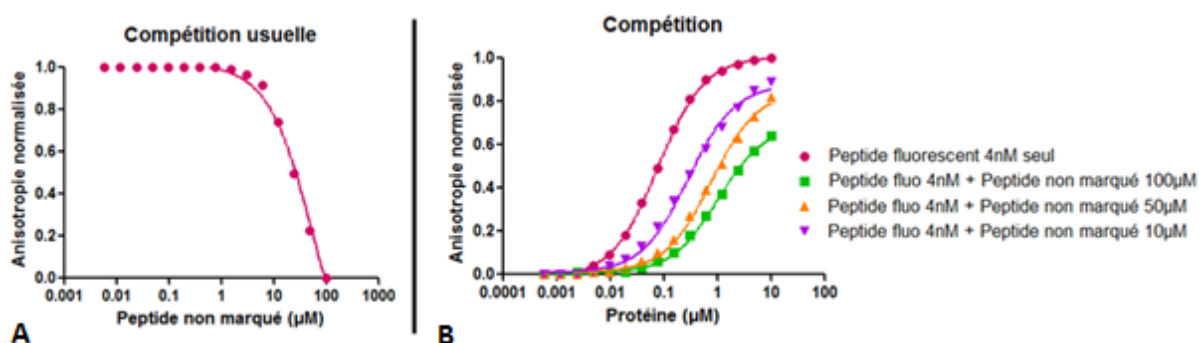


Figure 2.5 : Comparaison des deux méthodes de réalisation de compétitions. (A) Le cas classique consiste en la titration de la protéine, à concentration fixe, par des concentrations croissantes de peptide marqué d'un fluorophore. La concentration en protéine correspond à celle pour laquelle 50% du complexe est formé. C'est ainsi que le suivi de la dissociation de la protéine d'avec le peptide marqué est suivie, parallèlement à la fixation du peptide non marqué. (B) La méthode de compétition utilisée dans ce manuscrit consiste en la titration du peptide marqué, à concentration fixe, par la protéine, à concentration croissante en présence du peptide non marqué à 100, 50 ou 10 μ M. Connaissant la constante d'affinité du peptide marqué, celle du peptide non marqué pourra être déterminée.

L'analyse des données dans le cas d'une compétition est différente puisqu'il faut considérer 3 éléments (la protéine, le peptide fluorescent et le peptide non marqué) et 5 espèces (la protéine, le peptide fluorescent, le peptide non marqué, la protéine + le peptide fluorescent et la protéine + le peptide non marqué). A ce moment-là, 2 ΔG sont déterminés : celui de la protéine avec le peptide marqué d'un fluorophore (déjà connu) et celui de la protéine avec le peptide non marqué. Les courbes obtenues, après analyse et ajustement des données brutes, ont le même profil qu'une courbe de titrage classique. Elles sont toutes normalisées entre 0 et 1, 0 correspondant à la valeur du

plateau bas et 1 à celle du plateau haut. Toujours dans un souci d'uniformité, les fluorophores n'étant pas tous les mêmes, les deltas d'anisotropie sont différents. La différence entre le plateau haut et bas (des données brutes) de référence est celui en absence de ligands. En effet, ceux-ci pouvant parfois émettre aux mêmes longueurs d'onde que les fluorophores, il faut s'affranchir de ces variations. D'autre part, dans les cas où le plateau haut n'est pas atteint (cas dans lesquels le complexe ne se forme pas à 100%), le delta d'anisotropie est calculé en fonction de celui de référence (celui obtenu en absence de ligand). Le delta d'anisotropie de référence est ajouté à la valeur du plateau bas (obtenu en présence de ligand). Ainsi, la valeur du plateau haut en présence de ligand est connue (celle qui aurait théoriquement été atteinte si le complexe s'était formé à 100%) et les autres valeurs sont réparties entre 0 et 1. Ce traitement de données permet de comparer directement différentes conditions et de visualiser de façon claire et précise l'effet des ligands sur l'interaction.

II. Principe de la microscopie de fluctuation de fluorescence

L'interaction des protéines pleine taille a également été étudiée *in cellulo* par une technique de microscopie de fluctuation de fluorescence : N&B. Afin de mieux comprendre la technique utilisée une description du système utilisé sera faite. Le microscope confocal ainsi que le laser biphotonique seront présentés avec leurs avantages et leurs inconvénients. Les techniques de FCS et de FCCS seront détaillées car elles sont le fondement du N&B et sont toutes trois basées sur l'observation des fluctuations de fluorescence. Pour finir, le matériel utilisé sera décrit ainsi que les protéines fluorescentes.

L'utilisation de la fluorescence dans l'étude de système biologique est très courante. Les molécules d'intérêt marquées spécifiquement avec des protéines fluorescentes adaptées peuvent être facilement localisées. L'utilisation de la fluorescence au travers de nombreuses techniques de microscopie permet d'avoir accès à plusieurs paramètres biologiques tels que la localisation, la concentration, le temps de diffusion etc... Le problème majeur qui se pose lors de l'utilisation de la fluorescence est l'excitation. En effet, lors d'étude biologique, la préservation de l'échantillon est capitale afin d'obtenir des données correctes et exploitables. Le laser envoyant un flux de photons de longueur d'onde spécifique sur l'échantillon peut causer beaucoup de dégâts de par le fait que l'excitation n'est pas localisée. L'échantillon est excité sur différents plans et toute la fluorescence émise est récupérée. De ce fait, trop de signal peut gêner la localisation précise d'une molécule ou fausser l'interprétation de ce signal. En effet, une excitation des différents plans de l'échantillon complique la réattribution des photons émis rendant impossible l'interprétation des données. Pour pallier à cela, un microscope confocal est utilisé.

1) La microscopie confocale

La microscopie optique détectant l'émission de fluorescence peut être à champ large ou en confocal. La microscopie à champ large pose un problème pour tous les objets ayant une certaine épaisseur. En effet, la lumière émise par le plan focal est perdue dans la fluorescence émise par les plans adjacents au plan focal ce qui aboutit à la détection d'une image floue. L'utilisation d'un laser émettant de la lumière visible permet une excitation focalisée en un seul point de l'échantillon. C'est ainsi que le volume d'excitation est considérablement réduit par rapport à celui de la microscopie à champ large qui excite l'échantillon dans sa totalité. L'utilisation d'un sténopé (ou pinhole) permet de réduire le signal de fluorescence détecté. Il est parfaitement aligné avec le laser d'excitation, de ce fait, seule la fluorescence du plan focal est détectée, celle émise par les plans adjacents est bloquée par le sténopé (Figure 2.6). Des images de faibles profondeur de champs, appelées sections optiques, sont ainsi obtenues et une reconstruction de l'image en 3D, par le déplacement de l'objectif ou de l'échantillon à différents points focaux, peut être établie. Plusieurs choses permettent d'augmenter la résolution des images:

L'utilisation d'un objectif possédant une grande ouverture numérique (NA) permet la

focalisation de la lumière en un petit point unique.

$$NA = n \sin \alpha$$

Le terme « n » désigne l'indice de réfraction du milieu utilisé. En effet, les objectifs peuvent être à air, à eau ou à huile, leur choix dépend en partie de la résolution que l'on veut obtenir. Le terme « α » correspond à l'angle que forme le rayon incident du laser avec l'axe optique. Plus ces deux valeurs sont élevées, plus la résolution de l'image est importante. En effet, un indice de réfraction élevé entraîne la réduction de la déviation de la fluorescence d'émission, le nombre de photons collectés est donc augmenté. D'autre part, plus la valeur de l'angle α est grande, plus les photons détectés sont importants. La résolution de l'image définie en x-y et en z par les relations suivantes :

$$R_{s_{x,y}} = \frac{\lambda}{[2n \cdot \sin(\alpha)]} \quad R_{s_z} = \frac{2\lambda}{[2n \cdot \sin(\alpha)]^2}$$

La résolution est ainsi améliorée en jouant sur ces deux paramètres. Des filtres spécifiques adaptés à la détection de la fluorescence émise par les FPs permettent de séparer les photons d'excitation de ceux d'émission. A partir du signal enregistré l'image est reconstituée point par point en pixels. Les photons d'émission sont collectés par des détecteurs photomultiplicateurs ou des photoavalanches diodes qui les convertissent en électrons. Ce signal électrique est ensuite transformé en signal numérique permettant d'obtenir une carte pixélisée dans laquelle chaque pixel correspond à la quantité d'électrons (de photons) reçus.

La microscopie optique est une avancée majeure dans la microscopie de fluorescence permettant une excitation et une détection diminuée par rapport à la microscopie à champ large. Cependant, le travail sur des échantillons biologiques vivants est très délicat. Afin d'observer au mieux les phénomènes cellulaires, il est nécessaire de réduire au maximum les dommages causés à l'échantillon. Bien que la microscopie confocale permette l'excitation d'un petit volume, celui-ci peut être encore plus réduit par l'utilisation d'un laser biphotonique.

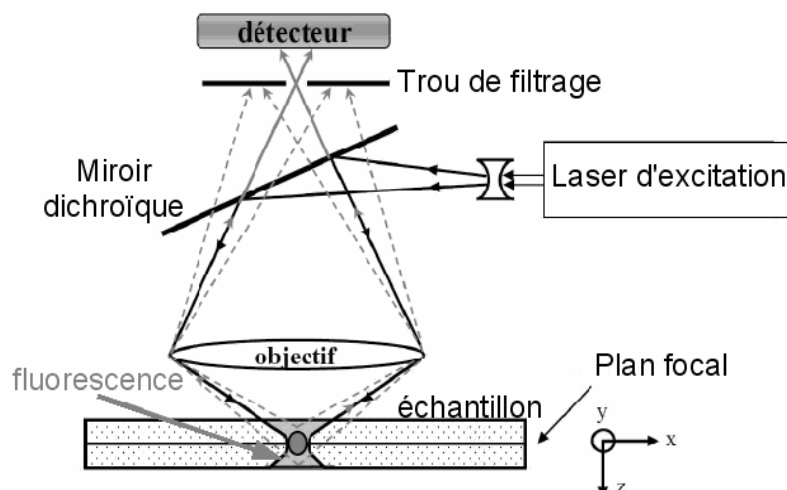


Figure 2.6: Principe de la microscopie confocale. La source d'excitation (le laser d'excitation) est unique et ponctuelle et va exciter l'échantillon. La fluorescence émise est ensuite filtrée avec un sténopé ou pinhole (facultatif) et envoyée sur le détecteur. Le traitement du signal électrique reçu en image pixélisée permettra d'attribuer la position relative des particules.

2) La microscopie biphotonique

L'excitation biphotonique nécessite l'absorption simultanée de 2 photons dont la longueur d'onde théorique est, environ, 2 fois supérieure à celle requise pour l'excitation monophotonique à une longueur d'onde donnée. Les photons nécessaires à l'excitation biphotonique sont beaucoup moins énergétiques que ceux requis pour l'excitation monophotonique, ils abîment moins l'échantillon. L'absorption de 2 photons par un fluorophore dans un intervalle de temps très court (10^{-15} secondes) est un événement très rare, afin d'augmenter cette probabilité, le flux de photons envoyé pour exciter l'échantillon doit être extrêmement important. Cela signifie qu'une puissance de sortie de laser élevée est requise, ce qui est permis par l'utilisation d'un laser pulsé. Celui-ci envoie une grosse quantité de photons à chaque pulse augmentant la probabilité que 2 photons excitent simultanément la FP. De ce fait, le volume d'excitation est strictement restreint au volume focal du fait que les photons y sont concentrés (Figure 2.7 A) et les dommages causés à l'échantillon, comme le photo blanchiment ou la destruction de cellules, sont fortement diminués. En effet, Le volume d'excitation est de 0.3 fL:

$$V_{eff} = \frac{\left(\frac{\pi}{2}\right)^{3/2}}{8} \times w_0^2 z_0$$

Avec $z_0 = 1,4 \mu\text{m}$ et $w_0 = 0,3 \mu\text{m}$ qui sont respectivement la largeur et la hauteur de la PSF à 780 nm. Notre travail a été appliqué sur des cellules eucaryotes qui ont une taille de 50 μm environ. De ce fait, le volume de la PSF correspond également au volume d'excitation. Toute la fluorescence excitée provient donc du volume focal et est utilisable en totalité pour la reconstruction de l'image. L'utilisation d'un sténopé n'est donc plus nécessaire car l'excitation très localisée des FPs génère peu de bruit de fond, permettant ainsi l'augmentation du signal de fluorescence spécifique qui nous intéresse et une attribution des signaux très précise.

Le laser biphotonique excite l'échantillon avec des photons situés dans l'infrarouge (de 800 à 1000 nm avec un laser Titane Sapphire) (Figure 2.7 B) qui sont moins énergétiques que les photons employés pour une excitation monophotonique dans le visible. Le rayonnement d'excitation est moins destructeur car il est moins absorbé et pénètre plus profondément dans l'échantillon. En effet, aux longueurs d'onde utilisées pour une excitation biphotonique (800–1000 nm environ), l'absorption est diminuée en comparaison de celle obtenue pour une excitation monophotonique (Figure 2.8). Cette figure représente l'absorption de l'eau et de deux constituants du sang en fonction de la longueur d'onde. Considérant le fait que le travail réalisé dans la partie microscopie de fluctuation de fluorescence s'effectue sur des cellules vivantes, constituées majoritairement d'eau, avec une excitation biphotonique de 950 nm, l'absorption du milieu est effectivement diminuée par rapport à une excitation monophotonique. Les photons pénètrent donc plus profondément dans l'échantillon, car moins absorbés, pour une excitation très localisée et spécifique des FPs permettant de diminuer fortement l'émission de fluorescence ne provenant pas du plan focal.

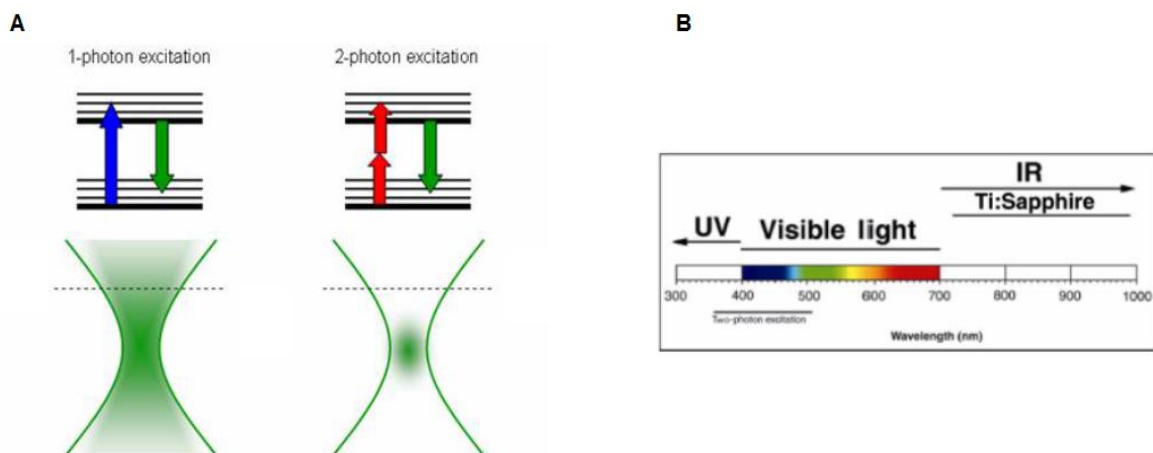


Figure 2.7 : **(A)** Représentation du principe de l'excitation 2-photons. Une excitation monophotonique (schéma de gauche) permet le passage de la molécule directement dans un état excité, une désexcitation de la molécule entraîne l'émission de fluorescence. Le volume excité dans ce cas-là est assez profond, la fluorescence de tous les plans en z est récupérée pouvant créer une image floue. L'excitation biphotonique nécessite l'absorption simultanée de 2 photons de longueur d'onde 2 fois supérieure à celle requise pour une excitation monophotonique. Un événement tel que celui-ci est rare, l'excitation est donc très localisée et petite (environ 0,3 fL) grâce au pulse de laser. **(B)** L'excitation infra rouge (IR) du laser titane saphire utilisé au laboratoire est illustrée sur cette échelle de longueur d'onde.

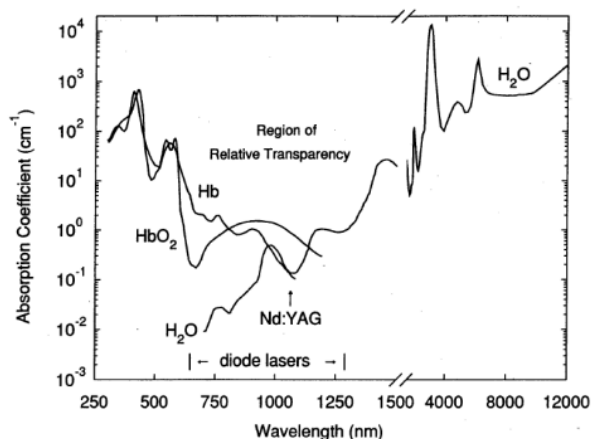


Figure 2.8 : Coefficient d'absorption d'échantillons biologiques et de l'eau dans le proche infrarouge (Svoboda and Block 1994). Hb et HbO₂ réfèrent à la déoxyhémoglobine et l'oxyhémoglobine présentes dans le sang.

Ce type d'excitation biphotonique est par conséquent mieux adapté pour l'étude d'échantillon biologique d'une certaine épaisseur comme des cellules par exemple. Un autre avantage de la microscopie biphotonique est la possibilité d'excitation simultanée unique de 2 FPs spectralement différentes. Il est vrai que ceci est également possible par un laser monophotonique, mais l'avantage d'une excitation biphotonique est qu'elle est ciblée uniquement aux protéines d'intérêts et que le rapport signal sur bruit est fortement diminué permettant d'obtenir une image nette. Cet aspect sera détaillé ultérieurement dans la partie traitant des protéines fluorescentes utilisées pour ce travail.

Comme il a été précisé dans la partie introduction, la technique du N&B est basée sur le principe d'observation du FCCS. Afin de comprendre au mieux cette technique les prochains paragraphes seront focalisés sur l'explication des techniques de FCS et de FCCS. Les équations

utilisées pour le traitement de signal seront également expliquées.

3) FCS & FCCS

La spectroscopie à Corrélation de Fluorescence a été développée en 1972 par D. Madge, E. Elson et W.W. Webb dans le but de caractériser la dynamique de processus moléculaire dans des systèmes à l'équilibre thermodynamique. Ces mesures sont basées sur les fluctuations de la fluorescence détectée lorsque les particules présentes en solution traversent le volume d'excitation (de l'ordre du femto litre) à une position fixe de l'échantillon. Le FCS a été développé pour la première fois en 1972 (Madge *et al*, 1972) et permet notamment de mesurer :

- La concentration des espèces présentes en solution déterminée par l'amplitude des fluctuations d'intensité de fluorescence.
- Le temps de diffusion de molécules d'intérêts

Une des extensions de la technique du FCS est le FCCS (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy). Tandis que le FCS permet l'observation d'une seule molécule marquée, le FCCS quant à lui permet l'observation simultanée de 2 molécules différentes via leur marquage par 2 fluorophores spectralement distincts. Grâce aux fluctuations de fluorescences émises spécifiquement par les 2 fluorophores, plusieurs choses peuvent être déterminées :

- Le temps de diffusion caractéristique de chaque espèce marquée qui dépend de la taille de la particule marquée et de son environnement (viscosité, interactions avec des tiers)
- La concentration respective de celles-ci
- L'interaction spécifique entre elles par une corrélation croisée temporelle positive de leurs signaux respectifs

Le FCCS serait par conséquent adapté pour étudier l'interaction entre RevErb α et NCor *in cellulo* (puisque cette technique peut être appliquée aussi bien *in vitro* qu'*in cellulo*) et étudier les effets de ligands sur cette interaction. Toutefois, il se montre limité par différents aspects :

- Pas ou peu d'information spatiale (c'est une technique point unique ou single point FCCS) sur l'échantillon
- Artéfacts sur les mesures dûs au photo blanchiment de la partie immobile en protéines marquées.
- Mouvement de la cellule perturbant ou faussant la fluorescence émise

Le FCS permet de réaliser une étude de molécules dans un milieu très peu concentré avec une résolution spatio-temporelle importante. En comparaison avec d'autres techniques de fluorescence, le paramètre d'étude premier n'est pas l'émission de fluorescence des molécules d'intérêts mais plutôt les fluctuations spontanées d'intensités à l'état d'équilibre. Ainsi tous les paramètres physiques pouvant participer aux fluctuations du signal de fluorescence, tels que la concentration locale, le coefficient de diffusion ou les réactions intra et intermoléculaires de biomolécules marquées par un fluorophore sont accessibles. Les intensités de fluorescence émises par les molécules d'intérêts diffusant au travers du volume d'excitation sont enregistrées. L'amplitude et le temps caractéristique de ces fluctuations peuvent être évalués en construisant la fonction d'autocorrélation (ACF) temporelle. L'ACF est en fait une image directe des fluctuations d'intensité de fluorescence détectées et donc en particulier des fluctuations de concentrations de fluorophores dans le volume focal.

a) Notions de variance

La variance représente la distribution des intensités de fluorescence d'un échantillon. Le signal fluorescent enregistré est moyenné et les différences de fluctuations de fluorescence peuvent être déterminées. Deux cas peuvent être différenciés pour une même valeur moyenne du signal:

- Un faible nombre de grosses particules fluorescentes diffusent à travers le volume d'excitation (**A**). Le passage de ces molécules engendre des fluctuations importantes du signal d'intensité de fluorescence créant de grosses disparités dans la distribution des valeurs enregistrées. En effet, les grosses particules ont une diffusion plus faible au travers du volume d'excitation aboutissant à de grosses variations des fluctuations de fluorescence (Figure 2.9 **A**).
- Un grand nombre de petites molécules fluorescentes diffusent au travers du volume d'excitation (**B**). Ces petites molécules, bien qu'elles soient plus nombreuses n'entraînent pas de variations importantes des fluctuations de fluorescence enregistrées. En effet, les petites molécules ont une diffusion beaucoup plus rapide ayant pour conséquence une disparité des valeurs moins importante (Figure 2.9 **B**).

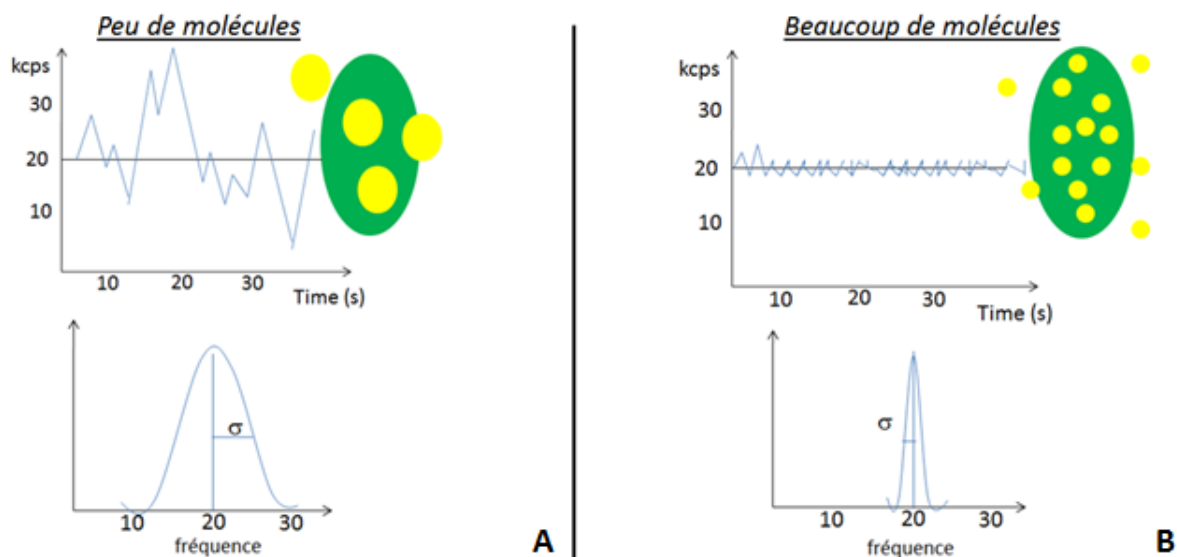


Figure 2.9: (**A**) Peu de molécules brillantes traversent le volume d'excitation créant ainsi de grosses fluctuations de l'intensité de fluorescence détectée. L'écart de la disparité des valeurs représente la variance (σ) qui sera grande dans ces cas-là. (**B**) Au contraire, beaucoup de molécules peu brillantes traversant le volume d'excitation aboutiront à de faibles variations de l'intensité de fluorescence. Par conséquent la dispersion des valeurs (variance) sera moins importante.

La variance est un terme largement utilisé pour les analyses FCS, FCCS et N&B.

b) La fonction d'autocorrélation

L'ACF est réalisée si on veut se focaliser sur une particule marquée (qu'elle soit monomérique dimérique ou hétérodimérique). Le signal de fluctuations de fluorescences est quantifié en auto corrélant temporellement le signal d'intensité enregistré. Cette méthode d'analyse permet de mesurer l'autosimilarité d'un signal temporel et de mettre en évidence les constantes de temps caractéristiques des molécules d'intérêts.

Le signal, enregistré en coups par seconde et par molécule (cps), émis par une particule fluorescente suit une distribution poissonnienne, c'est à dire que cet événement est quantifiable dans le temps et l'espace et va se produire en moyenne N fois sur la période de temps T. Mais cet événement se produira indépendamment du temps écoulé depuis l'événement précédent. La fonction d'autocorrélation est définie par l'équation ci-dessous:

$$\delta F(t) = \int_V W(r) \delta(\eta C(r, t)) \cdot dV$$

Plusieurs paramètres spécifiques aux molécules d'intérêts sont ainsi accessibles:

$C(r, t)$ est la concentration d'une molécule à l'instant t à une position r

$W(r)$ représente la position de la particule dans le volume d'illumination. Ce paramètre permet de déterminer la distribution spatiale de la lumière émise.

R est la position latérale (x) de la particule concernée.

$\delta F(t)$ est la fluctuation du signal de fluorescence

η en coup par seconde et par molécule représente la brillance moléculaire, elle renseigne sur l'état d'oligomérisation de la molécule concernée

La fonction d'autocorrélation normalisée est déterminée par l'équation suivante:

$$G(t) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$

Le signal est analysé par rapport à son auto similarité entre des intervalles de temps τ que l'on fait varier. Point par point, la courbe d'autocorrélation est construite en corrélant le signal au temps t avec le même signal à un temps $t + \tau$ (Figure 2.11 A). La courbe d'ACF est ainsi construite (Figure 2.10).

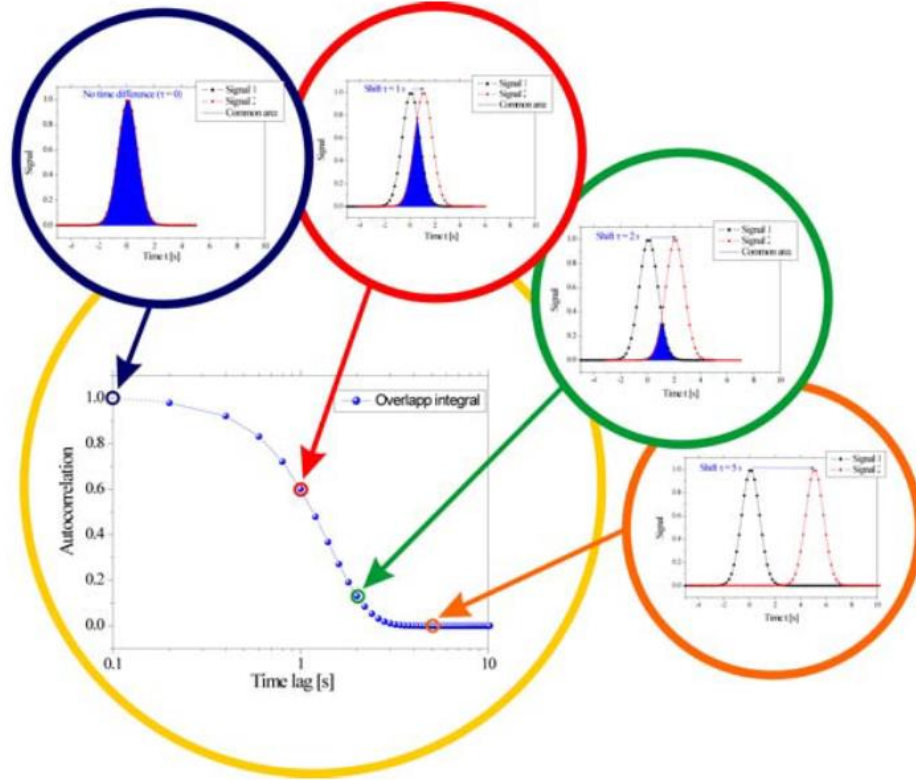


Figure 2.10: Etapes de construction d'une courbe d'auto corrélation. L'autosimilarité du signal est suivie au cours du temps. Avec une corrélation d'un Δt de 0, le signal obtenu présente 100% de similarité avec lui-même. Plus le Δt est grand, moins le signal est corrélé, d'où la décroissance de l'ACF qui représente la traversée du volume d'excitation.

La courbe d'autocorrélation représente donc le passage d'une molécule fluorescente au travers du volume d'excitation. La concentration de la particule d'intérêt est déterminée par l'amplitude maximale de la courbe ($G(0)$). Celle-ci représente la variance normalisée de la fluctuation du signal de fluorescence $\delta F(t)$.

$$G(0) = \frac{(\langle F(t) \rangle - \langle F(t) \rangle)^2}{\langle F(t) \rangle^2}$$

$$G(0) = \frac{\sigma}{\langle F \rangle^2} = \frac{1}{N}$$

La valeur $G(0)$, qui est inversement proportionnelle aux nombres de molécule (N), permet d'avoir accès à la concentration molaire de la particule présente en solution (Figure 2.11 B). Le temps de diffusion (τ_D) caractéristique de la particule concernée est accessible (Figure 2.11 B). Si on décompose les termes de l'équation permettant de construire la courbe ACF, l'équation suivante est obtenue:

$$G(\tau) = (1/N)(1 + \tau/\tau_D)^{-1} (1 + w_0^2 \tau/\tau_D)^{-1/2}$$

Dans cette équation, plusieurs termes peuvent nous renseigner sur les caractéristiques du système étudié:

Le temps de diffusion de la particule concernée est déterminé par:

$$\tau_D = r_0^2 / 4\tau D$$

r_0 est la position latérale en x

D représente la constante de diffusion de la particule étudiée qui est d'ailleurs déterminée par cette équation:

$$D = k_b T / 6\pi\eta R$$

Ces différents paramètres permettent de caractériser de façon précise différentes particules fluorescentes dans l'échantillon.

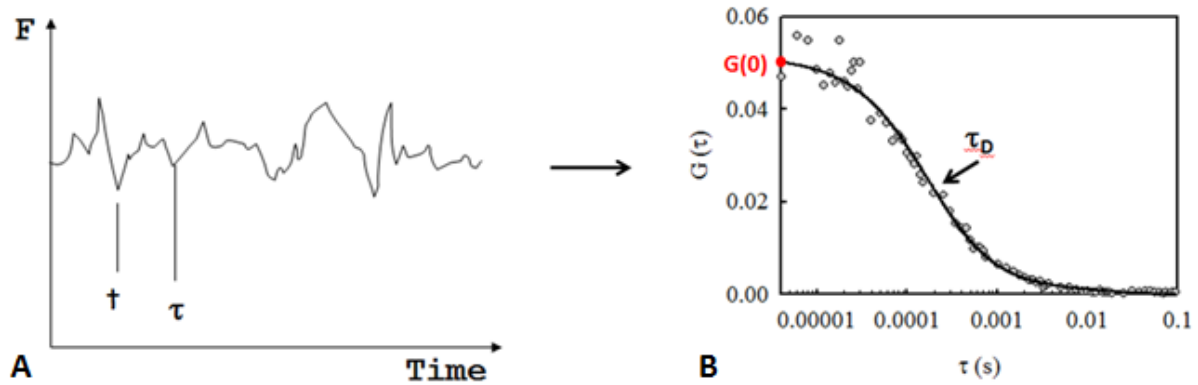


Figure 2.11: (A) Exemple d'un signal de fluctuations d'intensité de fluorescence qui est auto corrélé à $t + \tau$. (B) La courbe d'autocorrélation (ACF) est ainsi construite permettant de déterminer le $G(0)$ qui est l'ordonnée à l'origine. Il est inversement proportionnel au nombre de molécules présentes dans l'échantillon. La pente de la courbe permet de déterminer le temps de diffusion (τ_D).

L'extension du principe du FCS au FCCS est une avancée majeure dans l'étude de l'interaction protéine-protéine.

c) La corrélation croisée

Le FCCS ou corrélation croisée de fluorescence suppose que deux molécules différemment marquées soient présentes en solution. Le signal d'émission de fluorescence des 2 FPs est corrélé aboutissant à la construction d'une nouvelle courbe: la courbe de corrélation croisée ou CCF. Cette dernière permet d'extraire des événements de codiffusion qui reflètent l'interaction entre les deux protéines. De ce fait, trois courbes sont obtenues: les deux courbes d'autocorrélation (ACF) spécifique à chaque FP de manière individuelle et la courbe de corrélation croisée (CCF) permettant de mettre en évidence une interaction entre les 2 molécules marquées des 2 FPs. Ces courbes permettent de déterminer la concentration totale de chaque espèce libre (C_R et C_B) et liée (C_X) ainsi que le degré de complexation des deux protéines (Schwille *et al*, 2001).

$$G_x(t) = \frac{\langle \delta F_R(t) \delta F_B(t + \tau) \rangle}{\langle F_R \rangle \langle F_B \rangle}$$

Admettons que les deux molécules d'intérêts soient marquées par une protéine fluorescente émettant dans le bleu et l'autre dans le rouge (permettant la séparation spectrale ainsi que l'identification précise des deux molécules d'intérêts), ces dernières diffusent collectivement au travers du volume d'excitation créant des variations de l'intensité de fluorescence dans le rouge (F_R) et dans le bleu (F_B). L'interaction de ces deux molécules d'intérêts mène à l'augmentation de l'amplitude de la corrélation croisée ($G_x(0)$). C'est ainsi qu'une corrélation croisée positive définit une interaction entre les protéines d'intérêts.

Une des applications réalisées avec l'équipement du laboratoire démontre que cette approche est valide (Savatier *et al*, 2010). Dans cet article, les auteurs étudient un couple de protéines nucléaire: ER α (le récepteur nucléaire) et Tiff2 (son coactivateur). Ils démontrent par la technique du FCCS que non seulement ces deux protéines interagissent mais que l'ajout de ligand agoniste (favorisant l'interaction) ou antagoniste (défavorisant l'interaction) est détectable. En effet des changements se produisent sur l'amplitude de la CCF au temps 0 ($G_x(0)$), ce qui est directement relié à des modifications du nombre de complexes. Plus l'amplitude de la CCF est grande, plus le nombre de complexes est important et inversement.

$$G_x(0) = \frac{C_x}{V_{eff}C_{R,t}C_{B,t}}$$

Les amplitudes obtenues avec l'ACF et de la CCF sont inversement proportionnelles au nombre de molécules / complexes ce qui signifie que plus l'amplitude est grande moins les molécules sont nombreuses. D'autre part, l'amplitude de la CCF ne pourra jamais être supérieure aux amplitudes des deux ACF car elle est limitée par le nombre de molécules de l'espèce limitante.

Les avantages de ces deux techniques sont nombreux, tout d'abord, la détermination de l'amplitude de l'ACF ($G(0)$) permet de déterminer la concentration totale de l'espèce observée. La brillance moléculaire (η) représente l'état d'oligomérisation et plus particulièrement l'agrégation des molécules. Ce paramètre est calculé en divisant la moyenne de l'intensité de fluorescence ($F(t)$) par le nombre de molécules (N).

$$\eta = \frac{\langle F(t) \rangle}{N} = \langle F(t) \rangle \cdot G(0)$$

Connaissant la brillance moléculaire (η), il est alors possible d'évaluer l'extinction de fluorescence due à un changement d'environnement de la FP ou bien une augmentation de la fluorescence des particules due à un effet d'agrégation.

La détermination du temps de diffusion des molécules permet de déterminer la mobilité de la particule ainsi que des interactions éventuelles. D'autre part, un changement du coefficient de diffusion (D) de la particule ne peut pas être seulement induit par des réactions chimiques, mais par un changement conformationnel de la particule causant des changements du rayon hydrodynamique (R_h). Ces modifications affectent directement la mobilité impactant la valeur de du coefficient de diffusion (D) (Schwille and Haustein).

Les équations développées ci-dessous permettent de calculer le nombre de complexes formés (Weidemann and Schwille 2013).

Considérons le cas où deux espèces, formant des complexes, sont présentes en solution. L'une est marquée avec un fluorophore émettant dans le vert et l'autre dans le rouge. Une analyse en FCCS de ces protéines aboutit à la construction de deux ACF (l'une pour l'espèce verte et l'autre pour l'espèce rouge) et d'une CCF. Les amplitudes de ces trois courbes apportent les informations des $G_V(0)$, $G_R(0)$ et $G_X(0)$ (Figure 2.12). Sachant que le $G(0)$ des ACF ($G_V(0)$ et $G_R(0)$) est inversement proportionnel au nombre de molécules, plus il sera grand et moins l'espèce sera concentrée (Figure 2.12). Par contre, le $G_X(0)$ est directement proportionnel à la quantité de complexes.

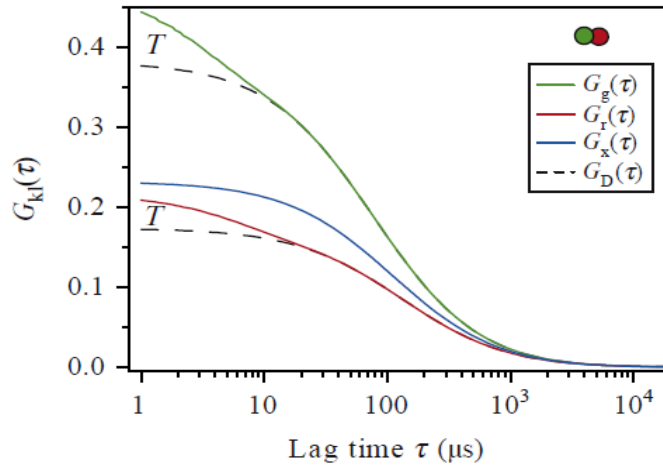


Figure 2.12: Exemple de courbe d'auto corrélation de deux espèces en solution marquées par 2 FPs différentes. Ces 2 molécules rouge et verte forment des complexes entre elles apportant une corrélation croisée positive du signal. L'espèce verte ayant le plus grand $G(0)$ est par conséquent l'espèce limitante au contraire de la rouge qui a le plus petit $G(0)$. Cette dernière est la plus concentrée. La courbe bleue représente la CCF et son ordonnée à l'origine est le $G_X(0)$ représentant le nombre de complexes formés.

L'ordonnée à l'origine de la CCF est le $G_X(0)$, sa valeur est limitée par l'espèce ayant la plus faible concentration. L'autocorrélation dans le canal rouge est gouvernée seulement par les particules rouges:

$$G_R(0) = \frac{N_R + N_{RV}}{(N_R + N_{RV})^2} = \frac{1}{(N_R + N_{RV})} = \frac{1}{N_{R,\text{total}}}$$

Les termes N_R et N_V représentent respectivement le nombre de molécules de l'espèce marquées avec le fluorophore rouge ou vert. N_{RV} représente le nombre de complexes.

L'amplitude de la CCF dépend de l'abondance des trois espèces présentes en solution.

$$G_X(0) = \frac{N_{RV}}{(N_R + N_{RV})(N_V + N_{RV})}$$

C'est ainsi qu'en calculant le ratio de ces deux termes, le pourcentage du nombre de complexes formés est obtenu:

$$\frac{G_x(0)}{G_R(0)} = \frac{N_{RV}(N_R + N_{RV})}{(N_R + N_{RV})(N_V + N_{RV})} = \frac{N_{RV}}{(N_V + N_{RV})} = \frac{N_{RV}}{N_{V,\text{total}}}$$

La fraction des espèces doublement marquées présentes en solution est obtenue par ce calcul. Ce ratio représente le pourcentage de particules liées par rapport au nombre de molécules de l'espèce limitante (dans ce cas l'espèce verte).

Bien que ces techniques soient très puissantes dans l'identification d'une interaction ainsi que dans la détermination du nombre de complexes, elles restent des techniques d'études statiques considérant le fait que le mode d'analyse est du point unique. La méthode de N&B a pour avantage d'apporter une carte de la distribution spatiale des molécules à l'intérieur de la cellule. Cette méthode a premièrement été développée par l'équipe d'Enrico Gratton (Digman *et al*, 2008) dans le but de détecter des complexes et de mesurer leur stœchiométrie dans des cellules vivantes.

III. Méthodologie pour les études d'interaction *in cellulo*

La technique choisie pour étudier l'interaction entre RevErb α et NCor dans des cellules vivantes est le N&B et plus précisément le 2psN&B (2 photon scanning Number and Brightness). C'est une technique qui utilise les fluctuations de fluorescence et qui permet de mettre en évidence l'interaction entre deux protéines dès lors qu'elles sont étiquetées par des protéines fluorescentes appropriées. Son grand avantage par rapport au FCS est que le N&B est une technique de scanning ce qui permet d'extraire des informations spatiales sur le nombre de molécules et leur brillance et en deux couleurs, ainsi que les caractéristiques spatiales des interactions entre deux protéines. Pour cela, les deux protéines d'intérêts sont chacune marquées avec une protéine fluorescente (FP) différente. Les deux FPs sont la mCherry et la Cerulean émettant respectivement dans le rouge et le bleu, elles ont été sélectionnées afin de maximiser leur excitation par notre laser bi-photon et minimiser le FRET et le chevauchement de l'émission de fluorescence (bleedthrough) entre les deux canaux de détection. L'analyse des covariances d'intensité de fluorescence de ces protéines permettra de déterminer si RevErb α et NCor résident dans des complexes moléculaires communs.

1) Principe de la technique de Number and Brightness (N&B)

L'approche du N&B utilise la variance (σ) de la distribution de l'intensité de fluorescence des protéines marquées, à tous les pixels, à partir d'un balayage rapide de l'échantillon. Ce signal d'intensité est décomposé en nombre de particules (concentration) et en brillance moléculaire (stœchiométrie). Le calcul de la covariance entre les fluctuations d'intensité dans les canaux de détections rouge (canal 1) et bleu (canal 2) permet l'évaluation de la brillance croisée (Bcc) ou de la covariance des intensités qui est une mesure directe de l'interaction entre deux protéines marquées par des FPs émettant dans deux couleurs différentes (Digman *et al*, 2009). Une Bcc positive est observée uniquement en cas de codiffusion des molécules présentes dans l'échantillon au pixel observé. Cette Bcc positive est une mesure quantitative absolue de la formation d'un complexe de protéines. Un avantage certain du N&B est que le temps de balayage de l'échantillon est très petit ce qui implique un temps de résidence dans chaque pixel très court, 32 μ s dans notre cas, ce qui signifie que le faisceau laser ne restera pas dans la même région très longtemps. Une centaine d'images sont

ainsi prises et, le temps de visite d'un pixel étant très court, les dommages causés à l'échantillon, comme le photo blanchiment, sont moins importants que si c'était une analyse point fixe comme le FCCS. Cependant, contrairement à ce dernier, les informations sur des échelles de temps plus grandes, permettant l'obtention des coefficients de diffusion, sont ici perdues (Declerck and Royer 2013).

La variance pour chaque canal et à chaque pixel dans une série d'images permet la décomposition du signal de fluorescence en nombre de particule fluorescente (N) et en brillance moléculaire (B). La brillance croisée (Bcc) entre les deux canaux permet quant à elle une estimation du degré de formation de complexe :

Avec

$$B = \frac{\sigma^2}{\langle F \rangle} \text{ et } N = \frac{\langle F \rangle^2}{\sigma^2}$$

Les valeurs de brillances (B) sont corrigées pour la contribution du bruit de fond en soustrayant 1 à la valeur de B afin d'obtenir la vraie brillance ε :

$$\varepsilon = B - 1$$

Et le vrai nombre de molécules (n) est calculé en utilisant la formule suivante :

$$n = \frac{(N \times B)}{\varepsilon}$$

Les protéines d'intérêts étudiées dans ce manuscrit sont nucléaires, donc par excitation spécifique des FPs (mCherry-RevErb α et Cerulean-NCOR), seuls les noyaux sont visibles. La mCherry est détectée dans le canal 1 et la Cerulean dans le canal 2. Considérant la taille du noyau des cellules Cos7 utilisées ici, qui est de 50 μm environ, ceux-ci seront imagés en 50 μm par 50 μm . Une centaine d'images du noyau en question a été prises à chaque fois avec un temps de résidence par pixel de 32 microsecondes.

Connaissant le nombre de molécules (n) et le volume d'excitation, il est possible de calculer la concentration molaire de la particule concernée:

$$C = \frac{n}{V_{\text{PSF}} \times N_A}$$

Avec C = la concentration en molaire

n = le nombre de molécules

V_{PSF} = volume d'excitation en litre

N_A = le nombre d'Avogadro

La brillance croisée (Bcc), quant à elle, est calculée comme la covariance des fluctuations d'intensités de fluorescence entre les deux canaux :

$$\mathbf{Bcc} = \frac{\sigma_1 \times \sigma_2}{\langle F \rangle_1 \times \langle F \rangle_2}$$

Avec les chiffres 1 et 2 représentant les détecteurs sur lesquels sont collectés les photons d'émission. Le détecteur 1 récolte le signal de la mCherry et le 2 celui de la Cerulean. La Bcc représente l'interaction spécifique des deux protéines car le bruit de fond du détecteur est éliminé et non pris en compte dans le calcul de la Bcc. Celle-ci est donc équivalente à la valeur Gx(0) classiquement obtenue lors d'une analyse de FCCS (Moutin *et al*, 2014).

L'efficacité de cette technique dans l'identification spécifique d'une interaction a été démontrée dans plusieurs publications : une étude *in vivo* chez la levure met en évidence l'assemblage d'un complexe protéique (Garcia-Marcos *et al*, 2008). Un travail sur les complexes d'adhésion focale, regroupant les protéines de vinculine et paxilline, a permis de démontrer qu'il est possible de calculer la stœchiométrie de ces regroupements de protéines (Digman *et al*, 2009). Une investigation sur l'assemblage du virus Ebola, par N&B, a été menée permettant de vérifier l'implication de l'oligomérisation de la protéine VP40 indispensable au cycle de vie du virus (Adu-Gyamfi *et al*, 2012). La complexation d'une protéine kinase (LRRK2) a été étudiée par cette technique révélant une oligomérisation de celle-ci dans le cytoplasme et dans les membranes cellulaires (James *et al*, 2012).

D'autre part, des travaux réalisés avec le montage de notre laboratoire ont été publiés : une étude FCCS de l'interaction entre le RN ER α et le coactivateur Tiff2 (Savatier *et al*, 2009). Un travail chez les bactéries en N&B a permis d'étudier l'activité d'un promoteur pour l'expression d'une protéine marquée. Plutôt qu'une mesure directe de l'intensité de fluorescence qui reflète en fait la concentration réelle, les auteurs ont choisi d'utiliser la technique de N&B pour quantifier l'expression précise de la protéine d'intérêt (Fergusson *et al*, 2011). La stœchiométrie d'un complexe de protéines localisées dans les neurones a été déterminée par N&B avec le microscope du laboratoire (Moutin *et al*, 2014).

Ces récents travaux mettent en place une technique innovante et originale permettant d'obtenir une cartographie spatiale des complexes à partir de laquelle il est possible d'extraire les informations de stœchiométrie, d'interaction et de concentration moléculaire. Cette technique de balayage de l'échantillon permet d'avoir accès à de nombreuses informations habituellement obtenues séparément. Elle est tout à fait adaptée à l'étude de l'interaction des protéines RevErb α et NCor et surtout l'effet des ligands a pu être étudié sur la formation des complexes.

2) Méthodes d'analyse des données

Les images sont d'abord traitées avec le logiciel SimFCS (développé par Enrico Gratton) duquel il est possible de tirer les informations de la brillance et du nombre de molécules dans les deux canaux, B1 et B2 / N1 et N2, correspondant respectivement à la brillance et au nombre des particules de mCherry et de Cerulean et de la Bcc (G0x). Cette valeur de G0x est directement proportionnelle à la quantité de complexes, en assumant qu'il n'y en ait qu'un seul type :

Avec ces informations, le pourcentage de complexes formés par rapport à l'espèce limitante présente en solution, c'est à dire l'espèce la moins concentrée, est calculé. L'équation utilisée est la suivante :

$$\text{Pourcentage du nombre de complexes formés} = \frac{G0_x}{\text{Plus petit } G0}$$

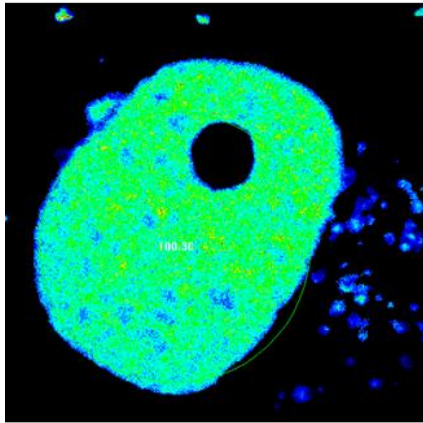
C'est l'équation utilisée pour calculer le nombre de complexes RevErba / NCor formés en présence ou en absence de ligand. Pour chaque cellule vont être déterminés les paramètres suivants pour chaque canal (mCherry et Cerulean):

- Le nombre de molécules
- La concentration des protéines
- La brillance moléculaire
- La brillance croisée qui représente le Gx(0)
- Le nombre de complexes en pourcentage présent dans un noyau

Les données sont ensuite représentées sous forme d'histogrammes permettant de mieux visualiser les changements liés à la présence de ligands.

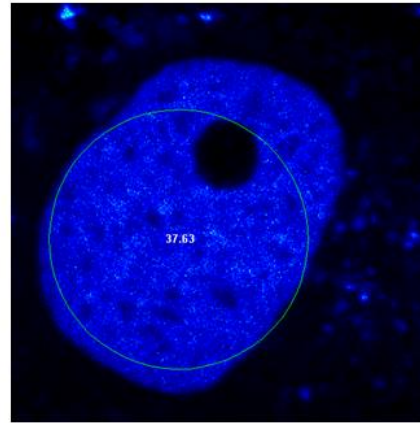
Deux logiciels ont été utilisés pour l'analyse des données : SimFCS et PaTrack (développé par Patrice Dosset). Ils donnent tous 2 les mêmes résultats. Le logiciel PaTrack permet de déterminer une région d'intérêt (ROI) de la taille du noyau et donc apporte une estimation plus précise du nombre de molécules à l'intérieur du noyau, ce qui permet d'avoir accès à la concentration (C).

Canal 1: mCherry-RevErb α



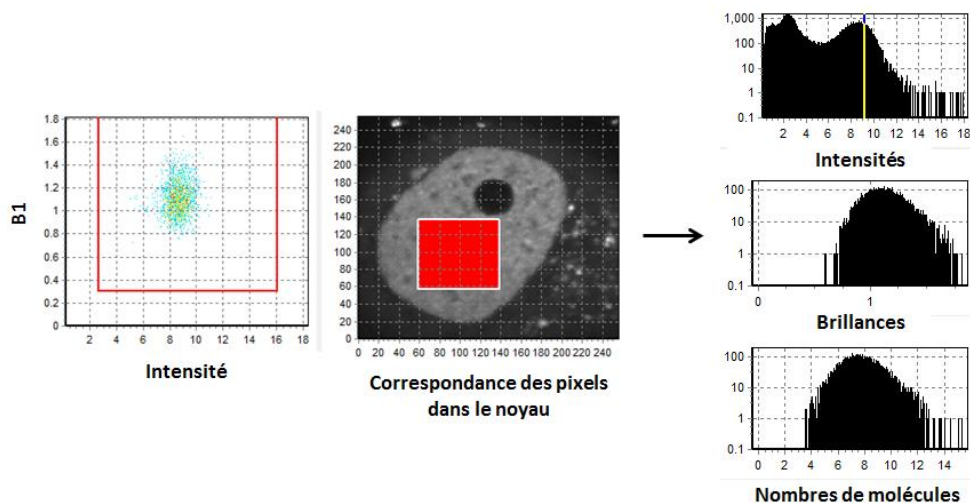
Moyenne n dans ROI = 100.3

Canal 2: Cerulean-NCor



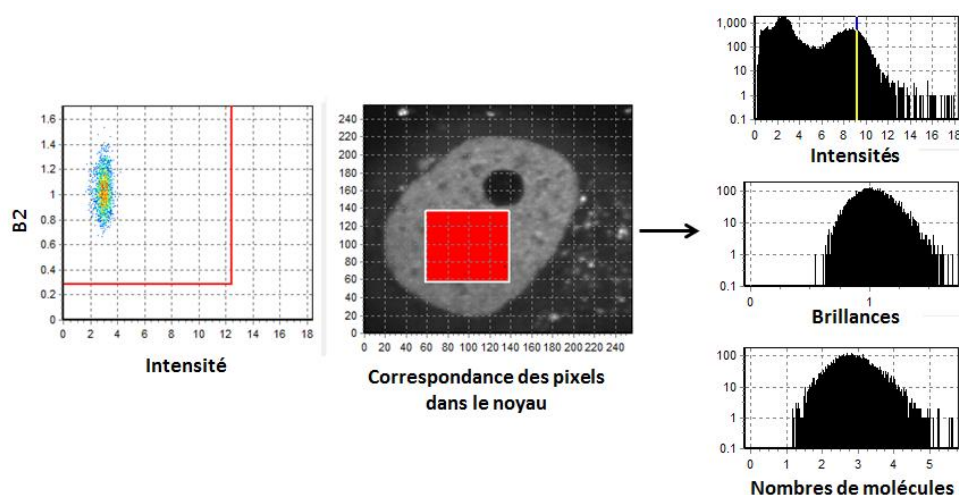
Moyenne n dans ROI = 37.63

Le logiciel SimFCS est utilisé pour déterminer les brillances dans les canaux 1 et 2, les intensités et les brillances croisées :

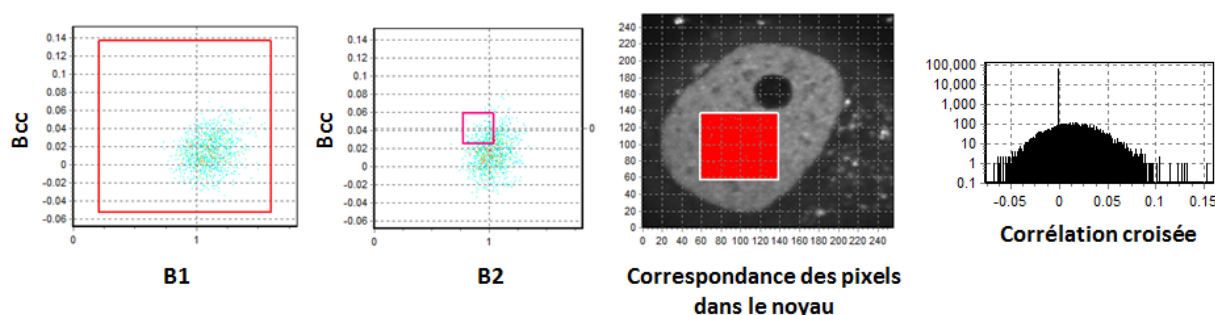


La ROI à l'intérieur du noyau permet de prendre en compte dans le calcul uniquement les pixels localisés à l'intérieur du noyau et correspondant aux protéines d'intérêt. Les pixels non spécifiques situés à l'extérieur du noyau ne sont pas pris en compte dans le calcul de la Bcc. L'image ci-dessus permet de déterminer la brillance dans le canal 1 (la mCherry). Le nuage de points représente l'intensité des pixels de la ROI en fonction de la brillance dans le canal 1. La correspondance des pixels à l'intérieur de la ROI est visible dans l'image du milieu. Des histogrammes sont également donnés par le programme représentant les valeurs d'intensités de fluorescence, les brillances (B) et le nombre de molécules (N) dans la ROI en fonction de leur fréquence.

L'image ci-dessous permet de déterminer la brillance dans le canal 2 (la Cerulean). Les informations apportées sont les mêmes à l'intérieur de la même ROI.



L'identification de la corrélation croisée (Bcc) s'effectue juste après, les valeurs de Bcc en fonction de la brillance dans le canal 1 ou 2 sont représentées (à gauche) ainsi que la correspondance des pixels dans la ROI. Les valeurs de Bcc selon leur fréquence sont représentées sous forme d'histogramme (à droite).



Les valeurs de brillances ainsi déterminées, les G01 et G02 ainsi que la Bcc = G0x sont calculés et le nombre de complexes est déterminé par l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage du nombre de complexes formés} = \frac{G0_x}{\text{Plus petit } G0}$$

Cependant, il faut considérer lors du calcul que l'oligomérisation des protéines entraîne une brillance plus importante. Ce calcul considère des espèces monomériques, or ce n'est pas systématiquement le cas. Nous ne connaissons pas la quantité d'espèces libres et liées dans les 2 canaux, nous connaissons la brillance des monomères des 2 FPs, mais pas celle des complexes. Si l'on considère une stœchiométrie 1 :1, la valeur de G0x ne pourra jamais dépasser 1 car le plus petit G0 correspond à l'espèce limitante et le nombre de complexes formés ne pourra pas être supérieur au nombre de molécules de l'espèce la moins concentrée. Cependant, la stœchiométrie des complexes n'est pas toujours 1:1 et l'une ou l'autre des protéines peut oligomériser changeant ainsi la stœchiométrie du complexe qui ne sera pas prise en compte dans le calcul du pourcentage de complexes. De ce fait, le rapport de G0x sur le plus petit G0 dépassera 1, ce qui est le cas dans notre étude.

Après tous ces calculs, les données sont représentées sous forme d'histogrammes permettant

une visualisation directe de l'effet potentiel des ligands sur l'interaction RevErb α /NCor.

3) Matériels utilisés

a) Montage du microscope et filtres

Les cellules sont imagées avec un microscope inversé Axiovert 200M (Zeiss) équipé d'un module de balayage ISS, avec 2 canaux de détection APD (Avalanche Photo Diode). Les FP sont excitées à 950 nm par un laser infrarouge pulsé Titanium Saphire (Spectra Physics MaiTai) à une fréquence de 80 MHz et les pulses ont une durée de 100 femto secondes. Dans le module de balayage du laser, la lumière d'excitation de 950 nm est dirigée jusqu'à un objectif Zeiss Apochromat à immersion à huile 63X, d'une ouverture numérique (NA) de 1,4 (Figure 2.13). La puissance du laser pour l'excitation des FP est de 36 mW en sortie de laser. Cette puissance a été choisie comme le meilleur compromis afin de maximiser l'excitation des 2 FPS tout en minimisant le photoblanchiment avec un temps de résidence par pixel de 32 μ sec.

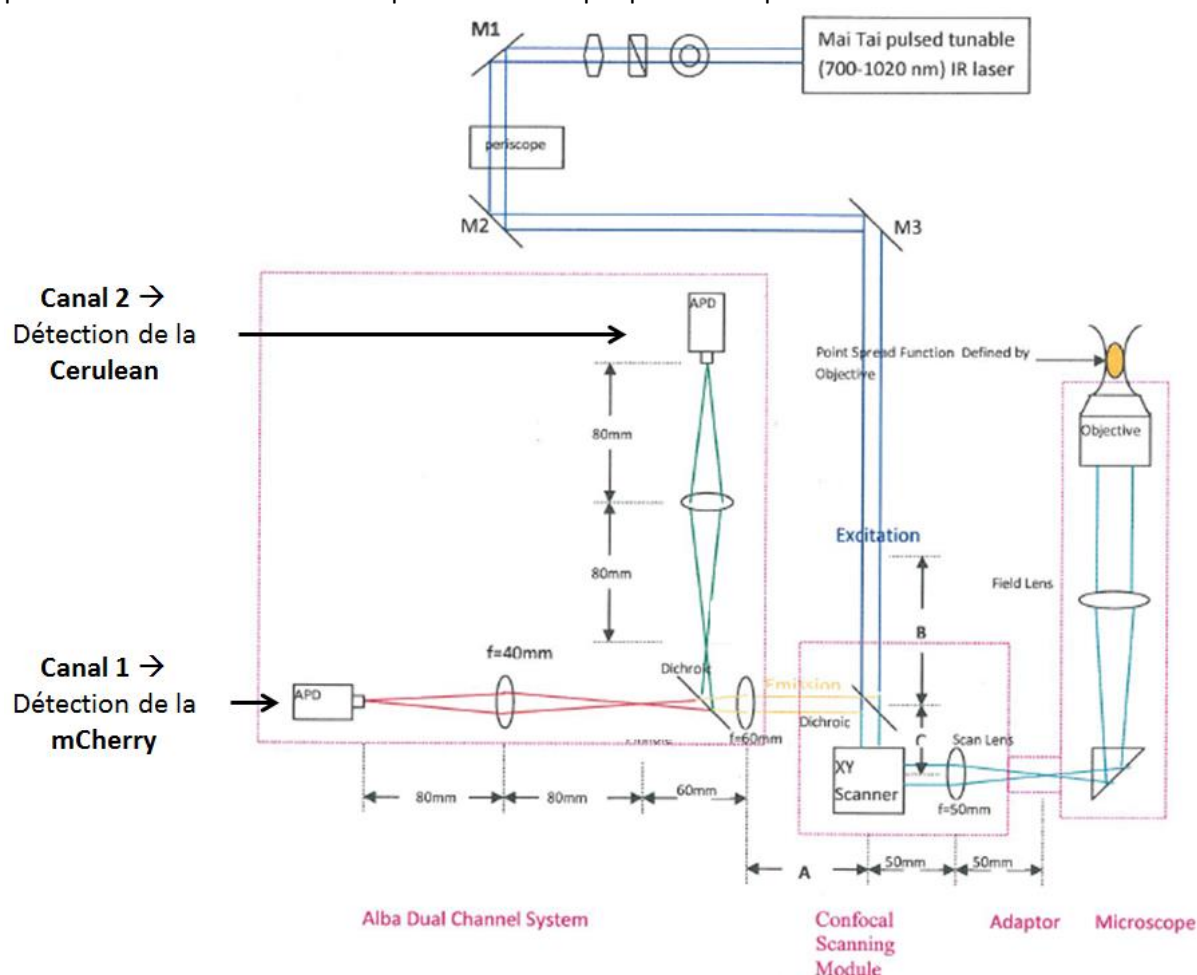


Figure 2.13 Représentation schématique du montage utilisé en microscopie de fluorescence.

La fluorescence émise par les 2 FP est séparée par un jeu de filtres (Figure 2.14):

- Un filtre 580/LP (pour Long Pass) permet de séparer les photons d'émission. Tous les photons supérieurs à 580 nm (correspondant à la mCherry) sont envoyés sur le détecteur APD n°1. Les

photons inférieurs à 580 nm (Cerulean) sont envoyés sur le détecteur APD n°2 (Figure 2.13-14).

- Un filtre 650/100 permet de récupérer le signal d'émission de la FP mCherry qui possède son pic d'émission à 610 nm (Figure 2.13-14).
- Un filtre 510/84 permet de récupérer le signal d'émission de la FP Cerulean qui possède son pic d'émission à 475 nm (Figure 2.13-14).

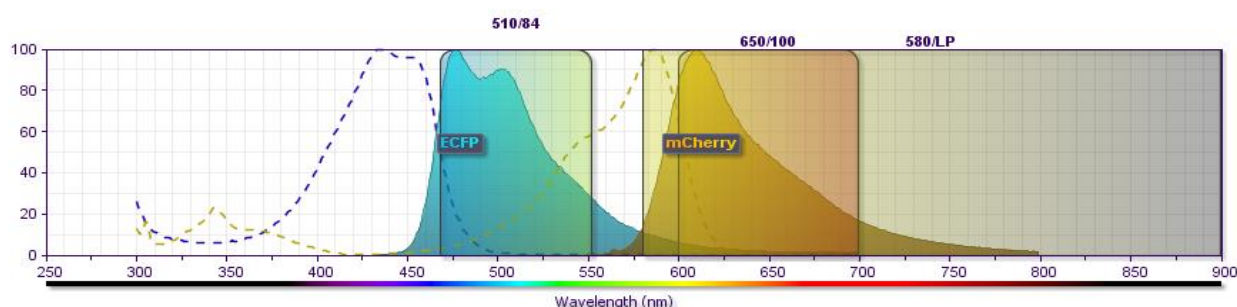


Figure 2.14 : Illustration des filtres d'émission utilisés afin de maximiser la collecte des photons d'émission en fonction des protéines fluorescentes utilisées : mCherry et Cerulean. Les spectres d'excitation des deux FPs sont représentés en pointillés. Les spectres d'émission sont colorés en bleu pour la Cerulean et en orange pour la mCherry. La visualisation des filtres directement sur leurs spectres d'émission, indique bien qu'un maximum de la fluorescence d'émission est collecté.

b) Protéines fluorescentes mCherry et Cerulean

La mCherry est la FP utilisée pour le marquage du récepteur nucléaire RevErb α en N-ter. Ses longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont respectivement de 587 et 610 nm. Cette FP a été sélectionnée car son spectre d'émission se situe dans le rouge. Sa large séparation spectrale avec des FPs émettant dans le vert ou le bleu en font une FP de choix pour les applications multicolores tel que c'est le cas dans ce présent travail (Wu *et al*, 2009). De plus la mCherry est photostable et ne forme pas de dimères (Shanner *et al*, 2005).

Le choix de la deuxième protéine fluorescente a été réalisé dans le but de pouvoir exciter les 2 FPs simultanément par un laser biphotonique. Dans un premier temps, l'EGFP (Enhance Green Fluorescent Protein) a été proposée en association avec la mCherry, mais les 2 FPs sont souvent utilisées pour les expériences de FRET. La possibilité que la mCherry éteigne le signal de l'EGFP par FRET n'est pas avantageux pour notre étude. Bien que des événements de FRET soit la preuve d'une interaction, dans ce cas, le nombre de complexes ne peut pas être déterminé par cette technique. De plus la diminution de l'émission de fluorescence de l'EGFP compliquerait le calcul de détermination du nombre de complexes. Pour cette raison, la Cerulean a finalement été choisie. C'est un des plus brillants variants de la protéine CFP (Cyan Fluorescent Protein). Le repliement à 37 °C (température de croissance des cellules Cos7) est très efficace et elle est photostable. Elle possède des longueurs d'ondes d'excitation et d'émissions respectives de 433 et 475 nm (Shanner *et al*, 2005). De plus, l'excitation des 2 FPs mCherry et Cerulean ne provoque pas de FRET. Ainsi l'excitation simultanée des 2 FPs est possible de par le recouvrement de leur spectre d'excitation biphoton (Figure 2.14). L'excitation se fera à 950 nm permettant d'exciter la fin du spectre de la Cerulean et le début de celui de la mCherry (Figure 2.15). L'utilisation des filtres d'émission appropriés, mentionnés précédemment permet une collecte maximale des photons (Figure 2.15). D'autre part, la séparation des spectres d'émission de ces 2 FPs évite de récupérer des photons bleus dans le canal rouge et vice versa. Le signal peut donc être correctement réattribué et l'effet des ligands sur la formation de complexes sera observé.

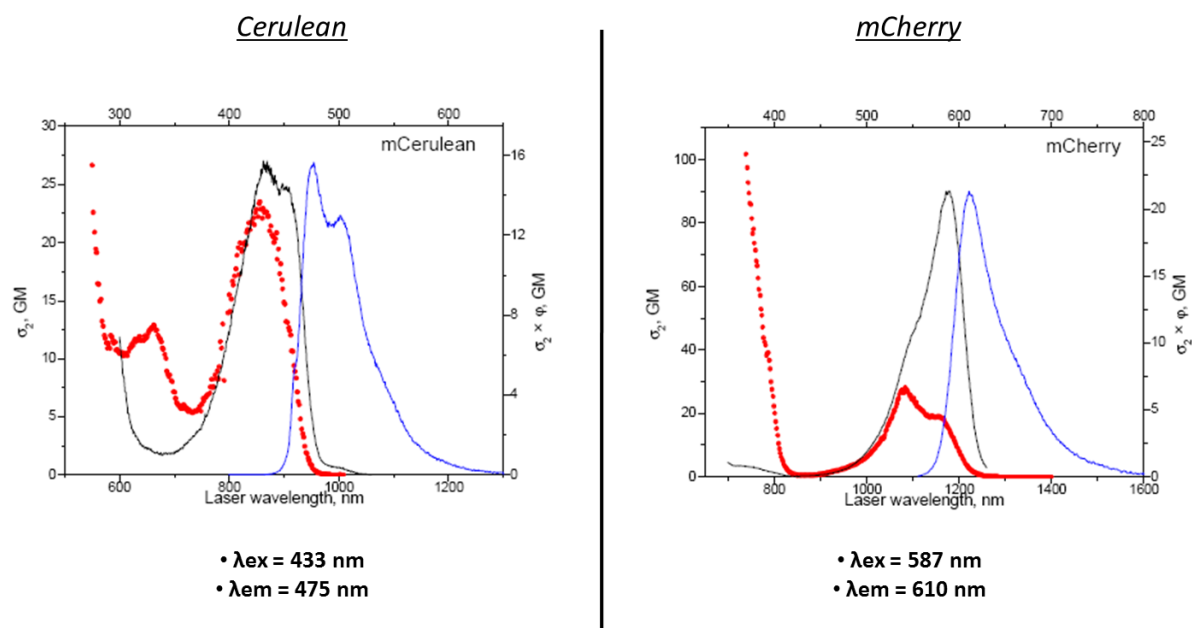


Figure 2.15: Spectres d'excitation et d'émission monophotonique et biphotonique des 2 FPs Cerulean (à gauche) et mCherry (à droite). Le spectre d'excitation monophotonique est représenté en noir et celui d'émission en bleu. L'axe des abscisses supérieur représente les longueurs d'onde pour une excitation monophotonique. L'axe des abscisses inférieur représente les longueurs d'ondes pour une excitation biphotonique. Les spectres d'absorptions biphotoniques sont représentés en rouge.

c) Construction des plasmides mCherry-RevErb α et Cerulean-NCor

Les plasmides synthétisés dans cette partie codent pour les protéines d'intérêts RevErb α et NCor pleine taille qui sont respectivement marquées par les FPs mCherry et Cerulean. Ces plasmides seront utilisés pour les tests en microscopie. Les plasmides, utilisés pour insérer les séquences des protéines d'intérêts, ont été sélectionnés car ils contiennent un promoteur SV40 qui permet une forte expression des protéines à l'intérieur des cellules après transfection.

Le plasmide exprimant RevErb α pleine taille a été fourni par la société pharmaceutique Servier (Annexes 7). La séquence ADN de la protéine NCor pleine taille a été commandé à la société Labomics (Annexes 7) et les plasmides contenant les protéines fluorescentes mCherry et Cerulean proviennent tous deux du laboratoire et ont été synthétisés pour un travail sur le récepteur nucléaire ER α et son corépresseur Tiff2 (Savatier *et al*, 2010).

La séquence nucléotidique codant pour la protéine RevErb α est extraite de son plasmide d'origine par des enzymes de restrictions spécifiques et incorporée dans le plasmide contenant la séquence nucléotidique de la mCherry également digérée par les mêmes enzymes. Les séquences d'intérêts sont isolées et récupérées par une extraction sur gel d'agarose 0.7% TAE. Le choix d'enzymes de restrictions générant des extrémités cohésives, permet l'incorporation dirigée de la séquence. Une ligation est réalisée et le produit obtenu est mis à migrer sur gel d'agarose 0.7% TAE afin de vérifier la bonne taille du plasmide. Un séquençage a confirmé la validité de ce dernier.

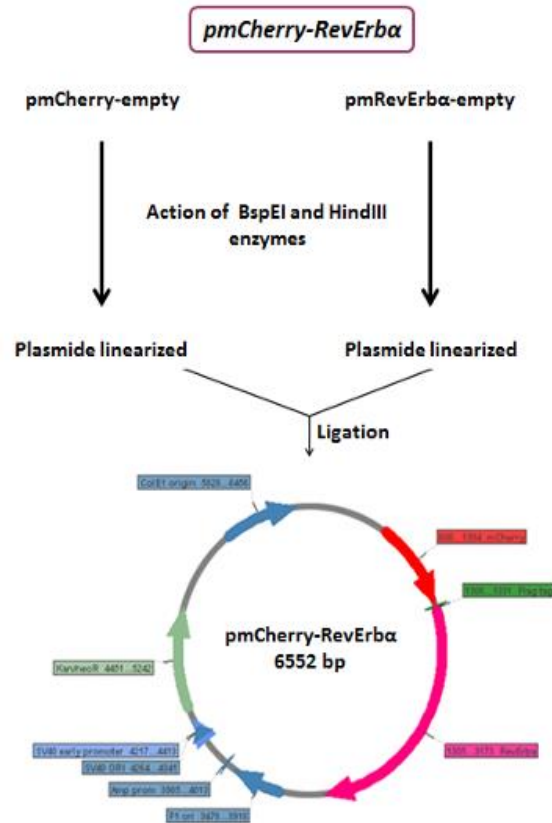


Figure 2.16 : Représentation des différentes étapes de synthèse du plasmide mCherry-RevErba. Les deux plasmides contenant les séquences codant pour les protéines RevErba et mCherry sont digérées par des enzymes de restriction. Le plasmide final est obtenu après ligation des 2 séquences RevErba et mcherry isolés.

La synthèse du plasmide Cerulean-NCor se fait de la même manière que celle du plasmide mCherry-RevErba. Les séquences nucléotidiques codant pour les protéines Cerulean et NCor sont digérées par des enzymes de restrictions adaptées générant des extrémités cohésives et permettant la bonne orientation des séquences isolées dans le plasmide final. Après isolation des deux séquences par extraction sur gel d'agarose 0.7% TAE, une ligation est effectuée à 16 °C et le produit obtenu est mis à migrer sur gel d'agarose 0.7% TAE afin de vérifier la bonne taille du plasmide. Un séquençage a confirmé la validité de ce dernier.

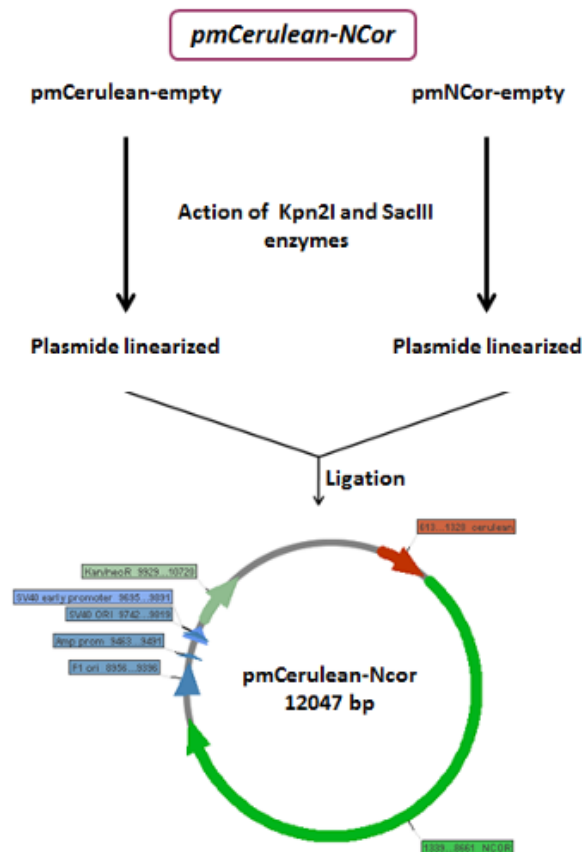


Figure 2.17 : Représentation des différentes étapes de synthèse du plasmide Cerulean-NCor. Les deux plasmides contenant les séquences codant pour les protéines NCor et Cerulean sont digérées par des enzymes de restriction. Le plasmide final est obtenu après ligation des 2 séquences NCor et Cerulean isolés.

d) Culture cellulaire

Les cellules utilisées pour ce projet sont des Cos7, c'est une lignée cellulaire immortalisée de fibroblastes de rein de singe vert. Ces cellules sont parfaitement adaptées pour la transfection de vecteurs exprimant l'antigène T SV40, ce qui est le cas pour les plasmides ayant été utilisés au cours de ce travail.

i. Congélation / Décongélation des cellules Cos7

Les cellules sont cultivées en fioles de 25 ml dans du milieu DMEM, sans rouge de phénol, en présence de 10 % de sérum de veau fœtal à 37 °C et à 5 % de CO₂.

Ces cellules Cos7 ont été choisies pour leur capacité d'adhérence, leur efficacité de transfection et d'expression des plasmides incorporés. De plus, ces cellules sont résistantes aux transfections simultanées de plusieurs plasmides. Leur forte adhérence facilite leur étude en microscopie. Dans ce but, les supports utilisés pour la microscopie sont des LabTecks à 2 puits qui possèdent un fond en verre. Les cellules sontensemencées à une confluence de 40 000 cellules par puits. Le lendemain, elles sont transfectées par les plasmides désirés.

ii. Transfections transitoires

L'incorporation des plasmides dans les cellules est réalisée par un agent chimique dont l'action repose sur l'encapsidation des plasmides à l'intérieur de liposomes. Ces derniers fusionnent avec la membrane cellulaire permettant l'entrée des plasmides dans le cytoplasme. L'agent de

transfection utilisé est le FuGene ou X-tremeGENE. C'est un produit commercialisé par les laboratoires Roche. Ce réactif forme des complexes avec l'ADN (plasmides incorporés), qui est transportés à l'intérieur des cellules Cos7.

Les quantités de plasmides transfectés sont de 1 µg pour le plasmide mCherry-RevErbα et de 2 µg pour le plasmide Cerulean-NCOR. Pour 3 µg d'ADN total, 7,5 µl de réactif FuGene est ajouté à l'ADN. Le mélange est vortexé 5 secondes, puis mis à incuber 15 minutes à température ambiante. Il est ensuite déposé dans les puits au contact des cellules, puis mis à incuber pendant 24 heures à 37 °C.

Le lendemain, le milieu de culture est changé et les ligands sont ajoutés à une concentration de 5 µM. L'hème, qui est conservé dans du DMSO 100 %, est dilué dans du milieu DMEM complémenté de 10 % de sérum et ajouté directement aux cellules. Les ligands, étant conservés dans du DMSO 100 %, sont également dilués dans du milieu DMEM complémenté. La concentration finale en DMSO est de 0,05 % ce qui est négligeable et sans effet toxique sur les cellules. Les ligands sont laissés à incuber une à deux heures avec les cellules, l'analyse en microscopie peut alors commencer.

La combinaison de ces techniques apporte une étude complète du mécanisme d'interaction du complexe RevErbα/NCOR. L'anisotropie de fluorescence *in vitro* permet de déterminer des constantes d'affinité entre RevErbα-LBD et différents peptides corépresseurs issus de NCOR et SMRT et portant les séquences CoNR1, 2 ou 3 indispensable à l'interaction du RN avec les CoRs. L'effet des ligands a également été étudié sur l'affinité des complexes. Une étude structurale basée sur des structures cristallographique du RN avec les 2 CoRs, en présence et en absence de ligand, a été effectuée. Cette étude permet de mettre en évidence les mécanismes de fixation particuliers du complexe et de comprendre les affinités différentes des peptides corépresseurs. La microscopie de fluctuation de fluorescence (N&B) a permis d'aller plus loin dans la compréhension de l'interaction du complexe *in cellulo* et de l'effet des différents ligands hème, SGN et SD7. La détermination de la stœchiométrie en présence et en absence de ligand a été déterminée et comparé à ce qui a été observé *in vitro*. Pour compléter cette étude et apporter un aspect fonctionnel, l'effet du complexe, en présence et en absence de ligand, sera déterminé sur l'activité transcriptionnelle d'un des gènes cible : la G6Pase. Ce travail ne sera pas présenté dans ce manuscrit.

La combinaison de ces trois techniques permet d'apporter une comparaison directe du comportement des protéines et des complexes *in vitro* et *in vivo* ainsi que de l'effet des ligands.

CHAPITRE 3 : RESULTATS : ETUDE *IN VITRO* DES INTERACTIONS ENTRE LE DOMAINE DE LIAISON DU LIGAND DE REVERB α ET DES PEPTIDES COREGULATEURS PAR ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE

La première partie de ce travail de recherche consiste en la caractérisation quantitative de l'interaction du domaine de liaison au ligand de RevErb α purifié avec différents peptides corépresseurs. Ce travail a été réalisé exclusivement *in vitro*, en présence de fragments de protéines et non de protéines entières. Les peptides corépresseurs utilisés sont issus des corépresseurs NCor et SMRT et correspondent aux domaines IDs, comprenant les motifs CoNRs, indispensables à l'interaction avec le récepteur nucléaire. Nous avons étudié leur interaction avec le LBD tronqué de RevErb α (P281-Q614 Δ 342-413). Tout d'abord nous avons examiné la dépendance de l'affinité des interactions sur la séquence des peptides corépresseurs. Ensuite nous avons testé les effets de différents ligands sur ces interactions. Le but ici a été d'identifier ceux ayant la capacité d'augmenter le recrutement du complexe NCor-HDAC3 sur RevErb α . L'effet d'une vingtaine de ligands a donc été étudié sur l'interaction entre RevErb α et le peptide NCor ID1. Cependant, seuls trois sont présentés dans ce manuscrit. Ce sont ces trois ligands qui ont été utilisés *in cellulo* en microscopie de fluorescence dans la deuxième partie de ce manuscrit.

Afin de quantifier les interactions RevErb α -LBD avec les peptides corépresseurs et les effets des ligands sur ces interactions nous avons utilisé l'anisotropie de fluorescence. Des peptides marqués par un fluorophore subissent une rapide diffusion rotationnelle due à leur petite taille et donc présentent une faible valeur d'anisotropie. Lorsque les peptides marqués sont en interaction avec le RevErb α -LBD, la taille du complexe étant significativement plus grande que celle du peptide, seule leur diffusion rotationnelle diminue et la valeur d'anisotropie de fluorescence augmente. Ainsi lors des titrages des peptides marqués par RevErb α -LBD, nous observons une augmentation progressive de l'anisotropie de fluorescence qui est directement proportionnelle à la formation du complexe. Les données sont traitées avec le logiciel BioEqs (Royer and Beechem 1992). A partir des données brutes d'anisotropie obtenues, un ajustement est effectué et la constante de diffusion K_D est ainsi obtenue.

Nous avons examiné les peptides portant la séquence de NCor ID1, ID2 ou ID3 ainsi que les peptides portant la séquence de SMRT ID1 et ID2 (Tableau 3.1). Enfin un autre peptide corépresseur provenant de NCor a également été testé dans cette partie. Il présente la particularité de contenir 2 motifs CoNRs, le CoNR1 et le CoNR2. C'est le peptide NCor5 (Tableau 3.1), dont l'avantage est qu'il comporte les 2 domaines d'interactions (ID1 et ID2) rapportés comme étant les plus importants pour l'interaction du corépresseur avec le récepteur nucléaire. Il est donc intéressant de l'étudier afin de vérifier si une différence d'affinité avec RevErb α apparaît lorsque les 2 motifs CoNRs sont présents.

Peptide	Séquences Acides aminés	Fluorophore
NCor ID1	RLITLADHICQIITQDFAR	Fluorescéine
NCor ID2	DPASNLGLEDIRKALMGSFDD	Fluorescéine
NCor ID3	KTTITAANFIDVITRQIASDKDAR	Fluorescéine
SMRT ID1	RVVTLAQHISEVITQDYTR	Rhodamine 110
SMRT ID2	TNMGLEAIRKALMGKYDQWEE	Fluorescéine
NCor5	QVPRTHRLITLADHICQIITQDFARNQVPSQASTSTFQTSPSALSSTPVRTK TSSRYSPESQSQTVLHPRPGPRVSPENLVDKSRGSRPGKSPERSHIPSEPYE PISPPQGPAVHEKQDSMLLSQRGVDPAEQRSDSRSPGSISYLPSSFCKLES TSPMVKSKKQEIFRKLNSSGGGSDMAAAQPGTEIFNLPAVTTSGAVSSR SHSFADPASNLGLEDIRKALMGSFDDKVEDHGVVMSHPVVGIMPGSAST SVVTSSEARRDE	Atto647N

Tableau 3.1: Compilation de tous les peptides utilisés au cours des essais d'anisotropie de fluorescence. La boîte CoNRN est surlignée en rose et les acides aminés indispensables à l'interaction entre RevErb α et NCor sont représentés en gras.

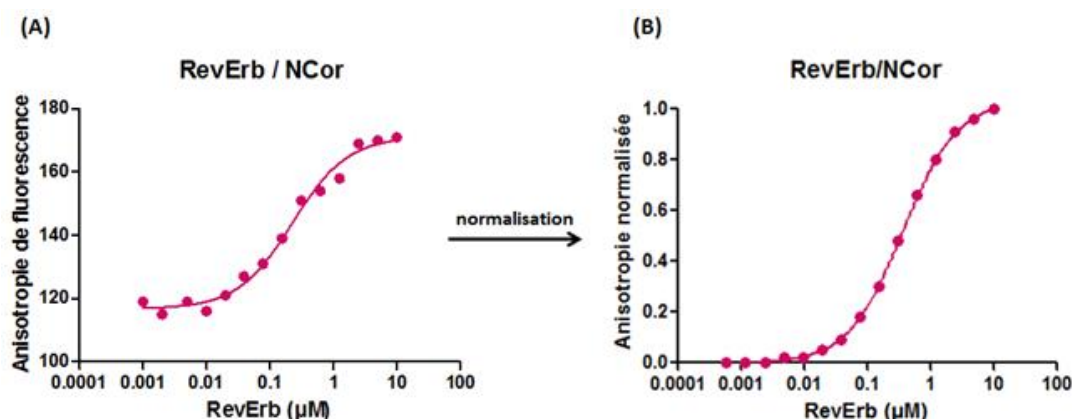


Figure 3.1 : Illustration du traitement des données brutes d'anisotropie de fluorescence et normalisation. (A) Les valeurs brutes sont traitées avec le logiciel BioEqs afin d'obtenir la constante d'affinité K_D . (B) Normalisation entre 0 et 1 en fonction de la différence d'anisotropie maximale et minimale. Ainsi si le plateau d'anisotropie (correspondant à 100 % de formation de complexe) n'est pas atteint, cela sera conservé dans la normalisation.

De faibles concentrations de ces peptides sont titrées par le RevErb α -LBD purifié à concentration croissante et des courbes de fixations sont tracées. Le but ici est de déterminer des constantes d'affinités qui seraient de l'ordre du nano molaire. L'utilisation de faible concentration de peptides corépresseur évite de saturer les sites de fixations de RevErb α -LBD, permettant ainsi la détermination de constantes d'affinités précises. Ces expériences sont répétées en présence de différents ligands, dont l'hème, qui fixe le LBD mais dont les effets sur l'interaction LBD-corépresseur sont controversés (Raghuram *et al*, 2007).

Après analyse, une normalisation des courbes entre 0 et 1 est effectuée pour les données brutes et les données théoriques pour la visualisation des différences d'affinité. Cette normalisation permet, entre autre, de s'affranchir des différences de delta d'anisotropie inhérente au fluorophore

utilisé ou encore du fond d'auto fluorescence des échantillons. Les propriétés d'absorption et d'agrégation peuvent en effet changer avec le fluorophore ou le ligand affectant ainsi le signal obtenu. La procédure de normalisation des données brutes (Figure 3.1 **A**) consiste à leur retrancher dans un premier temps la valeur du plateau bas de la courbe (ramenant le peptide marqué seul à une valeur nulle) puis à normaliser la courbe obtenue par la valeur du plateau haut (ramenant le pourcentage maximum de complexes à une valeur égale à 1) (Figure 3.1 **B**). La même opération est effectuée pour l'ensemble des mesures ayant atteint le plateau de saturation. Celles n'atteignant pas le plateau d'anisotropie sont, quant à elles, normalisées en considérant un delta d'anisotropie équivalent à celui obtenu sans ligand.

I. L'interaction de RevErb α avec différents peptides corépresseurs

Dans un premier temps l'interaction entre le RN RevErb α et différents peptides, issus des CoR NCor et SMRT, est quantifiée par anisotropie de fluorescence. Il est important ici de confirmer l'importance des domaines étudiés par rapport à ce qui est rapporté dans la littérature. Il a en effet été observé à de nombreuses reprises que RevErb α *in vivo* fonctionne préférentiellement avec le domaine ID1 de NCor et pas avec celui de SMRT (Hu and Lazar 2001). Cependant, il a été rapporté que le RN *in vitro* a la capacité de se lier également au domaine ID1 de SMRT (Raghuram *et al*, 2007). Nous avons donc étudié ces différences de liaisons par anisotropie de fluorescence. Le but étant d'identifier les domaines nécessaires à la liaison de RevErb α , toutes les séquences connues à ce jour sont testées : NCor ID1, ID2 et ID3 ainsi que SMRT ID1 et ID2.

1) Interaction entre RevErb α -LBD et des peptides SMRT et NCor comportant un seul domaine ID

Nous avons tout d'abord comparé les interactions des petits peptides comportant un seul motif ID. Les peptides de NCor ID1, ID2 et ID3 et SMRT ID2 sont marqués de manière covalente en N-ter par la fluorescéine, alors que le peptide SMRT ID1 est marqué à la rhodamine 110 et le peptide NCor5 (comportant les 2 domaines ID1 et ID2) est marqué à l'Atto647N. Les courbes normalisées de titrage par anisotropie de tous ces peptides sont regroupées dans la figure 3.2. Avec une concentration de peptide cible de 4nM, toutes les courbes décrivent une interaction à l'équilibre puisque la gamme de concentration pour laquelle l'interaction est observée est dans tous les cas supérieure à 2 unités log en concentration. La plus grande affinité est observée pour le peptide SMRT ID1 rhodamine 110 avec un K_D de 0,25 μ M (Tableau 3.2). Le second plus affin est le peptide NCor ID1 fluorescéine avec un K_D de 0,55 μ M (Tableau 3.2). Enfin les peptides NCor ID2 et ID3, marqués à la fluorescéine, ont une assez faible tendance à interagir avec le RevErb α -LBD leurs constantes d'affinités de 3,7 et 14,8 μ M sont respectivement 7 et 30 fois plus faibles que pour le peptide NCor ID1 fluorescéine (Tableau 3.2). Ceci confirme que les domaines ID2 et ID3 ne se lient pas de manière aussi forte que le peptide ID1 démontrant donc que ce dernier est indispensable pour la liaison du corépresseur à RevErb α (Figure 3.2 **A**). Bien qu'étant rapporté dans la littérature que RevErb α *in vivo* se lie préférentiellement et majoritairement au corépresseur NCor, il a aussi été rapporté qu'il a la capacité de se lier au peptide SMRT *in vitro* (Raghuram *et al*, 2007). C'est d'ailleurs ce qui est démontré par les résultats que nous avons obtenus en anisotropie de fluorescence. Les données rapportent que le peptide SMRT ID1 rhodamine 110 présente une affinité pour RevErb α -LBD deux fois plus importante que celle du NCor ID1 fluorescéine, alors que SMRT ID2 fluorescéine se lie deux fois moins bien que le NCor ID1 fluorescéine avec un K_D de 1,14 μ M (Tableau 3.2). Mais cette interaction est toujours plus affine que celles des autres peptides NCor fluorescéine ID2 et ID3 (Figure 3.2 **A**).

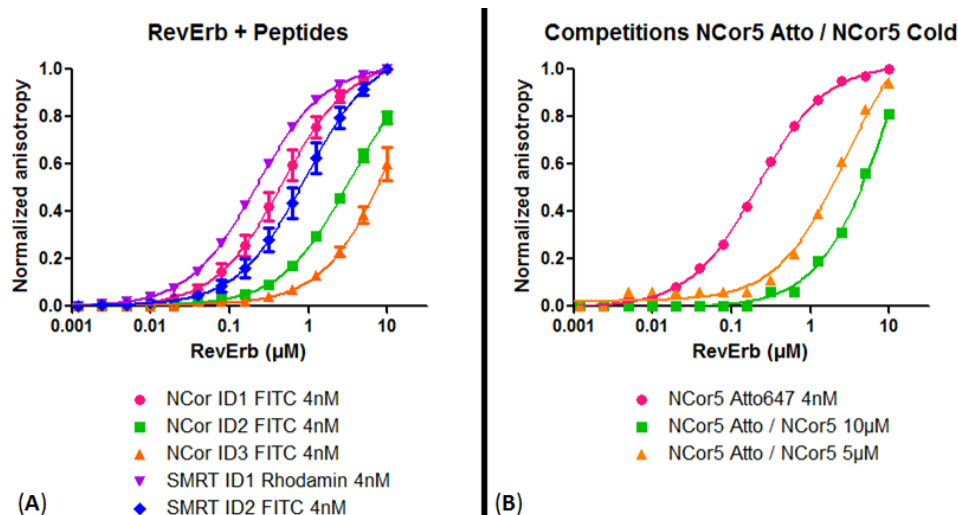


Figure 3.2: **(A)** Profil d'anisotropie de fluorescence pour la liaison du LBD de RevErb α avec les peptides NCor ID1, ID2 et ID3 et SMRT ID1 et ID2. Les peptides fluorescents sont ajoutés à une concentration de 4 nM en présence de concentration croissante de RevErb α (axe des abscisses). Les valeurs d'anisotropies de fluorescence sont normalisées entre 0 et 1 (axe des ordonnées) comme expliqué dans la section Matériels et Méthodes. Toutes les mesures ont été réalisées dans du tampon anisotropie **(B)** Tests de compétitions basés sur l'anisotropie de fluorescence du peptide NCor5 Atto 647N à 4 nM. Le peptide compétiteur est le NCor5 non marqué ajouté à 5 ou 10 μM. La protéine RevErb α est ajoutée en concentration croissante. En fonction de la concentration du peptide NCor5 non marqué, les courbes d'anisotropies seront différentes permettant de déterminer une affinité entre le LBD de RevErb α et le peptide NCor5 non marqué. Les données sont traitées comme expliqué dans la partie Matériels et Méthodes, les mesures sont également réalisées dans du tampon anisotropie (Annexes 1)

Nous avons aussi testé l'effet de combiner deux motifs IDs dans le même peptide. En l'occurrence, nous avons examiné l'interaction de RevErb α -LBD avec un peptide NCor5 comportant les domaines ID1 et ID2 de NCor et marqué à l'Atto647N (Tableau 3.1). L'affinité du peptide NCor5 pour le RevErb α -LBD est déterminée à 330 nM ce qui est supérieur à celle obtenue avec le peptide NCor ID1 fluorescéine soit 600 nM (Tableau 3.2) (Figure 3.2 **B**). Cependant, le fluorophore n'étant pas le même (Atto647N pour NCor5 et Fluorescéine pour le NCor ID1) il est nécessaire de vérifier qu'il n'intervient pas dans l'association des protéines et qu'il ne fausse pas les constantes d'affinités déterminées.

En effet, les affinités déterminées ci-dessus représentent l'interaction du LBD de RevErb α avec différents peptides marqués avec un fluorophore. Il est donc important de s'affranchir des effets que les fluorophores pourraient éventuellement avoir sur l'interaction. Il se peut que certains présentent une affinité importante pour le RN ou les peptides, aboutissant à une valeur de K_D faussée et trop élevée. Au contraire, il se peut que l'un des fluorophores empêche ou diminue l'affinité des peptides pour le RN. De ce fait, il est important de déterminer l'affinité réelle de RevErb α pour le peptide NCor ID1 non marqué dans un premier temps. Ce dernier étant celui utilisé pour le criblage de ligands, il est nécessaire de confirmer qu'il est le peptide approprié pour cette étape. Nous avons donc titré le peptide SMRT ID1 Rhodamine 110 par le RevErb α -LBD en présence de plusieurs concentrations de peptide NCor ID1 non marqué et nous avons globalement analysé les données pour le K_D de NCor ID1 non marqué, connaissant celui du SMRT ID1 Rhodamine 110. Par cette approche de titrage en compétition, toujours observant l'anisotropie de fluorescence du peptide marqué, nous avons déterminé que l'affinité réelle du peptide NCor ID1 en absence de fluorophore est de 4,75 μM (Figure 3.3 **A**) (Tableau 3.2). Ceci est à comparer avec la valeur de K_D de 0,55 μM déterminée pour le peptide marqué. Apparemment, la présence du fluorophore augmente l'affinité

d'un facteur 10.

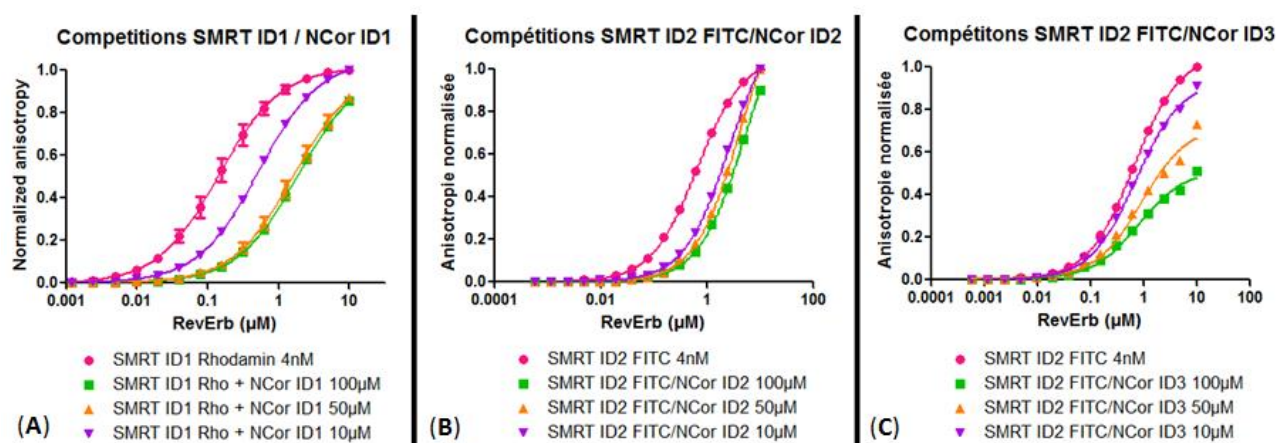


Figure 3.3 : Tests de compétitions basés sur l'anisotropie de fluorescence du peptide SMRT ID1 rhodamine 110 ou SMRT ID2 fluorescéine à 4 nM. **(A)** Le peptide compétiteur est le NCor ID1 non marqué ajouté à 10, 50 ou 100 μM . **(B)** Le peptide compétiteur est le NCor ID2 non marqué ajouté à 10, 50 ou 100 μM . **(C)** Le peptide compétiteur est le NCor ID3 non marqué ajouté à 10, 50 ou 100 μM . Dans tous les cas, la protéine RevErb α est ajoutée en concentration croissante (axe des abscisse). En fonction de la concentration des peptides NCor ID1, ID2 ou ID3 non marqué, les courbes d'anisotropies seront différentes permettant de déterminer une affinité entre le LBD de RevErb α et les différents peptides non marqués. Les données sont traitées comme expliqué dans la partie Matériels et Méthodes, les mesures sont également réalisées dans du tampon anisotropie (Annexes 1)

Des compétitions réalisées en présence du peptide NCor5 marqué et non marqué permettent de déterminer que l'affinité du NCor5 non marqué est de 550 nM (Figure 3.2 **B**). Il semble donc que le fluorophore Atto647N a une faible tendance à favoriser l'association des protéines, l'effet étant nettement plus faible que celui observé pour la fluorescéine avec le peptide NCor ID1. La différence est négligeable et au vu des écarts type obtenus sur la moyenne des constantes d'affinité de RevErb α avec NCor5 Atto647N (Tableau 3.2), l'influence du fluorophore sur l'interaction peut être considérée comme négligeable. Il est clair que le NCor5 présente une affinité beaucoup plus importante pour RevErb α (0,55 μM) que le NCor ID1 (5,09 μM) (Tableau 3.2). Bien que le peptide NCor ID2 ne se lie pas de manière très importante au LBD (3,7 μM pour le peptide marqué comparé à 0,56 μM pour NCor ID1 marqué), il semble évident que ce domaine facilite la liaison de NCor et stabilise sa fixation à RevErb α .

Les affinités réelles des peptides NCor ID2 et ID3 non marqués ont également été déterminées. Les valeurs de K_D respectivement obtenues pour les deux peptides sont de 10,71 et de 10^{+6} μM (Figure 3.3 **B** et **C**). Il est cependant difficile d'évaluer l'affinité réelle du peptide NCor ID3 vu qu'elle est très faible.

Les affinités réelles des peptides SMRT ID1 et ID2 ont également été déterminées en réalisant des compétitions. Le peptide SMRT ID1 rhodamine 110 est titré par le RevErb α -LBD en présence des peptides SMRT ID1 (Figure 3.4 **A**) et SMRT ID2 non marqués (Figure 3.3 **B**) à 100, 50 ou 10 μM . Connaissant l'affinité du peptide marqué, les constantes d'affinité de 1,41 μM et 7,1 μM sont respectivement établies pour les peptides SMRT ID1 et SMRT ID2 non marqués (Tableau 3.2). Dans ce cas, la fluorescéine augmente l'affinité d'un facteur 6, en comparaison de celle déterminée en présence du peptide SMRT ID2 fluorescéine de 1,15 μM . La rhodamine 110 semble augmenter l'affinité d'un facteur 5, cependant le K_D déterminé en présence de SMRT ID1 non marqué reste important (1,41 μM). L'affinité entre le RevErb α -LBD et le peptide SMRT ID1 est donc réelle ce qui est conforme à ce qui est rapporté dans la littérature (Raghuram *et al*, 2007).

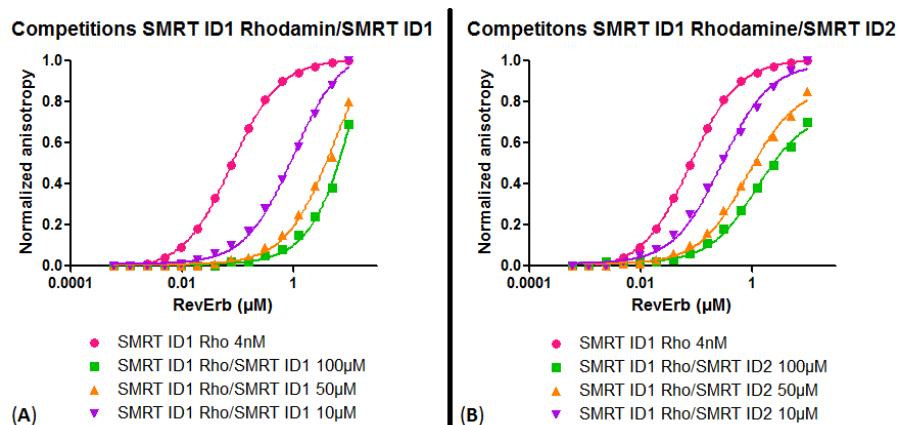


Figure 3.4 : Tests de compétitions basés sur l'anisotropie de fluorescence du peptide SMRT ID1 rhodamine 110 à 4 nM. Le peptide compétiteur non marqué est ajouté à 10, 50 ou 100 μ M. La protéine RevErb α est ajoutée en concentration croissante. En fonction de la concentration du peptide non marqué, les courbes d'anisotropies seront différentes permettant de déterminer une affinité entre le LBD de RevErb α et les peptides SMRT ID1 et ID2 non marqué. (A) Le peptide compétiteur est le SMRT ID1 non marqué. (B) Le peptide compétiteur est le SMRT ID2 non marqué.

L'interaction entre RevErb α et NCor a été démontrée à de nombreuses reprises *in vivo*. Les domaines d'interactions (IDs) des 2 corépresseurs NCor et SMRT ont largement été étudiés également.

Il a effectivement été démontré que le domaine ID1 de NCor est indispensable à son interaction avec RevErb α notamment par des essais de double hybride (Hu and Lazar 2001). Nous apportons au travail déjà réalisé des précisions sur la fixation du LBD de RevErb α avec l'ensemble des peptides corépresseurs comportant les domaines essentiels à leur liaison au RN. D'une part, des constantes d'affinités des peptides marqués et non marqués permettent d'évaluer l'importance de chaque domaine *in vitro*. D'autre part, l'étude des 2 corépresseurs NCor et SMRT apporte une comparaison directe et au cours d'une même étude de l'affinité de ces protéines pour le LBD de RevErb α . Les résultats seront discutés dans la partie conclusion et discussion de ce présent chapitre.

	K_D du peptide marqué (μ M)	K_D du peptide non marqué (μ M)
NCor ID1	$0,56 \pm 0,16$	$5,09 \pm 0,82$
NCor ID2	$3,77 \pm 0,04$	10.71 ± 6.3
NCor ID3	$14,8 \pm 3,7$	$10^{+6} \pm 2937$
NCor5	$0,35 \pm 0,13$	$0,55 \pm 0$
SMRT ID1	$0,19 \pm 0,06$	$1,41 \pm 0,23$
SMRT ID2	$1,15 \pm 0,45$	$7,11 \pm 2,22$

Tableau 3.2 : Tableau récapitulatif des constantes d'affinité (K_D) obtenus pour l'interaction du RevErb α -LBD avec les peptides NCor et SMRT marqués et non marqués

II. Effet de l'hème et des ligands non-naturels sur l'interaction RevErb α / NCor

1) Effet de l'hème sur le complexe RevErb α / NCor

Le rôle de l'hème concernant l'association du complexe corépresseur ou bien son action sur l'activité transcriptionnelle est à ce jour non résolu. De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont été réalisées à ce sujet menant à des résultats contradictoires. Des essais de gènes rapporteurs à la luciférase, *in cellulo*, démontrent clairement que l'absence d'hème empêche la répression de la transcription. D'autre part, au cours de cette même étude, la réalisation de ChIPs démontre que l'absence d'hème aboutit en la non-association du complexe répresseur (Yin *et al*, 2007). Cependant, une étude *in vitro* réalisée sur la liaison du LBD de RevErb α avec le peptide NCor ID1 montre clairement que la présence d'hème ne permet pas leur union (Raghuram *et al*, 2007). Les auteurs utilisent une technique appelée Luminex au cours de laquelle plusieurs peptides corépresseurs sont mis en contact avec le LBD de RevErb α (281-614, aucune délétion n'est indiquée) marqué d'un fluorophore. L'intensité de fluorescence mesurée est témoin de l'interaction entre les peptides et la protéine en présence et en absence d'hème.

Le but de cette section est d'apporter des informations quant au rôle de l'hème sur l'association du RevErb α -LBD avec le peptide NCor ID1 fluorescéine. L'anisotropie de fluorescence permettra de déterminer les constantes d'affinités des deux protéines en présence et en absence d'hème. La technique Luminex utilisée précédemment repose également sur la mesure d'intensité de fluorescence mais ne permet pas une étude juste du complexe, ni une détermination de constantes d'affinité. En effet, les peptides corépresseurs biotinylés sont accrochés à des billes de sépharose, puis mis en contact avec le RevErb α -LBD marqué d'un fluorophore. Tout ce qui ne se fixe pas aux peptides ou aux billes de sépharose est élué. L'intensité de fluorescence est alors mesurée permettant de déterminer l'interaction des peptides avec le RevErb α -LBD. Cependant, il n'est pas discuté des résultats obtenus qui ont été placés dans les données supplémentaires et les auteurs n'apportent aucune précision sur les différences de fixation entre RevErb α et NCor *in vitro* et *in vivo* en présence d'hème. Il est important d'étudier précisément ces variations et l'effet réel du ligand naturel de RevErb α sur cette interaction.

L'effet de l'hème à différentes concentration (5 et 10 μ M) a donc été testé sur la liaison du LBD de RevErb α avec le peptide NCor ID1 fluorescéine. L'affinité apparente du complexe en absence d'hème est de 0.56 μ M (NCor ID1 marqué fluorescéine), en présence de 5 et 10 μ M les valeurs de K_D sont respectivement de 8.3 et 13.7 μ M. L'affinité du complexe est donc diminué d'un facteur 10 en présence d'hème (Figure 3.5) (Tableau 3.3). Son effet sur l'association du complexe répresseur est antagoniste et concentration dépendante *in vitro*.

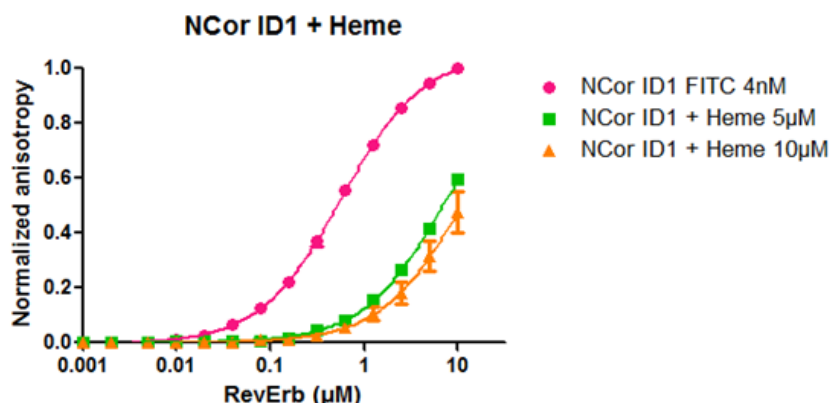


Figure 3.5 : Profil d'anisotropie de fluorescence pour la liaison du LBD de RevErb α avec le peptide NCor ID1 fluorescéine en présence ou en absence d'hème. Le peptide fluorescent est présent à une concentration de 4 nM, la protéine RevErb α est ajoutée en concentration croissante (axe des abscisse) et l'hème est à 5 ou 10 μ M. Les valeurs d'anisotropies de fluorescence sont normalisées entre 0 et 1 comme expliqué dans la partie Matériels et Méthodes. Toutes les mesures ont été réalisées dans du tampon anisotropie (Annexe 1)

Ces résultats sont en accord avec ceux déjà publiés (Raghuram *et al*, 2007). En effet, bien que les essais *in vivo* (ChIP ou tests rapporteurs à la luciférase) semblent indiquer que la présence d'hème favorise l'association du complexe RevErb α / NCor, les tests *in vitro* réalisés avec les IDs de NCor démontrent un effet plutôt déstabilisateur de la présence d'hème sur l'association du complexe. Les protéines entières, comme les LBDs, ont certainement la capacité de lier l'hème de manière efficace. Cependant, il se peut que l'hème entre en compétition avec le peptide NCor ID1 pour leur fixation dans le sillon hydrophobe du LBD de RevErb α . En effet, il a également été prédit par alignement de séquence que l'hème gêne fortement la fixation du peptide NCor ID1 au RN⁸. Ceci pourrait expliquer pourquoi aucune structure cristalline n'a pu être obtenue du complexe LBD-RevErb α / Hème / Peptide NCor ID1. En effet, si l'hème empêche la fixation du peptide NCor ID1 aucun complexe suffisamment stable ne pourra être cristallisé. Cependant, cette étude doit être approfondie afin de conclure de manière définitive sur son rôle au sein de ces protéines. C'est pour cela que des études *in cellulo* ont été réalisées par la suite.

Dans la partie consacrée à l'étude du complexe par microscopie de fluorescence, *in cellulo*, nous avons examiné l'effet de l'hème sur la formation des complexes entre les protéines entières dans un contexte cellulaire. Des travaux consacrés à l'étude de l'effet de l'hème sur l'activité transcriptionnelle du complexe répresseur, *in vivo*, déterminé par des essais de gènes rapporteurs à la luciférase sont en cours. Au vue des effets déstabilisateurs de l'hème sur le complexe RevErb α -LBD / NCor ID1 *in vitro*, la question s'est posée de savoir si le but de l'hème n'était pas en fait le recrutement et / ou la fixation d'un coactivateur sur RevErb α . Cette hypothèse a été testée avec les coactivateurs, SRC1 et Tif2 *in vitro*. Nous avons observé qu'en présence ou en absence d'hème aucun peptide coactivateur n'a la capacité de se lier au LBD de RevErb α (Résultats non montrés). Ceci est en accord avec les données structurales qui montrent l'importance de l'hélice C-ter des récepteurs nucléaire (correspondant au domaine de transactivation AF2) pour le recrutement des coactivateurs. Puisque RevErb α ne possède pas ce domaine particulier, il ne pourra jamais agir en tant qu'activateur de transcription.

⁸Les alignements de séquences prédisent que la liaison de l'hème à RevErb α créerait des encombrements stériques rendant la fixation de NCor ID1 impossible (Phelan *et al*, 2010).

2) Effets des ligands SGN et SD7 sur le complexe RevErb α / NCor

Comme il a été précisé précédemment, en plus de l'hème, une vingtaine de ligands ont été testés en anisotropie de fluorescence. Ce travail de criblage a permis d'en sélectionner deux (SGN et SD7) ayant un effet visible sur l'interaction entre le LBD de RevErb α et le peptide corépresseur NCor ID1.

Le ligand SGN a été identifié par FRET d'après sa capacité à augmenter le recrutement d'un peptide NCor sur le LBD de RevErb α . Par la même technique, l'affinité entre les deux protéines a été estimée à 250 nM en présence de ligand (Meng *et al*, 2008). Aucune valeur n'est précisée quant à la fixation des 2 protéines en absence de ligand. D'autre part, la séquence du peptide NCor utilisé dans ce cas n'est pas précisée ; ce doit certainement être le peptide NCor ID1 pour atteindre une si haute affinité. Il est cependant indiqué que le ligand SGN permet une augmentation du recrutement de NCor sur RevErb α (certainement le LBD bien que rien ne soit précisé) de 70 %. Nous avons déterminé les affinités réelles de RevErb α -LBD avec le peptide corépresseur NCor ID1 en présence et en absence de ligand. La technique de FRET nécessite l'utilisation de 2 fluorophores contrairement à l'anisotropie de fluorescence qui en utilise un seul ce qui en fait une technique plus précise pour quantifier cette interaction en présence et en absence de ligand.

Le ligand SD7 quant à lui n'a jamais été testé sur le complexe RevErb α / NCor. Il est uniquement rapporté qu'il se lie au récepteur nucléaire ROR α et entraîne l'inhibition de la transcription des gènes cibles (Kumar *et al*, 2011).

Nous avons testé l'effet du SGN et du SD7 sur l'interaction de NCor ID1 marqué à la fluorescéine avec le LBD de RevErb α par anisotropie de fluorescence. Nous supposons que l'effet stabilisateur du fluorophore est le même, en absence et en présence de ligand. Ce sont donc des affinités relatives qui nous intéressent ici. Les courbes de titrage de NCor ID1 fluorescéine par RevErb α -LBD en absence et en présence des ligands SGN et SD7, à deux concentrations différentes 20 et 100 μ M, sont regroupés dans la figure 3.6. Dans les deux cas, le LBD devrait être saturé par le ligand quel que soit la concentration du LBD si le K_D du ligand pour le LBD est moins qu'environ 2 μ M. Il est clair dans les deux cas que le ligand SGN a une forte tendance à favoriser les interactions RevErb α -LBD / NCor ID1, alors que le SD7 défavorise cette liaison. Les valeurs de K_D apparents obtenus pour ces courbes sont rapportées dans le tableau 3.3. Afin de compléter cette étude, l'effet de la concentration des ligands sur l'interaction a été étudié. Comme il a été précisé précédemment, ces ligands présentent des problèmes de solubilité et donc d'agrégations pouvant perturber le signal de fluorescence par l'ajout d'intensité provenant de la diffusion de la lumière excitatrice et donc une augmentation artificielle des valeurs d'anisotropie de fluorescence. C'est ainsi que leur concentration d'agrégation a été testée en DLS dans le tampon anisotropie utilisé ici⁹ (Annexes 1). Il est apparu que le SGN commence à s'agréger à 12,5 μ M et le SD7 à 100 μ M. Il est donc probable que le ligand trop concentré (100 μ M) agrège en partie. En effet, des mesures ont été réalisées sur le comportement des ligands seuls, en absence de protéine et de leurs effets sur les valeurs d'intensité de fluorescence et d'anisotropie de fluorescence. Ceci a permis de révéler que plus le SGN est concentré et plus il entraîne une augmentation de l'intensité et de l'anisotropie de fluorescence en apparence, due à ce phénomène de diffusion. Ainsi, les données brutes d'anisotropie lors du titrage étaient particulièrement élevées en présence de 100 μ M de ligand, ceci ayant pour effet de diminuer la gamme dynamique de changement d'anisotropie lors de la fixation du peptide par le LBD, entraînant donc une diminution de la précision de détermination du K_D à forte concentration de ligand. Comme on peut le voir dans le tableau 3.4, les valeurs de K_D (apparents) pour le complexe LBD-RevErb α / NCor ID1 en présence de ces deux ligands ne varient pas avec leur concentration, dans la limite des incertitudes expérimentales sur leurs valeurs. Ceci est en accord avec l'hypothèse de saturation du LBD par le ligand aux deux concentrations testées. Mais on peut aussi constater que l'incertitude sur la valeur de K_D , particulièrement en présence du ligand SD7, est nettement plus élevée pour les

⁹La détermination des concentrations d'agrégation des ligands a été réalisée par les laboratoires Servier.

courbes obtenues avec une concentration de 20 μM . Ainsi une concentration saturante de SGN augmente l'affinité entre le LBD de RevErb α et le peptide NCor ID1 d'un facteur 5-6, alors que la fixation du ligand SD7 défavorise cette interaction par un facteur d'environ 3-4.

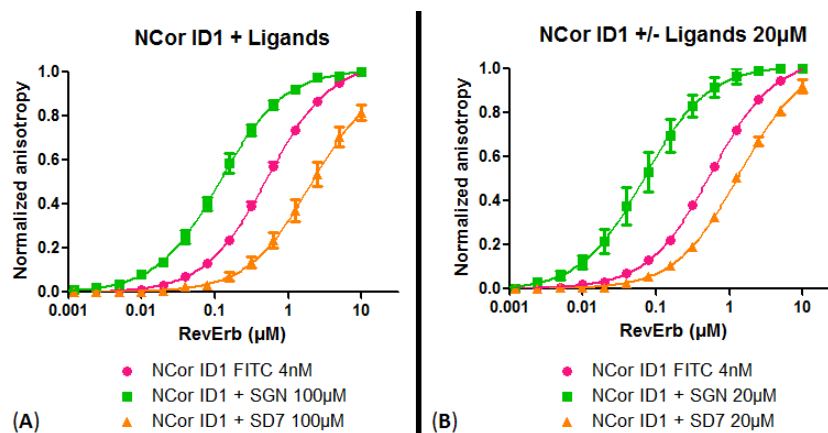


Figure 3.6 : Profil d'anisotropie de fluorescence pour la liaison du LBD de RevErb α avec le peptide NCor ID1 fluorescéine en présence ou en absence de ligand SGN ou SD7. Le peptide fluorescent est présent à une concentration de 4 nM, la protéine RevErb α est ajoutée en concentration croissante (axe des abscisse) et les ligands SGN et SD7 sont ajoutés à une concentration stable de 100 μM (A) ou 20 μM (B). Les valeurs d'anisotropies de fluorescence sont normalisées entre 0 et 1 comme expliqué dans la partie Matériels et Méthodes. Toutes les mesures ont été réalisées dans du tampon anisotropie (Annexes 1)

Il est donc confirmé que l'effet de ces ligands sur l'affinité du RevErb α -LBD avec NCor est stabilisateur pour le SGN et déstabilisateur en présence du SD7 et de l'hème. Ces résultats sont conformes avec ce qui a déjà été publié. L'effet du SGN a été étudié par FRET sur le complexe RevErb α -LBD / Peptide NCor et une constante d'affinité de 250 nM a été déterminée. Étant donné que le SD7 n'a été testé que sur un récepteur nucléaire capable d'activer la transcription (ROR α) (Kumar *et al*, 2011) nous n'avions pas d'expectation de départ sur l'effet de ce ligand sur le complexe RevErb α / NCor. RevErb α n'ayant pas la capacité d'activer la transcription le SD7 peut juste empêcher la liaison du peptide NCor ID1 *in vitro*. Il reste à déterminer ses effets *in cellulo*. Le but de ce projet est d'identifier un ou des ligands permettant d'augmenter le recrutement du complexe NCor-HDAC3 sur RevErb α . Le ligand SD7 au vue des résultats *in vitro* ne fait pas parti de ces ligands. Par contre il peut être un bon outil pour mieux appréhender les relations structure-fonction de RevErb α . Il sera intéressant de tester l'effet déstabilisant du SD7 sur les interactions RevErb α /NCor *in cellulo* par microscopie de fluorescence, ainsi que son effet sur la transcription du gène codant pour la G6Pase.

III. Etude de l'effet de l'hème et des ligands sur le complexe RevErb α / SMRT

L'étude de SMRT apportera des informations supplémentaires concernant la spécificité de liaison des corépresseurs à RevErb α . De plus, l'effet des ligands sur l'interaction du récepteur nucléaire avec SMRT permettra de vérifier si leur action est ciblée sur un complexe en particulier. La microscopie de fluorescence, qui sera abordée dans une deuxième partie, permettra de confirmer ou d'infirmer les spécificités de liaison du récepteur nucléaire avec un corépresseur ou l'autre et surtout de déterminer l'effet réel des ligands sur un complexe et / ou l'autre. Étant donné qu'une assez bonne affinité a été déterminée entre RevErb α et le peptide SMRT ID1 l'effet de l'hème et des ligands SGN et SD7 est également testé sur cette interaction. Si les ligands ont un fort effet associatif ou dissociatif du complexe, les constantes d'affinités seront fortement modifiées ce qui sera

visible sur les courbes construites. L'effet de ces ligands n'a jamais été testé sur l'association de ce complexe.

1) Effet de l'hème sur l'interaction RevErb α / SMRT

Comme il a été précisé précédemment, l'hème se fixerait dans le sillon hydrophobe de RevErb α occupant ainsi la place réservée au corépresseur NCor. Ceci a été prédit par des alignements de séquences entre le complexe RevErb β -LBD lié à l'hème et le complexe RevErb α -LBD lié à NCor ID1 (Pardee *et al*, 2009) (Phelan *et al*, 2010). Alors qu'*in vivo* l'hème est supposé favoriser et permettre l'association des protéines RevErb α et NCor, les résultats *in vitro* démontrent une tendance de celui-ci à empêcher la fixation de peptide corépresseur lorsqu'il est lui-même déjà associé au récepteur nucléaire. C'est pour cette raison qu'il n'est pas surprenant que l'hème ait un effet dissociatif sur le complexe RevErb α -LBD / SMRT ID1 rhodamine 110. De plus, l'effet déstabilisateur est concentration dépendante. Plus la concentration d'hème augmente, plus l'affinité entre le récepteur nucléaire et le peptide corépresseur diminue (Figure 3.7). C'est ainsi qu'en présence de 5 μ M d'hème l'affinité passe de 190 nM à 4,19 μ M, alors qu'en présence de 10 μ M d'hème l'affinité est de 6,27 μ M (Tableau 3.3).

De la même manière qu'avec le peptide NCor ID1, l'hème se fixe dans la pochette hydrophobe du LBD de RevErb α et ainsi pourrait gêner la fixation du peptide corépresseur à RevErb α . Cependant, l'effet dissociatif de l'hème sur le complexe RevErb α -LBD / SMRT ID1 rhodamine 110 est plus important que celui sur le complexe RevErb α -LBD / NCor ID1 fluorescéine. En effet, pour la fixation de SMRT ID1 rhodamine 110 et en présence d'hème à 5 ou 10 μ M l'effet déstabilisant est respectivement d'un facteur 28 et 35, alors que pour la fixation du peptide NCor ID1 en présence d'hème à 5 ou 10 μ M l'effet déstabilisant est respectivement d'un facteur 12 et 20.

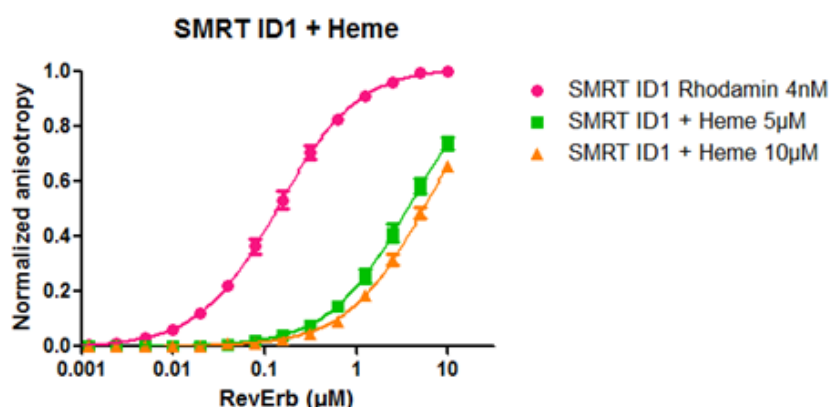


Figure 3.7 : Profil d'anisotropie de fluorescence pour la liaison du LBD de RevErb α avec le peptide SMRT ID1 rhodamine 110 en présence ou en absence d'hème à 5 ou 10 μ M. Les valeurs d'anisotropies de fluorescence sont normalisées entre 0 et 1 comme expliqué dans la partie Matériels et Méthodes. Toutes les mesures ont été réalisées dans du tampon anisotropie (Annexes 1)

2) Effet des ligands SGN et SD7 sur l'interaction RevErb α / SMRT

L'effet des ligands SGN et SD7 a également été étudié sur la formation du complexe RevErb α -LBD avec le peptide SMRT ID1 rhodamine 110. Ce complexe n'étant pas naturellement associé *in vivo* l'effet des ligands ne peut pas être prédit. Cependant, ce travail d'anisotropie est mis en place avec des fragments de protéine et les alignements de séquences des peptides NCor ID1 et SMRT ID1 démontrent une forte similarité. De ce fait, tout comme son action sur le complexe RevErb α / NCor

ID1 fluorescéine, le SGN favorise l'association du complexe RevErb α -LBD / SMRT ID1 rhodamine 110 (Figure 3.8). L'affinité est de 190 nM en absence de ligand et de 80 nM en sa présence, prouvant bien son action stabilisante de l'interaction (Tableau 3.3). L'effet du SGN est donc similaire quel que soit le peptide corépresseur.

Comme pour NCor ID1, le ligand SD7 a un effet antagoniste sur la formation du complexe RevErb α -LBD avec le peptide SMRT ID1 rhodamine 110. Effectivement, sa présence entraîne une diminution d'affinité en augmentant le K_D de 190 nM en absence de SD7 à 900 nM en sa présence (Tableau 3.3).

Concernant le SGN, son effet n'est pas exactement le même en présence des 2 peptides corépresseurs. Avec le NCor ID1 fluorescéine l'affinité est augmentée d'un facteur 4,5, alors qu'avec SMRT ID1 rhodamine 110 l'affinité est augmentée de 2,26. L'effet du ligand est moins importante sur ce dernier probablement car son affinité pour le RevErb α -LBD était déjà plus grande en absence de ligand, l'effet du ligand est donc plus faible. L'effet déstabilisant du SD7 quant à lui est d'un facteur 4 quel que soit le peptide corépresseur NCor ou SMRT.

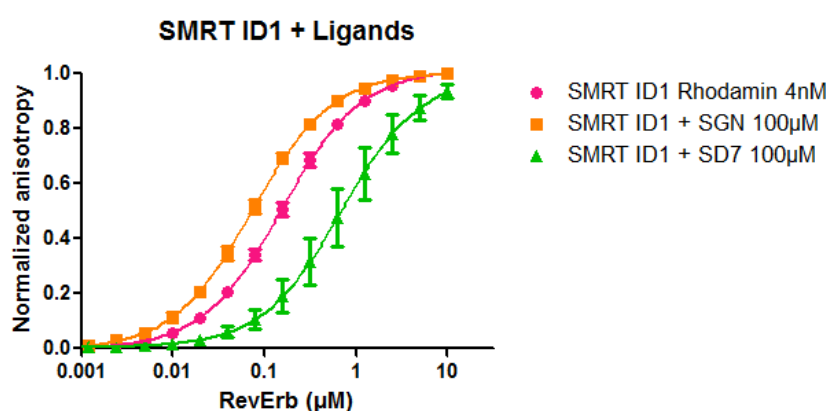


Figure 3.8 : Profil d'anisotropie de fluorescence pour la liaison du LBD de RevErb α avec le peptide SMRT ID1 rhodamine 110 en présence ou en absence de ligand à 100 μ M. Les valeurs d'anisotropies de fluorescence sont normalisées entre 0 et 1 comme expliqué dans la partie Matériels et Méthodes. Toutes les mesures ont été réalisées dans du tampon anisotropie (Annexes 1).

L'effet de ces ligands sur l'interaction des protéines pleine taille est à confirmer par la microscopie de fluorescence *in cellulo* qui a été mise en place dans une deuxième partie. Leurs actions sur l'activité transcriptionnelle seront également étudiées par des essais de gènes rapporteurs à la luciférase. Cette dernière partie ne sera pas présentée dans ce manuscrit car c'est un travail en cours de réalisation.

IV. Etude de l'effet de l'hème et des ligands sur le complexe RevErb α / NCor5

L'effet des ligands est naturellement testé sur l'interaction RevErb α -LBD / NCor5 Atto647N. Ce peptide NCor5 comporte simultanément les domaines ID1 et ID2, il est nécessaire de vérifier que ce qui a été observé précédemment est correct et que l'effet des ligands est similaire sur l'interaction du peptide NCor5 avec RevErb α -LBD.

Il est apparent dans la figure 8 que les ligands ont le même effet sur l'interaction de RevErb α -LBD / NCor5 Atto647N que sur celle de RevErb α -LBD / NCor ID1 fluorescéine. Cela confirme donc que le SGN et le SD7 sont respectivement stabilisateur et déstabilisateur de l'interaction et la modifie d'un facteur 4 environ dans les 2 cas (Figure 3.9). En revanche, bien que l'effet dissociatif de l'hème soit confirmé, son action est beaucoup plus importante sur l'interaction RevErb α -LBD / NCor5 Atto647N (diminution de l'affinité d'un facteur 150) qu'en présence de NCor ID1 fluorescéine (diminution de l'affinité d'un facteur 15) (Tableau 3.3). Ces données ne correspondent pas avec ce qui a été démontré, c'est à dire que son action est opposée selon que le travail soit réalisé en présence de peptides (*in vitro*) ou bien avec les protéines pleine taille (*in vivo*) (Raghuram *et al*, 2007). Si l'hème a des effets déstabilisants sur le complexe (sur les peptides NCor avec le LBD de RevErb α) et que le domaine ID2 stabilise l'interaction entre RevErb α et NCor, plus le peptide est long et moins celui-ci devrait être gêné par la présence de l'hème, ce qui ne semble pas être le cas ici. L'effet déstabilisateur de l'hème est 10 fois plus grand pour le peptide comportant les deux IDs.

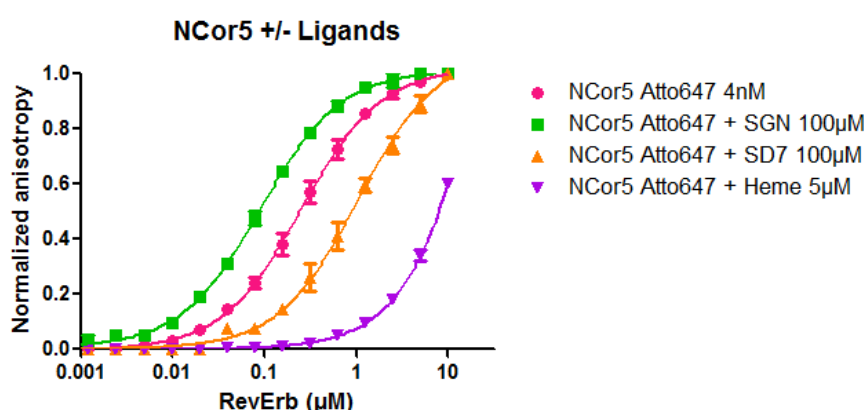


Figure 3.9 : Profil d'anisotropie de fluorescence pour la liaison du LBD de RevErb α avec le peptide NCor5 Atto647N en présence ou en absence de ligand SGN et SD7 à 100 μ M ou d'hème à 5 μ M. Toutes les mesures ont été réalisées dans du tampon anisotropie (Annexes 1).

K_D (app) (μ M)	Peptide seul	Peptide + Hème 5 μ M	Peptide + Hème 10 μ M	Peptide + SGN 20 μ M	Peptide + SGN 100 μ M	Peptide + SD7 20 μ M	Peptide + SD7 100 μ M
NCor ID1 Fluorescéine	0,56 $\pm$ 0,16	8,28 $\pm$ 1,39	13,73 $\pm$ 4,4	0,08 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,04	1,85 $\pm$ 0,51	3,8 $\pm$ 2,28
SMRT ID1 Rhodamine	0,19 $\pm$ 0,06	4,19 $\pm$ 0,72	6,27 $\pm$ 1,02		0,08 $\pm$ 0,01		0,9 $\pm$ 0,49
NCor5 Atto 647N	0,35 $\pm$ 0,13	45,77 $\pm$ 30,03			0,11 $\pm$ 0		1,44 $\pm$ 0,37

Tableau 3.3 : Tableau récapitulatif des constantes d'affinité (K_D) obtenus pour l'interaction du RevErb α -LBD avec les peptides NCor ID1 fluorescéine, SMRT ID1 Rhodamine 110 et NCor5 Atto647N en présence et en absence de ligands : Hème à 5 ou 10 μ M, SGN et SD7 à 20 ou 100 μ M.

L'effet de l'hème sur les protéines pleine taille doit donc être confirmé. Il peut également être intéressant de créer plusieurs mutants de NCor et de vérifier à quel moment l'effet de l'hème, sur le complexe, devient associatif. Ceci serait réalisé sur les protéines entières et pourrait être testé en microscopie de fluorescence.

V. Conclusions et discussion

Plusieurs éléments ont ici été démontrées dans cette partie, à commencer par la fixation préférentielle du LBD de RevErb α avec le peptide NCor ID1 Fluorescéine. L'affinité de ce dernier pour le LBD du RN est de 0,56 μ M (Tableau 3.4 – Figure 3.16). Cependant, connaissant la stœchiométrie de fixation du complexe répresseur *in vivo* qui est de 2 protéines RevErb α pour une protéine NCor (Zamir *et al*, 1997) il paraît impossible que le domaine ID1 interagisse simultanément avec les 2 RevErb α . De ce fait, les domaines ID2 et ID3, tous deux marqués à la fluorescéine, doivent intervenir lors de l'association du complexe. Cela a d'ailleurs été démontré avec le peptide NCor5 Atto 647N qui contient simultanément les 2 domaines ID1 et ID2. En effet, l'affinité de celui-ci pour RevErb α a été estimée à 0,35 μ M (Tableau 3.4 – Figure 3.16). Des compétitions ont par ailleurs confirmé que le peptide NCor5 non marqué présente une affinité de 0,55 μ M pour RevErb α , alors que celle du peptide NCor ID1 non marqué est de $5,09 \pm 0,82$ μ M (Tableau 3.4 – Figure 3.16). Il est clair que le domaine ID2 de NCor stabilise le complexe.

Une partie de l'étude a été consacrée au corépresseur SMRT, l'anisotropie de fluorescence a permis d'établir que les peptides SMRT ID1 rhodamine 110 et SMRT ID2 Fluorescéine présentent respectivement des affinités de 0,19 μ M et de 1,15 μ M (Tableau 3.4 – Figure 3.16) pour le LBD de RevErb α . La grande similarité de séquence entre NCor et SMRT, en particulier des domaines IDs, explique leur fixation comparable à RevErb α (Hu and Lazar 1999). Le corépresseur SMRT n'a jamais clairement été identifié comme se liant à RevErb α . En effet, des travaux ont précisé que celui-ci n'avait pas la capacité de se lier au récepteur nucléaire *in vivo*, lorsque ce dernier est lié à l'ADN (Zamir *et al*, 1997). Le peptide SMRT ID1 a tout de même été identifié *in vitro* comme se liant de manière assez forte à RevErb α -LBD par la technique de Luminex (Raghuram *et al*, 2007). C'est une technologie commerciale permettant d'évaluer la liaison de plusieurs peptides corépresseurs avec le LBD de RevErb α (281-614, aucune délétion n'est indiquée) marqué d'un fluorophore. L'intensité de fluorescence mesurée est témoin de l'interaction entre les peptides qui sont fixés sur des billes de sépharose et de la protéine marquée d'un fluorophore. Des valeurs arbitraires en mesure d'intensité de fluorescence (MFI) sont obtenues pour les 2 peptides corépresseurs NCor ID1 et SMRT ID1 de respectivement 350 et 600 MFI, une différence d'affinité d'un facteur 2 environ entre les 2 peptides est notée. Nos peptides SMRT ID1 et NCor ID1, utilisés en anisotropie de fluorescence, sont plus courts de 8 résidus en N-ter et de 6 résidus en C-ter par rapport à ceux de la publication (Raghuram *et al*, 2007). Cependant, il est difficile de comparer les 2 techniques (anisotropie de fluorescence et Luminex) car elles n'apportent pas exactement les mêmes informations. Alors que l'anisotropie de fluorescence permet de déterminer des constantes d'affinité des complexes précises et justes, la technique Luminex permet de comparer les affinités entre elles car les valeurs données en MFI sont arbitraires et ne peuvent être comparées à d'autres valeurs d'affinité. De plus, le LBD de RevErb α , utilisé dans la publication Raghuram *et al*, 2007, est marqué avec un fluorophore et les peptides corépresseurs sont tous fixés sur des billes de sépharose. Il n'a jamais été vérifié au cours de cette étude l'influence des fluorophores ou des billes sur l'interaction, ni comment cela pouvait affecter les affinités. L'anisotropie de fluorescence, en revanche, permet la détermination de constantes d'affinité justes des peptides non marqués avec le RevErb α -LBD. D'autre part, au cours de cette étude Luminex, plusieurs peptides ont été testés pour leur affinité avec le RevErb α -LBD. Ces peptides sont tous plus long que ceux que nous avons utilisés pour l'anisotropie de fluorescence, cependant, aucune affinité n'a été déterminée pour les peptides SMRT ID2, NCor ID2 et ID3 confirmant le fait que cette technique n'est pas la meilleure approche pour l'étude d'une interaction précise *in vitro* ni pour la détermination de constantes d'affinité justes.

Les résultats obtenus en anisotropie de fluorescence démontrent, par l'obtention de constantes d'affinité précises, que la liaison du peptide SMRT ID1 non marqué au RevErb α -LBD est environ 3 fois supérieure comparée à celle de NCor ID1 non marqué. En revanche, l'affinité du peptide NCor5 non marqué pour le RevErb α -LBD est environ 2 fois plus importante que celle de SMRT ID1 non marqué. Il est clair que le domaine ID2 stabilise l'interaction des 2 protéines. Cependant, les affinités des peptides SMRT ID1 et ID2 pour le LBD de RevErb α sont réelles, il n'y a aucune raison, au vue de la similarité de séquences entre les 2 corépresseurs, que SMRT ne puisse pas s'associer à RevErb α *in vitro* et *in vivo*. Ce travail est réalisé avec le LBD du récepteur nucléaire et des peptides issus des corépresseurs. Ce sont donc des petits fragments de protéines mis en contact et au vue de la similarité des séquences des IDs des corépresseurs (Hu and Lazar 1999), il n'est pas surprenant que RevErb α présente une affinité importante pour les 2 IDs 1 provenant de NCor ou de SMRT. Les motifs CoRNR1 et 2, en particulier, sont hautement conservés au sein de tous les corépresseurs il n'y a donc aucune raison physique que le LBD de RevErb α n'interagisse pas avec ces peptides. Une affinité non négligeable est également détectée avec le peptide SMRT ID2 non marqué, équivalente à celle déterminée pour le peptide NCor ID1 non marqué. De plus, il a été montré que le LBD de RevErb α n'avait pas de préférence pour l'interaction avec les ID2 qu'ils soient de NCor ou de SMRT (Hu and Lazar 2001). Il est tout de même important de souligner que malgré le fait que ce travail ait été réalisé *in vitro* avec des peptides et non des protéines pleine taille, SMRT ID1 non marqué présente une affinité bien plus importante que celle de NCor ID1 non marqué. Au vue de cette interaction importante, il est difficile d'expliquer que SMRT pleine taille ne puisse pas se fixer à RevErb α pleine taille également. Bien que les affinités présentées aient été déterminées *in vitro*, il semblerait surprenant que l'interaction spécifique de SMRT à RevErb α ne soit pas détectée en microscopie de fluorescence avec les protéines pleine taille. En effet, le chapitre suivant sera consacré, entre autre, à l'analyse de l'association de ces deux corépresseurs avec RevErb α *in cellulo*. Cette analyse structurale et non fonctionnelle permettra de déterminer si les deux protéines pleine taille ont physiquement la capacité d'interagir avec RevErb α .

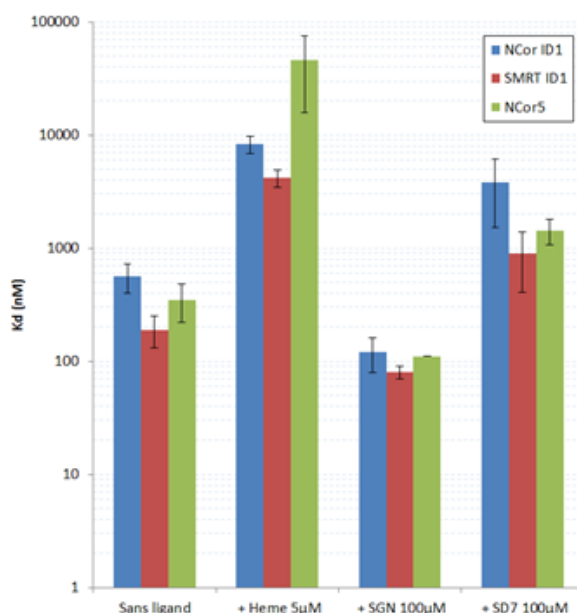


Figure 3.10 : Histogramme représentant les valeurs de K_D pour l'association du LBD de RevErb α avec les trois peptides NCor ID1, SMRT ID1 ou NCor5 marqués d'un fluorophore (à 4 nM) avec ou sans ligand SGN, SD7 ou l'hème. L'axe des ordonnées représente les valeurs de K_D en nanomolaire sur une échelle logarithmique. L'axe des abscisses indique les différentes conditions d'étude : sans ligand ou en présence de ligand, 5 μ M d'hème ou 100 μ M de SGN ou de SD7 en présence des trois peptides.

Le processus de fixation d'un récepteur nucléaire à un corépresseur est spécifique et requiert des interactions précises qui ont été décrites dans la publication Phelan *et al*, 2010. Les auteurs ont obtenu une structure cristalline du complexe RevErb α -LBD / Peptide NCor ID1. Il est intéressant d'étudier cette structure en détail afin de pouvoir la comparer avec les séquences de peptides que nous avons utilisés en anisotropie de fluorescence.

Peptides et protéines utilisées	Séquences
RevErb α -LBD (Phelan)	P281-Q614 Δ 324-422
RevErb α -LBD (Anisotropie)	P281-Q614 Δ 342-413
NCor ID1 (Phelan)	THRLITLADHICQIITQDFAR
NCor ID1 (Anisotropie)	RLITLADHICQIITQDFAR
NCor ID2 (Madauss)	LEDIIRKALMG
NCor ID2 (Anisotropie)	DPASNLGLEIIRKALMGSGFD
SMRT ID2 (Xu)	NMGLEAIIRKALMGKYDQW
SMRT ID2 (Anisotropie)	TNMGLEAIIRKALMGKYDQWEE

Tableau 3.4 : Tableau récapitulatif des structures utilisées pour la cristallisation et l'étude par anisotropie de fluorescence. Les peptides suivis de (Phelan) sont ceux utilisés dans la publication présentant la structure du complexe RevErb α -LBD avec le peptide NCor ID1, ceux suivis de (Madauss) et (Xu) sont les peptides utilisés dans la publication correspondante et présentant respectivement les structures de PR-LBD / NCor ID2 et PPAR α -LBD / SMRT ID2. Les peptides suivis de (Anisotropie) ont été utilisés pour le travail réalisé dans cette partie. Les séquences sont représentées dans la partie droite du tableau. Les parties déléstées sont représentées par le symbole Δ et le motif CoNRN1 est surligné en rose. Les résidus indispensables à l'interaction avec le RevErb α -LBD sont conservés entre les 2 peptides et surlignés en gras.

Le tableau ci-dessus regroupe les séquences de l'ensemble des protéines et peptides utilisés dans la publication de Phelan *et al*, 2010 et les nôtres (Anisotropie). Je commence par présenter la structure cristalline complète parue dans la publication Phelan *et al*, 2010 en détaillant les domaines essentiels à l'interaction des deux protéines. Je comparerai ensuite cette structure avec les séquences utilisées pour l'anisotropie de fluorescence et les affinités qui ont été déterminées. Nous pourrons ainsi appréhender le mécanisme de fixation *in vitro* dans sa totalité.

Le LBD pleine taille de RevErb α (281-614) avait des problèmes de solubilité, une délétion a donc été réalisée (281-614 Δ 324-422) entraînant la perte du domaine riche en proline entre les hélices α 1 et α 3. Ce mutant du LBD de RevErb α a été cristallisé avec le peptide NCor ID1 (2045-2065) (Figure 3.11). Malgré la déplétion et l'absence d'hélice H12, la structure globale de RevErb α -LBD est semblable à tous les LBD des récepteurs nucléaire. L'hélice α 10 de RevErb α permet la formation en dimère avec l'hélice α 10 d'un deuxième RevErb α .

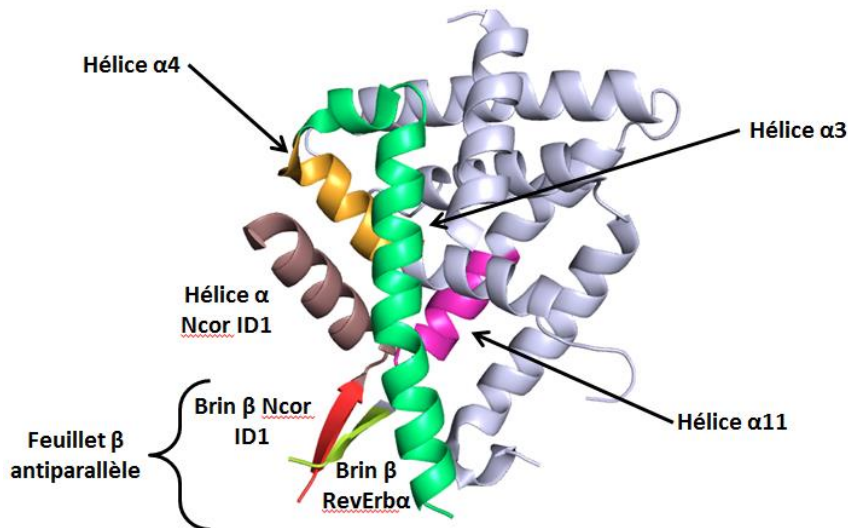


Figure 3.11 : Structure cristallographique du LBD de RevErb α lié au peptide NCor ID1. L'hélice α du peptide corépresseur est représentée en violet clair et le feuillet beta antiparallèle qu'il forme avec RevErb α est coloré en rouge, celui du récepteur nucléaire est en jaune. Les hélices de RevErb α établissant des interactions avec le peptide NCor ID1 sont représentées en vert, orange et rose et correspondent respectivement aux hélices α 3, 4 et 11 (Phelan *et al*, 2010).

La structure générale du RevErb α -LBD est composée de 11 hélices α , celles qui participent principalement à la liaison du peptide NCor ID1 sont les hélices α 3, 4 et 11 (Figure 3.12 **A**). Elles permettent la stabilisation du corépresseur dans la poche de fixation des corégulateurs. L'hélice α 3, s'étendant de la Valine 432 à la Sérine 464, est repositionnée à partir de la Proline 458 et participe à la stabilisation du peptide corépresseur. D'autre part, elle établit plusieurs interactions avec le peptide NCor ID1. C'est ainsi que des liaisons hydrogènes sont formées entre l'Histidine 2046 avec la Glutamine 437 et le Tryptophane 436 (Figure 3.12 **B**), l'Histidine 2054 avec la Thréonine 444 (Figure 3.12 **C**) et la Phénylalanine 2063 avec les résidus 451 (Valine), 461 (Arginine), 465 (Glutamine) (Figure 3.12 **D**). Une molécule d'eau permet la liaison de l'acide aspartique 2062 avec la Lysine 455 (Figure 3.12 **E**). L'hélice α 4 s'étend de la Glutamine 465 jusqu'à la Glycine 475 et comprend des résidus participant à la liaison du peptide NCor ID1. Des liaisons hydrogène sont établies entre la Phénylalanine 2063 avec la Valine 469 et la Leucine 472 (Figure 3.12 **D**), la Thréonine 2060 avec la Lysine 473 (Figure 3.12 **F**). La Lysine 605 de l'hélice α 11 (Résidus 583 à 614) forme une liaison hydrogène avec la leucine 2051 (Figure 3.12 **G**).

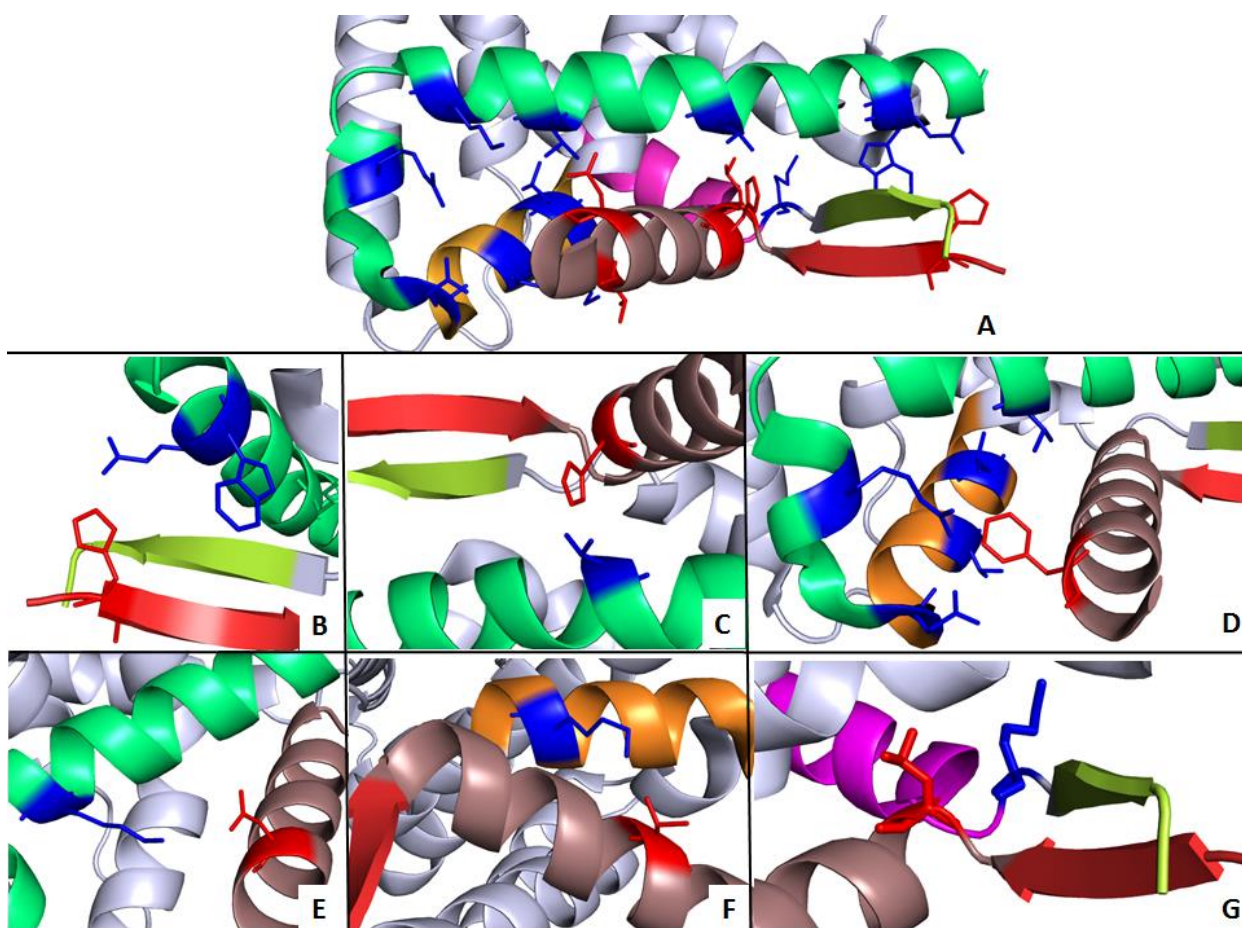


Figure 3.12 : Illustration détaillée des liaisons permettant la fixation du peptide NCor ID1 dans la poche de liaison des corégulateurs du LBD de RevErb α . Les résidus du corépresseurs sont colorés en rouge et ceux du récepteur nucléaire sont colorés en bleu. On retrouve le feuillet beta antiparallèle formé entre NCor ID1 (rouge clair) et RevErb α (jaune). L'hélice α du CoR est représentée en rose et les hélices α 3, 4 et 11 de RevErb α -LBD sont respectivement colorées en vert, orange et rose. (A) Représentation générale des interactions s'établissant entre NCor ID1 et les hélices α 3, 4 et 11 de RevErb α -LBD. (B) Liaison hydrogène entre l'Histidine 2046 (NCor) avec la Glutamine 437 et le Tryptophane 436 (RevErb α , hélice α 3). (C) Liaison hydrogène entre l'Histidine 2054 (NCor) avec la Thréonine 444 (RevErb α , hélice α 3). (D) Liaison hydrogène entre la Phénylalanine 2063 (NCor) avec la Valine 451, l'Arginine 461 (RevErb α , hélice α 3), la Valine 469 et la Leucine 472 (RevErb α , hélice α 4). (E) Liaison par une molécule d'eau de l'Asparagine 2062 (NCor) avec la Lysine 455 (RevErb α , hélice α 3). (F) Liaison hydrogène entre la Thréonine 2060 (NCor) avec la Lysine 473 (RevErb α , hélice α 4). (G) Liaison hydrogène entre la Leucine 2051 (NCor) et la Lysine 605 (RevErb α , hélice α 11).

La Lysine 605 marque la transition en un nouveau brin beta. La formation de ce feuillet particulier a précédemment été décrite pour le récepteur nucléaire RAR α . L'interaction de celui-ci avec les corépresseurs NCor et SMRT entraîne la formation d'un feuillet beta antiparallèle entre le récepteur nucléaire et le corépresseur qui confère l'activité répressive de la transcription. La liaison d'un ligand agoniste, en revanche, induit la transition du brin beta en hélice α permettant la formation de l'hélice H11 qui provoque la relâche du corépresseur et le repositionnement de l'hélice H12 suivi du recrutement du coactivateur. (Le Maire *et al*, 2010). Ce même principe s'applique au complexe RevErb α -LBD / NCor ID1. L'hélice α H11 de RevErb α se termine par un brin beta et par association avec le brin beta du peptide NCor ID1 permet la formation d'un nouveau feuillet beta antiparallèle. Le carboxyle de la Thréonine 2045 de NCor établit une liaison hydrogène avec l'amine de la Valine 611 de RevErb α (Figure 3.13) et initie le feuillet beta qui établit des liaisons hydrogènes

avec ses partenaires et finit avec le carboxyle de l'Isoleucine 2049 lié à l'amine de la Leucine 606 (Figure 3.13). Considérant la fonction de ce feuillet β sur l'activité répressive de la transcription, il semblerait qu'il ait également un effet stabilisateur de l'interaction entre le RevErb α -LBD et le peptide NCor ID1. La transition en hélice α du peptide NCor ID1, suite à la formation de ce feuillet β , débute avec la Leucine 2051 et marque le début des 15 résidus amphipathique de l'hélice α du peptide NCor ID1. Ces 15 résidus comportent le motif CoRNR1 (IxxII) : Isoleucine 2055, 2058 et 2059 (Figure 3.13). Cette hélice (Leucine 2051 à Phénylalanine 2063) traverse l'entière poche de liaison des corégulateurs avec les chaînes latérales hydrophobes pointant vers la surface de liaison de RevErb α la plus hydrophobe.

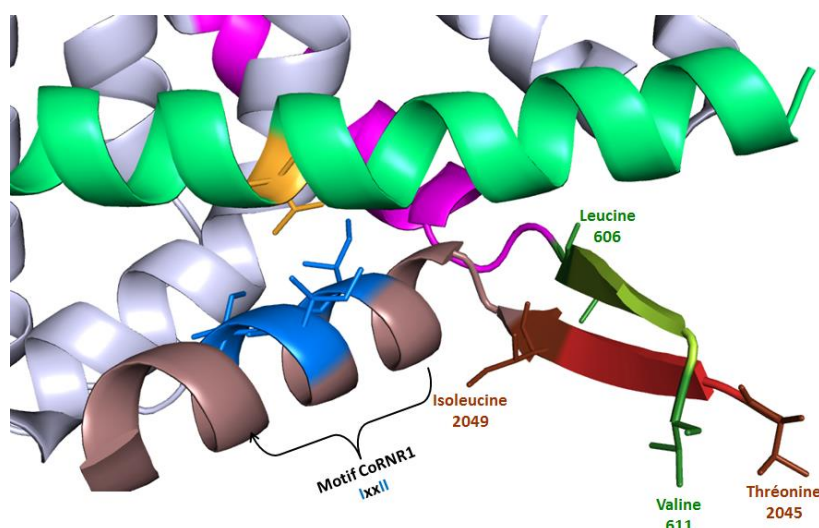


Figure 3.13 : Illustration de la fixation du peptide NCor ID1 (hélice rose pâle et brin beta rouge) dans la poche hydrophobe du LBD de RevErb α . Le motif CoRNR1 (IxxII) établit des liaisons hydrogènes avec l'hélice α 3 (en vert) notamment avec la Valine 447 (en orange). Les résidus nécessaires et suffisants à l'interaction (les Isoleucines 2055, 2058 et 2059) sont représentés en bleu. L'hélice α 11 de RevErb α (en rose foncée) se termine par la transition en un brin beta (en jaune) permettant la formation d'un feuillet beta antiparallèle portant une partie de l'activité de la répression de la transcription et s'établissant entre la Thréonine 2045 (en marron) et la Valine 611 (vert foncé) et entre l'Isoleucine 2049 (en marron) et la Leucine 606 (vert foncé).

Le peptide NCor ID1 que nous utilisons est plus court en N-ter de 2 acides aminés, de ce fait, le feuillet beta n'est pas complètement formé ce qui expliquerait l'affinité plutôt faible de celui-ci pour RevErb α -LBD que nous observons en anisotropie de fluorescence. En revanche, notre peptide NCor5 contient la totalité de la séquence permettant la formation complète de ce feuillet beta. L'association de ce peptide à RevErb α -LBD est par conséquent de plus haute affinité avec une valeur de K_D de 550 nM (déterminée avec le peptide non marqué). Ceci démontre le fait que la formation de ce feuillet est d'une part fonctionnelle, en inhibant la répression de la transcription, et d'autre part structurale vu qu'elle stabilise la liaison de RevErb α à NCor. De plus, le domaine CoRNR2 est également présent sur le peptide NCor5 stabilisant d'autant plus la liaison des 2 protéines. En effet, le peptide NCor ID2 non marqué présente une affinité de 10 μ M pour le RevErb α -LBD ce qui n'est pas négligeable et explique la forte affinité du peptide NCor5. Il serait intéressant de tester un mutant, voire plusieurs, en microscopie de fluorescence afin de prouver que la formation du feuillet, totale ou partielle, influe l'interaction entre RevErb α et NCor pleine taille.

Nous pouvons également comparer nos résultats aux structures parues avec les deux peptides corépresseurs SMRT ID2 et NCor ID2 lié respectivement à PPAR α (Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyssome) et à PR (Récepteur à la progestérone) (Xu *et al*, 2002) (Madauss *et al*, 2007). Les 2 peptides, utilisés dans les structures cristallographiques, sont plus courts en N et C-ter de

plusieurs résidus (1 et 2 de moins en N et C-ter pour SMRT ID2 et 7 et 3 de moins en N et C-ter pour NCor ID2). Un alignement de séquence avec le complexe RevErb α -LBD / NCor ID1 révèle que les 3 peptides se fixent exactement au même endroit sur le LBD du récepteur, c'est-à-dire à la surface de la poche hydrophobe de liaison des corégulateurs (Figure 3.14). Ces observations confirment le fait que les protéines s'organisent en complexe afin que le corépresseur puisse avoir 2 domaines de fixation au LBD du récepteur nucléaire, donc un homodimère de RevErb α pour une seule molécule de NCor. Cela explique la faible affinité du peptide NCor ID3 ; *in vivo* ce peptide ne s'associe pas directement à RevErb α , cependant, la similarité de séquence avec les autres peptides corépresseurs, ainsi que la présence du motif CoRNR, permet à celui-ci de présenter une faible affinité *in vitro* pour le RevErb α -LBD. Ce domaine ID3 est donc stabilisateur pour la formation du complexe.

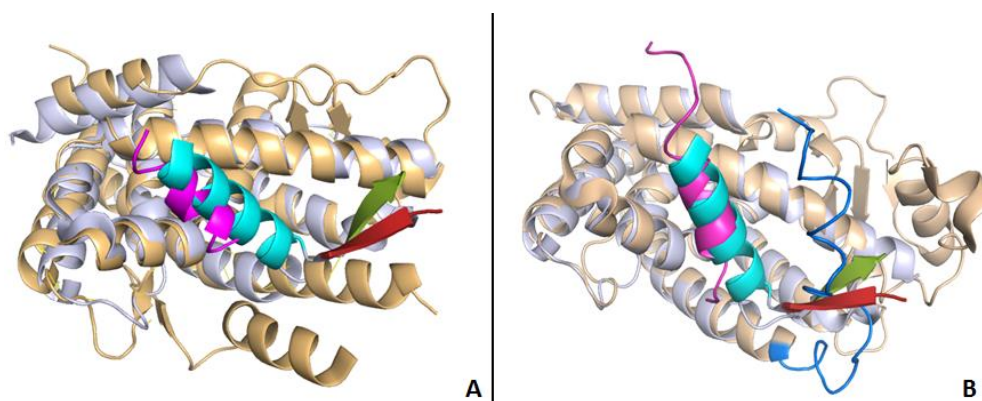


Figure 3.14 : Alignements de structures cristallographiques représentant : (A) RevErb α -LBD (gris clair) / NCor ID1 (bleu clair) avec PR (beige) / NCor ID2 (rose). (B) RevErb α -LBD (gris clair) / NCor ID1 (bleu clair) avec PPAR α (beige) / SMRT ID2 (rose).

La structure de PPAR α lié à SMRT ID2 révèle également que le peptide utilisé forme trois tours d'hélice α lorsqu'il est lié au récepteur nucléaire. Cette conformation s'étend dans l'espace qui est laissé par le repositionnement de l'hélice H12, ce qui l'empêche de se replier dans sa forme active (Xu *et al*, 2002). Le rôle des peptides ID2 des corépresseurs serait donc structural, leur liaison contrôlant la position de l'hélice H12. Cependant, RevErb α ne possède pas d'hélice H12, ce qui peut expliquer l'affinité moindre du peptide SMRT ID2. En outre, les peptides corépresseurs présentent tous une similarité de séquence, également conférée par la présence des motifs CoRNRs, les différences d'affinité *in vitro* ne devraient pas être si marquées. Il est évident qu'une spécificité de liaison, dépendante de la séquence, existe et contrôle le mode d'association de ces protéines. Ce qu'il est important de soulever ici c'est que malgré la présence du motif CoRNR dans le peptide NCor ID3, son affinité au RevErb α -LBD est négligeable, ce qui semble être confirmé par les informations collectées. Si la liaison du peptide SMRT ID1 n'était pas spécifique, il ne serait théoriquement pas possible de la quantifier, or elle est réelle et mesurable *in vitro* par anisotropie de fluorescence. Il semblerait donc que RevErb α s'associe au corépresseur SMRT de manière spécifique. L'association de ce peptide n'est pas fortuite et il est important de la vérifier *in cellulo*.

L'hème a été reconnu comme ligand naturel de RevErb α , son effet a été étudié majoritairement sur l'activité transcriptionnelle par des tests de gènes rapporteurs à la luciférase ou encore par des ChIP (Yin *et al*, 1997). L'hème est donc bien connu *in vivo*, mais notre étude dans ce cas est plutôt basée sur la structure et le mécanisme d'interaction précis de ces protéines. Comment expliquer le fait que ce ligand naturel puisse être essentiel à la répression de la transcription mais empêche l'association des domaines rapportés comme étant nécessaires et indispensables à l'interaction des 2 protéines ? En effet, nos résultats d'anisotropie, *in vitro*, confirment le fait que

l'hème déstabilise le complexe en question, en abaissant l'affinité d'un facteur 10 environ (Tableau 3.4). Malgré la présence du domaine ID2 sur le peptide NCor5, l'hème a également un fort effet déstabilisateur sur son association avec RevErb α entraînant une affinité de 45,77 μ M plutôt que 0,35 μ M obtenue en absence d'hème (Tableau 3.4 – Figure 3.10). D'autre part, ce dernier a aussi un effet déstabilisant sur l'association du complexe RevErb α -LBD / SMRT ID1. La constante d'affinité trouvée dans ce cas est de 4,19 μ M, alors qu'en absence d'hème elle est de 0,19 μ M (Tableau 3.4 – Figure 3.10). Une structure cristallographique de l'hème fixé au récepteur nucléaire RevErb β -LBD a été résolue (Pardee *et al*, 2009) révélant que l'hème se positionne dans la poche de fixation des ligands entraînant un repositionnement des hélices α 3 et α 11 (Figure 3.15 **A** et **B**). En effet, dans sa forme non liée à un ligand, les hélices α 3 et α 11 sont positionnées de sorte à protéger la poche de fixation qui est très hydrophobe (Figure 3.15 **A**). En revanche, la fixation de l'hème à l'intérieur de cette zone entraîne un repositionnement des 2 hélices permettant sa stabilisation (Figure 3.15 **B**). Le ligand est stabilisé par sa liaison aux résidus Cystéine 384 (hélice α 3) et Histidine 568 (hélice α 11) (Figure 3.15). Cependant, il n'a pas été possible d'obtenir une structure cristallographique du récepteur nucléaire (RevErb α ou β) lié simultanément à l'hème et à un peptide corépresseur. On peut supposer que l'hème présente une grande affinité pour RevErb α , en effet, sa fixation dans la poche de liaison du ligand gêne la liaison du peptide NCor ID1 empêchant son interaction avec le LBD du récepteur nucléaire (Phelan *et al*, 2010). Afin de mieux comprendre les mécanismes de fixation de ces 2 molécules, une comparaison des 2 structures cristallographiques présentées ci-dessus est effectuée.

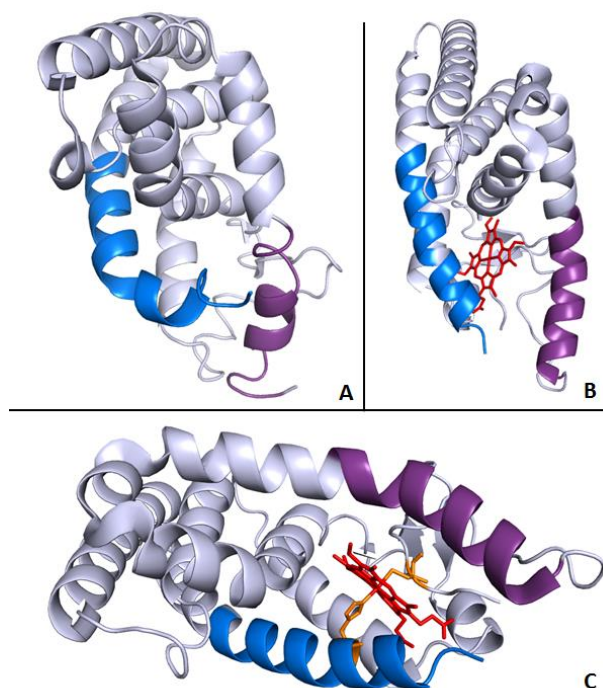


Figure 3.15 : Représentation de l'organisation structurale du RevErb β -LBD en présence ou en absence d'hème. Les hélices α 3 et α 11 sont respectivement colorées en violet et en bleue. **(A)** Organisation de RevErb β -LBD dans sa forme non liée à l'hème (Woo *et al*, 2007). **(B)** Réorganisation du RevErb β -LBD lorsqu'il est lié à l'hème (en rouge). **(C)** Illustration des résidus essentiels à la fixation de l'hème. Celui-ci (en rouge) est stabilisé à l'intérieur de la poche de liaison des ligands par sa liaison à la Cystéine 384 (hélice α 3) et l'Histidine 568 (hélice α 11) représentés en orange.

Il est certain que la fixation de ce ligand entraîne d'importants changements structuraux au sein du complexe mais à quel point affectent ils l'interaction ? Comparons les structures de RevErb α -LBD lié au peptide NCor ID1 et RevErb β lié à l'hème ou non. La différence structurale entre RevErb β -LBD (non lié) et RevErb α -LBD réside essentiellement dans le feuillet beta. Il est formé en présence de NCor ID1 mais pas en présence d'hème ce qui entraîne le repositionnement de l'hélice α 3 loin du

sillon hydrophobe dans lequel est fixé NCor ID1 (Figure 3.16).

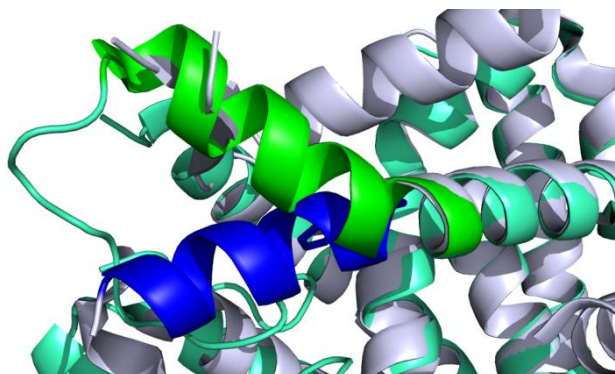


Figure 3.16 : Représentation des hélices $\alpha 3$ des récepteurs nucléaires RevErb α lié à NCor ID1 et RevErb β lié à une molécule d'hème. Les hélices de ces RNs liés sont respectivement représentées en bleu et en vert.

La figure 3.16 illustre le déplacement de cette hélice $\alpha 3$ suivant que le récepteur nucléaire est lié au peptide NCor ID1 ou à l'hème. La position particulière de cette hélice, dans la forme liée de RevErb β , va empêcher la fixation d'un corépresseur car elle provoque des encombrements stériques entre le Tryptophane 402 contenu dans l'hélice $\alpha 3$ avec le brin beta de NCor ID1. D'autre part, la liaison du peptide NCor ID1 semble impossible puisqu'elle entrerait en compétition avec la position de la partie C-ter de l'hélice $\alpha 3$ (Figure 3.17 A). En supposant que la liaison de l'hème à RevErb α entraîne les mêmes changements structuraux que ceux survenant dans RevErb β , en particulier au niveau de l'hélice $\alpha 3$, alors la formation du feuillet beta antiparallèle, entre RevErb α et NCor n'est pas possible en présence d'hème (Figure 3.17 B). Sachant également que la formation de ce feuillet confère une partie de l'activité répressive de la transcription, il est surprenant que l'hème soit rapporté comme étant indispensable à la répression *in vivo*.

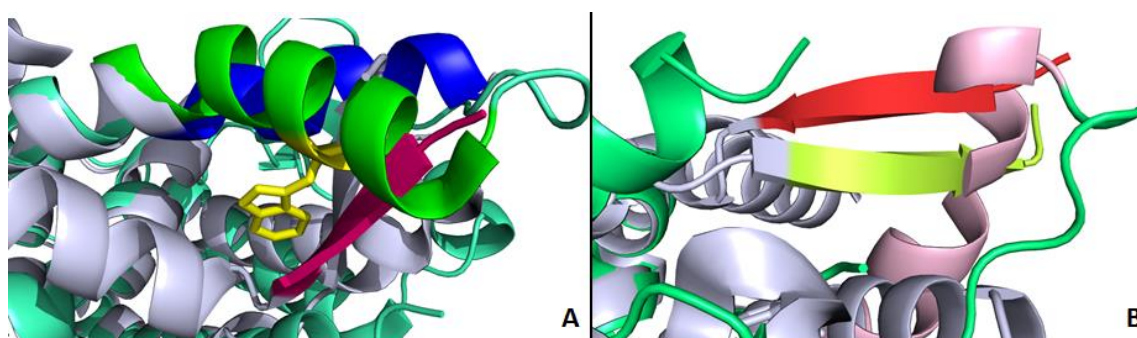


Figure 3.17 : Représentation de l'alignement des structures RevErb α -LBD / NCor ID1 avec RevErb β / Hème
(A) Illustration des clashes stériques qui se produiraient si l'hème se fixe à RevErb α -LBD simultanément avec le peptide NCor ID1. Les hélices $\alpha 3$ de RevErb α -LBD et RevErb β -LBD sont respectivement de couleur bleu et verte. Le tryptophane 402 de RevErb β (contenu également dans l'hélice $\alpha 3$) est représenté en jaune. **(B)** Illustration de l'effet de l'hème sur le repositionnement de l'hélice $\alpha 3$ et sur l'impossibilité de formation du feuillet beta antiparallèle (qui est formé dans la structure RevErb α -LBD / NCor ID1 en absence d'hème). Le brin beta que forme RevErb α avec NCor est coloré en jaune clair et celui de NCor ID1 en rouge. L'hélice $\alpha 3$ est représentée en rose pâle.

Ces représentations sont basées sur l'alignement des 2 structures cristallographiques RevErb α -LBD / NCor ID1 et RevErb β -LBD / Hème en supposant que la zone de fixation de l'hème soit la même dans les 2 récepteurs nucléaires et que les changements structuraux liés à cette liaison soient identiques. Elles expliquent également pourquoi aucune structure cristalline du complexe RevErb α -LBD / NCor ID1 lié à l'hème n'ait pu être obtenue. L'étude en microscopie de fluorescence permettra de déterminer si l'ajout de l'hème favorise ou défavorise l'interaction entre les protéines RevErb α et NCor pleine taille.

L'anisotropie de fluorescence a été initialement mise en place pour le criblage de ligand. Parmi la vingtaine de ligands étudiés par cette technique *in vitro*, deux ont été sélectionnés pour continuer les études *in cellulo*. Le SGN améliore l'association de RevErb α avec le peptide NCor ID1 fluorescéine en faisant passer l'affinité de 0,56 μ M, en son absence, à 0,08 μ M (Tableau 3.4 – Figure 3.10). Le SGN a effectivement été identifié comme favorisant l'interaction entre RevErb α et NCor par FRET (Meng *et al*, 2008). Ceci a été vérifié par nos analyses de microscopie de fluorescence qui ont permis de déterminer si ce ligand augmente la formation de complexe ou pas *in cellulo*. Par contre, l'effet de ce ligand sur l'activité transcriptionnelle des gènes régulés par RevErb α / NCor n'a pas été étudié. Les essais de gènes rapporteurs à la luciférase, que nous accomplirons dans la suite de ces travaux, permettront de conclure sur l'effet réel du ligand *in vivo*. Le deuxième ligand à avoir été sélectionné est le SD7. Sa présence entraîne une diminution de l'affinité entre le LBD de RevErb α le peptide NCor ID1 fluorescéine. En effet, l'affinité des deux protéines en absence de ligand est de 0,55 μ M, alors qu'en sa présence elle de 1,85 μ M (Tableau 3.4 – Figure 3.10). L'action du SD7 a initialement été étudiée sur la formation du complexe ROR α avec des coactivateurs. Il a pour effet d'empêcher l'association de ces protéines entraînant une diminution de la transcription des gènes cibles (Kumar *et al*, 2011). L'effet de ces deux ligands a été étudié dans la deuxième partie portant sur la microscopie de fluctuation de fluorescence *in cellulo*. La détermination du nombre de complexes formés en présence ou en absence de ligand a été étudié et a permis de conclure quant à l'action associative ou dissociative qu'ils peuvent avoir sur le complexe RevErb α / NCor pleine taille. Pour aller plus loin, l'effet des ligands sur l'activité transcriptionnelle du gène G6P sera étudié dans la suite de ces travaux par des tests de gènes rapporteurs à la luciférase, ce qui permettra de confirmer clairement l'effet de ceux-ci sur un des gènes cibles. La G6Pase intervenant dans la voie de synthèse du glucose en fait partie. Son activité transcriptionnelle en présence et en absence de ligand (y compris l'hème) sera par ailleurs étudiée. Ce travail ne sera pas présenté dans ce manuscrit, mais il permettra d'apporter plus d'informations sur l'action réelle de l'hème, du SGN et du SD7 sur le complexe corépresseur RevErb α / NCor.

L'effet de l'hème et des ligands SGN et SD7 ont été étudiés en microscopie de fluorescence dans la partie suivante afin de déterminer leur effet sur l'association du complexe corépresseur dans un contexte cellulaire. L'anisotropie de fluorescence a permis la détermination de constantes d'affinités fiables (comme le démontrent les écarts types calculés sur l'ensemble des valeurs de K_D), cependant, il ne faut pas oublier que ces constantes représentent l'affinité des peptides entre eux et non pas des protéines pleines taille. La microscopie de fluorescence permet également d'avoir accès à ce genre d'informations, mais de manière plus fastidieuse et moins automatisée. Cependant, la technique de microscopie de fluorescence qui a été utilisée apporte l'information de la stœchiométrie. La détermination du nombre de complexes formés en présence ou en absence de ligand (ou d'hème) donne une idée plus précise de l'effet de chacun sur les protéines pleine taille. Une augmentation de la quantité de complexes signifie que le ligand favorise leur association, au contraire, une diminution indique un effet défavorisant l'interaction.

	Affinité du peptide marqué (μM)	Affinité du peptide non marqué (μM)	+ SGN 100 μM Effet agoniste	+ SD7 100 μM Effet antagoniste	+ Hème 5 μM Effet antagoniste
NCor ID1 Fluorescéine	0,56 $\pm$ 0,16	5.09 $\pm$ 0,82	0,12 $\pm$ 0,04	3,8 $\pm$ 2,28	8,28 $\pm$ 1,39
SMRT ID1 Rhodamine 110	0,19 $\pm$ 0,06	1.41 $\pm$ 0,23	0,08 $\pm$ 0,01	0,9 $\pm$ 0,49	4,19 $\pm$ 0,72
NCor5 Atto647N	0,35 $\pm$ 0,13	0.55 $\pm$ 0	0,11 $\pm$ 0	1,14 $\pm$ 0,37	45,77 $\pm$ 30,03
NCor ID2 Fluorescéine	3,77 $\pm$ 0,04	10.71 $\pm$ 6.3			
NCor ID3 Fluorescéine	14,8 $\pm$ 3,7	10⁺⁶ $\pm$ 2937			
SMRT ID2 Fluorescéine	1,15 $\pm$ 0,45	7.11 $\pm$ 2.22			

Tableau 3.5 : Tableau récapitulatif des valeurs de K_D pour l'association du LBD de RevErb α avec les peptides NCor ID1, SMRT ID1 ou NCor5 en présence ou en absence de ligand SGN, SD7 ou l'hème. L'écart type indiqué est obtenue sur un minimum de deux valeurs de K_D . Les colonnes colorées en rose indiquent l'effet stabilisateur du ligand sur l'interaction. Au contraire, une colonne colorée en vert indique l'effet déstabilisateur d'un ligand sur l'interaction du LBD de RevErb α avec le peptide corépresseur considéré.

CHAPITRE 4 : RESULTATS DE MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE *IN CELLULO*

Ce chapitre est consacré à l'étude des interactions entre RevErb α et les corégulateurs dans des cellules vivantes par microscopie de fluctuation de fluorescence N&B. Après avoir démontré dans le chapitre précédent l'interaction *in vitro* du RevErb α -LBD avec les peptides NCor ID1 et SMRT ID1, l'effet des ligands (hème, SGN et SD7) a également été étudié sur la formation de ces complexes. Il a été établi que les ligands hème et SD7 déstabilisent l'association des peptides avec le récepteur nucléaire tandis que le SGN la favorise. Nous avons également étudié l'interaction du LBD RevErb α avec le peptide NCor5 (comprenant les motifs ID1 et ID2) et l'effet des ligands est similaire sur ce complexe. Le but des travaux présentés ci-dessous est de vérifier et quantifier l'interaction entre RevErb α et les corépresseurs NCor et SMRT pleine taille *in cellulo* et d'examiner les effets des trois ligands sur la formation des complexes. Ce travail a été réalisé dans des cellules Cos7 pour deux raisons ; premièrement, ces cellules n'expriment pas le récepteur nucléaire RevErb α . Il n'y aura donc pas de récepteur nucléaire endogène non marqué pour entrer en compétition avec les complexes portant les FPs. Par ailleurs, il n'y a pas non plus d'autres récepteurs nucléaires qui pourraient éventuellement rentrer en compétition avec le RevErb α transfecté pour l'interaction avec les corégulateurs.

La technique de scanning N&B utilise les fluctuations de l'intensité de fluorescence à chaque pixel d'une image de cellules fluorescentes scannée rapidement une centaine de fois afin de créer une cartographie 2D du nombre de molécules fluorescentes et leur brillance moléculaire. Le nombre dans notre volume d'excitation correspond à la concentration absolue de la molécule fluorescente et la brillance à sa stœchiométrie. Dans le cas présent, nos protéines d'intérêts (RevErb α et NCor) sont fusionnées avec des protéines fluorescentes qui sont étiquetées sur les plasmides d'expression qui sont transfectés transitoirement dans les cellules Cos7. Les FPs choisies émettent à des longueurs d'onde différentes, bien séparées dans leur absorption et leur émission afin d'éviter les phénomènes de FRET et de chevauchement spectral à la détection (bleedthrough), permettant ainsi l'attribution spécifique de la fluorescence détectée dans deux canaux séparés. Le laser biphotonique permet l'excitation simultanée des 2 FPs. En calculant le premier et le second moment des distributions de photons à chaque pixel de nos images, le signal d'intensité de fluorescence obtenu est décomposé en nombre de molécules (dont est extraite la concentration molaire des protéines présentes) et en brillance moléculaire (indicateur de l'état d'oligomérisation des protéines). La brillance permet d'isoler la fraction mobile de la fraction immobile. En effet, les molécules mobiles ont une vraie brillance (e) positive alors que la fraction immobile donnera une vraie brillance égale à 0. La covariance entre les deux canaux permet de calculer une brillance croisée (Bcc). Lorsqu'elle est positive, celle-ci démontre une interaction entre les protéines. Cette valeur de Bcc correspond au $G0x$ d'une courbe de FCCS, plus habituellement mesurée, dont la valeur indique la corrélation croisée du signal. Le rapport de cette valeur sur le plus faible $G0$ (obtenu de manière individuelle pour chaque FP) va permettre de déterminer le pourcentage de complexes formés par rapport au partenaire le moins concentré (Matériels et Méthodes). Nous commencerons par l'étude d'un complexe de protéines nucléaires connu et précédemment étudié au laboratoire (Savatier *et al*, 2010). L'interaction du récepteur nucléaire ER α avec son coactivateur Tif2 sera étudiée par N&B *in cellulo* en présence de ligand agoniste ou antagoniste. Les deux protéines sont marquées respectivement avec les FPs Cerulean et mCherry. L'utilisation des mêmes FPs que celles fusionnées à RevErb α et NCor

permet de conserver les mêmes paramètres d'observations et d'imagerie pour les deux complexes. Nous avons ainsi déterminé si la technique de N&B est efficace pour la détection de l'interaction et la quantification de l'effet des ligands. Les contrôles négatifs (mCherry et Cerulean) et positifs (mCherry-NLS-Cerulean) ont également été établis et ont renforcé la preuve de la validité de la technique pour la détermination et la quantification d'interactions protéiques spécifiques.

Les interactions entre RevErb α et NCor ont tout d'abord été examinées en absence de ligand. Ensuite, les effets des ligands sur la covariance ont été étudiés. D'autre part, ayant déterminé l'interaction entre le RevErb α -LBD avec les peptides SMRT ID1 et ID2, la liaison des protéines pleine taille a également été étudiée sur ce complexe.

I. Validation des protéines fluorescentes utilisées

Nous avons commencé par établir la validité des protéines fluorescentes utilisées, mCherry (émettant dans le rouge à 610nm) et Cerulean (émettant dans le bleu à 475nm) (Drobizhev *et al*, 2011) en vérifiant que le signal de l'une n'est pas détecté dans les deux canaux et vice versa (bleedthrough). Ce contrôle est important car le signal de chevauchement spectral à la détection (bleedthrough) est 100 fois corrélé dans les deux canaux et donne donc un signal de faux positif. Non seulement cette paire de FPs devrait diminuer le bleedthrough, mais également le FRET entre la Cerulean et la mCherry qui devrait être très peu probable. Celui-ci aurait pour effet de diminuer de façon artéfactuelle la covariance, car le FRET est anti-corrélé. Ensuite, la technique a été validée par l'utilisation d'un contrôle positif et négatif. Le contrôle positif est une protéine codant pour la séquence d'adressage au noyau (NLS) et marquée par les 2 FPs. Suite à des difficultés de coexpression des protéines fluorescentes dans le noyau des cellules Cos7, un mélange d'extrait de bactéries exprimant les 2 FPs a servi de contrôle négatif. Les mêmes FPs sont utilisées pour marquer les protéines RevErb α , NCor, SMRT, ER α et Tif2. RevErb α et Tif2 sont marqués par la mCherry, les 2 corépresseurs (NCor et SMRT) et ER α sont marqués par la Cerulean afin de corréler ce signal et de démontrer l'interaction entre les 2 protéines d'intérêts. Enfin l'effet des trois ligands a été testé sur la formation de complexes.

Les deux FPs mCherry et Cerulean ont été sélectionnées d'après leur séparation spectrale ainsi que leurs propriétés à émettre dans 2 couleurs différentes, respectivement le rouge et le bleu. Les protéines d'intérêts sont des récepteurs nucléaires et donc sont exclusivement nucléaires. L'excitation biphotonique permet, entre autres, l'excitation simultanée spécifique des 2 FPs dans la partie rouge de la bande de Cerulean et dans la partie bleue de la bande mCherry. Le signal émis est détecté par 2 détecteurs APD (Photo Avalanche Diode), le premier canal reçoit les photons émis par la mCherry et le deuxième ceux émis par la Cerulean. Afin d'être le plus précis possible dans la réattribution des signaux spécifiques à chaque FP, il a fallu dans un premier temps vérifier que le signal de la Cerulean est détecté uniquement dans le canal 2 et pas dans le 1 et vice versa pour la mCherry. Cette étape a également permis de vérifier la bonne expression des protéines d'intérêts, marquées des FPs, dans les cellules et de caractériser le niveau d'auto fluorescence car dans un cas il n'y a pas d'émission dans le canal 1 et dans l'autre le canal 2 ne détecte pas de photons. Cette partie a également permis de mettre au point les paramètres d'observation et de mesure et de déterminer la quantité optimale de plasmide à transfecter afin d'avoir suffisamment de signal pour obtenir une brillance positive, mais pas trop pour éviter l'agrégation ou la concentration trop importante de protéines dans les noyaux ce qui aboutirait à une brillance nulle et donc la corrélation croisée ne serait pas non plus détectable.

La FPs mCherry possède son pic d'excitation biphotonique à 1100 nm environ. Le laser que nous utilisons peut exciter jusqu'à 1050 nm, cependant la longueur d'onde n'est pas favorable à l'excitation de la Cerulean qui possède son pic d'excitation biphotonique à 850 nm (Figure 4.1).

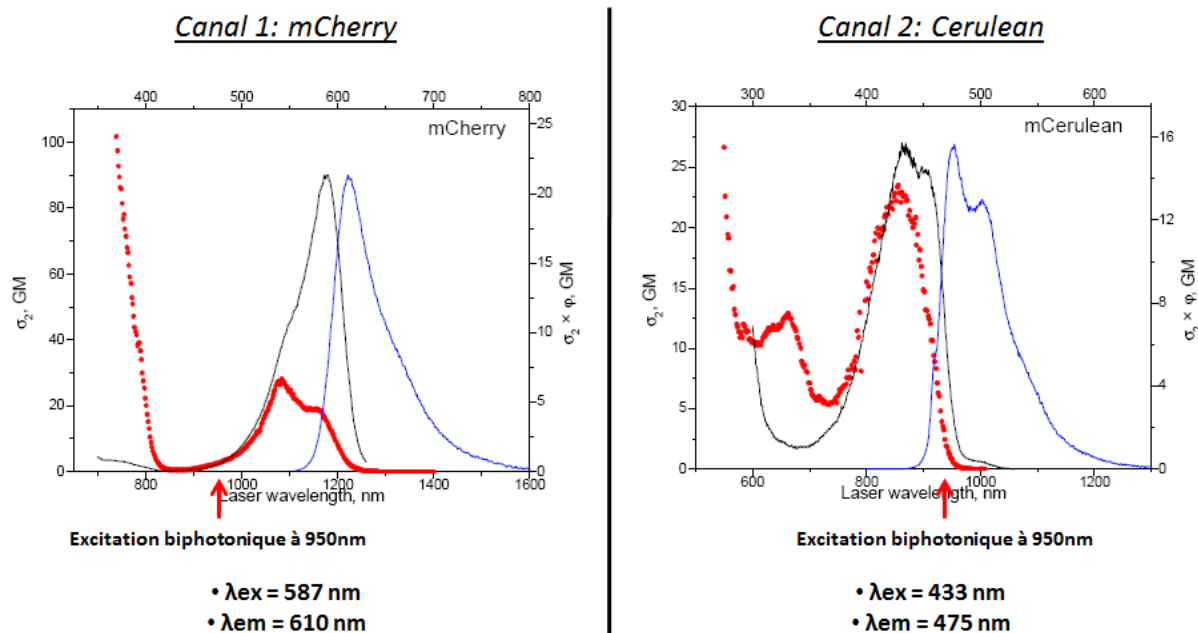


Figure 4.1: Spectres d'excitation et d'émission monophotonique et biphotonique des 2 FPs mCherry (à gauche) et Cerulean (à droite). Le spectre d'excitation monophotonique est représenté en noir et celui d'émission en bleu. L'axe des abscisses supérieur représente les longueurs d'onde pour une excitation monophotonique. L'axe des abscisses inférieur représente les longueurs d'ondes pour une excitation biphotonique. Les spectres d'absorptions biphotoniques sont représentés en rouge (Drobizhev *et al*, 2011).

Des gammes de longueur d'onde d'excitation ont donc été réalisées de 900 à 1000 nm avec des pas de 10 nm. Plus la longueur d'onde est proche de 900 nm et plus la qualité du signal émis par la Cerulean est importante, alors que la mCherry est plus efficacement excitée à 1000 nm (Figure 4.1). Cependant, une longueur d'onde d'excitation de 900 nm ne permet pas la détection de la mCherry et une de 1000 nm ne permet pas la détection de Cerulean. Nos choix ont par la suite été réduits à 950 nm et 970 nm. Une longueur d'onde de 970 nm permet l'excitation simultanée et efficace des 2 protéines, pourtant, la brillance de la mCherry dans ce cas-là est souvent trop faible. Il a été déterminé à la suite de cette étape que la longueur d'onde d'excitation appropriée était de 950 nm, elle permet de collecter un nombre de photons optimal pour les 2 FPs.

1) La protéine mCherry-RevErb α

Cette partie est consacrée à l'optimisation des paramètres de transfection du plasmide mCherry-RevErb α . Il est important de transfecter suffisamment de plasmides pour permettre la bonne expression de la protéine d'intérêt. Cependant, par définition la quantité de plasmides transfectée n'est pas dépendante de celle des protéines exprimées. En effet, toutes les séquences codant pour les protéines sont sous la dépendance d'un promoteur fort (SV40) signifiant que dès lors que le plasmide pénètre dans la cellule, la protéine sera exprimée en grande quantité. De ce fait, le plasmide ne doit pas être transfecté en trop grande quantité, afin d'éviter une surexpression voire l'agrégation des protéines, mais il doit tout de même être présent en quantité suffisante afin d'obtenir une expression correcte des protéines et une détection de photons satisfaisante. Il est donc nécessaire de combiner ces deux paramètres essentiels pour optimiser l'expression des protéines : la quantité de plasmides transfectés et le temps de transfection. Certaines protéines, pour s'exprimer, ne nécessitent que quelques heures alors que le protocole de transfection utilisé ici (FuGene) préconise de laisser agir le milieu de transfection 24 heures et d'utiliser 1 μ g de plasmide. Des

gammes de quantité de plasmides transfectés ainsi que différents temps de transfection ont été essayés. Nous avons estimé dans un premier temps qu'il fallait diminuer la quantité de plasmides, nous avons donc testé une gamme de 0.5 à 1 μg avec des pas de 0.1 μg . Cependant, ces valeurs n'étaient pas suffisamment importantes pour permettre une expression optimale des protéines, trop peu de noyaux exprimaient les protéines et leur concentration trop faible ne permettait pas de collecter les photons nécessaires. Les valeurs de brillances étaient trop petites également, par conséquent, aucune corrélation croisée ne pouvait être obtenue. En revanche une quantité de plasmide transfectée supérieure à 1 μg était trop importante et aboutissait à l'obtention de brillances trop élevées car les protéines étaient trop exprimées et donc trop concentrées, proche de 2 μg des phénomènes d'agrégation pouvaient être observés. Nous avons donc choisi pour l'expression nucléaire de la protéine mCherry-RevErb α de transfecter une quantité de plasmide de 1 μg . Simultanément à cette étude, différents temps de transfection ont été testés, il a été choisi de laisser agir le milieu de transfection entre 2 et 24 heures en retirant toutes les heures ce milieu. Des temps inférieurs à 12h ne sont pas suffisants pour obtenir une expression correcte des protéines, il a été estimé que le milieu de transfection devait être en contact avec les cellules entre 16 et 17 heures. Une incubation supérieure à 17 heures entraîne des dommages aux cellules importants perturbant leur analyse en microscopie. Ce point a longtemps été débattu sachant que plus le temps de transfection est important et plus les cellules sont abîmées. Le but étant de les imager au plus proche de leur état naturel, il était nécessaire de limiter au maximum les dommages qui leur sont causés que ce soit par le temps de transfection, la quantité de plasmide transfectée ou encore les produits chimiques utilisés pour la transfection.

A présent que les paramètres de transfection pour la protéine mCherry-RevErb α ont été déterminés, il faut mettre au point les conditions d'observation microscopique. Pour commencer il était nécessaire de déterminer le temps de résidence par pixels (TRP ou pixel dwell time) optimal pour l'observation et la détection de la protéine mCherry-RevErb α . Idéalement, ce TRP doit être adapté au mouvement de la protéine, afin d'être suffisamment rapide pour que la particule fluorescente soit immobile à l'échelle de temps de l'échantillonnage. En clair, il faut se placer en haut de la courbe d'autocorrélation (Figure 4.2).

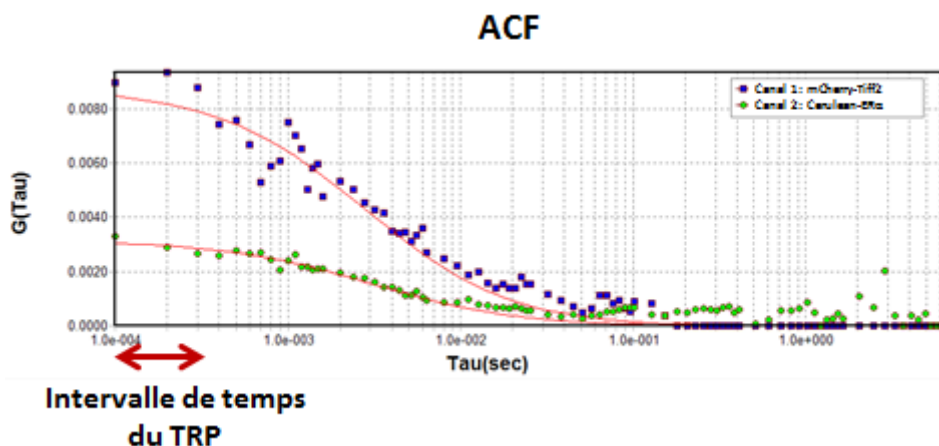


Figure 4.2 : Courbe d'autocorrélation illustrant l'intervalle de temps permettant de choisir le TRP approprié à notre étude. Les courbes ont été réalisées avec le couple de récepteur nucléaire mCherry-Tif2 et Cerulean-ER α .

Un TRP bien choisi permet d'améliorer les brillances moléculaires obtenues qui reposent sur le mouvement brownien des particules entrant et sortant du volume d'excitation. Il ne faut pas que durant le TRP les molécules aient le temps de traverser ce volume d'excitation et ainsi moyenner le signal. C'est ainsi qu'un TRP de 32 microsecondes a été sélectionné comme étant optimal pour

l'observation des protéines d'intérêts. Suite à cela, des noyaux de cellules Cos7, exprimant la protéine mCherry-RevErb α seule, ont été imagés afin de vérifier que les photons émis spécifiquement par la mCherry sont détectés exclusivement dans le canal 1 et non dans le 2. La réception dans le canal 2 de ce signal de fluorescence fausserait la réattribution des signaux et l'interprétation de la corrélation croisée entre les 2 FP. Dans un premier temps, l'expression de cette protéine a été détectée comme exclusivement nucléaire (Figure 4.3). Bien que le récepteur nucléaire soit rapporté comme pouvant exister en faible quantité dans le cytoplasme, nous la trouvons exclusivement nucléaire dans la majorité des cas (probablement parce que les cellules sont imagées une à deux heures après avoir retiré le milieu de transfection). La vraie brillance (e) de la mCherry est de 0.036. Ensuite les photons détectés dans chacun des 2 canaux sont analysés. Conformément à ce qui est attendu, le signal d'émission est récupéré uniquement dans le canal 1 pour la mCherry et en effet les photons provenant de cette FP sont tous localisés dans le noyau (Figure 4.3).

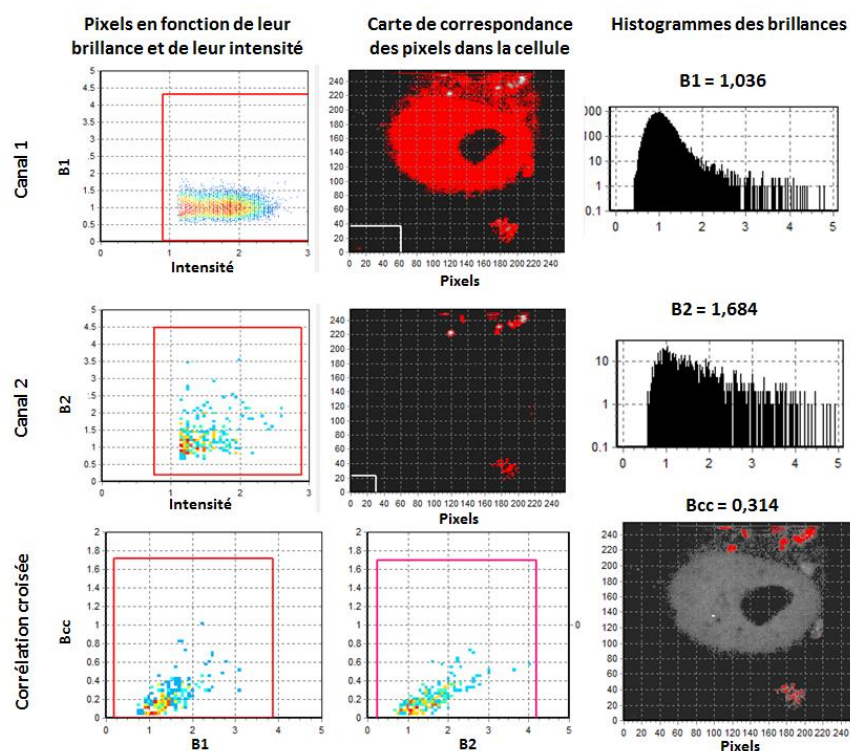


Figure 4.3 : Représentation du traitement de la totalité du noyau imagé : 50 μ m par 50 μ m, 256 pixels par 256 pixels. Les FPs sont excitées par un laser biphotonique à une longueur d'onde de 950 nm et une puissance de 36 mW avec un TRP de 32 microsecondes. Canal 1 et canal 2 : Le nuage de points représente l'intensité de fluorescence en fonction de la brillance dans le canal 1 (mCherry) ou dans le canal 2 (Cerulean) de chaque pixel. Ces derniers sont reportés sur la carte de correspondance des pixels dans la cellule où chacun est réattribué à une position précise dans la totalité de la cellule imagée. Les histogrammes des brillances représentent la répartition des valeurs obtenues ainsi que leur fréquence pour tous les pixels de l'image (comprenant également les particules péri-nucléaire). La corrélation croisée représente les valeurs de Bcc en fonction des brillances (B1 ou B2), et chaque pixel est réattribué dans la cellule imagée.

En revanche, aucun signal n'est détecté dans le noyau de la cellule dans le canal 2, le signal récupéré provient de structures situées à l'extérieur du noyau (Figure 4.3). En effet, lorsqu'une région d'intérêt spécifique (ROI) à l'intérieur du noyau est sélectionnée et analysée, aucun signal fluorescent, qu'il provienne de la mCherry ou de la Cerulean, n'est détecté dans le canal 2 signifiant donc que l'émission de la mCherry est récupérée uniquement dans le canal 1 (Figure 4.4). Les

structures très intenses, trouvées à l'extérieur du noyau, donnent une brillance (B) supérieure à 2 prouvant qu'ils peuvent être des agrégats ou plus probablement des débris cellulaires dûs à la transfection (Figure 4.4). D'ailleurs, ces particules sont retrouvées dans les deux canaux avec des covariances énormes. Ces vésicules péri nucléaires pourraient subir des phénomènes non-linéaires, car aucune entité fluorescente bleue n'est présente dans ces cellules. Ce signal n'est donc pas spécifique à la protéine d'intérêt mais pourrait aboutir à la détection d'une forte corrélation croisée au vu de la grande valeur de brillance. Il est donc important lors de l'analyse de ne pas prendre en compte ces éléments très brillants. L'utilisation d'une ROI (Region of Interest) qui sélectionne une zone à l'intérieur du noyau uniquement (Figure 4.4) permet de s'affranchir de ces particules et d'analyser uniquement le signal provenant spécifiquement des protéines d'intérêt nucléaire. La valeur de brillance de la mCherry est alors diminuée à 0.01, puisque les agrégats ne participent plus au calcul de la brillance dans ce cas-là. La corrélation croisée est inexistante comme indiqué dans la figure 4.2 lorsque seul mCherry-RevErb α est exprimée. Puisqu'aucun signal n'est détecté dans le noyau dans le canal 2, aucune covariance ne peut être observée (Figure 4.4).

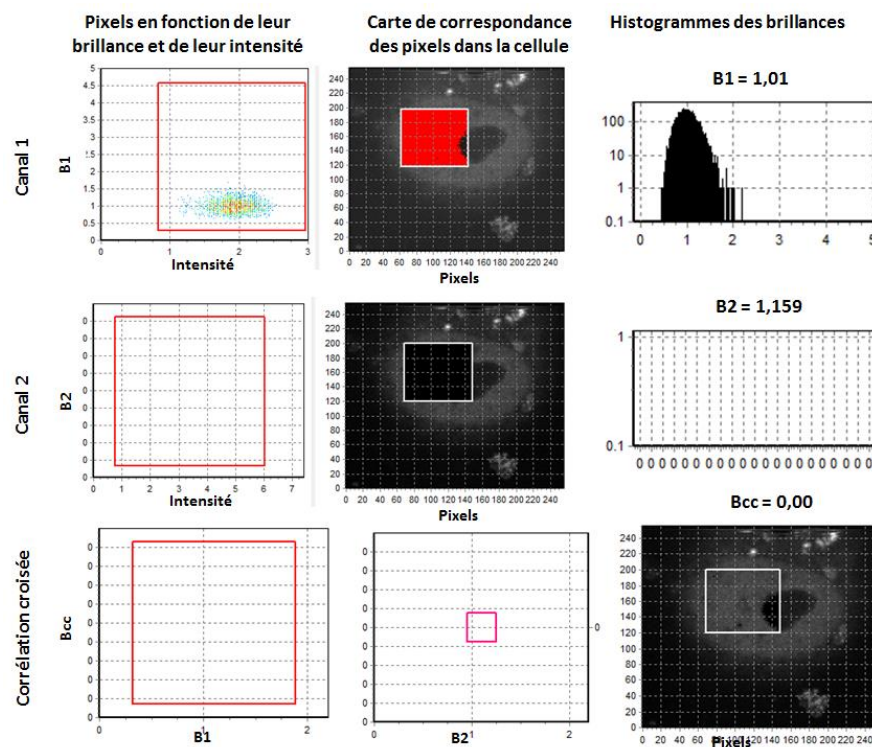


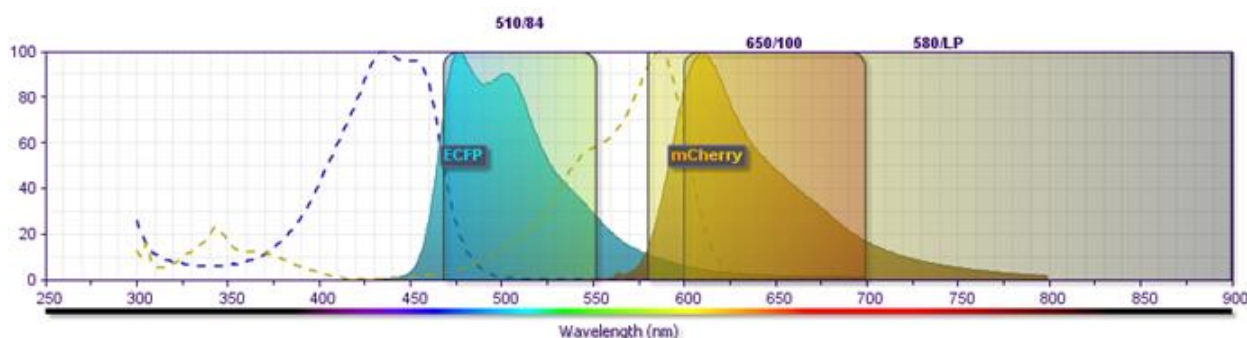
Figure 4.4 : Représentation du traitement d'une zone d'intérêt sélectionnée spécifiquement à l'intérieur du noyau (ROI). Les FPs sont excitées par un laser biphotonique à une longueur d'onde de 950 nm et une puissance de 36 mW avec un TRP de 32 microsecondes. La ROI (carré blanc) sert à isoler cette zone et à calculer les brillances et les Bcc uniquement à l'intérieur de celle-ci. Canal 1 et canal 2 : Le nuage de points représente l'intensité de fluorescence en fonction de la brillance dans le canal 1 (mCherry) ou dans le canal 2 (Cerulean) de chaque pixel. Ces derniers sont reportés sur la carte de correspondance des pixels dans la cellule où chacun est réattribué à une position précise dans la ROI. Les histogrammes des brillances représentent la répartition des valeurs obtenues ainsi que leur fréquence pour tous les pixels contenus dans la ROI. La corrélation croisée représente les valeurs de Bcc en fonction des brillances (B1 ou B2), et chaque pixel est réattribué dans la ROI.

Cette protéine est donc satisfaisante de par le fait qu'excitée à 950 nm avec un TRP de 32 microsecondes elle est détectée uniquement dans le canal 1 et non dans le 2. La protéine Cerulean-NCor peut désormais être étudiée afin de déterminer les conditions optimales d'observation.

2) Protéine Cerulean-NCor

Cette partie est consacrée à l'étude de la protéine Cerulean-NCor pleine taille dans des noyaux de cellules Cos7 et a été réalisée en parallèle des optimisations faites dans la partie précédente sur la protéine mCherry-RevErb α . Le but est de déterminer les conditions de transfection optimale du plasmide afin d'obtenir une expression des protéines satisfaisantes qui donneront des valeurs de brillances adéquates pour l'observation de la corrélation croisée. D'autre part, c'est également le moyen de confirmer que l'utilisation de la FP Cerulean est adaptée à cette étude. Tout comme il a été déterminé que le signal de la mCherry est détecté uniquement dans le canal 1, il est nécessaire de vérifier que les photons émis par la Cerulean seront spécifiquement détectés dans le canal 2 et non dans le 1. Avec le grand pied de bande du spectre d'émission de la Cerulean vers le rouge, ce type de chevauchement spectral à la détection est plus probable que celui du rouge dans le canal bleu et les filtres doivent être bien choisis afin d'éliminer ce phénomène. Nous avons choisi d'utiliser les filtres suivants afin de nous affranchir au maximum des photons provenant de la partie rouge de la bande d'émission de la Cerulean :

- Un filtre 580/LP (pour Long Pass) permet de séparer les photons d'émission. Tous les photons supérieurs à 580 nm (correspondant à la mCherry) sont envoyés sur le détecteur 1. Les photons inférieurs à 580 nm (Cerulean) sont envoyés sur le détecteur 2 (Figure 4.5).
- Un filtre 650/100 permet de récupérer le signal d'émission de la FP mCherry qui possède son pic d'émission à 610 nm (Figure 4.5).
- Un filtre 510/84 permet de récupérer le signal d'émission de la FP Cerulean qui possède son pic d'émission à 475 nm (Figure 4.5).



Dans un premier temps, différentes quantités de plasmides ont été transfectées permettant de déterminer rapidement qu'une quantité inférieure à 1 μ g n'est pas suffisante pour obtenir une expression optimale des protéines. En effet, l'observation des cellules après une transfection de moins de 1 μ g de plasmides révèle que les noyaux ne sont presque pas transfectés. Suite à cela, nous avons essayé des quantités de 1, 1.5, 2, 2.5 et 3 μ g, sachant que le corépresseur NCor est une protéine de taille importante (270 kDa) son expression efficace, nécessitant plus de temps que celle de RevErb α , requiert une quantité de plasmides transfectés plus importante afin de maximiser l'expression. A l'issue de cette étude, il a été décidé d'utiliser 2 μ g de plasmide Cerulean-NCor à transfecter. Les paramètres d'observation restent inchangés puisque les protéines sont étudiées et excitées de manière simultanée à 950 nm avec un TRP de 32 microsecondes. Il est vrai qu'une excitation à 930 nm aurait été plus adaptée à l'étude de la Cerulean, malheureusement, l'utilisation

de cette longueur d'onde ne permettait pas une excitation satisfaisante de la mCherry. Une longueur d'onde de 950 nm est le compromis idéal pour l'observation simultanée de 2 FPs. C'est ainsi que la protéine Cerulean-NCor a été exprimée dans des noyaux de cellules Cos7. Contrairement au récepteur nucléaire qui peut être, en faible partie, retrouvé dans le cytoplasme, le corépresseur NCor est exclusivement nucléaire. Le signal émis provient donc exclusivement de la Cerulean et est uniquement détecté dans le canal 2 (Figure 4.6). La valeur moyenne des vraies brillances (ϵ), qui est de 0.16, démontre que la protéine n'est pas agrégée car elle est nettement inférieure à 1. D'autre part, le signal émis est détecté exclusivement dans le canal 2 et non dans le 1 prouvant donc que cette FP est adaptée à l'étude en cours (Figure 4.6). En effet, aucun signal, spécifique de la protéine d'intérêt, ne sera détecté dans le mauvais canal, de ce fait la corrélation croisée positive qui sera observée sera le reflet de l'interaction entre les 2 protéines.

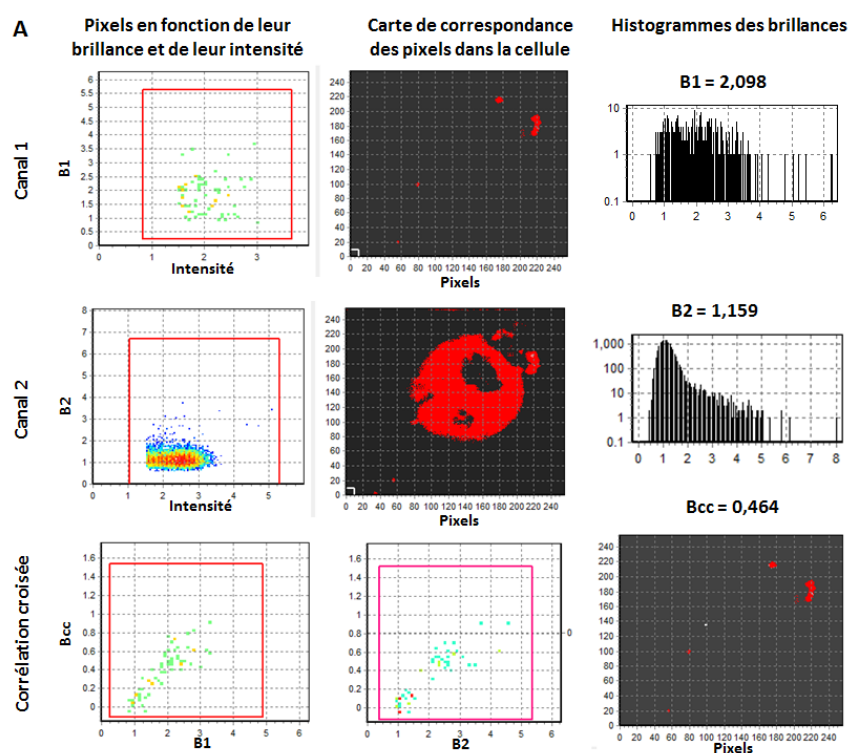


Figure 4.6 : Représentation du traitement de la totalité du noyau imagé : 50 μm par 50 μm , 256 pixels par 256 pixels. Les FPs sont excitées par un laser biphotonique à une longueur d'onde de 950 nm et une puissance de 36 mW avec un TRP de 32 microsecondes. Canal 1 et canal 2 : Le nuage de points représente l'intensité de fluorescence en fonction de la brillance dans le canal 1 (mCherry) ou dans le canal 2 (Cerulean) de chaque pixel. Ces derniers sont reportés sur la carte de correspondance des pixels dans la cellule où chacun est réattribué à une position précise dans la cellule imagée. Les histogrammes des brillances représentent la répartition des valeurs obtenues ainsi que leur fréquence pour tous les pixels de l'image (comprenant également les particules péri-nucléaire). La corrélation croisée représente les valeurs de Bcc en fonction des brillances (B1 ou B2), et chaque pixel est réattribué dans la totalité de la cellule imagée

Cependant, il est important d'analyser uniquement le signal à l'intérieur du noyau et non celui à l'extérieur. En effet, des particules très brillantes sont retrouvées dans les 2 canaux. Comme précédemment, elles pourraient correspondre à des agrégats (car leur vraie brillance est supérieure à 1), des vésicules péri-nucléaires ou à des débris cellulaires dues à la transfection. Ces particules sont localisées à l'extérieur du noyau et peuvent être facilement exclues de l'analyse par l'utilisation d'une ROI dans le noyau qui sélectionne une région d'intérêt spécifique (Figure 4.7). La valeur de vraie

brillance (e) est alors abaissée à 0.094, sans la contribution d'agrégats dans le calcul, ce qui reste positif et correct comme valeur. La corrélation croisée est inexistante comme indiqué dans la figure 4.7, en effet, l'intensité de fluorescence dans le canal 1 est nulle donc la valeur de Bcc est nulle à l'intérieur du noyau, dans la zone sélectionnée (ROI).

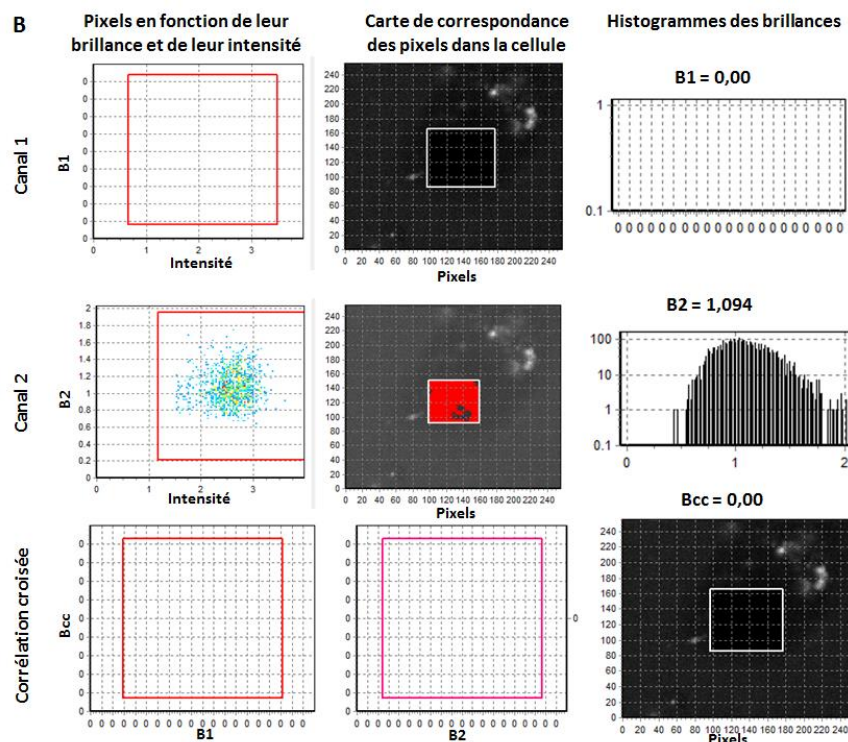


Figure 4.7 : Représentation du traitement d'une zone sélectionnée spécifiquement à l'intérieur du noyau (ROI). Les FPs sont excitées par un laser biphotonique à une longueur d'onde de 950 nm et une puissance de 36 mW avec un TRP de 32 microsecondes. La ROI (carré blanc) sert à isoler cette zone et à calculer les brillances (B1 et B2) et Bcc uniquement à l'intérieur de celle-ci. Canal 1 et canal 2 : Le nuage de points représente l'intensité de fluorescence en fonction de la brillance dans le canal 1 (mCherry) ou dans le canal 2 (Cerulean) de chaque pixel. Ces derniers sont reportés sur la carte de correspondance des pixels dans la cellule où chacun est réattribué à une position précise dans la ROI. Les histogrammes des brillances représentent la répartition des valeurs obtenues ainsi que leur fréquence pour tous les pixels de la ROI. La corrélation croisée représente les valeurs de Bcc en fonction des brillances (B1 ou B2), et chaque pixel est réattribué dans la ROI.

L'utilisation de la Cerulean est adaptée à l'étude qui nous intéresse, son émission spécifique dans le canal 2 ainsi que les valeurs de vraies brillances (e) de 0.094 obtenues à une longueur d'onde d'excitation de 950 nm en font un partenaire idéal pour la mCherry. En effet, leur excitation simultanée permettra l'identification spécifique d'une interaction entre les protéines pleine taille RevErb α et NCor de par le fait que leurs brillances seront adaptées à la détermination d'une corrélation croisée positive. Afin de vérifier que l'interaction pourra effectivement être détectée, une protéine exclusivement nucléaire (NLS) marquée simultanément en N et C-ter respectivement par la mCherry et la Cerulean servira de contrôle positif.

II. Validation de la technique

La technique de N&B permet de déterminer plusieurs paramètres:

La brillance moléculaire des FPs renseigne sur l'état d'oligomérisation de la protéine concernée. L'équation utilisée pour la déterminer est la suivante :

$$B = \frac{\sigma^2}{\langle F \rangle}$$

Le terme $\langle F \rangle$ représente l'intensité de fluorescence de la FP concernée et σ est la variance (Matériels et Méthodes). Nous utilisons les termes de vraies brillances moléculaire (e), c'est-à-dire les brillances corrigées pour le bruit de fond du détecteur et qui sont calculées comme suit :

$$e = B - 1$$

Nous calculons 2 brillances celle de la mCherry (e_1), qui fait référence à l'oligomérisation de RevErb α et celle de la Cerulean (e_2), qui indique l'oligomérisation de NCor.

Nous pourrions déterminer le nombre de molécules dans les deux canaux, c'est-à-dire le nombre de molécules de mCherry-RevErb α et de Cerulean-NCor, grâce à cette équation :

$$N = \frac{\langle F \rangle^2}{\sigma^2}$$

Nous utilisons les termes de vrais nombres de molécules (n_1 et n_2) corrigés pour le bruit de fond du détecteur et correspondant à :

$$n = \frac{(N \times B)}{e}$$

A partir du nombre de molécules (n) nous calculons la concentration molaire de chaque espèce par cette équation :

$$C = \frac{n}{V_{PSF} \times N_A}$$

Avec C , la concentration en molaire, V_{PSF} , le volume d'excitation biphotonique en litre et N_A , le nombre d'Avogadro.

Les valeurs de G01 et G02, respectivement de la mCherry et de la Cerulean sont déduites du nombre de molécules grâce à cette équation :

$$G0 = \frac{1}{N}$$

La brillance croisée (B_{cc}), correspondant au G0x classiquement calculé à partir des courbes de FCCS, renseigne sur l'interaction entre les deux protéines.

$$B_{cc} = \frac{\sigma_1 \times \sigma_2}{\langle F \rangle_1 \times \langle F \rangle_2}$$

Les indices 1 et 2 correspondent aux détecteurs qui donneront ces valeurs, c'est-à-dire détecteur 1 (mCherry) et détecteur 2 (Cerulean). La valeur de G0x est directement proportionnelle à la quantité de complexes, en supposant qu'il n'y ait qu'un seul type de complexe :

$$G0x = \frac{e1_{lié} \times e2_{lié} \times C_{complexes}}{[(e2_{lié} \times C_{Complexes}) + (e2_{libre} \times C_{Cerulean-NCor libre})] \times [(e1_{lié} \times C_{Complexes}) + (e1_{libre} \times C_{mCherry-RevErbA libre}]}$$

Une valeur positive de Bcc ou G0x est indicateur d'une interaction entre protéines, il faut s'assurer que les protéines en question ne sont pas agrégées, ou trop oligomérisées car cela aboutirait à des valeurs de brillances très élevées (pouvant être supérieure à 2) et donc le calcul de Bcc serait faussé. D'autre part, ce calcul ne prenant en compte qu'une espèce de stœchiométrie 1 :1, les valeurs ne peuvent pas être comparées entre elles, vu que l'état d'oligomérisation de chacun sera différent selon les conditions et les ligands utilisés. Il faut donc comparer des valeurs de pourcentage de complexes formés qui se calculent comme suit :

$$\text{Pourcentage de complexes formés} = \frac{G0x}{\text{Plus petit G0}}$$

Le plus petit G0 correspond à l'espèce la plus concentrée et ce rapport correspond en fait au nombre de complexes formés par rapport à l'espèce limitante (Matériels et Méthodes). Théoriquement, ce ratio de G0x sur le plus petit G0 ne doit pas être supérieur à 1, car les G0 ne peuvent pas être supérieurs au G0x. En effet, le maximum de complexes formés ne dépassera pas le nombre de molécules de l'espèce limitante. C'est ainsi que nous pourrions déterminer des pourcentages entre 0 et 1, correspondant à 0 et 100 %. Cependant, ces calculs ne prennent en considération que des complexes d'une stœchiométrie 1 :1, ce qui n'est pas toujours le cas surtout avec des transfections transitoires qui entraînent une surexpression des protéines et probablement des oligomérisations importantes qui dépasseront certainement la stœchiométrie 1 :1. La valeur de pourcentage de complexes formés dépassera donc certainement les 100 % rendant l'effet des ligands difficile à identifier.

1) Contrôle positif : mCherry-NLS-Cerulean

Il est nécessaire de s'assurer qu'une corrélation croisée spécifique peut être identifiée avec ces 2 FPs. Cette partie est axée sur l'optimisation de l'analyse des signaux émis par les 2 FPs et a permis de confirmer que celles-ci sont optimales pour la mise en évidence d'une corrélation croisée positive et donc d'une interaction. Pour cela, les FPs mCherry et Cerulean sont simultanément étiquetées sur la protéine NLS, respectivement en N et C-ter. La protéine de fusion obtenue est adressée au noyau. Les plasmides permettant l'expression de la protéine mCherry-NLS-Cerulean sont transfectés à 1µg dans les cellules eucaryotes Cos7 (Matériels et Méthodes). Après 16 à 17 heures de transfection, les cellules sont analysées en microscopie par un laser biphotonique. Les photons émis par la mCherry et la Cerulean sont respectivement collectés par les 2 détecteurs et ce signal est analysé par le logiciel SimFCS comme expliqué dans la partie Matériels et Méthodes. Les résultats donnés ici sont en fait des moyennes réalisées sur une trentaine de noyaux imagée. Nous avons déterminé les moyennes des concentrations molaires (805 nM pour la mCherry et 784 nM pour la Cerulean), les vraies brillances moléculaires (e1 et e2) (0.14 pour la mCherry et 0.05 pour la Cerulean), les G01 (0.017) et G02 (0.018) de toutes ces cellules. Ces mesures permettent de vérifier que tout est bien paramétré et que les protéines s'expriment correctement dans le noyau. Les 2 FPs

sont fusionnées sur la même protéine, les concentrations, les nombre de molécules et les G01 et G2 sont supposés être identiques. En effet, la répartition des valeurs sur les histogrammes indique que les concentrations et le nombre de molécules de la mCherry et de la Cerulean sont équivalents ainsi que les valeurs de G01 et G02 (Figures 4.8). D'autre part, la moyenne des valeurs de Bcc est positive, signifiant qu'une interaction est bien présente et identifiable par cette technique.

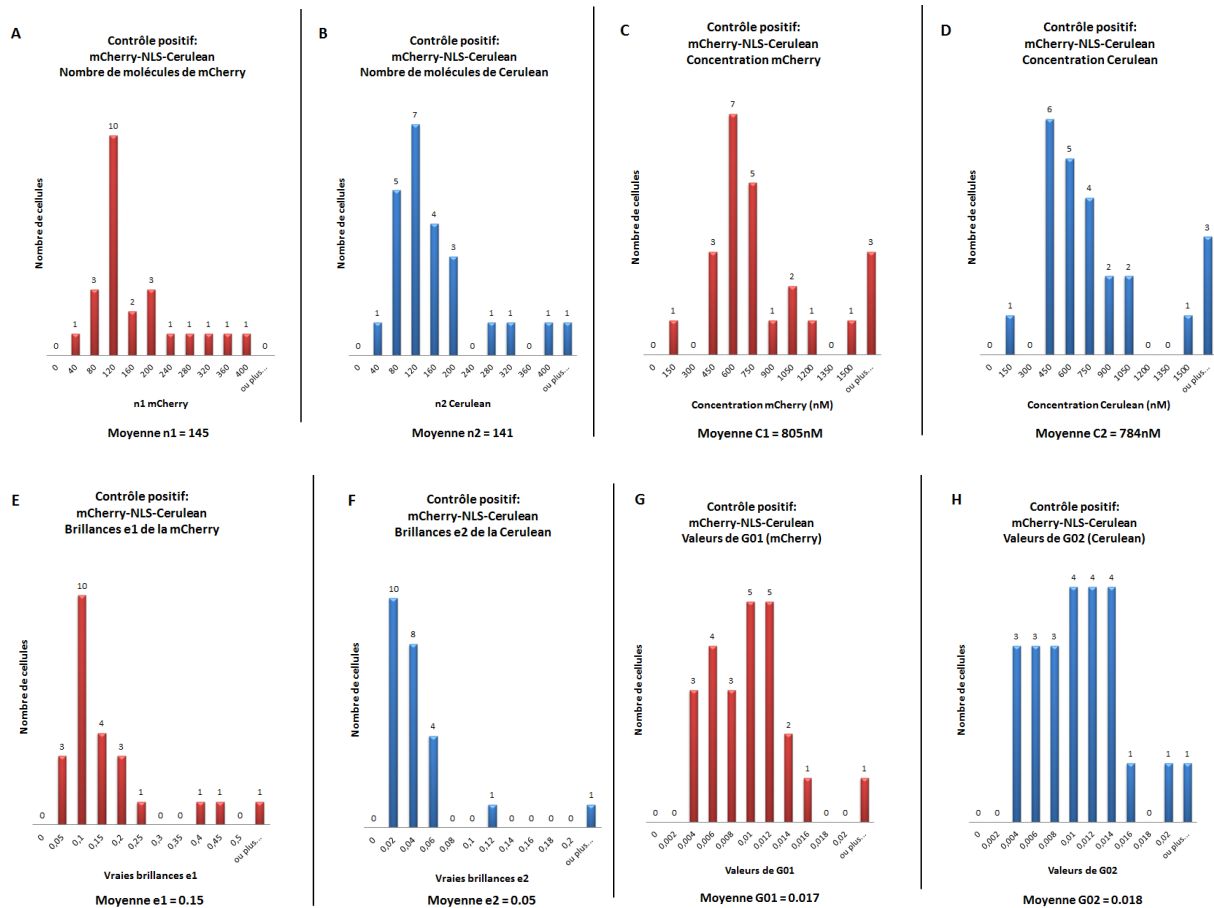


Figure 4.8 : Répartitions des valeurs obtenues pour le complexe mCherry-NLS-Cerulean : le nombre de molécules de mCherry (A) et de Cerulean (B), la concentration molaire de la mCherry (C) et de la Cerulean (D), les vraies brillances de la mCherry (E) et de la Cerulean (F) et des valeurs de G01 (G) et G02 (H).

C'est ainsi que les vraies brillances de la mCherry (e1) et de la Cerulean (e2) monomérique sont évaluées respectivement à 0.15 et 0.05 en effectuant les moyennes des valeurs de e1 et e2 obtenues sur une trentaine de cellules. Cependant, comme nous pouvons l'observer (Figure 4.8 E-F), la répartition de ces valeurs de brillances est plutôt large, des grosses valeurs de brillances peuvent fausser la moyenne calculée et la surestimer. Cependant, leur fréquence d'obtention peut être un indicateur de la brillance monomérique. En effet, une majorité de cellules est retrouvée à une valeur de 0.1 pour la mCherry (e1) et de 0.02 pour la Cerulean (e2). L'idéal aurait été d'obtenir toutes les cellules aux mêmes brillances pour e1 et e2, ce n'est pas le cas ici, cependant, nous avons estimé les brillances monomériques de la mCherry (0.1) et de la Cerulean (0.02) (Figure 4.8 E-F). Elles seront utilisées pour estimer la stœchiométrie des complexes de RevErba / NCor en absence et en présence de ligand.

La répartition des protéines est homogène et ne semble pas former d'agrégats, cependant, elles ne sont pas exprimées de manière identique dans toutes les cellules. En effet, la répartition des valeurs de concentration démontre que certains noyaux expriment fortement les protéines

contrairement à d'autres (Figure 4.8 **C-D**). Cependant, une corrélation croisée positive est systématiquement obtenue pour tous les noyaux imagés (Figure 4.10 **A**). La figure 4.9 **C** illustre la corrélation croisée obtenue dans la ROI à l'intérieur du noyau (permettant d'éliminer les agrégats ou débris cellulaires éventuels situés à l'extérieur du noyau). Le nuage de pixels (dont chacun sera réattribué selon sa localisation nucléaire précise) est majoritairement supérieur à 1 pour les valeurs de brillances non corrigées pour le bruit de fond du détecteur (B1 et B2 sur l'axe des abscisses). Le nuage de pixels est également majoritairement supérieur à 0 pour les valeurs de corrélation croisée (Bcc sur l'axe des ordonnées). La Bcc positive, systématiquement obtenue pour mCherry-NLS-Cerulean, est indicatrice de l'interaction des protéines (Figure 4.10 **A**). La technique de N&B est donc efficace pour déterminer une interaction. Cependant, le calcul du nombre de complexes est également un des avantages du N&B, ainsi nous espérons pouvoir déterminer l'effet des ligands sur le nombre de complexes formés.

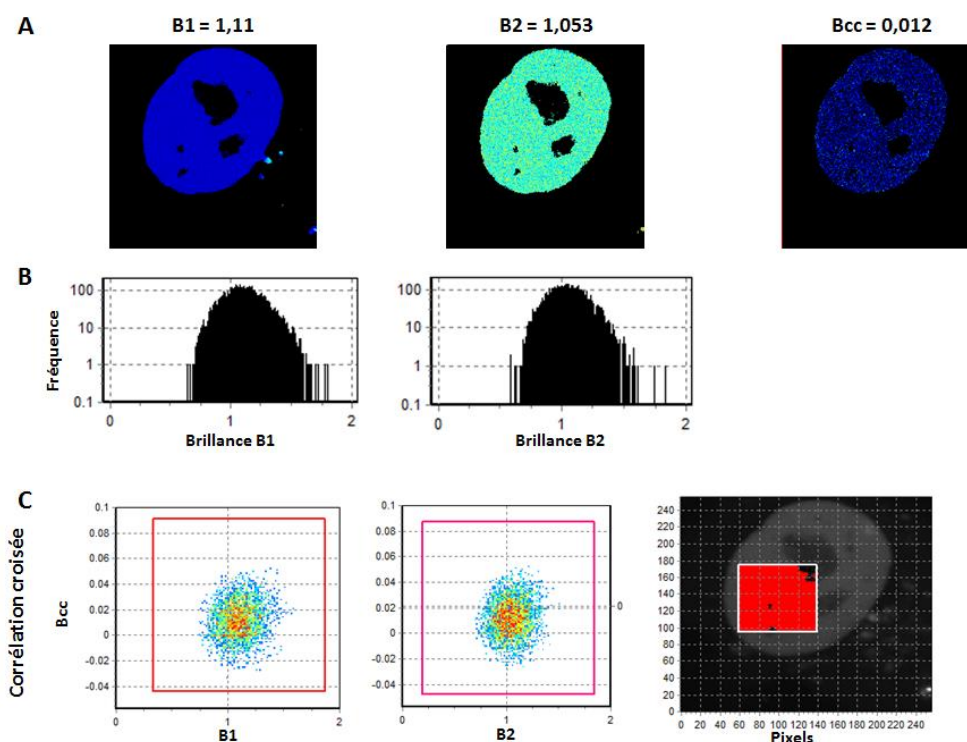


Figure 4.9 : Illustration des résultats obtenus pour le contrôle positif mCherry-NLS-Cerulean. Les FPs sont excitées par un laser biphotonique à une longueur d'onde de 950 nm et une puissance de 36 mW avec un TRP de 32 microsecondes. **(A)** Signal des brillances B1 (mCherry), B2 (Cerulean) et de la corrélation croisée Bcc. Cette représentation illustre la localisation des protéines à l'intérieur du noyau et démontre, par la carte de Bcc, la covariance du signal de brillances des 2 FPs. **(B)** Histogrammes représentant la répartition des valeurs des brillances de la mCherry (B1) et de la Cerulean (B2) en fonction de leur fréquence d'obtention. **(C)** Représentation des pixels de brillances (B1 et B2) en fonction de la Bcc à l'intérieur de la ROI.

La valeur de Bcc, calculée par le logiciel SimFCS, est égale à la covariance divisée par le produit des moyennes des intensités dans les deux canaux. Ceci correspond aussi à la valeur de G0x, typiquement donnée dans les expériences de FCCS. Elle est directement proportionnelle à la quantité de complexe, en assumant qu'il n'y ait qu'un seul type de complexes, c'est-à-dire une stœchiométrie 1 :1.

Le pourcentage de complexes est calculé comme indiqué précédemment, en divisant la valeur de G0x (Bcc) par le plus petit G0 car ceci équivaut à le multiplier par la concentration de molécules la plus élevée, laissant la concentration de molécules la moins élevée dans le

dénominateur de l'équation ci-dessous (Rosales *et al*, 2006) :

$$G0x = \frac{e1_{lié} \times e2_{lié} \times C_{complexes}}{[(e2_{lié} \times C_{Complexes}) + (e2_{libre} \times C_{Cerulean} - N_{Cor libre})] \times [(e1_{lié} \times C_{Complexes}) + (e1_{libre} \times C_{mCherry} - RevErba_{libre})]}$$

Le résultat obtenu indique le rapport du nombre de complexes formés sur le nombre de molécules de l'espèce limitante. Cependant, ce ratio ne prend pas en compte d'éventuelles différences de la stœchiométrie (donc brillance) des complexes. Puisque nous ne connaissons pas la stœchiométrie exacte ou la fraction de ces complexes, le rapport G0x/Plus petit G0 (non-corrigé pour des différences de stœchiométrie) peut dépasser la valeur de 1 ou 100 % (Figure 4.10). Ces valeurs suggèrent donc des stœchiométries de complexes différentes de 1:1 pour au moins une des protéines même avec le NLS, signifiant des oligomérisations importantes.

Le contrôle positif mCherry-NLS-Cerulean est supposé nous permettre de déterminer les valeurs de brillances monomériques pour les deux FPs. Cependant, comme il a été démontré précédemment, ces valeurs sont assez disparates rendant délicate la détermination exacte des brillances monomériques. La dispersion de ces différentes valeurs (concentration, brillances) est principalement due à l'expression des protéines assez variable d'une cellule à l'autre. Les fortes valeurs de brillances peuvent révéler une oligomérisation importante dues à la surexpression des protéines (proche du micro molaire dans certains cas). De ce fait, les valeurs de Bcc seront également conséquentes et autant dispersées que les valeurs de brillances comme le démontre la figure 4.10 A. Cependant, une surexpression des protéines peut aussi aboutir à de faibles valeurs de brillances, en effet, la concentration importante des protéines entraîne une augmentation de la viscosité et donc une diminution du mouvement brownien des particules. La technique de N&B étant basée sur l'étude des fluctuations de fluorescence des FPs, en cas d'immobilité des particules, les fluctuations ne pourront pas être identifiées aboutissant à des valeurs de brillances presque nulles non représentatives de la véritable oligomérisation des protéines. Ceci aboutira au final à un G0x surestimé et à un petit G0 (comme il est inversement proportionnel au nombre de molécules, plus il sera petit, plus les protéines seront concentrées) et donc à un pourcentage de complexes qui sera supérieur à 100 %. Cependant, les vraies brillances moléculaires (e1 et e2) obtenues sont toujours inférieures à 1 démontrant que les protéines ne forment pas d'énormes agrégats. Nous estimons, pour la suite, des brillances monomériques respectives pour la mCherry et la Cerulean de 0.1 et de 0.02. Nous avons ainsi pu avoir une idée de l'état d'oligomérisation des complexes RevErba / NCor en absence et en présence de ligands.

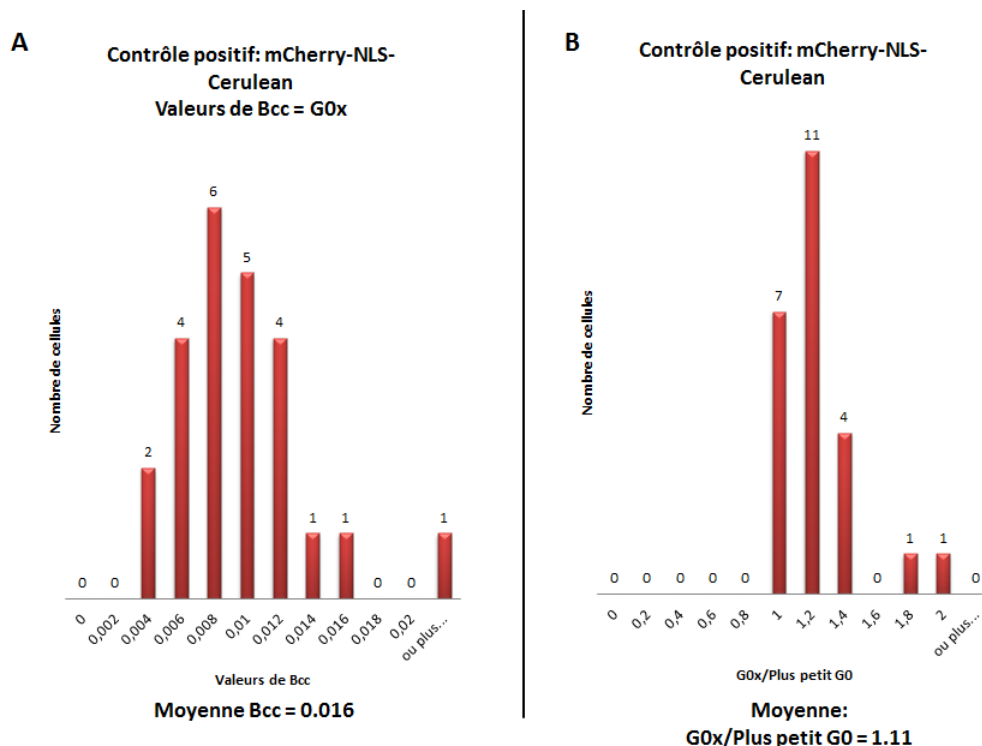


Figure 4.10 : Histogrammes représentant (A) la dispersion des valeurs de Bcc ou G0x (axe des abscisses) et (B) le pourcentage de complexes formés (axe des abscisses) en fonction de la fréquence d'obtention des valeurs (axe des ordonnées) pour le contrôle positif mCherry-NLS-Cerulean. La valeur de 1 représentant 100%.

Une analyse plus approfondie des valeurs de G01 et G02 (Figure 4.8), représentant respectivement la concentration des protéines mCherry et Cerulean, révèle que ces 2 valeurs sont très proches et très faibles démontrant une forte concentration de la protéine NLS (805 nM pour mCherry et 784 nM pour Cerulean). D'autre part, dans certains cas, ces valeurs ne sont pas identiques pour une même cellule analysée et présentent un écart important. Les 2 FPs étant les marqueurs du NLS, leur concentration est supposée être la même, or ce n'est pas systématiquement le cas. Il se peut que l'une des FP soit photo blanchie et l'autre non, expliquant ainsi la différence entre ces 2 valeurs. De ce fait, l'estimation de la concentration est erronée ainsi que le pourcentage de complexe calculé, qui est supposé être toujours égal à 1. Afin de faire une analyse uniforme et juste des données, les cellules pour lesquelles la différence entre les valeurs de G01 et G02 est trop importante ont été éliminées de l'analyse. Il a ainsi été possible d'améliorer l'estimation du pourcentage de complexes formés et de le ramener à des valeurs plus proches, mais toujours supérieures à 100 %. Il aurait été préférable de travailler avec le couple de FPs mCherry et EGFP émettant respectivement dans le rouge et dans le vert. Leurs longueurs d'onde d'excitation sont plus proches que celles de mCherry et Cerulean, leur utilisation aurait permis une excitation plus efficace ainsi qu'une diminution de la puissance de laser. De ce fait, les FPs auraient été moins photo blanchies lors de l'imagerie et les cellules moins abîmées. Cependant, il a été choisi de conserver le couple mCherry et Cerulean pour éviter les phénomènes de FRET et de chevauchement spectral à la détection. D'autre part, ce qui nous intéresse ici est de comparer les différences d'interaction entre les protéines selon qu'elles sont en présence ou en absence de ligand. L'utilisation de ces FPs a permis une analyse plus juste et spécifique de l'interaction.

Cette partie a permis de démontrer, d'une part, que les protéines fluorescentes mCherry et Cerulean sont adaptées à l'étude du système puisqu'elles aboutissent à l'obtention de brillance permettant l'identification d'une corrélation croisée positive. D'autre part, cela a permis de démontrer que l'interaction entre 2 protéines sera mise en évidence si elle existe. Il est important de vérifier à présent que si l'interaction n'est pas réelle, elle ne sera pas détectée par cette technique de N&B. Pour cela, une solution des 2 FP mCherry et Cerulean a été utilisée.

2) Contrôle positif : mCherry-Tif2/Cerulean-ER α

Nous voulions nous assurer avant d'aller plus loin, que la méthode de N&B était adaptée à la détermination d'interaction entre protéines intervenant dans de gros complexes moléculaires. En effet, les transfections transitoires surexpriment fortement les protéines qui s'organisent donc en oligomère de taille importante. Le contrôle positif que nous avons utilisé est très petit, c'est une séquence d'adressage au noyau qui ne formera pas d'aussi gros complexes que ceux assemblés avec des protéines plus volumineuses. Nous avons donc choisi de vérifier l'interaction d'un autre couple de récepteurs nucléaires précédemment étudié dans le laboratoire par la technique de FCCS (Savatier *et al*, 2010). Ces protéines devraient s'organiser en complexes aussi importants que le couple RevErba / NCor lors d'une transfection transitoire, c'est donc un bon point de comparaison par rapport à ce que nous souhaitons observer. Le récepteur nucléaire ER α est fusionné à la FP Cerulean et son coactivateur Tif2 à mCherry. Les plasmides permettant l'expression de ces protéines de fusions (Annexes 7) sont transfectés dans les cellules Cos7, 1 μ g pour le récepteur nucléaire et 2 μ g pour le coactivateur. Les paramètres d'observation et d'analyse sont les mêmes que précédemment et comme les FP sont identiques, la longueur d'onde est conservée. L'association de ce couple de récepteurs nucléaires est commune à tous les autres, c'est-à-dire que le coactivateur est lié au récepteur nucléaire en présence de ligand agoniste et la fixation d'un corépresseur est induite par la liaison d'un ligand antagoniste qui provoque des réorganisations structurales des protéines. ER α et Tif2 interagissent donc en présence d'un ligand agoniste qui est l'E2 et qui a été rajouté, une à deux heures avant l'imagerie, dans le milieu cellulaire. C'est ainsi qu'il a été possible de visualiser l'interaction entre les deux protéines, révélée par une valeur de corrélation croisée positive de 0.035 (Figure 4.11). Les vraies valeurs de brillances (e_1 et e_2) sont de 0.065 pour la mCherry-Tif2 et 0.1 pour Cerulean-ER α , signifiant que l'interaction est présente. Les protéines ER α et Tif2 s'expriment dans le noyau à des concentrations respectives de 273 nM et 100 nM, signifiant donc qu'elles sont moins concentrées que le NLS, ce qui devrait, en théorie, uniformiser les résultats obtenus. D'autre part, en comparaison avec le NLS, la valeur de Bcc déterminée ici est beaucoup plus importante que celle obtenue avec le NLS. Les gros complexes sont donc plus faciles à identifier comme interagissant en comparaison à des petits comme le NLS. En effet, les brillances seront plus élevées en présence d'oligomérisation importante entraînant donc des valeurs de corrélation croisée plus fortes. En revanche, comme il sera toujours impossible de déterminer précisément l'oligomérisation des protéines, le pourcentage de complexes ne pourra pas être corrigé pour la stœchiométrie, de ce fait, les valeurs risquent d'être encore plus fortes que celles obtenues pour le NLS.

La technique de N&B est donc bien adaptée à l'identification d'une interaction entre deux protéines. Dans notre cas, l'organisation des deux complexes protéiques ER α / Tif2 et RevErba / NCor devrait être similaire, nous espérons donc pouvoir identifier une interaction spécifique et voir l'effet de ligands sur la formation du nombre de complexes.

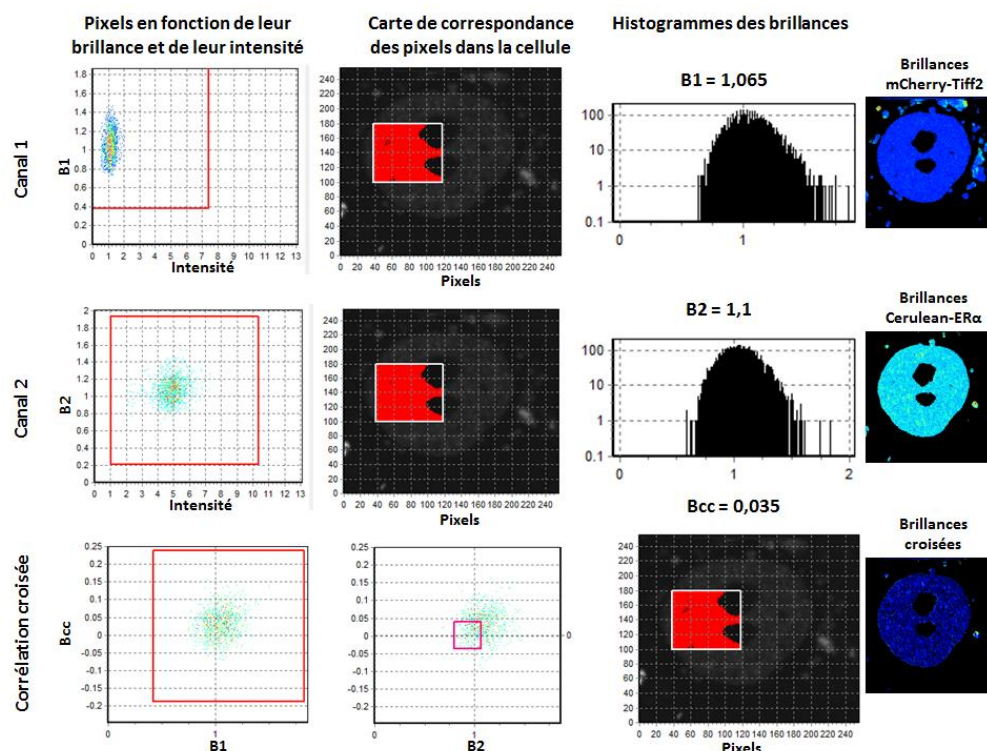


Figure 4.11 : Représentation du traitement d'une zone sélectionnée spécifiquement à l'intérieur du noyau (ROI). Les FP sont excitées par un laser biphotonique à une longueur d'onde de 950 nm et une puissance de 36 mW avec un TRP de 32 microsecondes. La ROI (carré blanc) sert à isoler cette zone et à calculer les brillances et les covariances uniquement à l'intérieur de celle-ci. Canal 1 et canal 2 : Le nuage de points représente l'intensité de fluorescence en fonction de la brillance dans le canal 1 (mCherry) ou dans le canal 2 (Cerulean) de chaque pixel. Ces derniers sont reportés sur la carte de correspondance des pixels dans la cellule où chacun est réattribué à une position précise dans la ROI. Les histogrammes des brillances représentent la répartition des valeurs obtenues ainsi que leur fréquence pour tous les pixels de la ROI. La corrélation croisée représente les valeurs de Bcc en fonction des brillances (B1 ou B2) et chaque pixel est réattribué dans la ROI.

3) Contrôle négatif : solution de mCherry et Cerulean

La mise en place du contrôle négatif a été délicate, l'expression des protéines après transfection est très efficace, même trop. Nous avons tout d'abord essayé de transfecter les FPs mCherry et Cerulean seules dans les cellules Cos7. Ceci est encore plus problématique pour les protéines individuelles que pour le mCherry-NLS-Cerulean utilisé précédemment. Dans un premier temps, les protéines étaient trop concentrées, donc les brillances étaient nulles ce qui ne permettait pas de déterminer des brillances croisée positives ou négatives. La diminution de la quantité de plasmides transfectée a abouti à des concentrations de protéines exprimées moins importantes et à des valeurs de brillances exploitables permettant la mise en évidence d'une corrélation croisée positive. Cependant, bien que les 2 FPs n'aient pas la capacité d'interagir les valeurs de Bcc obtenues étaient, dans la majorité des cas, positives. Au vu des brillances et des concentrations de protéique, les 2 FPs interagissent de manière non spécifique, ceci a été vu pour les FPs ayant tendance à dimériser pour éviter ce phénomène. Afin de réduire ces concentrations trop importantes, il a été décidé de ne pas travailler dans des cellules eucaryotes vivantes, mais de choisir des extraits bactériens exprimant les 2 FPs d'intérêts dont nous avons pu contrôler plus précisément la concentration. C'est ainsi que les protéines mCherry et Cerulean ont été exprimées dans des

bactéries *Bacillus Subtilis* qui ont ensuite été lysées. Le lysat a été dilué et mélangé afin d'obtenir des concentrations, pour les deux protéines, adéquates permettant l'obtention de brillances raisonnables (Figure 4.9), de ce fait, les valeurs de Bcc sont spécifiques.

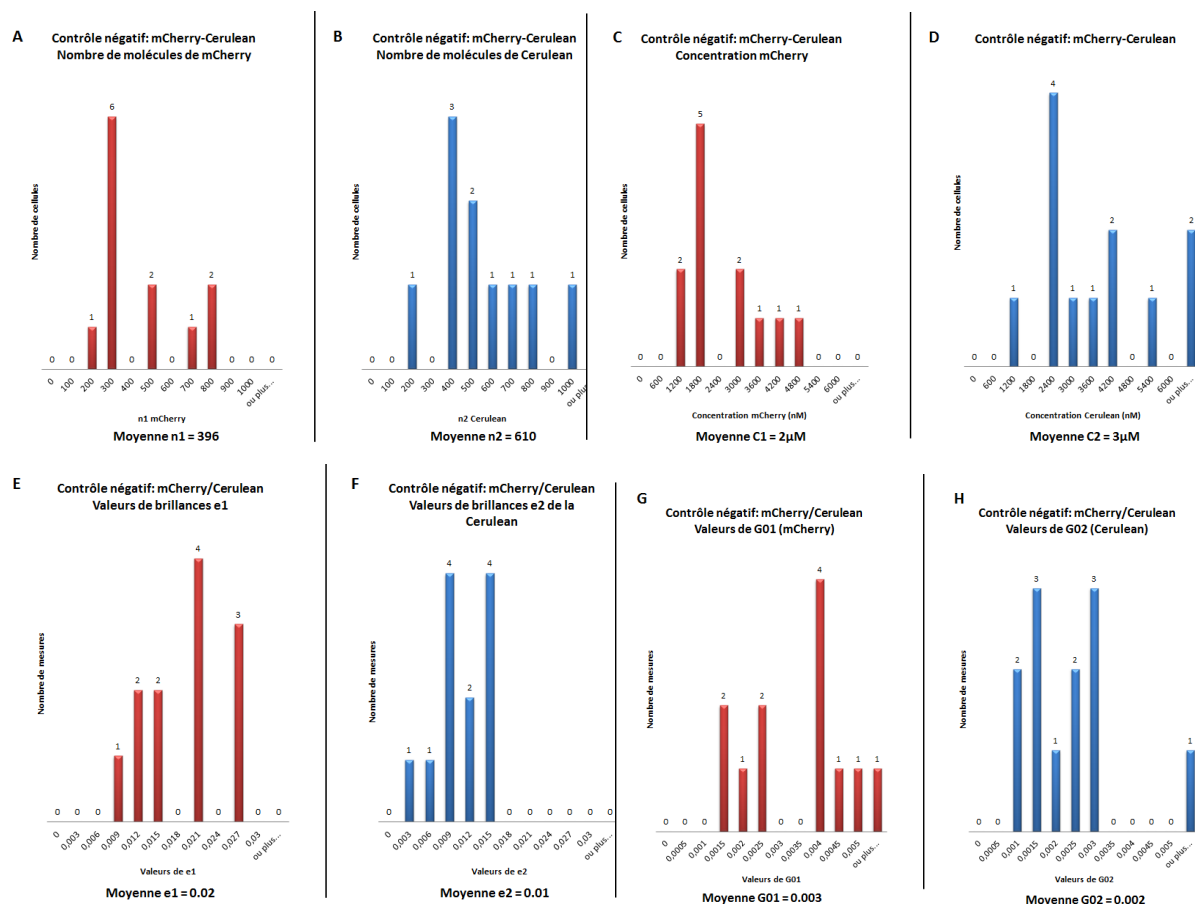


Figure 4.12 : Répartitions des valeurs obtenues pour le contrôle négatif (solution bactérienne exprimant les deux FPs mCherry et Cerulean) : le nombre de molécules de mCherry (A) et de Cerulean (B), la concentration molaire de la mCherry (C) et de la Cerulean (D), les vraies brillances de la mCherry (E) et de la Cerulean (F) et des valeurs de G01 (G) et G02 (H).

Les valeurs de vraies brillances (e1 et e2) obtenues ici ont été déterminées avec un TRP plus rapide. L'observation se faisant en milieu liquide et non pas sur cellules vivantes, les paramètres d'analyse ont eu à être légèrement adaptés. De ce fait, les valeurs de vraies brillances sont faibles (0.018 pour la mCherry et 0.01 pour la Cerulean), mais suffisamment positives pour pouvoir mettre en évidence une interaction si elle existe (Figure 4.12 E-F). Malgré le fait que les protéines soient fortement concentrées (2 µM pour la mCherry et 3 µM pour la Cerulean), les vraies brillances moléculaires sont positives (Figure 4.12 C-D). Les valeurs de Bcc sont majoritairement égales à 0 ce qui prouve le fait que si l'interaction n'existe pas, la corrélation croisée sera nulle (Figure 4.13 B).

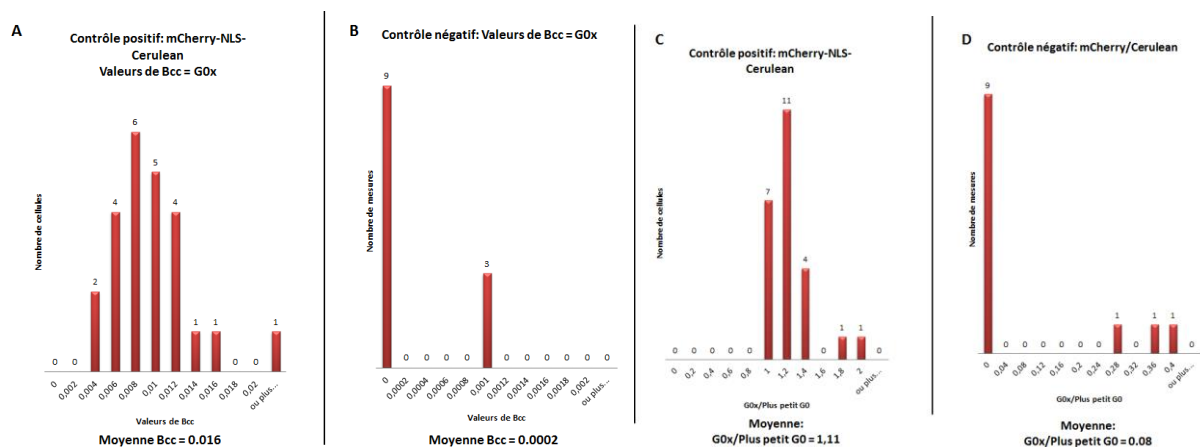


Figure 4.13 : Histogrammes représentant les valeurs de Bcc (G0x) obtenues pour le contrôle positif (A) (mCherry-NLS-Cerulean) et pour le contrôle négatif (B) (solution bactérienne exprimant les 2 FPs mCherry/Cerulean). Histogrammes illustrant le pourcentage de complexes formés (axe des abscisses) en fonction de la fréquence d'obtention des valeurs (axe des ordonnées). La valeur de 1 représentant 100%. (C) Contrôle positif : mCherry-NLS-Cerulean. (D) Contrôle négatif : mCherry/Cerulean.

Les paramètres d'observation déterminés précédemment ont été optimisés afin d'obtenir des brillances positives permettant de mettre en évidence une interaction si elle existe. De ce fait, les contrôles positifs et négatifs établis ici sont la preuve que si l'interaction est réelle, elle sera révélée par des valeurs de Bcc positive. En revanche, si elle n'existe pas et que les valeurs de brillances sont conformes à ce qui est attendu la corrélation croisée sera nulle.

A présent que la technique est vérifiée, nous allons pouvoir observer les protéines d'intérêts RevErb α et NCor en présence et en absence de ligands. D'autre part et au vu des résultats obtenus en anisotropie de fluorescence, il est important de vérifier l'interaction entre les protéines RevErb α et SMRT pleine taille car les essais sur les peptides dans la partie précédente révèlent une affinité de SMRT ID1 pour RevErb α -LBD importante et même plus grande d'un facteur 10 environ que celle obtenue pour le peptide NCor ID1. La partie suivante a testé l'hypothèse que le corépresseur SMRT est capable de s'associer au récepteur nucléaire RevErb α *in vitro* et *in cellulo*.

III. Interaction *in cellulo* de RevErb α et NCor pleine taille

Ce paragraphe est consacré à l'étude de l'interaction des protéines pleine taille RevErb α et NCor en présence et en absence des ligands hème, SGN et SD7. L'interaction entre ces 2 protéines *in vitro* et *in cellulo* n'est plus à prouver. En revanche, il est important de déterminer l'effet de l'hème sur cette association. Au vue de nos résultats en anisotropie de fluorescence et des comparaisons des structures cristallographiques entre RevErb α -LBD / NCor ID1 et RevErb β -LBD / Hème, il semblerait que l'hème, d'une part, empêche la fixation du peptide NCor ID1 (comportant le domaine CoNR1 rapporté comme étant essentiel à l'interaction des 2 protéines) et d'autre part entraîne la perte d'une partie de l'activité répressive de la transcription en empêchant la formation du feuillet beta antiparallèle (Le Maire *et al*, 2010). L'effet de l'hème a déjà été testé *in vivo* sur l'activité transcriptionnelle par des essais de gènes rapporteurs à la luciférase (Yin *et al*, 2007). Cependant, son action n'a jamais été établie sur l'interaction directe de RevErb α et NCor, de plus, il est surprenant que son effet soit opposé sur l'association des protéines *in vitro* alors qu'il est favorable à la répression de la transcription *in vivo*. Il est donc important de vérifier l'effet de ce ligand sur l'interaction directe des protéines pleine taille *in cellulo*.

Le traitement des données est une partie importante de ce travail et nécessite la

détermination de critères spécifiques de sélection qui seront conservés pour l'analyse de toutes les cellules imagées dans la suite de ce chapitre. C'est ainsi qu'il a été déterminé que les noyaux analysés sont sélectionnés selon plusieurs critères :

- Les vraies brillances moléculaires (e1 et e2) doivent être comprises entre 0 et 1. Cette technique permet de séparer la fraction mobile (vraies brillances supérieures à 0) de la fraction immobile (vraies brillances inférieures à 0) et sachant que seule la fraction mobile pourra donner une corrélation croisée positive, il n'est pas nécessaire d'analyser les protéines ne présentant pas de mouvement. D'autre part, une vraie brillance supérieure à 1 étant le témoin d'un phénomène d'agrégation, les noyaux présentant de telles valeurs ne seront pas analysés. Le but ici est d'étudier l'interaction entre les 2 protéines au plus proche de leur environnement naturel dans lequel elles ne sont pas agrégées.
- Les cellules doivent être immobiles. En effet, la technique de N&B est basée sur la fluctuation de fluorescence des molécules dans une cellule et non pas des cellules qui bougent elles-mêmes. Des mouvements cellulaires vont entraîner l'émission d'importantes variations d'intensité non spécifiques aux protéines d'intérêts. Ces cellules seront donc éliminées de l'analyse.
- Les cellules doivent être en bonne santé, c'est-à-dire qu'elles ne doivent pas être en apoptose. Les critères de sélection sont des cellules rondes avec des contours bien définis et des nucléoles marqués ainsi qu'une répartition homogène des protéines. Certaines cellules présentent une répartition protéique particulière. Elles se regroupent en amas très localisés dans le noyau, qui présentent de très fortes valeurs d'intensité de fluorescence et de brillance. Cette disposition révèle le début de l'apoptose de la cellule et celles-ci ne seront pas prises en compte dans les calculs des moyennes.

1) Interaction de mCherry-RevErba et Cerulean-NCor en absence de ligands

Les plasmides codant pour les protéines mCherry-RevErba et Cerulean-NCor sont transfectés simultanément et respectivement à 1 et 2 µg dans des cellules Cos7. Après 16 heures de transfection, les noyaux sont imagés selon les paramètres déterminés précédemment et les signaux détectés dans les 2 canaux sont analysés et réattribués spécifiquement aux protéines d'intérêt. Par traitement combiné des images par les 2 logiciels SimFCS et PaTrack, nous avons déterminé la concentration de RevErba et NCor, spécifiquement à l'intérieur du noyau, qui sont respectivement de 296 nM et 135 nM (Figure 4.14 C-D). Ces valeurs de concentrations sont comprises dans la gamme de détection de la technique N&B et représentent, en fait, la moyenne réalisée sur une soixantaine de noyaux imagés. La moyenne des vraies brillances moléculaire a été estimée à 0.209 pour la mCherry-RevErba et à 0.068 pour la Cerulean-NCor (Figure 4.14 E-F).

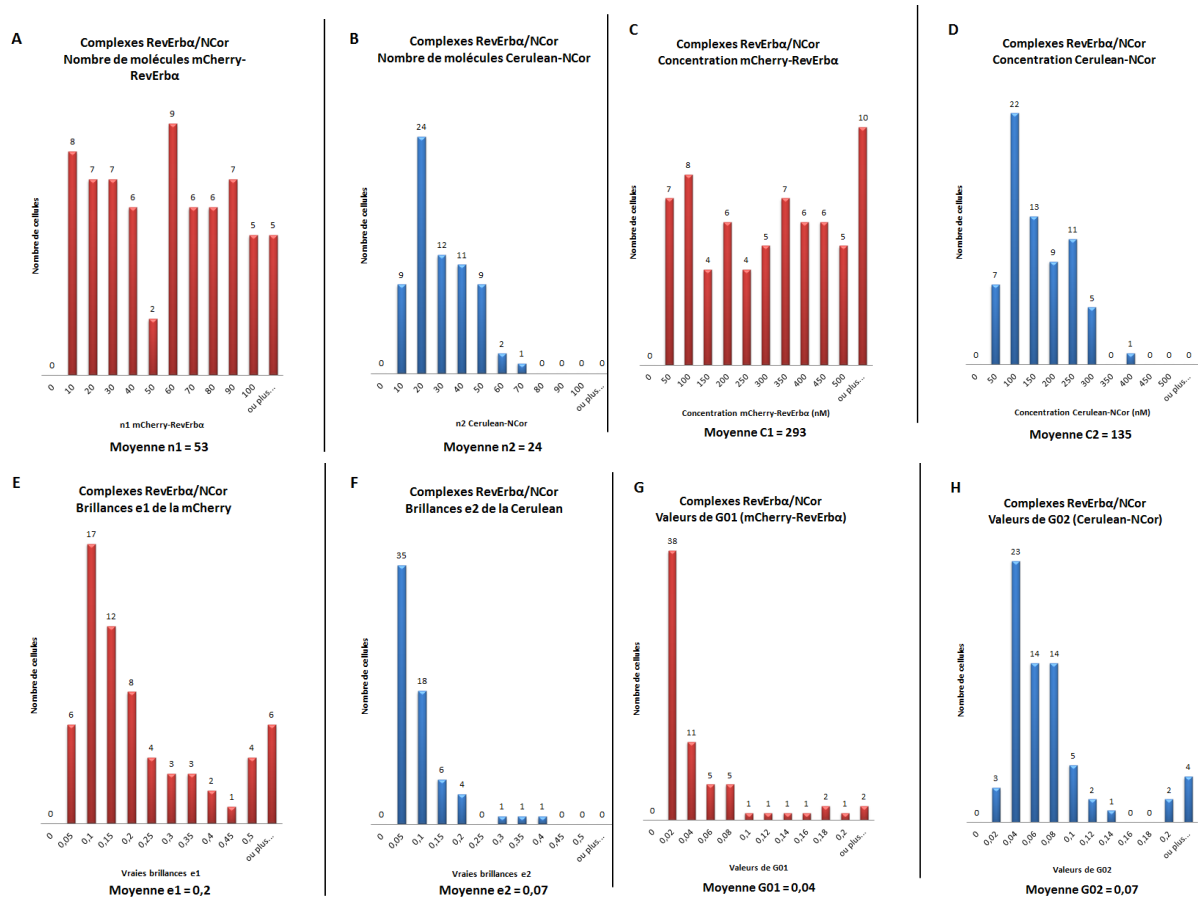


Figure 4.14 : Répartitions des valeurs obtenues pour le complexe RevErba / NCor : (A) le nombre de molécules de mCherry-RevErba et (B) de Cerulean-NCor, (C) la concentration molaire de mCherry-RevErba et (D) de Cerulean-NCor, (E) les vraies brillances de mCherry-RevErba et (F) de Cerulean-NCor et des valeurs de G01 (G) et G02 (H).

Les valeurs des vraies brillances déterminées pour les protéines d'intérêts sont ensuite comparées à celles estimées pour les FPs monomériques mCherry et Cerulean qui sont respectivement de 0.1 et de 0.02. Il semblerait donc que les protéines RevErba et NCor s'organisent en complexe assez important, ce qui est compréhensible vu leur surexpression. Cependant, les valeurs de vraies brillances sont plutôt dispersées signifiant que des gros complexes ne s'établissent pas systématiquement. Il semblerait cependant, que RevErba s'organise en homodimères car la vraie brillance monomérique estimée de la mCherry est de 0.1 et celle de mCherry-RevErba est de 0.2 soit le double prouvant donc que RevErba forme des dimères sur l'ADN. D'autre part, les protéines sont largement surexprimées dans le noyau, elles ne sont donc pas toutes liées à l'ADN et peuvent se trouver sous forme monomérique ou homodimérique. Nous pensons que les valeurs de brillances représentent un équilibre entre ces 2 formes de RevErba. Les valeurs de vraies brillances déterminées pour NCor sont plus proches de la valeur monomérique estimée de la Cerulean. Comme il est montré dans la figure 4.14 F, les valeurs d'e2 sont majoritairement inférieures à 0.1, nous pensons que les grandes valeurs de brillances correspondent à des gros complexes qui entraînent une surestimation de la vraie valeur de brillance de Cerulean-NCor. Sachant que la vraie brillance monomérique estimée de la Cerulean se situe entre 0.02 et 0.03, nous considérons que NCor est monomérique dans la majorité des cas. Ces informations sont conformes à ce qui est attendu, c'est-à-dire 2 molécules de RevErba pour une de NCor (Zamir *et al*, 1997). La corrélation croisée est ensuite étudiée et révèle l'interaction spécifique des 2 protéines (Figure 4.15 A).

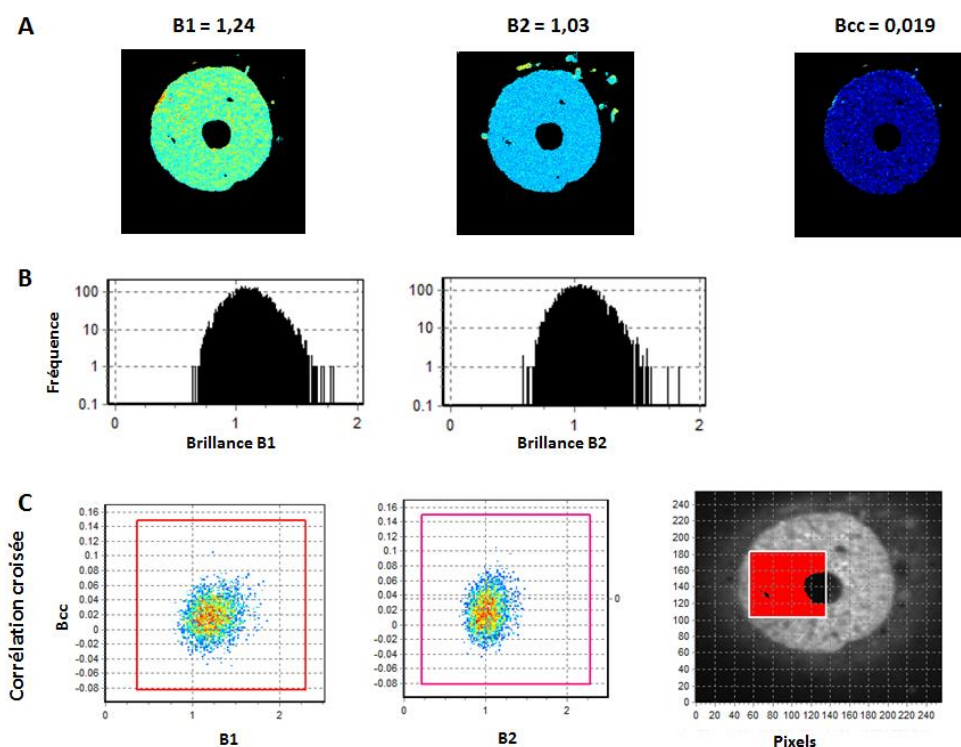


Figure 4.15 : Illustration des résultats obtenus pour l'interaction des protéines mCherry-RevErb α et Cerulean-NCor. Les FPs sont excitées par un laser biphotonique à une longueur d'onde de 950 nm et une puissance de 36 mW avec un TRP de 32 microsecondes. (A) Signal des brillances B1 (mCherry), B2 (Cerulean) et de la corrélation croisée Bcc. Cette représentation illustre la localisation des protéines à l'intérieur du noyau et démontre, par la carte de Bcc, l'interaction des 2 protéines. (B) Histogrammes représentant la valeur des brillances de la mCherry (B1) et de la Cerulean (B2) en fonction de leur fréquence d'obtention. (C) Représentation des pixels de brillances (B1 et B2) en fonction de la Bcc à l'intérieur de la ROI dans le noyau.

Les brillances B1 et B2 sont majoritairement supérieures à 1 signifiant qu'une interaction pourra être déterminée (Figure 4.15 B). En effet, les valeurs de Bcc sont positives, de plus les brillances (B1 et B2) ainsi que la Bcc sont déterminées à l'intérieur du noyau donc les agrégats ou les débris cellulaires ne sont pas pris en compte dans le calcul de ces valeurs signifiant que l'interaction est spécifique aux 2 protéines d'intérêts (Figure 4.15 C). La moyenne des valeurs de Bcc est de 0.039, il est donc clair que RevErb α et NCor ont la capacité de s'associer *in cellulo* de manière spécifique (Figure 4.16 A). Cependant, cette valeur est surestimée par les fortes valeurs de Bcc correspondant certainement à des agrégats ou à des complexes trop fortement oligomérisés ne correspondant pas aux conditions naturelles d'interaction des deux protéines d'intérêts.

Le pourcentage de complexes est alors calculé en divisant la valeur de G0x par le plus petit des 2 G0s. Il est alors obtenu le nombre de complexes par rapport à l'espèce limitante (Matériels et Méthodes). Par cette méthode de calcul, des histogrammes sont réalisés mettant en évidence que l'interaction entre les deux protéines est réelle, puisque des complexes se forment en moyenne à 118 % (Figure 4.16 B).

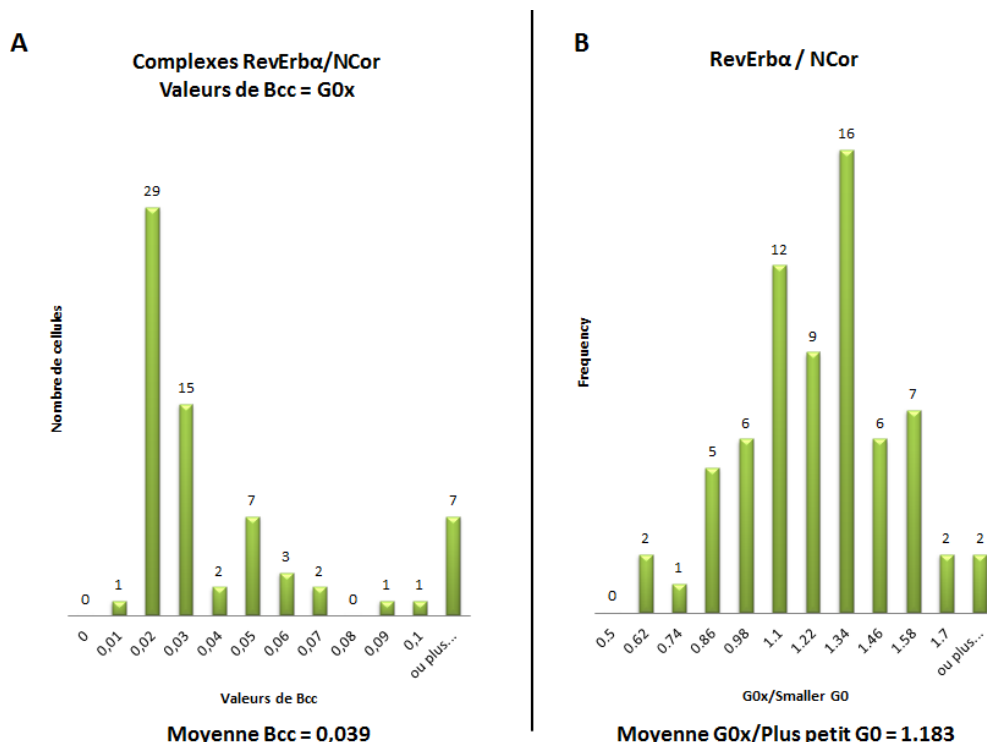


Figure 4.16 : Histogramme représentant les valeurs de Bcc ou G0x (axe des abscisses) (A) et le pourcentage de complexes formés (axe des abscisses) (B) en fonction de la fréquence d'obtention des valeurs (axe des ordonnées) pour la formation des complexes RevErb α / NCor. La valeur de 1 représentant 100%. Les moyennes sont réalisées sur 65 noyaux imagés.

Afin de réaliser une analyse complète de toutes ces données, les noyaux sont étudiés séparément en les classant selon leur brillance (cellules possédant des vraies brillances moléculaires inférieures ou supérieures à 0.2), et leur homogénéité (répartition des protéines à l'intérieur du noyau). En réalisant ce classement, des différences apparaissent dans les résultats ce qui sera utile lors de la comparaison des résultats en présence et en absence de ligand. Les transfections transitoires sont des traitements plutôt agressifs pour les cellules. Le but est effectivement de rester au plus proche des conditions naturelles, or les protéines sont largement surexprimées dans le noyau ce qui est assez éloigné de ce qui se passe dans la réalité. Cependant, si les noyaux sont divisés selon que leur brillance (dans les 2 canaux) est supérieure ou inférieure à 0.2, cela équivaut à les séparer selon que RevErb α forme des homodimères ou des plus gros complexes. Il se trouve que le complexe RevErb α / NCor sous sa forme active est composé de 2 molécules de RevErb α pour une de NCor (Zamir *et al*, 1997). Les noyaux ayant une brillance inférieure ou égale à 0.2 peuvent être considérés comme les complexes s'établissant naturellement *in vivo*. Cependant, ces cellules peuvent également être le témoin d'une complexation importante qui peut être supérieure à des homodimères, il faut donc interpréter ces résultats avec prudence et uniformément. La séparation des noyaux selon leur homogénéité est également un moyen de se rapprocher des conditions naturelles cellulaires. Un noyau hétérogène présentera de fortes valeurs d'intensité de fluorescence, contenant des protéines en forte concentration qui se regroupe pour former de gros complexes, potentiellement des agrégats (Figure 4.17). En effet, des cellules comme celles-ci présentent des amas de protéines de forte intensité de fluorescence. La ROI permet de mettre en évidence deux populations de protéines dans ces cellules hétérogènes. Les protéines à l'intérieur des spots sont regroupées et caractérisées par une forte intensité de fluorescence et des brillances légèrement plus importantes. Nous pensons que les brillances sont équivalentes car les protéines sont trop concentrées et présentent donc des mouvements browniens moins importants ce qui contribue à de faibles brillances. Cependant la brillance est compensée par la forte intensité de fluorescence. Les zones de plus fortes intensités représentent donc des regroupements importants de protéines qui sont peu mobiles et non

représentatifs des conditions de vie naturelle d'une cellule.

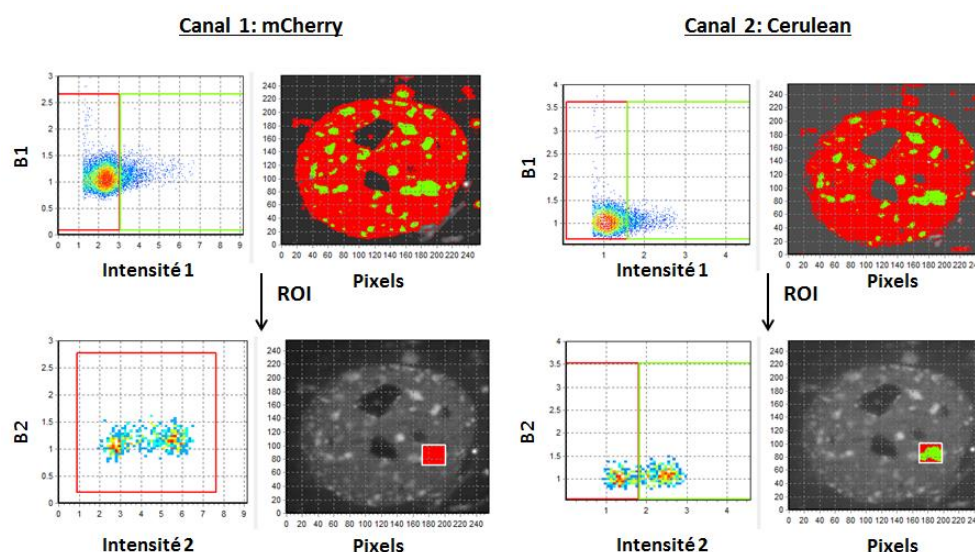


Figure 4.17 : Illustration de la répartition des protéines formant de gros complexes ou agrégats et se regroupant à l'intérieur d'amas brillants et de fortes intensités de fluorescence. Les deux populations de protéines sont visibles en rouge (endroit où les protéines sont moins concentrées) et en vert (endroit où les protéines sont plus concentrées).

Etant donné que ces noyaux hétérogènes présentent des brillances correctes et positives, ils n'ont pas été éliminés de l'analyse. Il est donc important de séparer les cellules et de les traiter selon leur état d'oligomérisation (cellules homogènes ou hétérogènes) et de leur brillance. C'est ainsi qu'en réalisant ces regroupements, les valeurs suivantes ont été déterminées :

RevErba/NCor	B1	B2	Bcc (G0x)	G0x/Plus petit G0
Totalité des cellules (65)	0.205	0.067	0.039	1.183
e1 ou e2 > 0.2 (22)	0.4	0.122	0.069	1.173
e1 ou e2 < 0.2 (38)	0.093	0.037	0.023	1.189
Cellules homogènes (34)	0.133	0.052	0.026	1.257
Cellules hétérogènes (30)	0.291	0.085	0.055	1.095

Comme ce tableau le démontre, des différences non négligeables, dues à la difficulté de contrôler l'expression des protéines d'intérêts par les transfections transitoires, apparaissent en réalisant un classement des noyaux étudiés. Ceux dont les valeurs de brillances sont supérieures à 0.2 ont en fait une moyenne de 0.4 pour mCherry-RevErba et de 0.12 pour Cerulean-NCor. Ces valeurs sont représentatives d'une grosse complexation des 2 protéines puisqu'elles sont environ 4 fois plus

grandes que celles obtenues pour les monomères. Cela ne signifie pas qu'une agrégation est présente, cependant, en prenant en compte ces noyaux nous nous éloignons de la réalité, il est peu probable que les protéines forment d'aussi gros complexes *in vivo*. Les cellules hétérogènes donnent également des brillances assez élevées : 0.29 et 0.085, ce qui est 2 à 3 fois plus important que les brillances monomériques estimées des 2 FPs. Dans les 2 cas (cellules hétérogènes ou $e_1 - e_2 > 0.2$), les fortes valeurs de brillance entraînent de fortes valeurs de Bcc et pourtant pas forcément des pourcentages de complexes plus importants. Le calcul du rapport $G0x$ par le plus petit $G0$ est donc spécifique d'une interaction réelle, en effet, les protéines forment des complexes importants sans interagir de manière spécifique : 117 % de complexes pour les cellules dont les brillances sont supérieures à 0.2 et 109 % pour les cellules hétérogènes. Nous pensons que les cellules homogènes ou présentant des brillances inférieures à 0.2 sont probablement plus proches de ce qui se passe dans des conditions naturelles. Pour conclure il est évident que les 2 protéines RevErb α et NCor interagissent de manière spécifique et importante, en effet pour les cellules homogènes et dont les brillances sont inférieures à 0.2, les pourcentages de complexes sont respectivement de 126 % et 119 %. Ces valeurs, bien que supérieures à 100% car les différences de stœchiométries ne sont pas prises en compte dans le calcul, prouvent bien que l'interaction entre RevErb α et NCor est spécifique.

Les valeurs que nous obtenons suggèrent que les complexes sont formés à 100%, de ce fait, l'effet de ligand antagoniste (diminuant l'interaction) pourra être visible, en revanche, l'effet d'un ligand agoniste (favorisant l'interaction des protéines) sera plus délicat à identifier. Cependant, comme ces valeurs de pourcentage supérieures à 100 % proviennent du fait qu'elles ne sont pas corrigées pour la stœchiométrie des complexes, nous espérons que ces derniers ne sont pas formés à 100 % et que l'effet des ligands pourra être identifié. La concentration nucléaire des protéines est importante, il se peut donc que des complexes se forment mais pas de façon naturelle. D'autre part, il est important de vérifier l'effet des FPs dans cette interaction, il ne faudrait pas qu'elle favorise l'interaction ou la défavorise. La solution serait l'utilisation d'une lignée cellulaire exprimant les protéines d'intérêts marquées des FPs de manière constitutive, ainsi l'expression de ces dernières pourrait être contrôlée, leur concentration diminuée ainsi que leur complexation, permettant ainsi d'abaisser le nombre de complexes formés. Ce travail est en cours, les lignées cellulaires exprimant les 2 protéines d'intérêts marquées par les FPs ont été établies et les essais en microscopie seront réalisés prochainement.

2) Interaction de mCherry-RevErb α et Cerulean-NCor en présence de ligand

L'effet des ligands a été testé, dans cette partie sur l'interaction des protéines pleines tailles *in cellulo*. La technique de N&B, par le calcul du pourcentage de complexes formés, est en mesure d'apporter les informations qui nous intéressent ici, à savoir, si un ligand est plutôt stabilisateur ou déstabilisateur de l'interaction entre RevErb α et NCor. Le ligand qui nous intéresse en particulier est l'hème, rapporté comme étant le ligand naturel de RevErb α . En effet, au vu des résultats contradictoires que nous avons obtenus en anisotropie de fluorescence, il est important de vérifier l'action de celui-ci sur la formation directe du complexe et non pas sur son activité transcriptionnelle. Nous avons donc commencé par l'étude de l'effet de l'hème sur le pourcentage de complexes formés, les ligands SGN et SD7 sont également présentés dans cette partie.

a) Effet de l'hème, ligand naturel de RevErb α , sur la formation de complexes

Les paramètres d'imagerie, d'observation et de traitement des données sont identiques, les plasmides mCherry-RevErb α et Cerulean-NCor sont respectivement transfectés à 1 et 2 μ g pendant 16 heures. Le ligand est ajouté, directement dans le milieu de culture, 2 heures avant l'imagerie à une concentration de 5 μ M. La quantité exacte d'hème qui pénètre dans la cellule ne peut donc pas être déterminée. Soixante-dix noyaux au total sont imagés et les valeurs données sont les moyennes déterminées sur l'ensemble de ces cellules. Les concentrations des protéines mCherry-RevErb α et Cerulean-NCor sont respectivement de 451 et 144 nM (Figure 4.18 C-D), ce qui est équivalent à ce qui avait été déterminé dans les conditions précédentes (en absence de ligand). Les valeurs de vraies brillances de la mCherry (e1) et de la Cerulean (e2) sont respectivement de 0.16 et 0.042 (Figure 4.18 E-F), il semblerait donc que RevErb α n'ait pas une forte tendance à homodimériser en présence d'hème et que NCor soit monomérique avec la formation de complexes plus importants. Les valeurs de brillances sont plutôt uniformes hormis quelques-unes qui pourraient surestimer les moyennes (Figure 4.18 C-D).

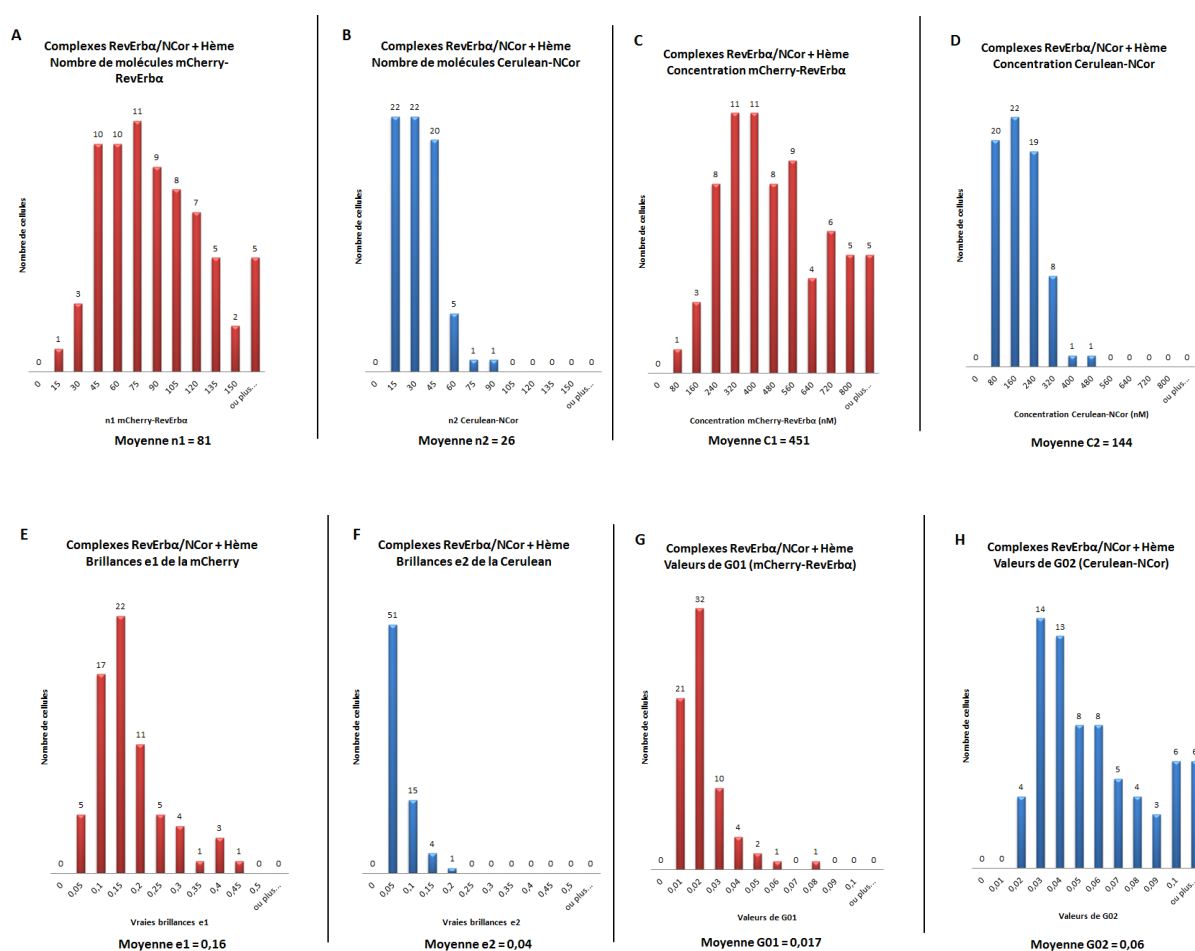


Figure 4.18 : Répartitions des valeurs obtenues pour le complexe RevErb α / NCor en présence d'hème : le nombre de molécules de mCherry-RevErb α (A) et de Cerulean-NCor (B), la concentration molaire de mCherry-RevErb α (C) et de Cerulean-NCor (D), les vraies brillances de mCherry-RevErb α (E) et de Cerulean-NCor (F) et des valeurs de G01 (G) et G02 (H). Les moyennes sont réalisées sur soixante-dix cellules analysées.

Une étude des noyaux imagés par le programme SImFCS révèle une interaction spécifique malgré la présence d'hème dans le milieu cellulaire (Figure 19 A). En effet, le nuage de points illustrant les pixels dans le noyau, spécifiquement à l'intérieur de la ROI, est majoritairement positif pour les valeurs de Bcc (Figure 19 C). Ceci révèle donc une interaction spécifique, mais est-elle plus importante qu'en l'absence d'hème ? L'hème *in vivo* a la capacité d'augmenter le recrutement du complexe NCor-HDAC3 sur RevErb α entraînant ainsi une diminution de la transcription (Yin *et al*, 2007). Si cet effet est réel, il devrait pouvoir être quantifié *in cellulo*.

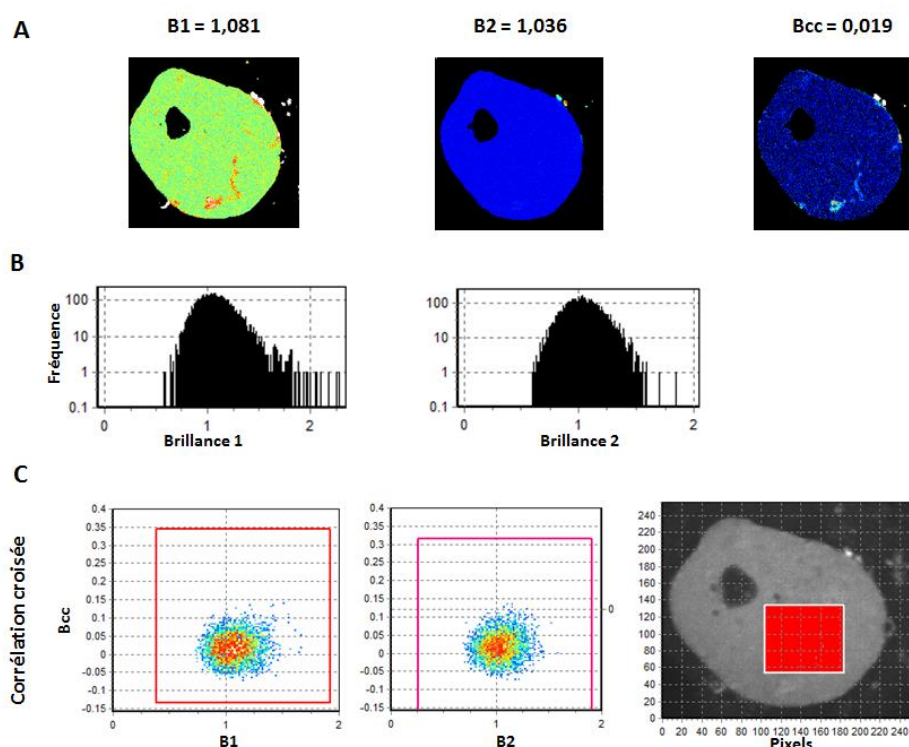


Figure 4.19 : Illustration des résultats obtenus pour l'interaction des protéines mCherry-RevErb α et Cerulean-NCor en présence d'hème. Les FPs sont excitées par un laser biphotonique à une longueur d'onde de 950 nm et une puissance de 36 mW avec un TRP de 32 microsecondes. (A) Signal des brillances B1 (mCherry), B2 (Cerulean) et de la corrélation croisée Bcc. Cette représentation illustre la localisation des protéines à l'intérieur du noyau et démontre, par la carte de Bcc, leur interaction. (B) Histogrammes représentant la valeur des brillances de la mCherry (B1) et de la Cerulean (B2) en fonction de leur fréquence d'obtention. (C) Représentation des pixels de brillances (B1 et B2) en fonction de la Bcc à l'intérieur de la ROI sélectionnée dans le noyau.

Si les noyaux sont étudiés dans leur ensemble, la moyenne des Bcc est de 0.02 (Figure 4.20 B), ce qui est moins important qu'en absence de ligand (0.039) (Figure 4.20 A). Cependant, ces valeurs ne permettent pas d'effectuer une quantification de l'effet de l'hème sur l'interaction. C'est ainsi que le pourcentage de complexes formés en présence de ligand, non corrigé pour des stœchiométries de complexes différentes de 1:1, a été déterminé à 134 % (Figure 4.20 D). En comparaison, la valeur de pourcentage de complexes formés pour l'interaction de RevErb α / NCor en absence de ligand et en prenant en compte la totalité des cellules est de 118 % (Figure 4.20 C). Cette différence est non négligeable, il semblerait donc que l'hème favorise l'association des deux protéines. Cependant, cet effet est déterminé sur la totalité des cellules et au vu de la variabilité des valeurs de vraies brillances et d'oligomérisation des protéines, l'effet réel de l'hème doit être confirmé.

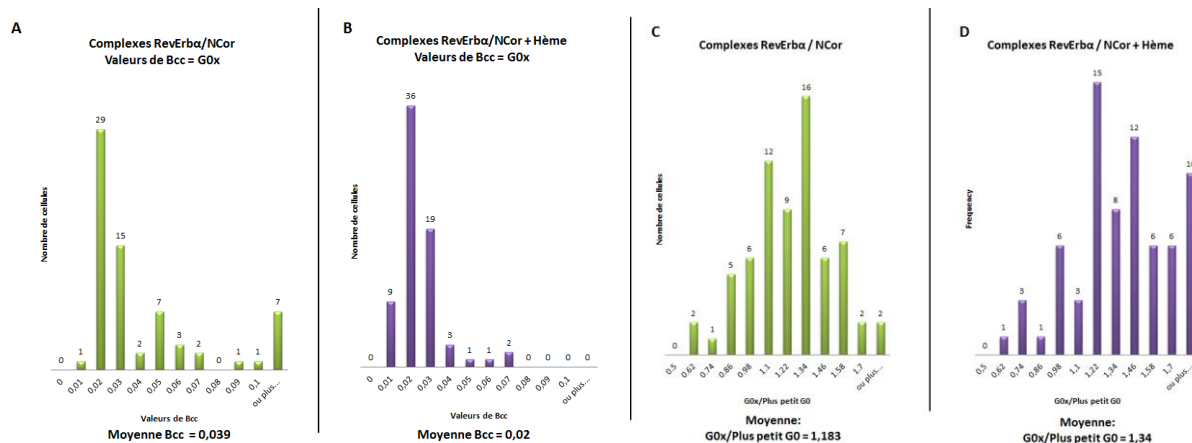


Figure 4.20 : Histogramme représentant les valeurs de Bcc ou G0x (axe des abscisses) et le pourcentage de complexes formés (axe des ordonnées) en fonction de la fréquence d'obtention des valeurs (axe des ordonnées) pour la formation des complexes RevErba / NCor en présence d'hème. Valeurs de Bcc (A) et pourcentage de complexes formés (B) obtenues pour le complexe RevErba/NCor en absence de ligand. Valeurs de Bcc (C) et pourcentage de complexes formés (D) obtenues pour le complexe RevErba / NCor en présence d'hème. La valeur de 1 représentant 100%. Le pourcentage de complexes formés, en absence de ligand, est de 118 %. Et de 134 % en présence d'hème. Les moyennes sont réalisées sur 70 noyaux imagés (pour les cellules en présence d'hème).

Il est difficile de conclure de manière précise quant à l'effet réel de l'hème sur cette interaction. Il est vrai que la moyenne de pourcentage de complexes formés est plus importante en présence d'hème qu'en son absence. Cependant, il faut considérer la disparité des valeurs obtenues, en effet, des pourcentages très importants sont déterminés en présence d'hème pouvant provenir d'une interaction non spécifique des protéines comme des agrégats. Ces fortes valeurs surestimeraient donc la moyenne de pourcentage de complexes formés. Il est donc nécessaire de réaliser le classement des noyaux selon leur brillance et leur homogénéité, comme effectué en absence de ligand. Ainsi, les noyaux pourront être comparés directement suivant leur caractéristique permettant de conclure de manière plus définitive sur l'effet réel de l'hème sur l'interaction directe de RevErba et NCor. Le tableau suivant regroupe les valeurs obtenues en fonction des différentes conditions d'analyse :

RevErba/NCor + Hème	e1	e2	Bcc (G0x)	G0x/Plus petit G0
Totalité des cellules (70)	0.146	0.042	0.020	1.34
e1 ou e2 > 0.2 (13)	0.35	0.066	0.026	1.4
e1 ou e2 < 0.2 (57)	0.106	0.035	0.019	1.3
Cellules homogènes (35)	0.128	0.03	0.19	1.26
Cellules hétérogènes (35)	0.201	0.054	0.022	1.4

Comme pour RevErba / NCor en absence de ligand, les cellules hétérogènes ou présentant une brillance supérieure à 0.2 donnent des valeurs de brillance importante faisant penser à la

formation de gros complexes. Les protéines, vu leur surexpression, doivent s'organiser en grand nombre ce qui peut être assez éloigné de ce qui se passe *in vivo*. Les brillances obtenues pour les cellules homogènes ou présentant des vraies brillances inférieure à 0.2 sont plus raisonnables. En effet, avec les valeurs de e_1 et e_2 d'environ 0.1 et 0.03, sont similaires à celles obtenues pour le complexe RevErb α / NCor en absence de ligand. En admettant que la complexation soit la même dans les 2 cas, les résultats peuvent être comparés entre eux. Si l'on considère les cellules hétérogènes et dont les vraies brillances sont supérieures à 0.2, l'hème aurait une faible tendance à favoriser l'association du complexe. En effet, des moyennes de 140 % de complexes formés en présence d'hème sont obtenues dans les 2 cas, ce qui représente une augmentation de 30 % du nombre de complexes formés en présence d'hème. Cependant, son effet très fort fait presque penser à un effet non spécifique. Nous avons pu constater en absence de ligand, que les protéines ne semblent pas interagir de manière spécifique dans des cellules hétérogènes ou dont les brillances sont supérieures à 0.2. En effet, ces cellules semblent plutôt éloignées des conditions de vie naturelle. Les différences de pourcentage de complexes formés, induite par la présence d'hème, sur les cellules homogènes ou dont les vraies brillances sont inférieures à 0.2 sont nettement moins marquées. Le ligand entraîne une augmentation de pourcentage inférieure à 10 dans les 2 cas, ce qui est négligeable. Il est possible que l'hème trop concentré entraîne l'agrégation des protéines ou une oligomérisation trop importante et non spécifique.

Il est difficile de conclure de manière définitive par rapport à l'effet de l'hème sur l'interaction RevErb α / NCor. Selon les conditions dans lesquelles sont les cellules, le nombre de complexes est plus ou moins important en sa présence. Afin de déterminer l'effet réel du ligand sur l'association des protéines d'intérêts, il serait nécessaire de pouvoir contrôler leur expression ce qui est possible par l'utilisation de lignée cellulaire exprimant constitutivement les protéines d'intérêts marquées des FPs. Une induction permettrait une expression contrôlée des protéines évitant ainsi leur surexpression ou leur agrégation ce qui aiderait à uniformiser les résultats obtenus et à conclure quant à l'effet réel de l'hème sur l'interaction.

b) Effet du SGN, ligand non naturel de RevErb α , sur la formation de complexes

Le ligand SGN a été identifié par FRET pour son effet sur le complexe RevErb α / NCor. Il est rapporté qu'il augmenterait le recrutement du corépresseur de 70%. Il a également été démontré que ce ligand entraînait une diminution de 30% de l'activité du promoteur Pai1 (un des gènes cible de RevErb α) par des essais de gènes rapporteurs à la luciférase. D'autre part, le SGN n'est pas connu pour avoir de l'affinité ou une activité sur d'autres récepteurs nucléaire excepté RevErb α (Meng *et al*, 2008). Ce ligand est donc d'un grand intérêt au vu de sa spécificité d'action. Nous avons déterminé par anisotropie de fluorescence que le SGN agit comme stabilisateur de l'interaction RevErb α / NCor. Le travail de microscopie a été de confirmer l'effet de ce ligand sur les protéines pleine taille dans un environnement se rapprochant des conditions de vie naturelles des cellules. Le nombre de complexes formés en présence et en absence de SGN a permis d'apporter des informations sur son action réelle.

Les conditions de cultures et d'imagerie microscopique restent les mêmes que celles utilisées précédemment et le ligand SGN est ajouté 2 heures avant l'imagerie à 5 μ M directement dans le milieu de culture. Une centaine de cellules ont été imagées dans ces conditions et triées comme cité auparavant, selon l'expression des protéines, les brillances et la santé des cellules imagées. C'est ainsi qu'il a été possible de déterminer les vraies brillances moléculaires de la mCherry-RevErb α et de la Cerulean-NCor en présence de SGN qui sont respectivement de 0.18 et de 0.06 (Figure 4.21 E-F), ainsi que les concentrations de RevErb α (380 nM) et de NCor (173 nM) (Figure 4.21 C-D).

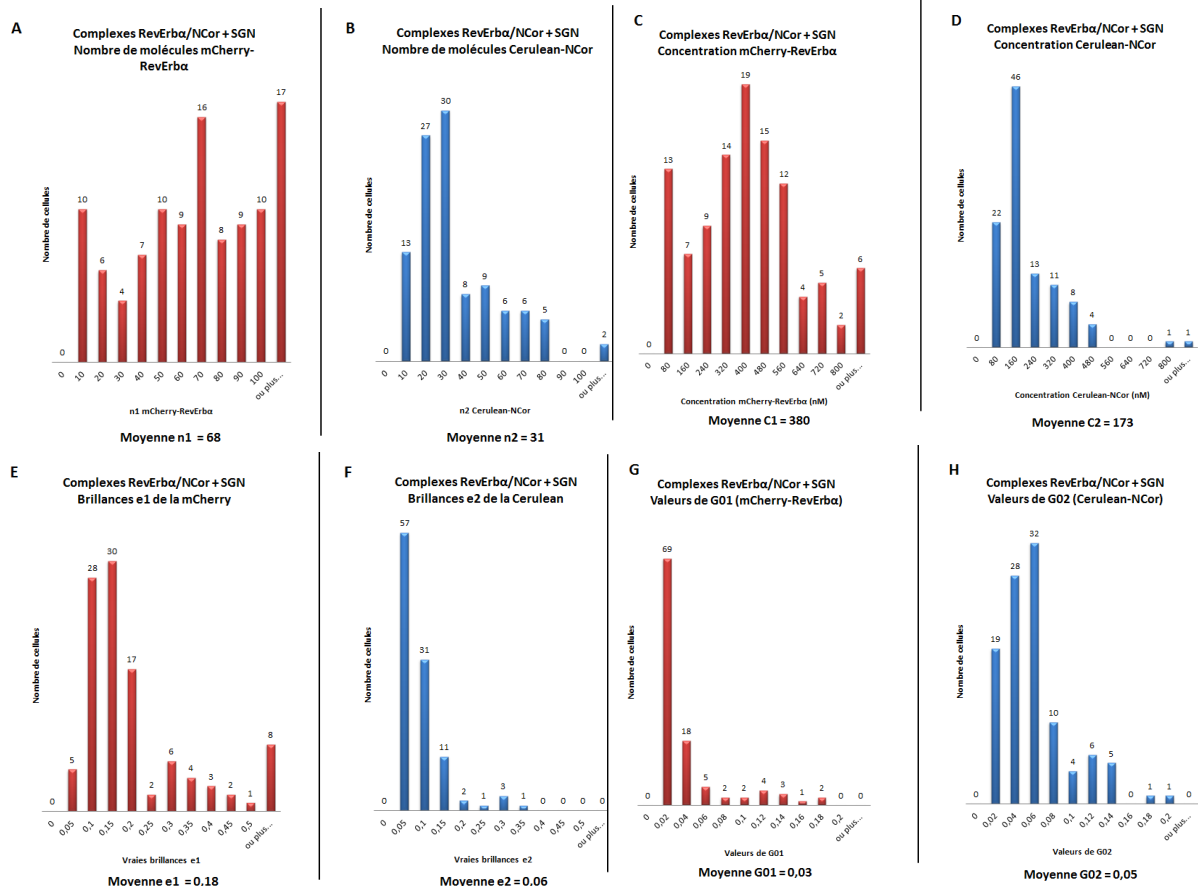


Figure 4.21 : Répartitions des valeurs obtenues pour le complexe RevErba / NCor en présence de SGN : le nombre de molécules de mCherry-RevErba (A) et de Cerulean-NCor (B), la concentration molaire de mCherry-RevErba (C) et de Cerulean-NCor (D), les vraies brillances de mCherry-RevErba (E) et de Cerulean-NCor (F) et des valeurs de G01 (G) et G02 (H). Les moyennes sont réalisées sur 105 cellules.

Comme précédemment, la surexpression des protéines entraîne une répartition des valeurs de brillances très larges. De grosses brillances sont obtenues qui font penser à des agrégats et qui sont prises en compte dans le calcul de la moyenne. Cependant, si l'on considère, non pas la moyenne, mais plutôt les valeurs de vraies brillances qui sont le plus représentées, les valeurs de 0.1 et 0.05 sont respectivement obtenues pour mCherry-RevErba et Cerulean-NCor (Figure 4.21 E-F). Sachant que les vraies brillances monomériques sont estimées à 0.1 pour mCherry et 0.02 pour Cerulean, il semblerait que les protéines respectent le schéma d'organisation classique c'est-à-dire 2 molécules de RevErba et une molécule de NCor. Les brillances (B1 et B2) sont majoritairement supérieures à 1 (Figure 4.22 B) et la répartition protéique dans le noyau est homogène. La présence de SGN ne semble pas affecter l'expression ou l'organisation des protéines (Figure 4.22 A-B). La corrélation croisée est positive à l'intérieur du noyau (Figure 4.22 C). La présence de débris cellulaires ou agrégats à l'extérieur du noyau peut entraîner une surestimation des valeurs de brillances et de la corrélation croisée. L'utilisation d'une ROI, permettant de sélectionner une zone d'intérêt spécifique à l'intérieur du noyau, élimine ces particules très brillantes des calculs de B1, B2 et Bcc (Figure 4.22 C). La corrélation croisée est positive en présence de SGN, le ligand ne semble donc pas avoir d'effet dissociatif sur le complexe (Figure 4.22 C). En effet, le nuage de points, correspondant aux pixels localisés à l'intérieur de la ROI, est majoritairement positif pour la Bcc prouvant qu'une interaction réelle et spécifique existe pour les protéines en présence de SGN.

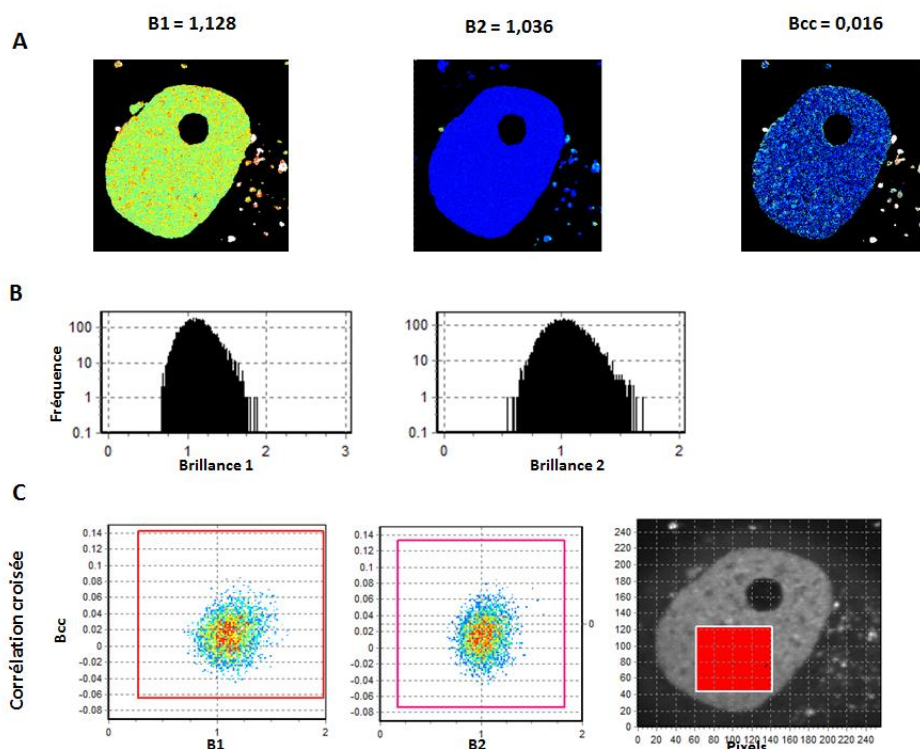


Figure 4.22 : Illustration des résultats obtenus pour l'interaction des protéines mCherry-RevErb α et Cerulean-NCor en présence de SGN. Les FPs sont excitées par un laser biphotonique à une longueur d'onde de 950 nm et une puissance de 36 mW avec un TRP de 32 microsecondes. **(A)** Signal des brillances B1 (mCherry), B2 (Cerulean) et de la corrélation croisée Bcc. Cette représentation illustre la localisation des protéines à l'intérieur du noyau et démontre, par la carte de Bcc, leur interaction. **(B)** Histogrammes représentant la valeur des brillances de la mCherry (B1) et de la Cerulean (B2) en fonction de leur fréquence d'obtention. **(C)** Représentation des pixels de brillances (B1 et B2) en fonction de la Bcc à l'intérieur de la ROI dans le noyau

Tout comme pour l'hème, l'effet du SGN est difficile à identifier clairement sur cette interaction. Au vu des valeurs de Bcc, il ne dissocie pas le complexe et favorise l'association des deux protéines RevErb α et NCor (Figure 4.23 B). Cependant, les différences de pourcentage de complexes formés, si l'on considère la totalité des cellules, sont négligeables. Une augmentation de 5 % est observé en présence de ligand ce qui est trop faible pour conclure précisément sur l'effet du SGN (Figure 4.23 C-D). Cependant, il est important de prendre en compte toutes les possibilités, comme précédemment, en réalisant une analyse selon l'état d'oligomérisation des protéines (vraies brillances) ou leur homogénéité. D'autre part, il est préférable de rester au plus proche des conditions de vie naturelle des cellules et pour cela, il faut éliminer de l'analyse les cellules présentant une trop forte brillance.

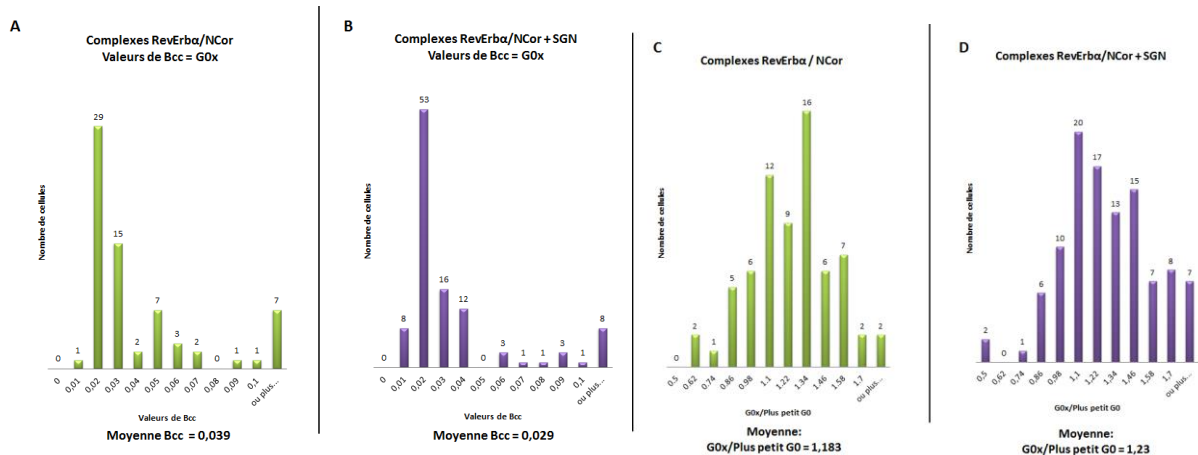


Figure 4.23 : Histogramme représentant les valeurs de Bcc ou G0x (axe des abscisses) et le pourcentage de complexes formés (axe des ordonnées) en fonction de la fréquence d'obtention des valeurs (axe des ordonnées) pour la formation des complexes RevErbα / NCor en présence de SGN. Valeurs de Bcc (A) et pourcentage de complexes formés (B) obtenues pour le complexe RevErbα / NCor en absence de ligand. Valeurs de Bcc (C) et pourcentage de complexes formés (D) obtenues pour le complexe RevErbα / NCor en présence de SGN. La valeur de 1 représentant 100 %. Le pourcentage de complexes formés, en absence de ligand, est de 118 %. Et de 123 % en présence de SGN. Les moyennes sont réalisées sur 70 noyaux imagés

Il semblerait qu'un faible effet stabilisateur du SGN soit identifié sur l'interaction des deux protéines RevErbα et NCor. Bien que les différences observées sur le pourcentage de complexes formés, en absence et en présence de ligand, soient très faibles (5-10 %), l'effet est réel. La répartition de ces valeurs semble être légèrement déportée vers de plus forts pourcentages que ceux obtenus en absence de ligand (Figure 4.23 C-D). En effet, une augmentation des pourcentages de complexes formés est observée pour les cellules hétérogènes et dont les brillances sont supérieures ou inférieures à 0.2. Il est encourageant d'observer un effet plus important sur les cellules dont les brillances sont inférieures à 0.2, car elles représentent les cellules au plus proches des conditions de vie naturelle. Cependant, l'effet du SGN est négligeable sur les cellules homogènes. Considérant la disparité des valeurs de brillances et de concentrations protéique, il sera difficile d'identifier distinctement un effet stabilisateur du SGN sur l'interaction de RevErbα et de NCor. Nous ne pouvons pas exclure que la surexpression des protéines peut entraîner des phénomènes d'agrégation ou d'oligomérisation importante qui fausseraient les résultats obtenus. De plus, la concentration exacte de ligands intracellulaires n'est pas connue, il est possible que nous soyons en présence d'un mélange de noyaux dans lesquels le ligand est présent à différentes concentrations. D'autre part, le nombre de complexes formés en absence de ligand est déjà supérieur à 100 %, il est donc plus difficile d'identifier un effet stabilisateur qui entraînerait une augmentation encore plus importante du pourcentage de complexes formés. Il se peut que l'effet agoniste du SGN faiblement observé ici soit spécifique, cependant, les résultats doivent être unifiés afin de pouvoir conclure précisément quant à l'effet du SGN sur l'interaction des protéines pleine taille.

RevErba/NCor + SGN	e1	e2	Bcc (G0x)	G0x/Plus petit G0
Totalité des cellules (105)	0.186	0.066	0.031	1.23
e1 ou e2 > 0.2 (24)	0.4	0.129	0.051	1.2
e1 ou e2 < 0.2 (80)	0.113	0.044	0.024	1.24
Cellules homogènes (34)	0.154	0.045	0.037	1.18
Cellules hétérogènes (70)	0.201	0.075	0.028	1.26

L'effet stabilisateur du SGN sur l'interaction de RevErba et NCor observé ici est faible, mais semble être spécifique. En effet, les valeurs de brillances ne sont pas différentes de celles obtenues en absence de ligand, ce qui indique que les protéines ne forment pas de gros agrégats ou d'interaction non spécifique. Il est cependant important de confirmer cet effet en uniformisant les données, afin d'extraire plus distinctement son action stabilisatrice de l'interaction. Pour cela, des lignées cellulaires inductibles, exprimant de manière constitutive les protéines d'intérêts RevErba et NCor fusionnées aux FP mCherry et Cerulean, seront utilisées. L'expression protéique pourra ainsi être contrôlée et unifiée. Enfin, la dernière étape sera l'étude de l'effet de ce ligand sur l'activité transcriptionnelle du complexe sur un gène cible particulier codant pour l'enzyme G6Pase intervenant dans la voie de synthèse du glucose. Ce travail sera réalisé ultérieurement à l'écriture de ce manuscrit.

c) Effet du SD7, ligand non naturel de RevErba, sur la formation de complexes

Le ligand SD7 a été identifié par des tests de gènes rapporteurs à la luciférase. C'est un ligand antagoniste du RORα / SRC2, c'est-à-dire qu'il diminue l'interaction entre le récepteur nucléaire et son coactivateur et de ce fait, entraîne une baisse de l'activité transcriptionnelle des gènes cibles. Aucune activité n'a été déterminée sur les récepteurs nucléaires LXR et RORγ. L'effet du ligand a été testé sur le gène codant pour la G6Pase et qui nous intéresse dans ce travail (Kumar *et al*, 2009). Nous avons confirmé, avec l'anisotropie de fluorescence, l'effet déstabilisateur de ce ligand sur l'association du complexe RevErba / NCor. Nous souhaitons à présent confirmer son effet *in cellulo* sur les protéines pleine taille.

Les plasmides codant pour les protéines d'intérêts (mCherry-RevErba et Cerulean-NCor) sont transfectés transitoirement dans des cellules Cos7 aux mêmes quantités que précédemment (respectivement 1 µg et 2 µg). Le ligand a été ajouté environ 2 heures avant l'imagerie des cellules à 5 µM. Les conditions d'imagerie et d'analyse restent inchangées et une cinquantaine de cellules ont été étudiées. Les moyennes données prennent en compte la totalité des cellules dans un premier temps. C'est ainsi que les vraies brillances des protéines ont été estimées à 0.15 pour mCherry-RevErba et 0.05 pour Cerulean-NCor (Figure 4.24 E-F).

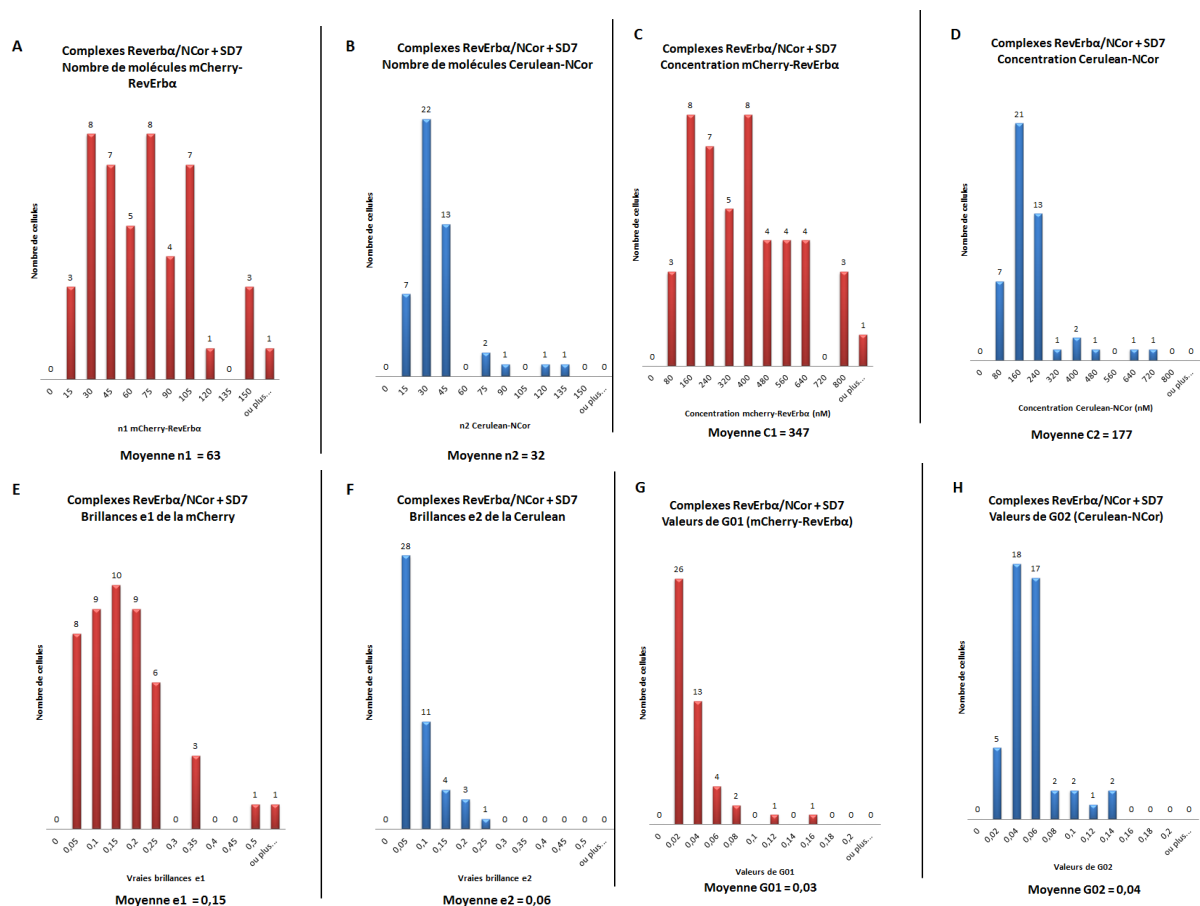


Figure 4.24 : Répartitions des valeurs obtenues pour le complexe RevErba/NCor en présence de SD7 : le nombre de molécules de mCherry-RevErba (A) et de Cerulean-NCor (B), la concentration de mCherry-RevErba (C) et de Cerulean-NCor (D), les brillances de mCherry-RevErba (E) et de Cerulean-NCor (F) et des valeurs de G01 (G) et G02 (H). Les moyennes sont réalisées sur 46 noyaux imagés.

Les moyennes des vraies brillances monomériques des FPs mCherry (e1) et Cerulean (e2) ont été respectivement estimées à 0.1 et 0.02. Comme précédemment, dû à la surexpression des protéines et à leur forte concentration (347 et 177 nM respectivement pour la mCherry-RevErba et Cerulean-NCor), nous sommes en présence d'un mélange de monomères, d'homodimères et de complexes plus importants dans certains cas (Figure 4.24 C-D). Une analyse plus approfondie permet de préciser que les brillances ainsi que la corrélation croisée sont uniformes dans le noyau (Figure 4.25 A). La corrélation est détectable dans le noyau, malgré la présence d'agrégats ou de débris cellulaires péri-nucléaire (Figure 4.25 A). Le calcul de ces paramètres est amélioré grâce à la sélection d'une ROI, exclusivement nucléaire, vérifiant le fait qu'à l'intérieur du noyau les brillances (B1 et B2) sont majoritairement supérieures à 1 (Figure 4.25 B) et que la corrélation croisée est majoritairement positive (Figure 4.25 C). La moyenne des valeurs de Bcc est de 0.025 (Figure 4.26 B), signifiant que les protéines RevErba et NCor interagissent de manière spécifique malgré la présence du ligand SD7 supposé être déstabilisateur. Il est possible que ce ligand ait un effet spécifique sur l'association du complexe qui ne sera pas entièrement visible car il ne permet pas de rompre toutes les interactions surtout si celui-ci est en concentration inférieure aux nombre de protéines. Il est ajouté à 5 μ M dans le milieu cellulaire, cependant il n'est pas possible de déterminer sa concentration intracellulaire. Il se peut qu'il n'en pénètre pas suffisamment à l'intérieur du noyau, c'est pour cela qu'il est important de vérifier si le SD7 a un effet sur la formation du nombre de complexes.

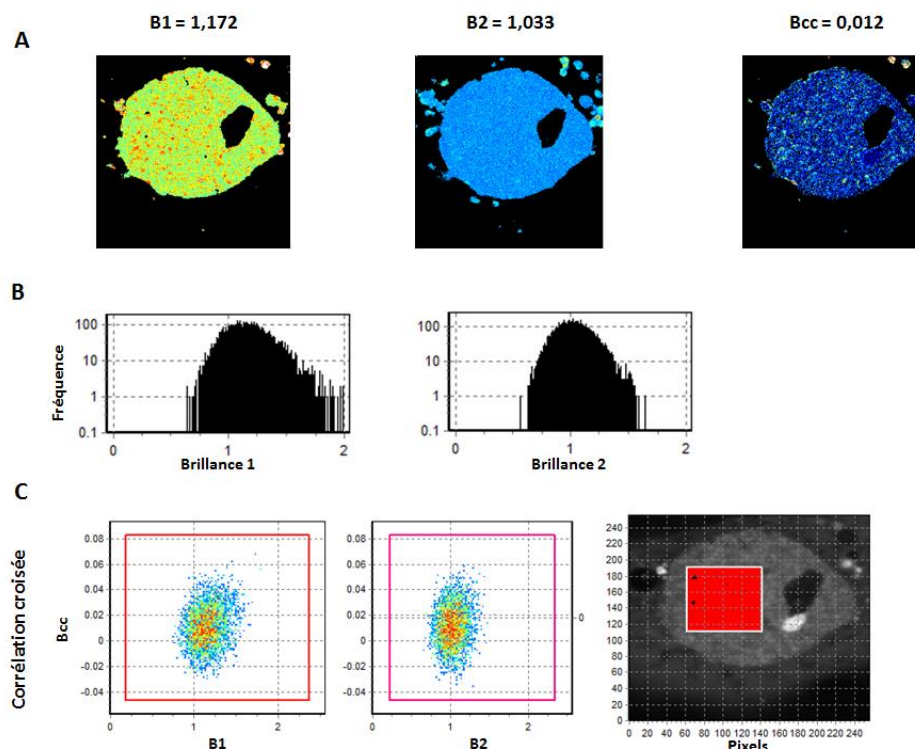


Figure 4.25 : Illustration des résultats obtenus pour l'interaction des protéines mCherry-RevErb α et Cerulean-NCOR en présence de SD7. Les FPs sont excitées par un laser biphotonique à une longueur d'onde de 950 nm et une puissance de 36 mW avec un TRP de 32 microsecondes. **(A)** Signal des brillances B1 (mCherry), B2 (Cerulean) et de la corrélation croisée Bcc. Cette représentation illustre la localisation des protéines à l'intérieur du noyau et démontre, par la carte de Bcc, leur interaction. **(B)** Histogrammes représentant la valeur des brillances de la mCherry (B1) et de la Cerulean (B2) en fonction de leur fréquence d'obtention. **(C)** Représentation des pixels de brillances (B1 et B2) en fonction de la Bcc à l'intérieur de la ROI dans le noyau.

La moyenne du pourcentage de complexes formés pour la totalité des cellules est de 124 % en présence de SD7 alors qu'elle est de 118 % en son absence. Il semblerait que ce ligand favorise l'interaction des protéines pleine taille. Cependant, la large répartition des valeurs de pourcentage de complexes (Figure 4.26 D) indique que la moyenne calculée pourrait être faussée. En effet, ces valeurs de pourcentage élevées correspondent probablement à des agrégats ou à des protéines trop oligomérisées qui possèdent de fortes brillances et aboutissent donc à de fortes valeurs de Bcc. L'effet de ce ligand est encore difficile à déterminer précisément, dû à la disparité des valeurs de brillances, de concentration protéique, ainsi que de concentration intracellulaire de ligand. En effet, nous ne connaissons pas la quantité exacte de SD7 présent à l'intérieur des cellules, ni même si celle-ci sera suffisante pour saturer les sites d'interactions et induire une dissociation des protéines visible sur les valeurs de pourcentage de complexes formés. Il est également possible que ce ligand provoque des phénomènes d'agrégations aboutissant à une surestimation du nombre de complexes formés. Pour essayer de palier à ces différences et d'uniformiser les résultats, les cellules sont classées comme précédemment et analysées selon leur homogénéité et leur vraies brillances.

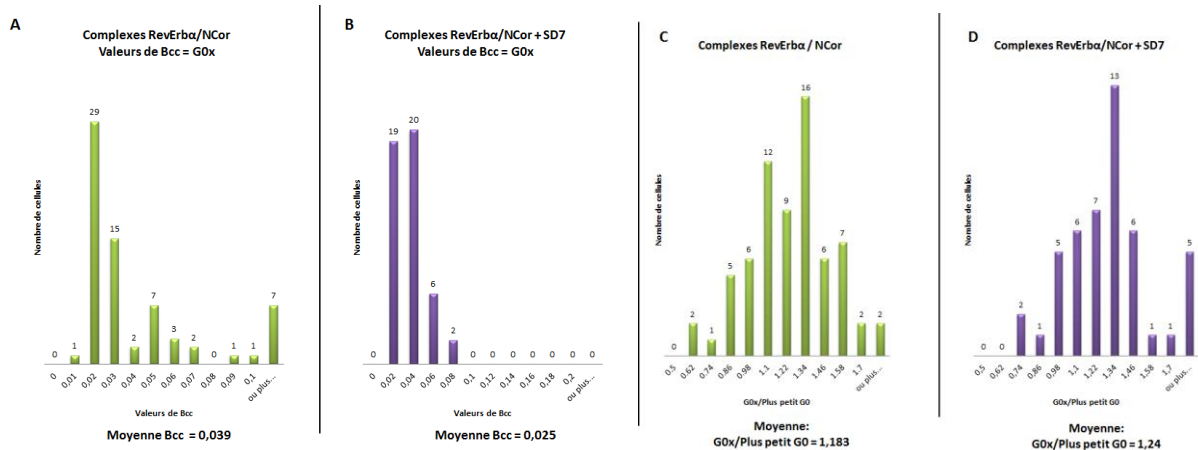


Figure 4.26 : Histogrammes représentant les valeurs de Bcc ou G0x (axe des abscisses) et le pourcentage de complexes formés (axe des ordonnées) en fonction de la fréquence d'obtention des valeurs (axe des ordonnées) pour la formation des complexes RevErba / NCor en présence de SD7. Valeurs de Bcc (A) et pourcentage de complexes formés (B) obtenues pour le complexe RevErba / NCor en absence de ligand. Valeurs de Bcc (C) et pourcentage de complexes formés (D) obtenus pour le complexe RevErba / NCor en présence de SD7. La valeur de 1 représentant 100 %. Le pourcentage de complexes formés, en absence de ligand, est de 118 % et de 124 % en présence de SD7. Les moyennes sont réalisées sur 46 noyaux imagés.

Les cellules ont donc été séparées en fonction des différents critères, précédemment énumérés, afin de pouvoir conclure sur l'effet réel du ligand SD7 sur l'interaction. Suite à la classification des cellules, le ligand SD7 ne semble pas entraîner une dissociation du complexe, mais il n'augmente pas non plus leur affinité. Les différences de pourcentage des complexes avec et sans ligand sont d'à peine 10 % pour toutes les conditions, exactement comme pour le SGN. Cet écart n'est pas suffisamment important pour conclure de manière juste sur l'effet de ce ligand.

RevErba/NCor + SD7	e1	e2	Bcc (G0x)	G0x/Plus petit G0
Totalité des cellules (46)	0.148	0.058	0.026	1.24
B1 ou B2 > 1.2 (11)	0.279	0.092	0.031	1.24
B1 ou B2 < 1.2 (35)	0.103	0.046	0.024	1.24
Cellules homogènes (20)	0.141	0.056	0.027	1.35
Cellules hétérogènes (26)	0.154	0.06	0.025	1.16

Le ligand SD7 ne semble pas dissocier le complexe, mais il ne semble pas favoriser son association non plus. Il est possible que son effet ne puisse pas être visible à cause de la surexpression des protéines. Afin de conclure clairement sur le SD7, l'utilisation de lignée cellulaire inducible, exprimant les protéines d'intérêts fusionnées aux FPs constitutivement, aiderait à contrôler l'expression des protéines et permettrait également de comprendre le mode de fonctionnement du SD7. Des essais de gènes rapporteurs à la luciférase permettraient de conclure par rapport à son effet sur l'activité transcriptionnelle des gènes régulés par le complexe RevErba / NCor, en particulier sur le gène codant pour l'enzyme G6Pase. Ces travaux ne seront pas présentés dans ce manuscrit mais seront effectués par la suite.

IV. Interaction *in cellulo* de RevErb α et SMRT pleine taille

Le corépresseur SMRT est souvent retrouvé associé aux mêmes récepteurs nucléaires que NCor, c'est pour cela que son étude nous a intéressés. RevErb α est rapporté pour interagir uniquement avec NCor *in vivo*, cependant, au vu de nos résultats en anisotropie de fluorescence, il est évident que l'interaction entre RevErb α et SMRT est possible d'un point de vue structural. En effet, la similarité de séquences et de structures entre les 2 corépresseurs n'explique pas l'impossibilité de SMRT à se lier à RevErb α . D'autre part, les constantes d'affinités déterminées en anisotropie de fluorescence entre le LBD du récepteur nucléaire et un peptide corépresseur SMRT sont 10 fois plus importantes que celle obtenues avec le même peptide NCor. Cette affinité ne peut pas être limitée à se produire uniquement *in vitro*, il n'y a aucune raison que les 2 protéines pleine taille n'interagissent pas *in cellulo*. C'est ce qui a été vérifié en microscopie de fluorescence N&B, le corépresseur SMRT pleine taille est marqué par la Cerulean en N-ter, de ce fait aucune modification d'analyse, d'imagerie ou d'étude n'a été effectué. Les plasmides sont transfectés à des quantités de 1 μ g pour mCherry-RevErb α et 2 μ g pour Cerulean-SMRT.

Une cinquantaine de cellules ont été imagées et analysées permettant de déterminer les moyennes des vraies brillances de mCherry-RevErb α (e1) et de la Cerulean-SMRT (e2) respectivement de 0.082 et 0.119 (Figure 4.27 E-F). Les concentrations des deux protéines sont de 329 nM, le corépresseur SMRT s'exprime mieux par transfections transitoires que le NCor (Figure 4.27 C-D).

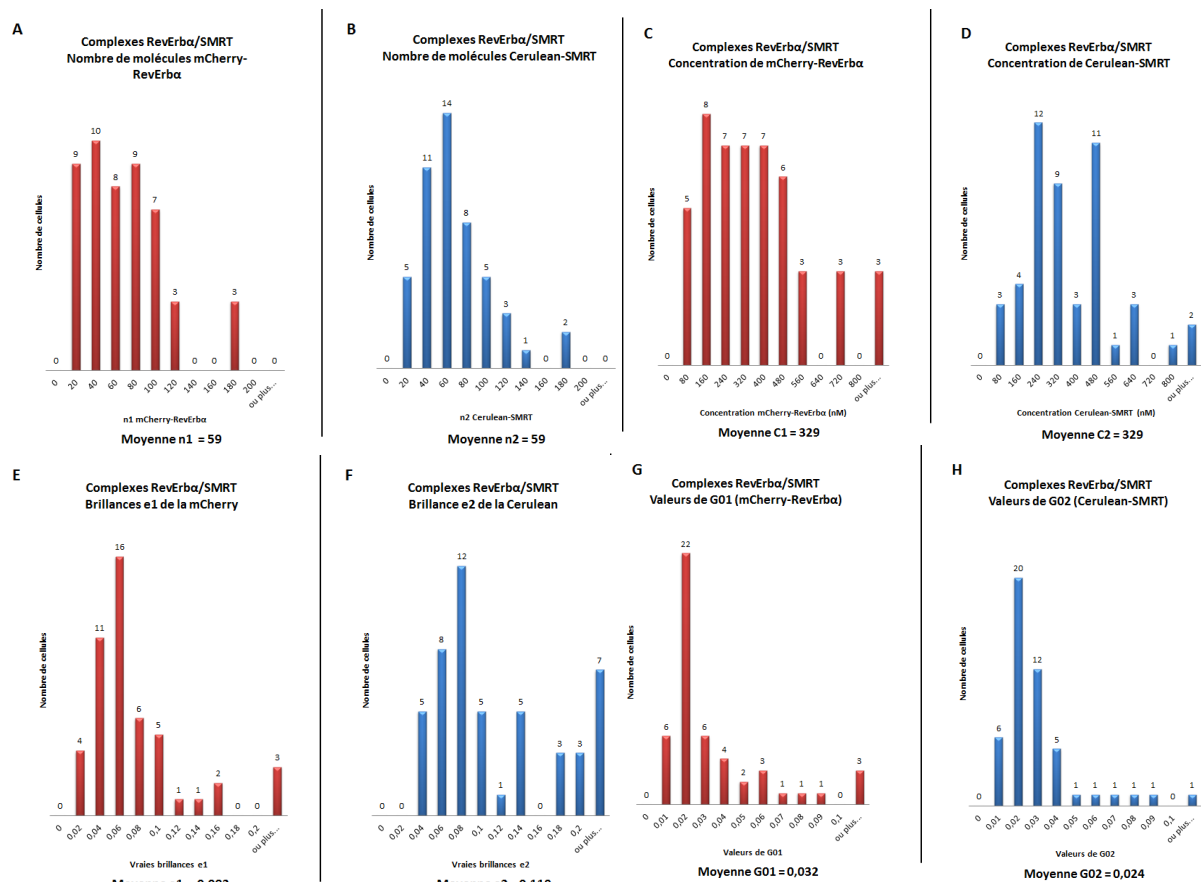


Figure 4.27 : Répartitions des valeurs obtenues pour le complexe RevErba / SMRT : le nombre de molécules de mCherry-RevErba (A) et de Cerulean-SMRT (B), la concentration molaire de mCherry-RevErba (C) et de Cerulean-SMRT (D), les vraies brillances de mCherry-RevErba (E) et de Cerulean-SMRT (F) et des valeurs de G01 (G) et G02 (H). Les moyennes sont réalisées sur 48 noyaux imagés

Les brillances monomériques des FPs ont été déterminées à 0.1 pour la mCherry et 0.02 pour la Cerulean. Il semblerait donc que SMRT dimérise, voire oligomérisse en complexes plus importants contrairement à NCor, par contre RevErba semble être présent sous forme monomérique. Les brillances (B1 et B2) sont homogènes (Figure 4.28 A) et majoritairement supérieures à 1 dans le noyau (Figure 4.28 B). La corrélation croisée est présente uniformément dans le noyau, signifiant donc une interaction spécifique entre RevErba et SMRT (Figure 4.19 A-C). Afin de s'affranchir des particules péri-nucléaires très brillantes, la ROI permet de sélectionner une région d'intérêt à l'intérieur du noyau. Les agrégats ou débris cellulaires, étant à l'origine d'une forte brillance pouvant amener à des fortes valeurs de Bcc non spécifique d'une interaction, seront éliminés du calcul de la corrélation croisée (Figure 4.28 C). Les valeurs de Bcc sont majoritairement positives à l'intérieur du noyau soutenant l'hypothèse d'une interaction spécifique entre les protéines RevErba et SMRT pleine taille (Figure 4.28 C).

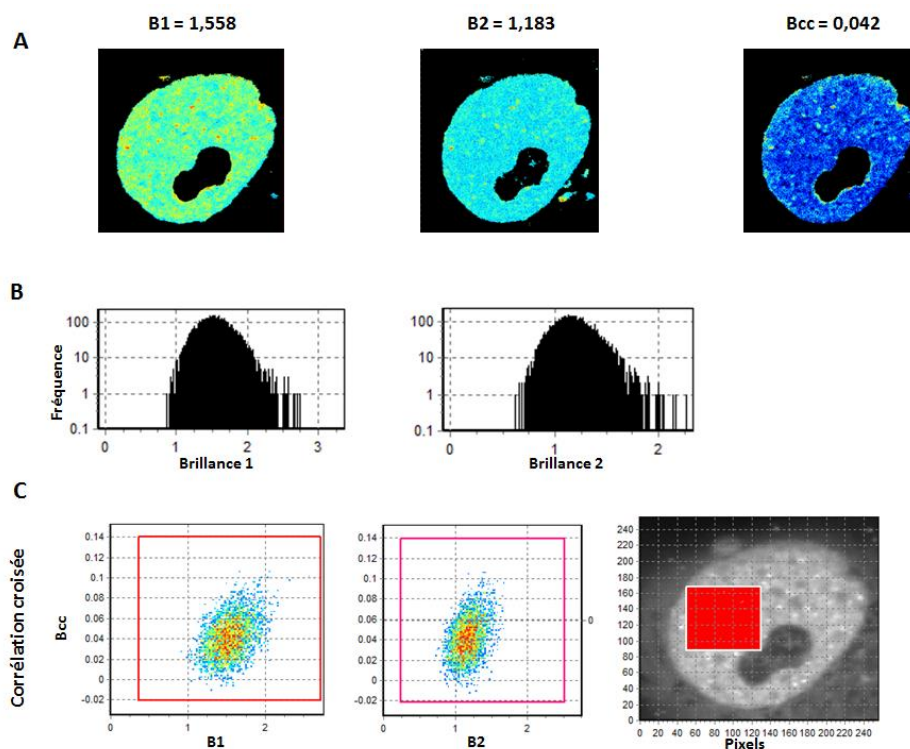


Figure 4.28 : Illustration des résultats obtenus pour l'interaction des protéines mCherry-RevErb α et Cerulean-SMRT. Les FPs sont excitées par un laser biphotonique à une longueur d'onde de 950 nm et une puissance de 36 mW avec un TRP de 32 microsecondes. (A) Signal des brillances B1 (mCherry), B2 (Cerulean) et de la corrélation croisée Bcc. Cette représentation illustre la localisation des protéines à l'intérieur du noyau et démontre, par la carte de Bcc, l'interaction des 2 protéines. (B) Histogrammes représentant la valeur des brillances de la mCherry (B1) et de la Cerulean (B2) en fonction de leur fréquence d'obtention. (C) Représentation des pixels de brillances (B1 et B2) en fonction de la Bcc à l'intérieur de la ROI dans le noyau

L'interaction *in cellulo* de RevErb α avec SMRT pleine taille est donc réelle et spécifique, les valeurs de Bcc sont positives et leur moyenne de 0.019 positive confirme cette l'association protéique (Figure 4.29 B). Il n'y a aucune raison structurale pour que les protéines ne puissent pas interagir, cependant, le mode d'association RevErb α / SMRT semble être différent que celui de RevErb α / NCor. Alors qu'avec NCor le complexe serait formé de 2 molécules de RevErb α et d'une molécule de NCor, en présence de SMRT, il semblerait que ce soit 2 molécules de SMRT pour une molécule de RevErb α . Nous avons remarqué que la concentration nucléaire des 2 protéines était de 329 nM chacune. Le fait que SMRT soit environ 3 fois plus exprimé que NCor pourrait expliquer les valeurs de brillances augmentées. La protéine SMRT peut se regrouper en complexe, sans agréger, ce qui ferait croire à la formation d'homodimères. Dans tous les cas, l'association de ces protéines est réelle et confirmée par le calcul du pourcentage de complexes formés qui est de 90 % (Figure 4.29 D). Ce chiffre est moins important que celui obtenu pour l'association de RevErb α et NCor, il se peut que les protéines pleine taille présentent des affinités différentes pour le récepteur nucléaire ce qui expliquerait la différence de pourcentage.

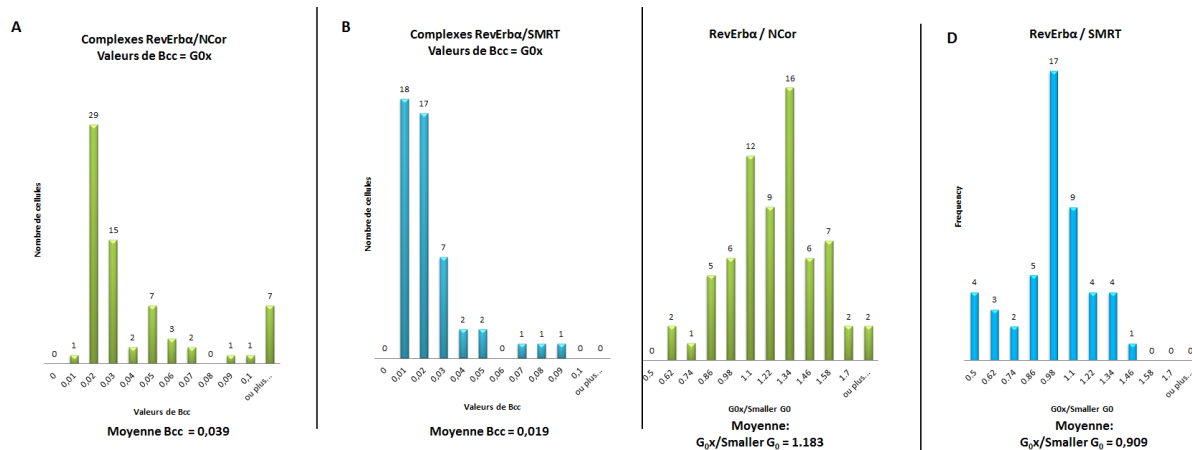


Figure 4.29 : Histogrammes représentant les valeurs de Bcc ou G0x (axe des abscisses) et le pourcentage de complexes formés (axe des ordonnées) en fonction de la fréquence d'obtention des valeurs (axe des ordonnées) pour la formation des complexes RevErba / SMRT. Répartition des valeurs de Bcc obtenus pour le complexe RevErba / NCor (A) et RevErba / SMRT (B). Pourcentage de complexes formés pour le complexe RevErba / NCor (C) et RevErba / SMRT (D). La valeur de 1 représentant 100 %. Le pourcentage de complexes formés par RevErba/ NCor est de 118 % et de celui de RevErba / SMRT est de 90 %. Les moyennes sont réalisées sur 48 noyaux imagés.

Le pourcentage de complexes formés pour l'association de RevErba avec SMRT est spécifique. Bien que les protéines soient surexprimées, les valeurs de vraies brillances (e1 et e2) sont correctes, toujours positives et les protéines ne semblent pas agréger. D'autre part, si l'interaction n'était pas réelle, il serait impossible de la visualiser. La protéine SMRT pleine taille présente une affinité moins importante pour RevErba que NCor, mais elle est capable de s'associer de manière spécifique au récepteur nucléaire. L'effet des ligands a été testé sur l'interaction des 2 protéines, mais aucun résultat concluant n'a été tiré de cette analyse, les ligands ne semblent pas avoir d'effet stabilisateur ou déstabilisateur sur l'interaction RevErba / SMRT. Le pourcentage de complexe est identique en présence et en absence de ligand (Résultats non montrés). Une confirmation de cette interaction serait de travailler avec des lignées cellulaires inducible exprimant de manière constitutive les protéines d'intérêts fusionnées aux FPs. Ce travail sera réalisé par la suite et ne sera pas présenté dans ce manuscrit.

V. Conclusions et discussion

La microscopie à fluctuations de fluorescence N&B est une technique novatrice et unique permettant d'accéder à de nombreuses informations. Un des avantages de cette méthode est qu'elle est adaptée pour être réalisée *in cellulo* et permet l'étude de protéines pleine taille. Nous pouvons ainsi nous rapprocher au maximum de leur comportement dans leur environnement naturel. Le N&B fournit des cartes d'intensité de fluorescence permettant d'identifier de manière précise les FPs ainsi que leur localisation cellulaire. Les brillances des FPs renseignent sur l'état d'oligomérisation des molécules permettant d'apporter des informations sur l'organisation du complexe. Le N&B permet surtout d'identifier une interaction spécifique entre 2 molécules et de calculer le pourcentage du nombre de complexes formés et d'étudier l'effet de ligands sur cette association. Elle reste cependant une technique peu connue ni utilisée, ce qui a nécessité un gros travail de mise en place de la méthode. Les protéines d'intérêts sont marquées par les FPs mCherry et Cerulean et sont exprimées dans le noyau grâce à des transfections transitoires des plasmides codant pour ces protéines de fusion. La détermination des quantités appropriées de plasmides à transfecter est très importante, il faut éviter de transfecter en trop grande quantité pour ne pas surexprimer les protéines qui

pourraient agréger à de trop fortes concentrations. Cependant, il faut transfecter suffisamment de plasmides pour avoir une expression protéique détectable et obtenir suffisamment de photons d'émission. Les séquences codantes pour les protéines d'intérêts sont sous la dépendance d'un promoteur SV40, qui permettra une forte expression protéique une fois pénétré dans la cellule. Lorsque ces paramètres ont bien été mis en place, il a fallu vérifier que les FPs choisies étaient appropriées pour cette étude et qu'elles ne donneraient pas de signal non spécifique. Leur signal de fluorescence d'émission est collecté dans 2 canaux indépendants, le 1 et le 2. Le canal 1 détecte les photons d'émission de la mCherry et le 2 ceux provenant de la Cerulean. Le but de cette mise au point est de vérifier que le signal de la mCherry est détecté uniquement dans le canal 1 et non dans le 2 et que celui de la Cerulean, au contraire, est récupéré uniquement dans le canal 2. Des photons mal collectés et mal réattribués peuvent être à l'origine de signal non spécifique et peuvent fausser les résultats obtenus. Nous avons donc transfecté indépendamment les 2 protéines mCherry-RevErb α et Cerulean-NCOR et avons confirmé que ces FPs sont parfaitement adaptées à cette étude puisque leur signal est spécifique et détecté dans le canal approprié à chaque fois. Ces transfections ont également permis de déterminer les conditions d'observation des cellules, c'est-à-dire la longueur d'onde, 950 nm pour une excitation optimale des 2 FPs, le temps de résidence par pixel de 32 μ s, qui doit être adapté aux mouvements des protéines étudiées, la puissance du laser de 36 mW, qui doit être suffisamment importante pour collecter des photons mais pas trop forte pour éviter le photo blanchiment des FPs.

Une fois que ces paramètres essentiels à l'imagerie ont été déterminés, il était nécessaire de vérifier la validité de cette technique avec un contrôle positif et négatif. Une séquence protéique d'adressage au noyau (NLS) a été choisie pour valider l'efficacité de la technique. Les 2 FPs mCherry et Cerulean sont respectivement en N et C-ter de la protéine NLS. C'est ainsi que les vraies brillances monomériques des 2 FPs (e1 et e2) ont été estimées à 0.1 (mCherry) et 0.02 (Cerulean). Une interaction spécifique et supérieure à 100 % dans la majorité des cas a été déterminée grâce au calcul du nombre de complexes formés qui s'obtient en divisant la valeur de Bcc (G0x) par le plus petit G0. Ce calcul permet d'avoir accès à la fraction du nombre de complexes par rapport à l'espèce limitante et donc de déterminer le pourcentage de complexes formés. Le pourcentage déterminé pour la protéine NLS est supérieur à 100 % car il ne prend pas en compte la stœchiométrie différente des complexes formés. En effet, le calcul du G0x par rapport au plus petit G0 ne considère qu'un seul type de complexe de stœchiométrie 1 :1. De ce fait, si le pourcentage du nombre de complexes formés n'est pas corrigé pour des stœchiométries différentes, il sera surestimé. Il serait possible de corriger ce calcul en connaissant les brillances monomériques précises des FPs. Cependant, la disparité des vraies brillances (e1 et e2), obtenues pour le contrôle positif mCherry-NLS-Cerulean, ne permet pas de déterminer clairement ces valeurs. Nous avons estimé les brillances monomériques en nous basant sur les brillances les plus représentées, c'est-à-dire celles pour lesquelles la majorité des cellules présentent ces valeurs.

D'autre part, la surexpression des protéines dûes aux transfections transitoires peut entraîner des phénomènes de complexations importantes ou d'agrégaions qui sont éloignées des conditions de vie naturelles des cellules. Ces structures peuvent aboutir à de fortes valeurs de brillances et donc à de fortes valeurs de Bcc qui fausseront les calculs du nombre de complexes et les surestimeront. Afin de rester proche du comportement naturel des protéines, les cellules présentant des valeurs de brillances trop importantes ont été éliminées de l'analyse permettant une meilleure estimation des brillances monomériques des deux FPs et de se rapprocher des valeurs proches de 100 % de complexes formés.

Il aurait certainement été préférable de choisir le couple de FPs mCherry / EGFP, car la longueur d'onde d'excitation aurait été plus proche de leur excitation optimale respective. De ce fait, la puissance du laser aurait pu être diminuée évitant le photoblanchiment trop important des FPs. Cependant, il a été décidé de conserver le couple mCherry/Cerulean afin d'éviter les phénomènes de FRET et de chevauchements spectral à la détection. En effet, le couple mCherry / EGFP est généralement utilisé pour les essais de FRET, ce qui peut fausser les résultats et empêcher de mettre en évidence une interaction réelle. D'autre part, des phénomènes de chevauchement spectral à la

détection, c'est-à-dire le signal de la mCherry détecté dans le canal 2 et celui de l'EGFP détecté dans le 1, peuvent se produire avec ce couple de FPs ce qui compliquerait la détermination d'une interaction.

Il est donc évident que cette technique est efficace pour la mise en évidence d'une interaction spécifique ainsi qu'au calcul du pourcentage du nombre de complexes formés. Suite à cela, plusieurs contrôles négatifs ont été essayés dans les cellules vivantes. Cependant, il a fallu avoir recours à une solution bactérienne exprimant la mCherry et la Cerulean. En effet, il n'a pas été possible d'exprimer correctement les FPs dans les cellules vivantes, les protéines étaient trop exprimées et trop concentrées donnant des valeurs de brillances nulles car les molécules sont immobiles. Une diminution de la quantité de plasmides transfectée permet une expression plus appropriée des protéines, mais ne fournit pas suffisamment de photons d'émission. De ce fait, les brillances sont égales à 0 et ne permettent pas de détecter une corrélation croisée. Une solution de bactéries lysées, dans lesquelles ont été exprimées les FPs, a donc été analysée. Les valeurs de vraies brillances ($e1$ et $e2$) sont positives donc une corrélation croisée, si elle existe, pourra être détectée ce qui n'est pas le cas. Les valeurs de Bcc sont nulles et le pourcentage du nombre de complexes formé est proche de 0. Cette technique est donc adaptée pour l'identification d'une interaction, malgré le photoblanchiment des FPs et les difficultés d'expression des protéines d'intérêts, si une interaction existe elle sera spécifiquement mise en évidence par la technique de N&B.

Ce travail a été consacré à l'étude de l'interaction de RevErb α avec les 2 corépresseurs NCor et SMRT. L'anisotropie de fluorescence a permis de déterminer que RevErb α présentait une affinité importante pour le peptide corépresseur NCor ID1, mais que son affinité pour le peptide SMRT ID1 était beaucoup plus importante. Au vu des informations structurales ainsi que des affinités déterminées *in vitro*, il semble évident que SMRT a la capacité d'interagir avec RevErb α pleine taille *in cellulo*, c'est d'ailleurs ce qui a été prouvé dans ce chapitre. RevErb α forme effectivement des complexes avec NCor (118 % de complexes formés) et de manière moins importante avec SMRT (90 % de complexes formés). Cette association est spécifique bien que moins importante que celle avec NCor. Il est donc confirmé dans cette partie que RevErb α a la capacité physique et structurale d'interagir avec SMRT, ce qui n'explique pas le fait que l'interaction *in vivo* n'ait jamais été mise en évidence. Il a été démontré par des essais de gènes rapporteurs à la luciférase que RevErb α monomérique n'a pas la capacité d'inhiber la transcription contrairement à la forme homodimérique (Harding and Lazar 1995). Au vu de nos résultats N&B, il semblerait qu'en présence de SMRT, RevErb α est majoritairement retrouvé sous forme monomérique. Leur interaction est donc spécifique structuralement, mais elle n'est pas fonctionnelle. En effet, il a été montré par des essais de double hybride que le complexe RevErb α / SMRT n'a pas d'activité inhibitrice de la transcription (Hu *et al*, 2000), mais des IPs ont démontré que les 2 protéines ont la capacité d'interagir lorsque le récepteur nucléaire n'est pas lié à l'ADN (Zamir *et al*, 1997). L'interaction de RevErb α avec SMRT est donc possible de par leur structure mais fonctionnellement n'est pas effective pour inhiber la transcription. Il se peut cependant, que SMRT prenne le relais dans la régulation de la transcription dans les cas où NCor n'est pas présent. Il est possible également que l'action de ces corépresseurs soit dépendante de leur localisation cellulaire, dans la majorité des cas, c'est NCor qui s'associe à RevErb α pour réguler la transcription, mais SMRT pourrait se lier à RevErb α dans une minorité des cas qui n'ont pas encore été mise en évidence. Cela peut être lié à une localisation cellulaire particulière ou bien dans des cas où NCor serait dans l'incapacité de se lier à RevErb α . Ce qui expliquerait que SMRT ne soit jamais retrouvé associé à RevErb α lors des essais *in vivo*.

L'interaction entre RevErb α et NCor a également été mise en évidence par cette technique. Les brillances déterminées permettent une estimation de la composition du complexe qui est de 2 molécules de RevErb α pour une de NCor, ce qui est consistant avec ce qui a déjà été déterminé (Zamir *et al*, 1997). La corrélation croisée est majoritairement positive et localisée à l'intérieur du noyau spécifiquement par sélection d'une région d'intérêt (ROI). Les calculs sont tous réalisés à l'intérieur de cette ROI. D'autre part, la répartition protéique à l'intérieur du noyau est uniforme. Même dans les cas où les protéines, trop concentrées, se regroupent et s'associent sous forme de

gros complexes très localisés dans le noyau. C'est ainsi que des amas apparaissent qui sont plus brillants que le reste de la cellule. Ces noyaux présentent des brillances plus élevées pouvant aboutir à la détection d'une interaction non spécifique. Pour éviter cela, les cellules sont classées et analysées selon différents critères :

- L'homogénéité de la répartition protéique à l'intérieur du noyau qui est visible par l'apparition de spots très brillants dans la cellule, donc facilement isolables.
- Les vraies brillances des FPs permettent de séparer les cellules suivant si elles ont des brillances supérieures ou inférieures à 0.2

Le classement des cellules permet de s'affranchir des erreurs liées à l'expression différente des protéines d'une cellule à l'autre. Les noyaux sont ainsi comparés entre eux de manière plus juste en présence et en absence de ligand permettant de mettre en évidence plus précisément l'effet des ligands sur l'interaction et sur le pourcentage de complexes formés.

L'effet de l'hème, ligand naturel de RevErb α , est naturellement testé sur l'association de ces protéines. Les résultats que nous avons obtenus en anisotropie de fluorescence tendent à dire qu'une action stabilisante de ce ligand sur l'association du complexe n'est pas possible. En effet, au vu des données structurales, la liaison simultanée du ligand et du corépresseur NCor n'est pas possible car cela créerait des encombrements stériques importants, à moins d'une réorganisation de l'ensemble de la structure. D'autre part, les constantes d'affinité, qui ont été déterminées sur l'association du complexe RevErb α -LBD / Peptide NCor ID1 par anisotropie de fluorescence, confirment l'effet déstabilisateur de l'hème sur la liaison de ces 2 protéines. Cependant, le ligand est rapporté comme favorisant la répression de la transcription *in vivo*. Nous avons testé, dans ce chapitre, l'interaction des protéines pleine taille en présence d'hème et essayer de rester au plus proche des conditions naturelles de vie cellulaire. C'est ainsi qu'il a été déterminé que l'hème ne favorise pas de manière importante l'interaction des protéines. Son effet sur la formation du nombre de complexes n'est pas significatif et les différences de pourcentage en présence et en absence d'hème sont négligeables. Afin d'affiner l'analyse, les cellules ont été comparées selon leur état d'homogénéité et leur vraies brillances (comme expliqué précédemment). Malgré la séparation des cellules, l'effet de l'hème reste négligeable sur la formation du nombre de complexes avec une différence de 10 % (Figure 4.30). En effet, certaines grosses valeurs de pourcentage de complexes, obtenues en présence d'hème, peuvent correspondre à des agrégats ou à des protéines fortement oligomérisées. Ces valeurs suggèrent un effet non spécifique du ligand sur l'interaction et faussent les moyennes de pourcentage de complexes. Cependant, les complexes dans les 2 cas interagissent de manière importante, l'écart visible sur le pourcentage de formation du nombre de complexes est faible mais peut être significative. En effet, une différence de 10 % sur un complexe déjà formé à plus de 100 % n'est pas négligeable. D'autre part, la concentration d'hème intracellulaire n'est pas connue, il est possible que la quantité de ligand ne soit pas suffisante pour voir une action spécifique sur la formation du nombre de complexes.

L'hème aurait donc un effet stabilisateur sur le complexe RevErb α / NCor pleine taille *in cellulo*. Ceci reste à vérifier sur des lignées cellulaires inductibles exprimant constitutivement les protéines d'intérêts fusionnées aux FPs.

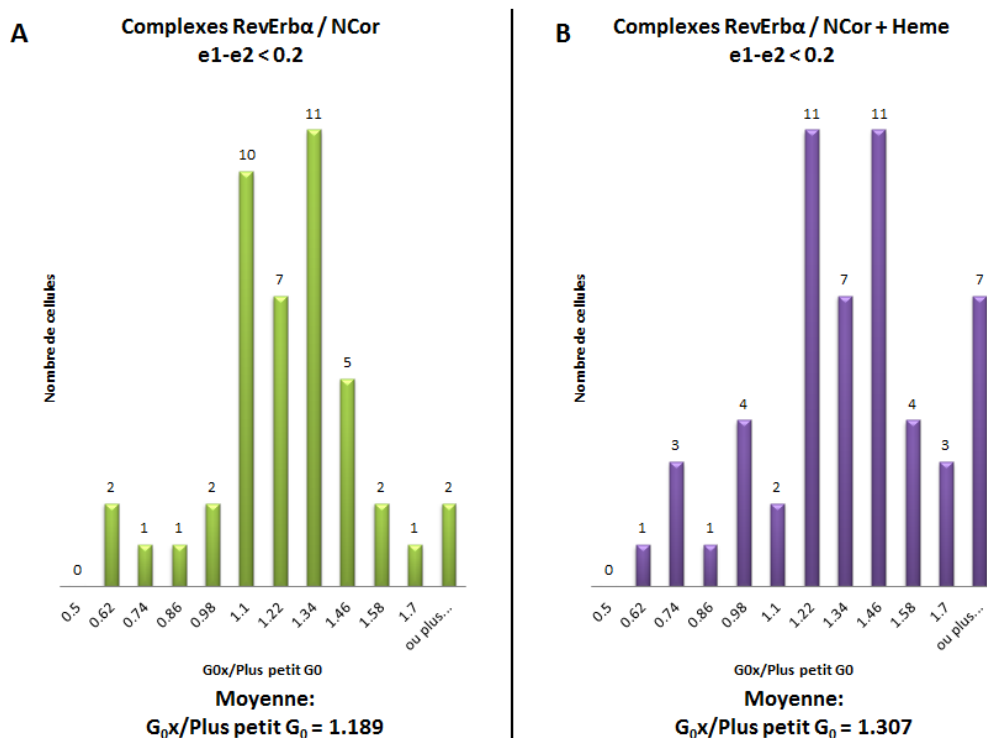


Figure 4.30: Histogrammes représentant le pourcentage de complexes formés (axe des abscisses) en fonction de la fréquence d'obtention des valeurs (axe des ordonnées) pour les cellules présentant des valeurs de vraies brillances inférieures à 0.2. La valeur de 1 représentant 100 %. **(A)** Interaction RevErba / NCor en absence de ligand. Le pourcentage de complexes formés est de 118 %. **(B)** Interaction RevErba / NCor en présence d'hème. Le pourcentage de complexes formés est de 130 %

Effectivement, l'effet de l'hème sur les cellules homogènes ne modifie pas le pourcentage du nombre de complexes formés qui est de 126 % avec et sans ligand (Figure 4.31). Il est donc difficile de conclure clairement sur l'effet réel de ce ligand.



Figure 4.31: Histogrammes représentant le pourcentage de complexes formés (axe des abscisses) en fonction de la fréquence d'obtention des valeurs (axe des ordonnées) pour les cellules homogènes uniquement. La valeur de 1 représentant 100 %. (A) Interaction RevErba / NCor en absence de ligand. Le pourcentage de complexes formés est de 126 %. (B) Interaction RevErba / NCor en présence d'hème. Le pourcentage de complexes formés est de 126 %

Au vu du pourcentage important de complexes, en présence et en absence d'hème, les différences devraient être plus importantes pour conclure sur l'effet réel de ce ligand. Ce qui est certain c'est qu'il n'empêche pas l'interaction spécifique de ces protéines, mais il ne la favorise pas non plus. Il faut tout de même préciser que la quantité de ligands pénétrant dans la cellule ne peut pas être déterminée, il se peut que le ligand ne soit pas présent à des quantités suffisamment importantes pour permettre de déterminer un effet réel. Il est également possible que les protéines soient trop concentrées dans le noyau et de ce fait il serait impossible de voir une dissociation quelconque des protéines puisqu'elles s'organisent déjà en complexes importants. Il est donc difficile de conclure de manière précise quant à l'effet réel de ce ligand sur la formation du complexe.

L'effet des 2 ligands non naturels de RevErba a également été testé en microscopie de fluctuation de fluorescence N&B. Ces 2 ligands sont le SGN et le SD7. Le SGN a été identifié comme stabilisant l'interaction entre RevErba et NCor par des essais de FRET (Meng *et al*, 2008). Cependant, l'imprécision de ces données nécessitait une vérification, c'est ainsi que l'anisotropie de fluorescence a permis de mesurer des constantes d'affinités précises qui sont augmentées en présence de ligand. Son effet sur l'association des protéines pleine taille est vérifié en N&B. L'effet stabilisateur du SGN est délicat à mettre en évidence. Il semblerait que de plus fortes valeurs de pourcentage de complexes soient obtenues avec le SGN, cependant, les moyennes ne sont pas différentes, du moins pas suffisamment pour isoler un effet spécifique. Malgré la séparation des cellules selon leur brillance et leur homogénéité, les moyennes du pourcentage de complexes formés ne sont pas différentes. Une uniformisation des résultats (des brillances, des concentrations et de l'expression protéique ainsi que des concentrations des ligands intracellulaires) est nécessaire pour statuer précisément quant à l'effet réel du SGN sur l'interaction des protéines RevErba et NCor (Figure 4.32-33).

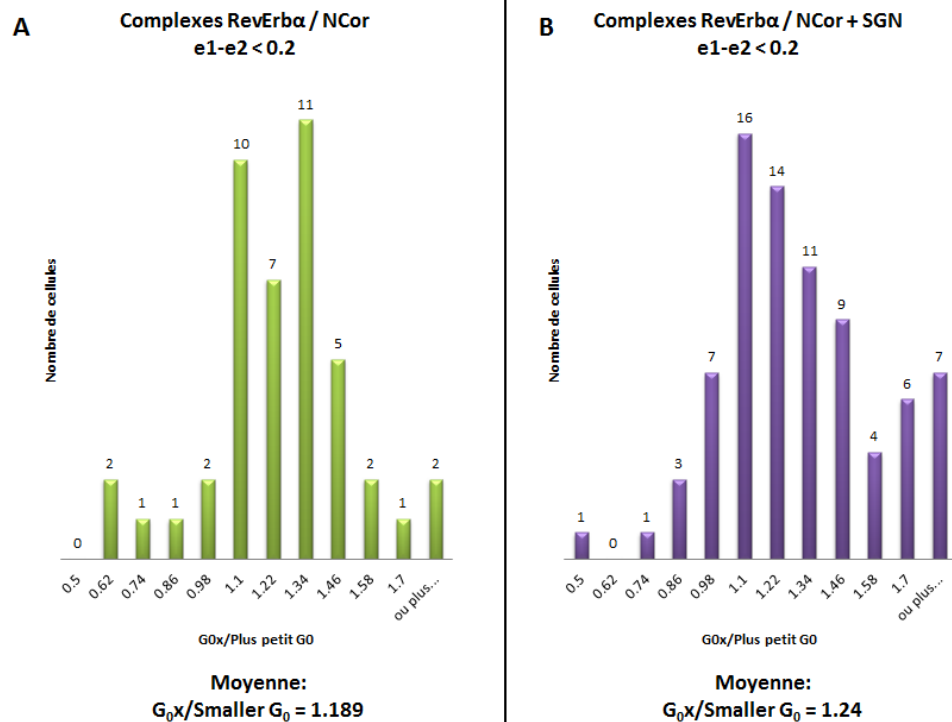


Figure 4.32: Histogrammes représentant le pourcentage de complexes formés (axe des abscisses) en fonction de la fréquence d'obtention des valeurs (axe des ordonnées) pour les cellules présentant des valeurs de vraies brillances inférieures à 0.2. La valeur de 1 représentant 100 %. **(A)** Interaction RevErb α / NCor en absence de ligand. Le pourcentage de complexes formés est de 118 %. **(B)** Interaction RevErb α / NCor en présence de SGN. Le pourcentage de complexes formés est de 124 %

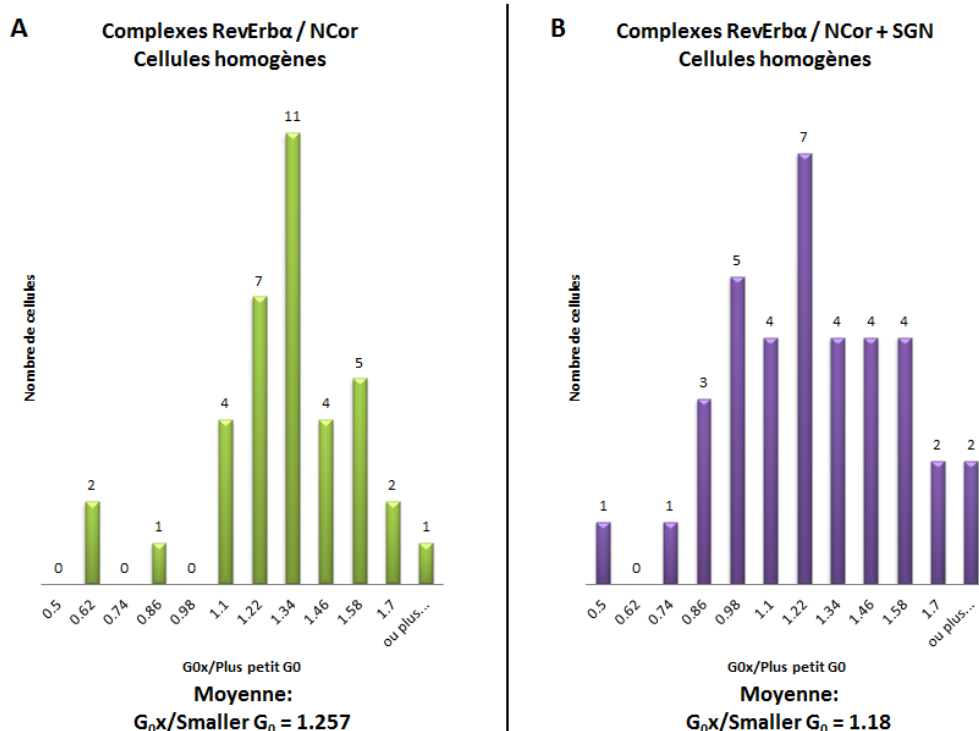


Figure 4.33: Histogramme représentant le pourcentage de complexes formés (axe des abscisses) en fonction de la fréquence d'obtention des valeurs (axe des ordonnées) pour les cellules homogènes uniquement. La valeur de 1 représentant 100 %. **(A)** Interaction RevErbα / NCor en absence de ligand. Le pourcentage de complexes formés est de 126 %. **(B)** Interaction RevErbα / NCor en présence de SGN. Le pourcentage de complexes formés est de 118 %

Le ligand SD7 a été identifié comme déstabilisateur de l'interaction de RORα avec SRC2, par des essais de gènes rapporteurs à la luciférase entraînant une diminution de l'activité transcriptionnelle d'un des gènes cibles (Kumar *et al*, 2009). Nous avons confirmé en anisotropie de fluorescence l'effet déstabilisateur du ligand sur l'interaction du RevErbα-LBD / Peptide NCor ID1 et nous avons déterminé des constantes d'affinité prouvant ce fait. Son effet sur l'interaction des protéines pleine taille *in cellulo* a été déterminé dans ce chapitre. L'effet de ce ligand est difficile à déterminer de manière précise. L'interaction des 2 protéines est détectable et la corrélation croisée est largement positive. Cependant, la différence sur le nombre de complexes formés en présence de SD7 est négligeable (inférieure à 10 %). Le classement et la comparaison des cellules selon leur homogénéité et leur brillance ne permettent pas non plus de mettre en évidence un effet stabilisateur ou déstabilisateur du ligand. Les différences de pourcentage de complexes formés sont négligeables et pas suffisamment importantes pour conclure quant à l'effet réel du ligand sur l'interaction des protéines pleine taille (Figure 4.34-35).

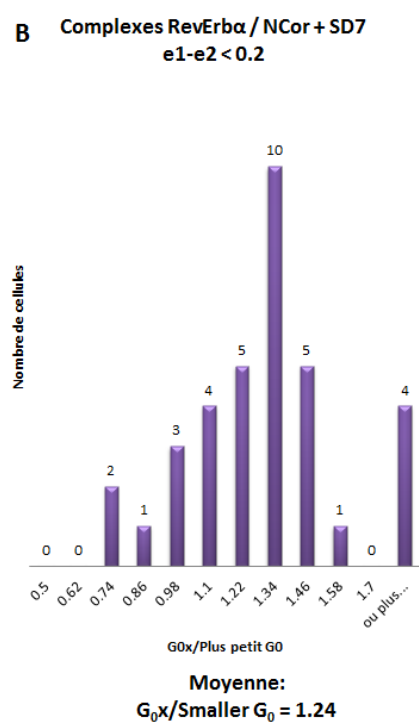
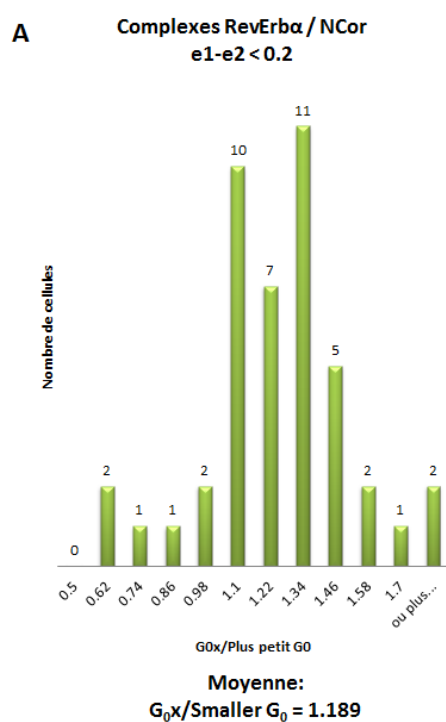


Figure 4.34: Histogramme représentant le pourcentage de complexes formés (axe des abscisses) en fonction de la fréquence d'obtention des valeurs (axe des ordonnées) pour les cellules présentant des valeurs de vraies brillances inférieures à 0.2. La valeur de 1 représentant 100%. **(A)** Interaction RevErba/NCor en absence de ligand. Le pourcentage de complexes formés est de 118%. **(B)** Interaction RevErba/NCor en présence de SD7. Le pourcentage de complexes formés est de 124%

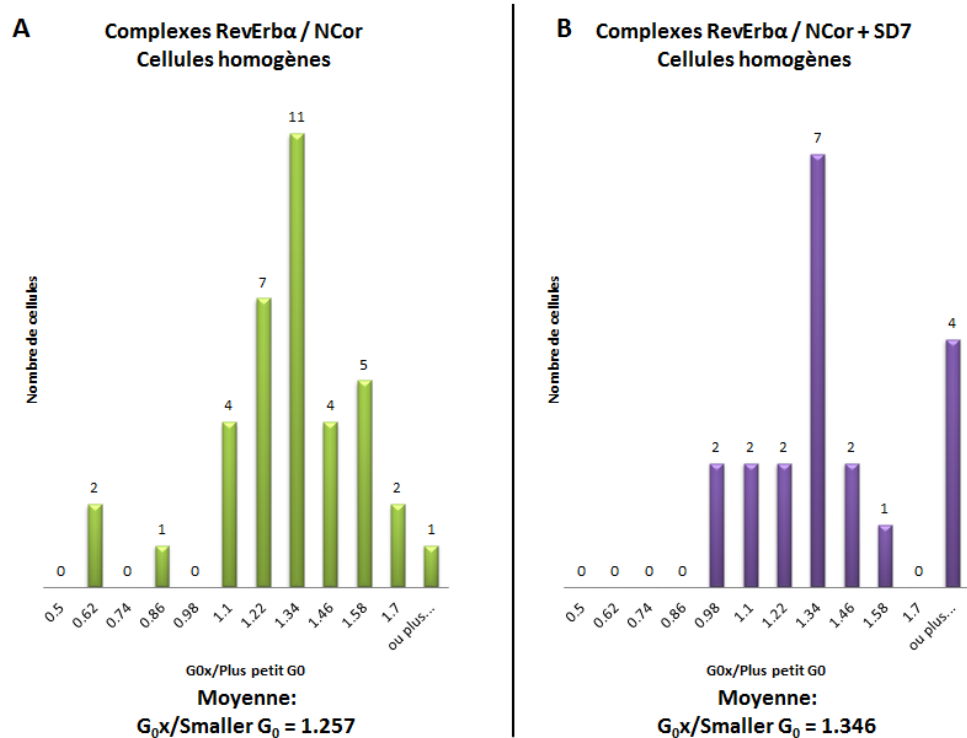


Figure 4.35: Histogramme représentant le pourcentage de complexes formés (axe des abscisses) en fonction de la fréquence d'obtention des valeurs (axe des ordonnées) pour les cellules homogènes uniquement. La valeur de 1 représentant 100 %. **(A)** Interaction RevErb α / NCor en absence de ligand. Le pourcentage de complexes formés est de 125 %. **(B)** Interaction RevErb α / NCor en présence de SD7. Le pourcentage de complexes formés est de 134 %

L'effet des ligands est difficile à visualiser clairement dans ces conditions. Les protéines sont surexprimées à cause des transfections transitoires, ce qui aboutit à des phénomènes de complexations importantes, ou même à des agrégats. De ce fait, les complexes sont systématiquement formés à plus de 100 % en présence ou en absence de ligand. D'autre part, visualiser un effet stabilisateur sur des complexes qui sont déjà formés à plus de 100 % est délicat. De plus, la concentration intracellulaire des ligands n'est pas connue, il est possible qu'elle ne soit pas suffisante pour saturer les sites d'interactions et visualiser une dissociation.

L'effet des ligands n'a pas pu être déterminé de façon précise sur le pourcentage de complexes formés. En effet, une analyse globale des valeurs de Bcc obtenues pour les cellules en présence et en absence de ligand indique que la Bcc est la plus forte en absence de ligand (Figure 4.36).

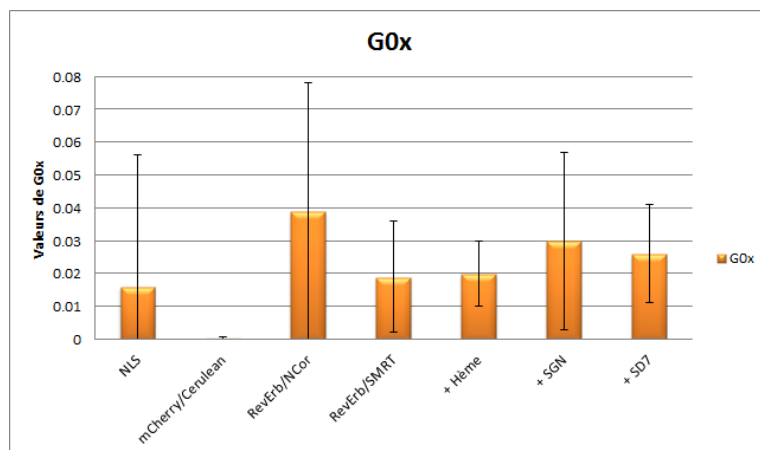


Figure 4.36 : Représentation des moyennes de G0x, ou Bcc, obtenues pour les contrôles positifs et négatifs et pour l'interaction de RevErb α / NCor en absence et en présence des différents ligands, hème, SGN et SD7.

Le classement des cellules en fonction de leurs vraies brillances et de leur homogénéité révèle que RevErb α et NCor forment des complexes importants, voire des agrégats, qui augmentent fortement la moyenne de Bcc. En effet, les barres d'erreurs sont conséquentes surtout pour les cellules hétérogènes et dont les brillances sont supérieures à 0.2 (Figure 4.37).

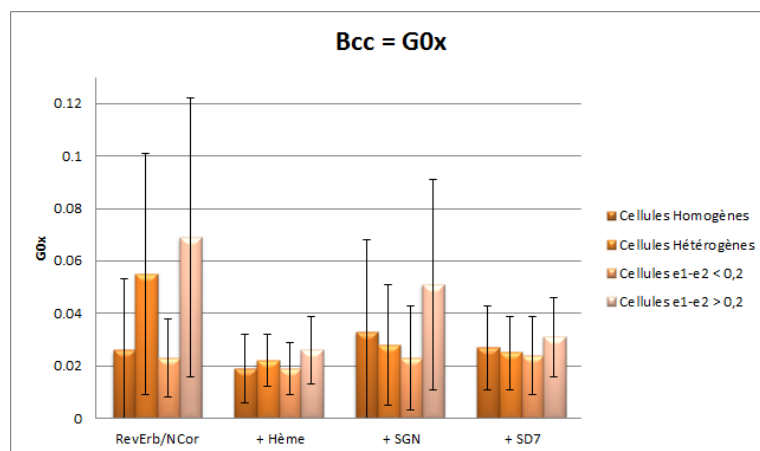


Figure 4.37 : Représentation des moyennes de G0x, ou Bcc, obtenues pour l'interaction de RevErb α / NCor en absence et en présence des différents ligands, hème, SGN et SD7. Les cellules sont triées selon leur homogénéité et leurs brillances.

Ces valeurs de Bcc sont des valeurs absolues et ne nous renseignent pas sur l'effet réel des ligands sur la formation de complexes. La figure 4.38 résume les moyennes des valeurs de G0x/Plus petit GO (pourcentage de complexes) pour l'interaction des protéines RevErb α et NCor en absence et en présence de ligand.

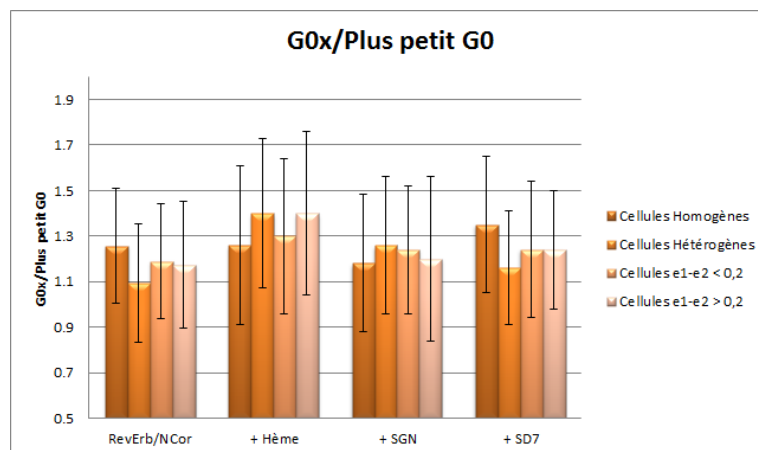


Figure 4.38 : Représentation des moyennes de G0x/Plus petit G0 représentant le pourcentage de complexes formés en absence et en présence des ligands, hème, SGN et SD7. Les cellules sont triées selon leur homogénéité et leurs brillances

Afin d'éclaircir la situation, il serait nécessaire de travailler avec des lignées cellulaires inductibles exprimant de façon constitutive les protéines d'intérêts fusionnées aux FPs. Cela permettrait de contrôler l'expression protéique et de s'affranchir des erreurs liées à leur surexpression, comme les phénomènes d'agrégation, ou d'oligomérisation trop importante. D'autre part, il est indispensable de déterminer clairement les vraies valeurs de brillances monomériques des FPs d'intérêt mCherry et Cerulean. Les calculs de pourcentage de complexes formés pourraient ainsi être corrigés pour leur stœchiométrie différente. Cette étape permettrait d'uniformiser les résultats et de pouvoir statuer plus précisément quant à l'effet réel des ligands.

Il serait, en outre, intéressant de vérifier les effets des différents ligands sur l'activité transcriptionnelle du complexe sur un des gènes cibles codant pour l'enzyme G6Pase qui intervient dans la voie de régulation du glucose. La mise en place d'essais de gènes rapporteurs à la luciférase permettra de vérifier d'une part l'effet des FPs sur l'interaction des protéines et d'autre part de déterminer l'effet réel des ligands, *in vivo*, sur les protéines pleine taille et l'activité transcriptionnelle du promoteur d'un des gènes cibles. Cette étape sera une approche supplémentaire dans le traitement contre le diabète de type 2 et sera réalisé prochainement.

CHAPITRE 5 : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce manuscrit présente les résultats obtenus durant mes trois années de thèse sur l'étude de l'interaction du complexe RevErb α / NCor. Le but principal de ce projet était d'identifier des ligands favorisant l'interaction des protéines d'intérêts dans le but d'amorcer les voies de recherche pour un traitement contre le diabète de type 2. Au cours de ce travail, plusieurs éléments ont été ajoutés aux recherches : l'étude d'un corépresseur non rapporté comme interagissant de manière spécifique et fonctionnelle à RevErb α (SMRT) et celle de l'hème, ligand naturel de RevErb α qui ne présente pas les mêmes effets sur l'interaction *in vitro* et *in vivo*. Afin d'étudier ces interactions, deux techniques dont le principe repose sur l'émission de fluorescence ont été utilisées : l'anisotropie de fluorescence *in vitro* a été utilisée principalement comme une étape de criblage de ligand et la microscopie de fluctuations de fluorescence *in cellulo* (N&B) permet d'étudier l'interaction entre les protéines pleine taille ainsi que de quantifier l'effet des ligands.

L'anisotropie de fluorescence permet de suivre la formation de complexes et de déterminer des constantes d'affinité précises. Cette technique s'applique *in vitro* sur des fragments de protéines et permet d'identifier les régions des corépresseurs présentant de plus fortes affinités pour le domaine de liaison au ligand de RevErb α . C'est de cette manière qu'il a été déterminé qu'un peptide issu de SMRT présentait une plus forte affinité pour RevErb α -LBD que le même peptide issu de NCor. Les deux corépresseurs sont très similaires dans leur séquence et leur structure lorsqu'ils sont liés à un récepteur nucléaire. En effet, les domaines de fixations à ce dernier sont les mêmes et surtout ils comportent le motif CoNRN qui est la région indispensable pour l'interaction des corépresseurs avec les récepteurs nucléaires. Il n'est donc pas surprenant que le peptide SMRT présente une affinité importante pour RevErb α . Cependant, le fait que cette liaison soit plus forte que celle de RevErb α avec le même peptide NCor suggère que l'interaction entre RevErb α et SMRT pourrait être spécifique contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature (Zamir *et al*, 1997). Il a été démontré, par immunoprécipitation (GST pull down) *in vivo*, que RevErb α interagissait avec SMRT lorsqu'il n'était pas fixé à l'ADN, cette association est donc structuralement possible mais non fonctionnelle et elle a été vérifiée et confirmée en microscopie N&B dans le troisième chapitre de ce manuscrit. Comme il a été précisé précédemment, l'anisotropie de fluorescence a été initialement mise en place pour le criblage de ligands. Une vingtaine a été testée et trois sont présentés dans ce manuscrit et ont été étudiés par la suite en microscopie de fluorescence. C'est au cours de cette étape de criblage que nous nous sommes intéressés à l'hème, ligand naturel de RevErb α , qui est rapporté comme favorisant l'interaction entre RevErb α et le corépresseur NCor ainsi que l'inhibition de la transcription (Yin *et al*, 1997). En effet, des ChIP, *in vivo*, ont été réalisées après avoir retiré l'hème du milieu cellulaire et ont révélé qu'en absence de ligand, l'interaction entre RevErb α et NCor ne se faisait pas. Des essais de gènes rapporteurs à la luciférase ont également été réalisés après avoir retiré l'hème du milieu cellulaire et ont mis en évidence que l'inhibition de la transcription par RevErb α et NCor n'est plus possible en absence d'hème. Cependant, une autre publication révèle que bien qu'*in vivo* l'hème présente un rôle stabilisateur de l'interaction et inhibiteur de la transcription, les résultats *in vitro* sont plus controversés. Des IPs, *in vivo*, ont été réalisées après avoir retiré l'hème par traitement chimique, de ce fait, l'interaction entre les deux protéines n'est plus détectée. Cependant, dans cette même publication les auteurs utilisent la technique Luminex, s'appliquant *in vitro* et permettant de mettre en évidence des interactions entre peptides. Ces essais révèlent que la présence d'hème défavorise l'association du domaine de liaison au ligand de RevErb α avec un peptide corépresseur issu de NCor (Raghuram *et al*, 2007). Basé sur ces informations, nous avons caractérisé quantitativement l'effet de l'hème sur l'interaction de RevErb α avec le peptide NCor, comportant le motif CoNRN1. Nos résultats *in vitro* révèlent que l'hème défavorise fortement l'association du

domaine de liaison au ligand du récepteur nucléaire avec des peptides corépresseurs issus de NCor et de SMRT et les différences d'affinité en absence et en présence d'hème ont été déterminées (Annexes 5).

Nous avons interprété les différences d'affinité des peptides étudiés pour RevErb α et les effets des ligands d'un point de vue structural en nous basant sur des comparaisons de structures cristallographiques publiées. Il est rapporté que l'activité inhibitrice de transcription est conférée par la formation d'un feuillet beta antiparallèle entre la partie C-ter du domaine de liaison au ligand de RevErb α et la partie N-ter du peptide corépresseur NCor. En effet, des travaux réalisés sur l'association du récepteur nucléaire RAR α avec les corépresseurs NCor et SMRT ont révélé que l'activité basale répressive de RAR α est conférée par un brin beta qui forme un feuillet beta antiparallèle avec des résidus spécifiques du domaine ID1 des corépresseurs NCor ou SMRT. La liaison d'un ligand agoniste induit la transition du brin beta en hélice α permettant la formation de l'hélice H11 qui provoque la relâche du corépresseur et le repositionnement de l'hélice H12 entraînant le recrutement du coactivateur. (Le Maire *et al*, 2010).

Les alignements des structures cristallographiques réalisées dans ce manuscrit révèlent que la fixation simultanée de l'hème et du peptide NCor ID1 est impossible car cela créerait des encombrements stériques. D'autre part, nous avons mis en évidence que la formation du feuillet beta, caractéristique de l'inhibition de transcription, n'était pas possible lorsque l'hème est fixé au domaine de liaison de RevErb α . Cette déstabilisation des complexes RevErb α / Corépresseur en présence d'hème si claire *in vitro* ne l'est apparemment pas *in vivo*. En effet, la liaison de l'hème avec RevErb α *in vitro* entraîne des changements structuraux importants avec des déplacements d'hélice. Cette interaction affecte également le complexe fonctionnellement par l'impossibilité de la formation du feuillet beta lorsque l'hème est lié à RevErb α , il est donc difficile de conclure sur l'effet de l'hème. S'il est vraiment un acteur dans la formation du complexe RevErb α / NCor et dans l'inhibition de la transcription, sa liaison doit être accompagnée de changements structuraux importants au sein du complexe entier, car l'impossibilité de la formation de ce feuillet beta antiparallèle laisse présager que l'inhibition de la transcription ne pourra plus être possible.

Le criblage de ligand, en anisotropie de fluorescence, a permis d'identifier deux ligands synthétiques de RevErb α : SGN et SD7 qui présentent respectivement une action stabilisatrice et déstabilisatrice sur la formation du complexe RevErb α / NCor. Ces deux ligands ont été choisis car leur effet sur les valeurs d'affinité était important et visible.

La deuxième approche *in cellulo* est basée sur l'observation des fluctuations de fluorescence de protéines fluorescentes qui marquent les protéines d'intérêts (RevErb α , NCor et SMRT). C'est la technique de N&B qui permettra d'étudier les protéines pleine taille dans un environnement proche de leurs conditions physiologiques. Cette technique, novatrice et encore peu utilisée, est basée sur le mouvement brownien des particules fluorescentes présentes dans les cellules. Elle permet de mettre en évidence des interactions entre protéines. D'autre part, elle apporte une carte spatiale de l'intensité de fluorescence représentant l'organisation des complexes dans la cellule imagée. Nous pourrions également estimer le degré d'oligomérisation des protéines ainsi que le pourcentage de complexes formés dans différentes conditions. L'effet des ligands pourra donc être quantifié de cette manière. Nous avons commencé par caractériser dans les cellules eucaryotes Cos7 vivantes l'interaction spécifique entre des fusions de RevErb α et NCor avec des protéines fluorescentes. Nous avons pu estimer le nombre de complexes formés en absence de ligand (118 %). Les effets des trois ligands, Hème, SGN et SD7, ont ensuite été testés. Leur effet n'est pas clair sur la totalité des cellules imagées. Les protéines sont exprimées dans les cellules par transfections transitoires et de ce fait, leur concentration n'est pas contrôlable et le traitement reste détériorant pour les cellules. Les protéines ne s'organisent pas et ne s'expriment pas de la même manière suivant le noyau observé. Nous avons constaté que quatre catégories de cellules pouvaient être identifiées :

- Les cellules dont la répartition protéique nucléaire est homogènes
- Les cellules dont la répartition protéique nucléaire est hétérogènes
- Les cellules dont les brillances moléculaires sont inférieures à 0.2

- Les cellules dont les brillances moléculaires sont supérieures à 0.2

Les différences d'homogénéité sont visibles à l'œil nu, les protéines se rassemblent dans des zones très localisées formant des amas de fortes brillances moléculaires. Ces dernières renseignent sur l'état d'oligomérisation des protéines : une cellule présentant une forte brillance forme des gros complexes, contrairement à une cellule de faible brillance. Ces différences de brillance sont probablement dues aux concentrations différentes des protéines. Les cellules dans lesquelles la surexpression est très forte sont celles où les protéines montrent des foci localisés, probablement des complexes de très grande stœchiométrie ou des agrégats. Les résultats obtenus n'étant pas uniformes, nous avons donc choisi de classer les cellules et de les comparer selon leur état d'oligomérisation et d'homogénéité. Nous considérons que les cellules homogènes et dont la brillance est inférieure à 0.2 sont plus proches des conditions physiologiques. Au contraire, des cellules présentant une oligomérisation des protéines importante ou bien s'organisant en gros agrégats (cellules hétérogènes) ne sont pas représentatives de la situation naturelle. En réalisant cette catégorisation, nous avons constaté que les valeurs de pourcentage de complexes sont plus importants dans ces conditions, c'est-à-dire lorsque les protéines sont très surexprimées. En revanche, les différences de pourcentage des cellules homogènes et dont les brillances sont inférieures à 0.2 sont négligeables. L'effet des ligands sur le pourcentage de la formation de complexes n'est pas directement identifiable. L'expression protéique doit d'abord être contrôlée et unifiée afin de pouvoir comparer toutes les cellules de manière uniforme dans des conditions identiques. Des concentrations protéiques homogènes permettront de s'affranchir des phénomènes d'agrégation et d'oligomérisation entraînant des valeurs de brillances et de Bcc plus fortes. D'autre part, la détermination précise des brillances monomériques des FPs permettrait de corriger les valeurs de pourcentages de complexes en prenant en compte les stœchiométries différentes, ramenant ces valeurs en dessous de 100 %. La détermination de l'effet des ligands sera alors plus précise.

Nous avons considéré pourquoi nous aurions pu détecter un effet des ligands *in vitro* dans nos courbes d'anisotropie, alors qu'*in cellulo*, leurs effets étaient faibles ou indétectables. Nous ne connaissons pas la concentration exacte de ligands intracellulaires. Il est possible que leur quantité ne soit pas suffisante pour saturer les sites de liaison et induire un changement significatif. D'autre part, leurs effets sont relativement modestes, si on considère les courbes d'anisotropie *in vitro* en particulier pour le ligand SD7. A de fortes concentrations de peptide, lorsque la liaison en absence de ligand est proche de 80-90 %, les différences d'anisotropie, quel que soit le ligand, sont relativement faibles (10-20 %), et ceci à de fortes concentrations de ligand (100 μ M). Comme nous ne pouvons pas estimer les concentrations intracellulaires des ligands, il est difficile de savoir s'ils sont saturants pour le RevErb α exprimé. Une solution pour améliorer ces résultats serait de travailler avec des lignées cellulaires inducible exprimant de manière constitutive les protéines d'intérêts RevErb α et NCor marquées des protéines fluorescentes. Leur concentration pourrait être contrôlée ce qui permettrait d'abaisser le pourcentage de complexes formés et de visualiser plus clairement l'effet de ces ligands. Cependant, un effet déstabilisateur est plus facilement identifiable sur des complexes déjà formés de façon importante. Les ligands hème et SD7 ne semblent donc pas avoir ce genre d'effet sur l'association des deux protéines RevErb α et NCor. Il est possible que l'ajout d'hème n'ait pas d'effet, cependant, des études *in vivo* ont montré que l'absence d'hème déstabilise l'association du complexe et abolit l'inhibition de la transcription, révélés par IPs et gènes rapporteurs à la luciférase (Yin *et al*, 1997). Il est possible que l'absence d'hème affecte toute l'homéostasie de la cellule et que les effets observés sur RevErb α et NCor soient induits par la réadaptation de la cellule due à l'absence d'hème. Ou encore, l'hème en tant que ligand pourrait stabiliser la protéine RevErb α , elle-même, en se liant, augmentant ainsi la concentration intracellulaire de cette dernière. Considérant les informations structurales dont nous disposons, il est tout de même difficile de concilier un effet de l'hème qui stabiliserait le complexe *in vivo* et la déstabiliserait *in vitro*.

Nous avons également mis en évidence une interaction entre RevErb α avec SMRT pleine taille *in cellulo*. En effet, elles forment environ 90 % de complexes. Cela peut être une conséquence de la surexpression des protéines, mais il semblerait que RevErb α s'organise de manière différente avec

SMRT et avec NCor. En effet, nous avons constaté, à partir des brillances moléculaires estimées que le complexe RevErb α / NCor est en moyenne constitué de deux molécules de RevErb α et d'une de NCor, similaires à d'autres complexes Récepteur nucléaire / Corégulateurs (Osz *et al*, 2012, Takacs *et al*, 2013). En revanche, le complexe RevErb α / SMRT semble présenter en moyenne une stœchiométrie différente avec une molécule de RevErb α et deux de SMRT. Cependant, il apparaît que l'association entre RevErb α et SMRT, bien que possible structuralement, n'est pas une interaction fonctionnelle. En effet, des essais de gènes rapporteurs à la luciférase ont démontré que le complexe RevErb α / SMRT *in vivo* n'entraînait pas la répression de la transcription (Zamir *et al*, 1997) Il est tout de même surprenant que les protéines *in cellulo* s'associent mais qu'elles n'aient aucun rôle fonctionnel ensemble. Il est possible que SMRT prenne le relais lorsque NCor est indisponible ou bien que leur action soit tissu spécifique, ou encore gène spécifique. Il est aussi possible qu'*in vivo*, SMRT soit partitionné sur d'autre récepteur nucléaire à d'autres gènes cibles et n'est pas disponible pour une interaction avec RevErb α .

Une manière d'améliorer les résultats serait l'utilisation de lignées cellulaires inductibles stables permettant de contrôler l'expression des protéines et donc la formation de complexes. Par ailleurs, il serait important de développer des approches automatisées pour l'acquisition, ainsi que l'analyse des données de microscopie. D'autre part, ces études requièrent des contrôles fonctionnels pour tirer des conclusions claires. Ainsi, afin de compléter ce travail et d'apporter l'information fonctionnelle, nous avons commencé des essais de gènes rapporteurs à la luciférase qui nous permettront tout d'abord de vérifier la fonctionnalité de nos protéines de fusion et ensuite d'identifier un effet des ligands sur l'activité transcriptionnelle d'un des gènes cibles de RevErb α / NCor codant pour l'enzyme G6Pase. Cette dernière est impliquée dans la glucogénèse qui est la voie de synthèse du glucose. Une augmentation du recrutement de NCor sur RevErb α entraînerait une inhibition de la transcription de ce gène cible et donc une diminution de la synthèse de glucose et par conséquent une diminution de l'accumulation de glucose dans le sang dans les cas de diabète de type 2.

La technique de N&B est une méthode efficace pour mettre en évidence des interactions entre protéines dans des cellules vivantes. Sa capacité à quantifier les effets des ligands sur des interactions protéines-protéines dans le milieu cellulaire est pleine de promesses pour son utilisation dans le développement de molécules ciblant ces interactions, ou bien pour les stabiliser ou les défavoriser. Cependant, comme nous avons pu le constater ici, son efficacité dépend des niveaux d'expression des protéines, des affinités relatives des ligands pour les protéines et des protéines entre elles, ainsi que de la disponibilité du ligand et des effets éventuels d'autres protéines endogènes. Par ailleurs, ce travail souligne l'importance d'avoir une grande quantité de données sur des dizaines, voire des centaines de cellules afin de baser les conclusions sur une statistique robuste. Ceci rend relativement onéreux en temps et en personnel, ce genre d'approche. En application pharmaceutique en général, la combinaison de ces techniques pourrait être utilisée afin d'accomplir :

- Une identification rapide de l'effet des ligands sur des interactions protéines-protéines d'intérêts par anisotropie de fluorescence (criblage de ligands). C'est une approche qui est utilisée de façon relativement répandue dans la recherche publique et privée. Néanmoins, elle nécessite d'avoir purifié des domaines des protéines d'intérêts.
- Un effet quantifiable des ligands sur l'interaction des protéines pleine taille *in cellulo* par N&B. Cette technique permettant d'identifier les phénomènes d'agrégation, les ligands dont l'effet est non spécifique seraient rapidement éliminés. Toutefois, au-delà d'une instrumentation coûteuse et fragile, le N&B nécessite des conditions d'expression particulières des protéines de fusion, discutées ci-dessus. Par ailleurs, pour nombre de protéines, l'existence de protéines endogènes posera un problème non-négligeable. Des techniques telles que l'ARN d'interférence ou encore, une approche basée sur le système d'immunité bactérien, CRISPR, pourrait être utilisé afin de contourner ces obstacles.

Dans tous les cas, des études fonctionnelles doivent être faites afin de contrôler qu'il y ait un effet fonctionnel des ligands sur l'activité transcriptionnelle de gènes cibles *in vivo* par des gènes rapporteurs à la luciférase.

Les deux aspects importants structural et fonctionnel seraient ainsi quantifiés, ce qui permettrait de faire une analyse complète de chaque ligand spécifiquement sur l'interaction et sur l'activité transcriptionnelle. Ce travail est une amorce dans la voie de recherche du traitement contre le diabète de type 2, mais peut être appliqué à d'autres complexes protéiques et améliorer la compréhension générale des systèmes et l'identification d'acteurs influant sur leur activité ou sur leur association.

ANNEXES

ANNEXE 1: Les tampons et les milieux utilisés

Tampon de lyse

- 20mM de tampon phosphate pH 7,4
- 0,5M de NaCl
- 1mM de DTT
- 0,5% de triton X-100
- 1 pastille d'inhibiteur de protéase EDTA free pour 50mL de solution de tampon

Tampon A

- 20mM de tampon phosphate pH 7,4
- 0,5M de NaCl
- 1mM de DTT
- 5% de glycérol
- 5mM d'imidazole

Tampon B

- 20mM de tampon phosphate pH 7,4
- 0,5M de NaCl
- 0,5M d'imidazole
- 1mM de DTT
- 5% de glycérol

Tampon anisotropie

- 20mM de Tris-HCl pH 7,5
- 150mM de NaCl
- 1mM d'EDTA
- 5mM de DTT
- 10% de glycérol
- 2,5% de DMSO

Tampon TAE 50X pH8, composition pour 1L de solution

- 242g Tris Base
- 57,1mL acide acétique glacial 100%
- 100mL EDTA 0,5M
- Compléter avec de l'eau

Milieu LB (Lysogeny Broth ou Luria-Bertani) pour 1L de solution

- 10g de bactotryptone (apporte du nitrogène, des acides aminés et des vitamines)

- 5g d'extrait de levure
- 10g de NaCl

Milieu DMEM

Fournisseur : Life Technologies, référence: 21063-029

Composition:

- Glucose
- L-Glutamine
- Hepes

A rajouter avant la culture:

- 10% FBS (Sérum de veau foetal)
- Pyruvate
- Pénicilline / Streptomycine

Hème (Hemin from bovine)

Fournisseur: Sigma-Aldrich, référence: SLBC4685V

Annexes 2 : Culture cellulaire

I. Décongélation des cellules Cos7

Les cellules sont conservées dans de l'azote liquide, elles sont congelées dans du milieu DMEM (Annexes 1) en présence de 10% de DMSO. Les aliquotes cellulaires congelés sont de 1ml et les cellules sontensemencées et cultivées dans des flasques de 25 ml. Après décongélation, les cellules sont suspendues dans 5ml de milieu DMEM compléter de 10% de SVF (préalablement chauffé à 37°C), puis elles sont mises en culture dans les flasques à l'incubateur à 37°C sous 5% de CO₂. Lorsque les cellules atteignent une confluence de 100%, elles sont divisées et réensemencées. Pour ce faire, le milieu DMEM complémenté est retiré de la flasque, les cellules sont rincées avec du DMEM non complémenté, puis trypsinisées. L'action de la trypsine entraîne un décollement des cellules. L'action de la trypsine prend quelques minutes à 37°C. Lorsque les cellules sont décollées, elles sont reprises dans 5ml de milieu DMEM complémenté qui a pour effet de neutraliser l'effet de la trypsine. Les cellules sont ensuite réensemencées à la concentration désirée dans des flasques de 25ml ou de 75ml, en vue d'une congélation afin d'avoir un stock conséquent pour les essais à venir.

II. Congélation des cellules Cos7

La congélation des cellules se fait dans des tubes cryogènes étudiés pour résister à de très basses températures. Lorsque les cellules sont à une confluence de 100% ou presque, elles sont trypsinisées. Les cellules sont reprises dans 5ml de milieu DMEM complémenté et 900µl de la solution cellulaire sont ajoutés à 100µl de DMSO 100%, le tout est placé dans un tube cryogène puis congelé à -80°C. Le lendemain, les tubes sont mis dans l'azote liquide. Le passage à -80°C permet d'abaisser progressivement la température évitant ainsi de causer trop de dommages aux cellules.

Ces cellules Cos7 sont choisies car elles sont efficacement transfectées, elles sont bien adhérentes ce qui facilitera leur visualisation en microscopie. Elles sont de plus résistantes aux transfections de plusieurs plasmides simultanément, ce qui est le cas. En vue de la transfection, les cellules sontensemencées dans des LabTecks 2 puits à une confluence de 40000 cellules par puit. Elles sont comptées sur une cellule TOMA pour obtenir la concentration désirée.

III. Transfections transitoires

Ces cellules Cos7 sont choisies car elles sont efficacement transfectées, elles sont bien adhérentes ce qui facilitera leur visualisation en microscopie. Elles sont de plus résistantes aux transfections de plusieurs plasmides simultanément, ce qui est le cas. En vue de la transfection, les cellules sontensemencées dans des LabTecks 2 puits à une confluence de 40000 cellules par puits. Elles sont comptées sur une cellule TOMA pour obtenir la concentration désirée. L'agent de transfection utilisé est le FuGene ou X-tremeGENE. C'est un produit commercialisé par les laboratoires Roche. Le FuGene est un agent non liposomal, sa faible cytotoxicité et son fort taux de transfection en font un agent idéal. Ce réactif va former des complexes avec l'ADN (plasmides incorporés), qui seront transportés à l'intérieur des cellules Cos7.

Une solution de 100µl est préparée contenant les plasmides (dont la concentration est à adapter) avec le réactif. Les cellules en culture dans les LabTecks sont d'abord rincées avec du DMEM non complémenté, puis remises avec du DMEM complémenté, 30µl du mélange de transfection est ensuite ajouté. Les quantités de plasmides sont transfectés sont de 1µg pour le plasmide mCherry-RevErbα et de 2µg pour le plasmide Cerulean-NCor. Pour 3µg d'ADN total, 7,5µl de réactif FuGene est ajouté à l'ADN. Le mélange est alors vortexé 5 secondes, puis mis à incuber 15min à température ambiante. Si le temps d'incubation est trop long (supérieur à 20 minutes, les

complexes lipides/ADN risquent de se regrouper et de se coller à la paroi, rendant la transfection moins efficace. Si l'incubation est trop courte (inférieure à 15min), les complexes n'ont pas le temps de se former. Le mélange est ensuite déposé dans les puits au contact des cellules, puis mis à incuber pendant 24h à 37°C.

Le lendemain, le milieu de culture est changé et les ligands sont ajoutés à une concentration de 5µM. L'hème qui est conservé sous forme de poudre est dilué dans du milieu DMEM complétement et ajouté à la bonne concentration. Les ligands étant conservés dans du DMSO 100% sont également dilués dans du milieu DMEM complétement. La concentration finale en DMSO est de 0,05% ce qui est négligeable et sans effet toxique sur les cellules. Les ligands sont laissés à incuber une à deux heures avec les cellules, l'analyse en microscopie peut alors commencer.

Annexes 3 : Purification du LBD de RevErb α pour l'anisotropie de fluorescence

Le plasmide permettant d'exprimer le LBD de RevErb α a été fourni par la société pharmaceutique Servier. C'est un plasmide pET23 Ampicilline résistant permettant d'exprimer le LBD de RevErb α (P281-Q614 Δ 342-413), étiqueté avec 6 histidines en N-ter de RevErb α . Il est nommé pET23-6xHis-RevErb α . La délétion d'une partie de la protéine permet une meilleure solubilité de celle-ci qui a tendance à agréger. La protéine RevErb α est purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne histidine-trap. C'est donc grâce à l'étiquette histidines que la protéine sera retenue sur la colonne. Cette dernière est composée de billes de sépharose qui ont la capacité de fixer l'histidine. Un ajout d'imidazole permet de casser ces liaisons et donc entraîne l'élution de RevErb α .

I. Préparation de bactéries compétentes

Pour commencer il est nécessaire de produire des bactéries compétentes, c'est à dire des bactéries ayant la capacité d'accepter un plasmide. Pour cela, des bactéries E. Coli sont mises en culture dans 5mL de milieu LB (Annexes 1) sous agitation constante à 37°C pendant la nuit. Le lendemain 1ml de bactéries sont ensemencées dans 49mL de milieu LB et mises sous agitation à 37°C jusqu'à obtention d'une DO comprise entre 0,3 et 0,4 (phase exponentielle de croissance des bactéries). A partir de ce stade, les bactéries doivent être maintenues à 4°C. Le milieu de culture est ensuite centrifugé 10min à 5000rpm. Le culot est suspendu dans un demi-volume de solution de chlorure de calcium (CaCl₂) stérile à 50 mM et laissé 20min dans la glace à 4°C. Les bactéries sont ensuite centrifugées 10min à 5000rpm. Le culot est suspendu dans 1/20^{ème} de solution de CaCl₂ à 50mM. Les bactéries sont à présent prêtes à l'insertion d'un ADN plasmidique et peuvent être conservées dans 15% de glycérol (évitant la formation de cristaux de glace et donc la destruction ou des dommages causés aux bactéries) à -80°C.

Suite à cela, l'ADN plasmidique d'intérêt (pET23-6xHis-RevErb α) est mis en contact avec 50 μ l des bactéries fragilisées par la présence du CaCl₂. La mise en contact est d'une demi-heure sur la glace et 100 à 200ng d'ADN plasmidique est ajouté. La mixture est ensuite mise 45 secondes à 42°C, puis replacée à 4°C pendant 2-3min. 1ML de milieu LB est alors ajouté et la solution est mise à 37°C sous agitation durant la nuit.

Le CaCl₂ a une bonne conductivité électrique, son action permet de rendre la paroi de la bactérie plus poreuse, la rendant plus sensible et donc plus à même d'intégrer de l'ADN plasmidique. De plus, les ions Ca²⁺ neutralisent les charges négatives de la membrane bactérienne ainsi que celles de l'ADN plasmidique, favorisant ainsi son adhésion à la membrane. L'incubation initiale dans la glace stabilise les mouvements moléculaires dans la membrane bactérienne. Les chocs thermiques (passage de 4°C à 42°C) accroissent la perméabilité de la membrane bactérienne. Ces 2 étapes favorisent la pénétration du plasmide dans la cellule. Une incubation finale dans le milieu de culture LB permet un début d'expression du gène de résistance à l'antibiotique (AB).

Suite à l'incubation à 37°C, les bactéries peuvent être conservées dans 15% de glycérol à -80°C. Elles expriment le plasmide d'intérêt et pourront être réutilisées pour des purifications futures.

II. Expression de RevErb α -LBD dans les bactéries compétentes

1) Pré-culture du pET23-6xHis-RevErb α -LBD

A partir du stock de bactéries exprimant le plasmide pET23-6xHis-RevErb α , quelques bactéries sontensemencées dans du milieu de culture LB en présence de l'AB ampicilline ajouté à une concentration de 240 μ g/ μ l. L'ajout de l'AB permet d'obtenir uniquement l'amplification du plasmide porteur de la résistance à cet AB et d'éviter l'amplification de contaminant. La solution est mise à 37°C sous agitation durant la nuit.

2) Induction de l'expression de RevErb α -LBD

Le lendemain, 20ml de pré-culture estensemencé dans 500ml de milieu LB toujours en présence de l'AB ampicilline à 240 μ g/ μ l. La culture est mise sous agitation à 37°C jusqu'à l'obtention d'une DO de 0,8 (environ 3h). La culture est alors mise sous agitation à 16°C pendant une heure. Après cela, 0,1mM d'IPTG est ajouté et la solution est laissée sous agitation à 16°C pendant 20 heures. Cette dernière étape permet l'induction de l'expression de la protéine RevErb α

3) Préparation du lysat bactérien

Le lendemain, le milieu de culture est centrifugé 20min à 6000rpm et à 4°C. Le culot est ensuite suspendu dans 25ml de tampon de lyse (Annexes 1), le tout est bien homogénéisé. Les cellules bactériennes sont alors congelées dans du nitrogène, permettant une congélation très rapide et en même temps la fragilisation de la paroi bactérienne qui sera cassée plus facilement. La décongélation se fait progressivement dans de l'eau froide. Lorsque le mélange est décongelé, il est soniqué dans la glace à une amplitude de 60, avec 30 pulses par minute. La sonication dure 6 minutes pendant lesquelles, la culture sera soniquée par cycle de 20 secondes, alternée avec 40 secondes dans la glace. Après cela, le milieu est centrifugé 45 minutes à 18000rpm. Le surnageant est finalement filtré avec un filtre de 0,5 μ m.

III. Purification de RevErb α -LBD sur colonne Nickel-Histidine de 1ml

Deux tampons sont nécessaires à cette purification, un tampon A permettant de lancer la solution issue de la culture bactérienne dans la colonne et ainsi de permettre la fixation de RevErb α aux billes de sépharoses. C'est donc un tampon avec une faible concentration d'imidazole, ce qui évitera de décrocher la protéine trop rapidement. Le deuxième tampon: tampon B sera plus concentré en imidazole et permettra donc d'éluer la protéine (Annexes 1).

Premièrement, toute la solution issue de la culture bactérienne est mise en contact de la colonne. Cette étape permet à RevErb α de se lier aux molécules de nickels fixés aux billes de sépharose composant la colonne. La deuxième étape qui est l'élution se fera en 2 fois. Dans un premier temps, la colonne sera mise en contact avec un mélange de 80% de tampon A et 20% de tampon B. Cette étape permet de décrocher de la colonne ce qui est non spécifique et pas assez fortement lié. La dernière étape est de mettre en contact 100% du tampon B avec la colonne. Cela permet de décrocher entièrement RevErb α .

C'est ainsi que le LBD de RevErb α est purifié et que les essais en anisotropie peuvent être effectués.

Annexes 4 : Anisotropie de fluorescence, conditions expérimentales et peptides corépresseurs utilisés

I. Appareillage expérimental et paramètres de mesures

Les mesures sont effectuées avec un appareil Tecan Safire2 à une température constante de 25°C (température ambiante). C'est un lecteur de plaque permettant de réaliser des mesures de fluorescence, d'absorbance et de polarisation. Les paramètres de mesures sont:

- Mesure de fluorescence de polarisation
- En mode end point
- Le gain est optimal
- La position en z ou facteur G = 1,2
- Temps d'intégration = 200µs

II. Peptides corépresseurs utilisés en anisotropie de fluorescence

Le tableau ci-dessous regroupe tous les peptides utilisés au cours des essais d'anisotropie de fluorescence. La boîte CoRNR est surlignée en rose et les acides aminés indispensables à l'interaction entre RevErb α et NCor sont représentés en gras.

Peptide	Séquences Acides aminés	Fluorophore
NCor ID1	RLITLADH ICQII TQDFAR	Fluorescéine
NCor ID2	DPASNLG LEDII IRKALMGsFD	Fluorescéine
NCor ID3	KTTITAANF IDVII TRQIASDKDAR	Fluorescéine
SMRT ID1	RVVTLAQH ISEVI TQDYTR	Rhodamine 110
SMRT ID2	TNMG LEAII IRKALMGKYDQWEE	Fluorescéine
NCor5	QVPRTHRLITLADH ICQII TQDFARNQVPSQASTSTFQTSPSALSSTPVRTK TSSRYSPESQSQTVLHPRPGPRVSPENLVDKSRGSRPGKSPERSHIPSEPYE PISPPQGPAVHEKQDSMLLLSQRGVDPAEQRSDSRSPGSISYLPsFFTLES TSPMVKSKKQEIFRKLNSGGGSDMAAAQPGTEIFNLPAVTTSGAVSSR SHSFADPASNLG LEDII IRKALMGsFDDKVEDHGVVMSHPVGMPSAST SVVTSSEARRDE	Atto647N

III. Synthèse du fragment NCor5 pour l'anisotropie de fluorescence

Le fragment NCor5 de 2670 acides aminés (GLN 2059-GLU 2325) est issu de la souris. L'alignement des séquences indique une grande similarité entre les peptides et surtout les domaines IDs sont conservés. Cette séquence a donc été insérée dans un plasmide Pet-Tev modifié: fusion à la thioredoxine¹. Ce vecteur possède un site de clivage à la Tev² qui permettra, après purification, une élution spécifique de la protéine d'intérêt. La modification que porte ce plasmide est la présence d'une étiquette histidine qui permettra la purification de la protéine insérée. Le plasmide contenant la séquence du peptide NCor5 est surexprimé dans des bactéries E. Coli BL21 Rosetta (souche de bactéries rendues compétentes pour l'insertion d'un plasmide et sa surexpression). La première étape de purification se réalise sur colonne de Nickel en présence de tampon C (Annexes 1). La deuxième étape consiste au clivage à la Tev. Le peptide NCor5 est retenu sur la colonne de Nickel grâce à l'étiquette histidine. La coupure à la Tev permet de décrocher le peptide de la colonne et de la séparer de l'étiquette histidine. Cette étape de clivage se réalise sur la nuit à 4°C. La troisième étape consiste en une colonne de gel filtration dans le tampon C (Annexes 1) permettant la séparation du peptide Ncor5 et de l'étiquette thioredoxine.

¹ Protéine oxydoréductrice qui aide à la production de la protéine sous forme soluble.

² La protéase Tev correspond au domaine catalytique de la protéine Nla (Nuclear Inclusion a) qui est une endopeptidase et qui a une masse de 27kDa. La séquence très spécifique reconnue par la Tev est largement utilisée pour cliver les protéines de fusion, notamment lors de purification de protéine.

ANNEXE 5: Tableaux anisotropie

Le tableau ci-dessous réunit les affinités du LBD de RevErb α avec les peptides issus de NCor.

Peptide	Moyenne K_D (μ M)	Ecart type sur le K_D	Moyenne ΔG (kJ)	Ecart type sur ΔG
NCor ID1 FITC	0,56	0,16	8,45	0,19
NCor ID2 FITC	3,77	0,04	7,31	0,01
NCor ID3 FITC	14,8	3,7	6,52	0,15
NCor ID1 FITC + Hème 5 μ M	8,28	1,39	6,85	0,1
NCor ID1 FITC + Hème 10 μ M	13,73	4,4	6,57	0,19
NCor ID1 FITC + SGN 100 μ M	0,12	0,04	9,32	0,17
NCor ID1 FITC + SD7 100 μ M	3,8	2,28	7,37	0,34
NCor ID1 FITC + SGN 20 μ M	0,08	0,03	9,57	0,21
NCor ID1 FITC + SD7 20 μ M	1,85	0,51	7,74	0,15
NCor5 Atto647	0,35	0,13	8,72	0,19
NCor5 Atto647 + SGN 100 μ M	0,11	0	9,39	0
NCor5 Atto647 + SD7 100 μ M	1,44	0,37	7,88	0,16
NCor5 Atto647 + Hème 5 μ M	45,77	30,03	5,92	0,42

Le tableau suivant regroupe les affinités du LBD de RevErb α avec les peptides issus de SMRT

Peptide	Moyenne K_D (μ M)	Ecart type sur le K_D	Moyenne ΔG (kJ)	Ecart type sur ΔG
SMRT ID1 Rhodamine	0,19	0,06	9,07	0,18
SMRT ID2 FITC	1,15	0,45	8,03	0,23
SMRT ID1 Rhodamine + SGN 100 μ M	0,08	0,01	9,52	0,07
SMRT ID1 Rhodamine + SD7 100 μ M	0,9	0,49	8,19	0,35

SMRT ID1 Rhodamine + Hème 5µM	4,19	0,72	7,25	0,1
SMRT ID1 Rhodamine + Hème 10µM	6,27	1,02	7,01	0,09

Le tableau ci-dessous résume les affinités du LBD de RevErbα avec les peptides issus des CoRs NCor et SMRT en absence de fluorophore

Peptide	Moyenne K_D (µM)	Ecart type sur le K_D	Moyenne ΔG (kJ)	Ecart type sur ΔG
NCor ID1 Nu 100µM	7,5	0,91	6,91	0,07
NCor ID1 Nu 50µM	4,43	1,18	7,23	0,17
NCor ID1 Nu 10µM	3,33	0,38	7,38	0,07
NCor ID1	5,09	0,82	7,17	0,1
NCor5 Nu 10µM	0,55		8,43	
NCor5 Nu 5µM	0,55		8,43	
NCor ID2 100µM	16.8		6.43	
NCor ID2 50µM	11.18		6.67	
NCor ID2 10µM	4.15		7.25	
NCor ID3 100µM	10 ⁺⁷		0.006	
NCor ID3 50µM	10 ⁺⁷		0.003	
NCor ID3 10µM	10 ⁺⁷		0.006	
SMRT ID1 100µM	2.28		7.6	
SMRT ID1 50µM	1.59		7.81	
SMRT ID1 10µM	1.15		8	
SMRT ID2 100µM	9.42		6.77	
SMRT ID2 50µM	6.9		6.95	
SMRT ID2 10µM	5		7.14	

Annexes 6 : Synthèse des plasmides mCherry-RevErb α et Cerulean-NCor pour la microscopie de fluctuation de fluorescence

Le but est d'obtenir des plasmides permettant d'exprimer les protéines d'intérêts marquées avec des protéines fluorescentes pour la partie microscopie. C'est ainsi que les plasmides suivants seront synthétisés :

- Le plasmide exprimant la protéine RevErb α pleine taille avec la protéine fluorescente mCherry en N-ter de RevErb α .
- Le plasmide exprimant la protéine NCor pleine taille avec la protéine fluorescente Cerulean en N-ter.

Pour cela, un couple de plasmides mCherry et Cerulean sont utilisés (Annexes 8). Ces plasmides avaient servi précédemment à une étude de l'interaction entre un RN et son CoR (Savatier et al, 2010). Ces plasmides sont utilisés car ils expriment les protéines fluorescentes désirées sous le contrôle d'un promoteur fort (SV40). Ceci permettra une expression importante des protéines lors des transfections transitoires. Le but est donc d'insérer les protéines RevErb α et NCor dans les plasmides voulus afin d'obtenir des nouveaux plasmides exprimant les protéines d'intérêt avec en N-ter les protéines fluorescentes.

Le plasmide exprimant RevErb α pleine taille a été fourni par la société pharmaceutique Servier (Annexes 8). La séquence ADN de la protéine NCor pleine taille a été commandé à la société Labomics (Annexes 8).

I. Synthèse du plasmide mCherry-RevErb α

Amplification et isolation de la séquence d'ADN de RevErb α

Dans un premier temps, la séquence ADN de RevErb α est amplifiée par PCR avec des séquences oligonucléotidiques comportant les sites de restriction BspE1 (en N-ter) et HindIII (en C-ter).

Oligo RevErb**BspE1**: 5'-AGT-TCC-GGA-ATG-GAC-TAC-AAG-GAC-GAC-GAT-GAC-AAG-3'

Oligo RevErb**HindIII**: 5'-ACT-GAA-GCT-TTC-ACT-GGG-CGT-CCA-CCC-GGA-AGG-3'

Le fait d'insérer les sites de restriction sur les oligos permettra d'insérer plus facilement l'ADN de RevErb α dans le plasmide désiré, et surtout, de l'insérer en respectant le bon cadre de lecture et à la position voulue. De plus, le fait de choisir ces enzymes de restrictions va engendrer des extrémités à bout cohérents. Donc uniquement un plasmide ayant été coupé avec les mêmes enzymes de restriction pourra se lier avec l'ADN de RevErb α .

Le cycle PCR est:

95°C --> 2min

95°C --> 30sec	} 30 fois
61°C --> 30sec	
70°C --> 40sec	

70°C --> 12min

12°C --> ∞

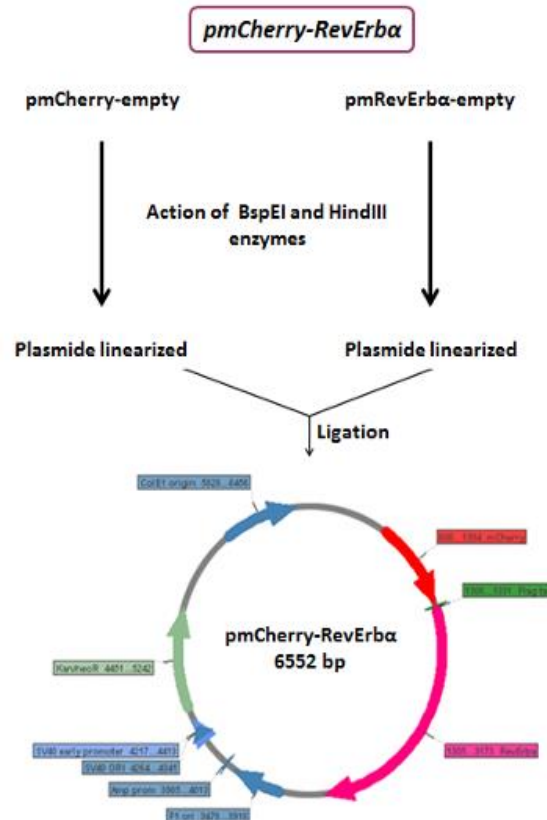
Une fois le cycle fini, l'amplification de l'ADN, attendu à une taille de 1,8 kb, est vérifié sur gel d'agarose 0,7% TAE 0,5X pendant 30min environ à 50V. La révélation de la bande ADN se fait avec du Syber green, qui est un intercalant des bases ADN et qui est directement mélangé à la solution de gel d'agarose à une concentration de 1000X. Lorsque la présence de l'ADN de RevErb α est vérifiée, celui-

ci est purifié par Mini-Prep sur une colonne NucleoSpin Extract II. La première étape est la liaison de l'ADN à une membrane de silice. Les contaminants sont ensuite éliminés par un lavage avec un tampon contenant de l'éthanol. L'ADN est finalement élué de la colonne avec un tampon 5mM Tris/HCl, pH 8,5. L'ADN de RevErb α est ainsi bien concentré.

L'ADN de RevErb α , issu de l'amplification et de la purification précédente, ainsi que le plasmide mCherry sont digérés par les enzymes de restriction BspE1 et HindIII. Pour cela, l'ADN de RevErb α est mis en contact avec 2 μ l de chacune des enzymes à une concentration de 0,2 μ g. Le plasmide mCherry est mis en contact avec 1 μ l de chacune des enzymes à une concentration de 1 μ g. La solution contenant le plasmide mCherry est mise à incuber 30min à 37°C et celle de RevErb α est mise à incuber 40min à 37°C. Les 2 solutions sont mises à -20°C jusqu'au lendemain afin d'inhiber l'action des enzymes de restrictions.

Le lendemain, la totalité des solutions est mise à migrer 30min environ à 50V sur un gel d'agarose 0,7% TAE, en présence de SyberGreen à 1000X. Les bandes sont révélées par lampe UV et l'ADN purifié sur colonne NucleoSpin. Pour cela, il faut extraire l'ADN du gel en découpant les bandes d'ADN révélées, puis les faire chauffer à 50°C dans un tampon très concentré en sels. Après la purification, la quantité d'ADN est dosée pour préparer la ligation. La ligation se fait avec l'enzyme T4 DNA ligase. Pour cela, le plasmide mCherry et l'ADN de RevErb α digérés sont mis en contact avec 1 μ l d'enzyme. L'insert (ADN de RevErb α) est 4 fois plus concentré que le plasmide mCherry, afin de favoriser la ligation. Le tout est mis à incuber toute la nuit à 16°C.

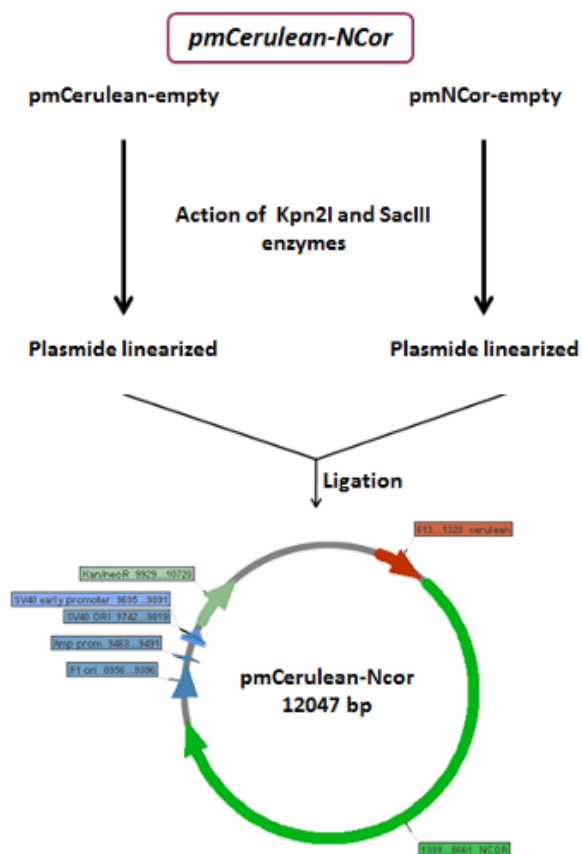
Le lendemain, la totalité de la solution de ligation est mise en contact avec des bactéries compétentes afin de les transformer (comme ce qui a été décrit précédemment). Les bactéries sont étalées sur du milieu LB solidifié contenant l'AB de résistance (Kanamycine) afin d'obtenir uniquement la croissance des bactéries ayant inséré le plasmide. Les boîtes sont alors mises à incuber à 37°C pendant la nuit. Le lendemain, quelques colonies sont prélevées et amplifiées grâce à des bactéries compétentes. L'ADN récupéré et amplifié est séquencé dans sa totalité pour vérifier la bonne insertion de l'ADN de RevErb α dans le plasmide mCherry.



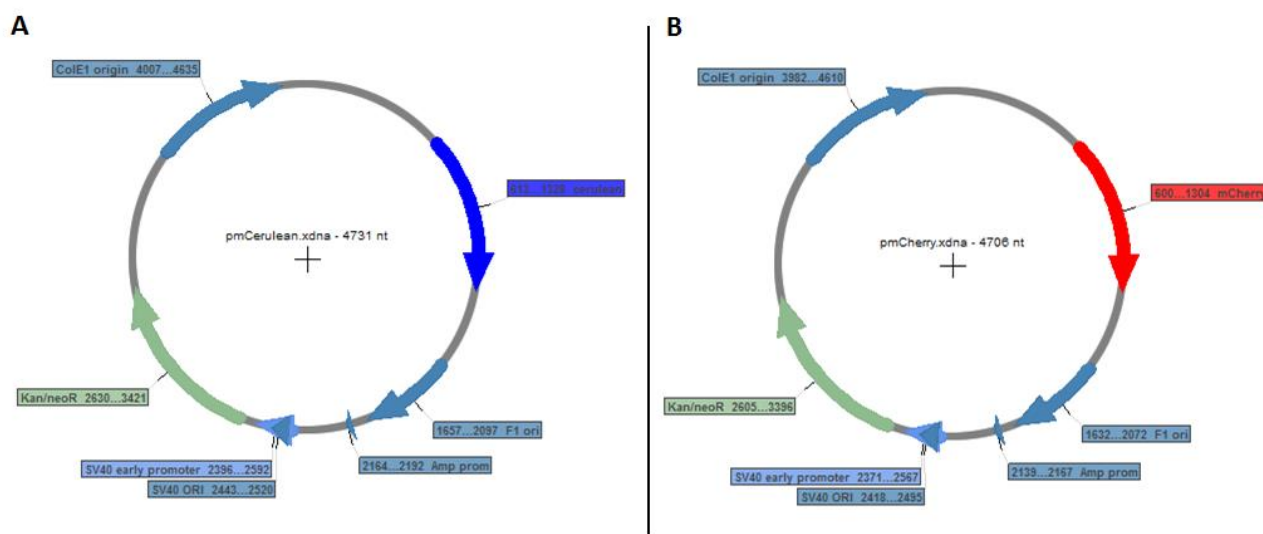
II. Synthèse du plasmide Cerulean-NCor

Etant donné que l'ADN de NCor a été commandé avec les bons sites de restrictions, une PCR d'amplification n'est pas nécessaire. L'ADN NCor et le plasmide Cerulean sont directement digérés avec les enzymes de restrictions *BspE1* (CCGGAA) et *Sac1* (GAGCTC). 0,2µg d'ADN NCor est mis en contact avec 1µl de chaque enzyme. 0,7µg de plasmide Cerulean est mis en contact avec 1µl de chaque enzyme. Les ADN digérés sont mis à migrer sur un gel d'agarose 0,6% TAE avec du SyberGreen à 1000X. Le gel est moins concentré car l'ADN de NCor est très gros, pour obtenir une meilleure séparation entre ADN et une meilleure migration, le maillage du gel est plus gros. Les ADN sont ensuite purifiés par colonne NucleoSpin à partir des bandes de gels découpés. Une fois l'ADN purifié, la ligation est lancée à 16°C durant la nuit, en mettant toujours 4 fois plus d'insert (NCor) que de plasmide (Cerulean).

Le lendemain, la totalité de la solution de ligation est mise en contact avec des bactéries compétentes. Les bactéries sont étalées sur du milieu LB solidifié contenant l'AB de résistance (Kanamycine). Les boîtes sont alors mises à incuber à 37°C pendant la nuit. Le lendemain, quelques colonies sont prélevées et amplifiées grâce à des bactéries compétentes. L'ADN récupéré et amplifié est séquencé dans sa totalité pour vérifier la bonne insertion de l'ADN de NCor dans le plasmide Cerulean.



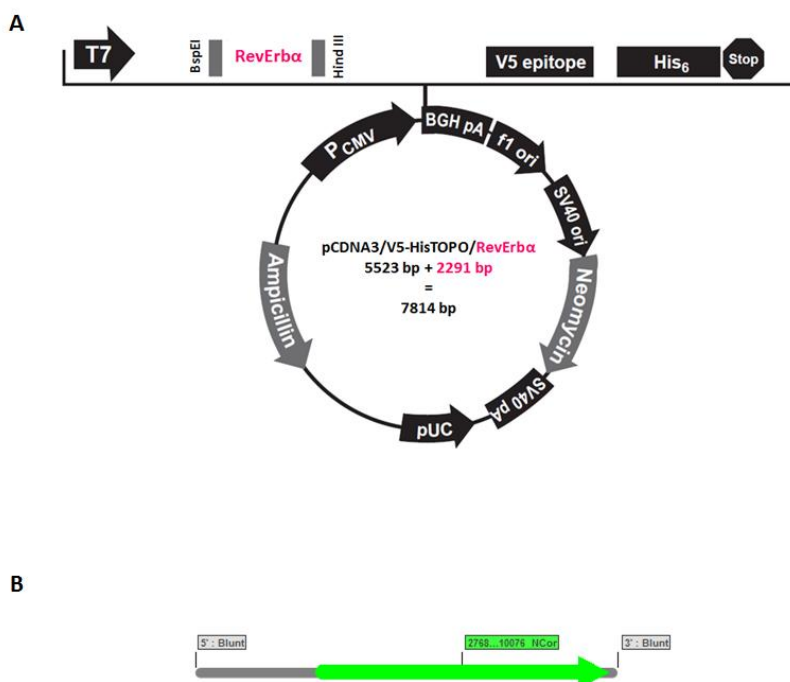
ANNEXE 7: Plasmides et séquences utilisés pour la synthèse des plasmides mCherry-RevErba et Cerulean-NCor



Les figures ci-dessus représentent les plasmides qui ont été utilisés pour la synthèse de mCherry-RevErba Cerulean-NCor.

A : Plasmide Cerulean vide dans lequel a été inséré NCor en C-ter de la séquence de la FP.

B : Plasmide mCherry vide dans lequel a été inséré RevErba en C-ter de la séquence de la FP.



A : Plasmide de RevErba fourni par Servier pour la synthèse du plasmide mCherry-RevErba

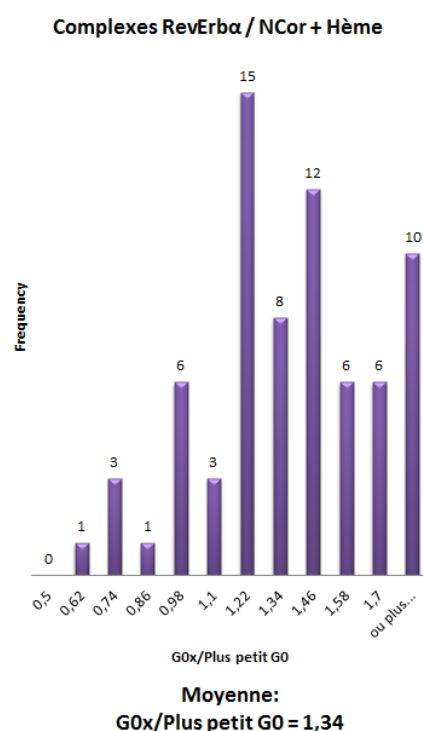
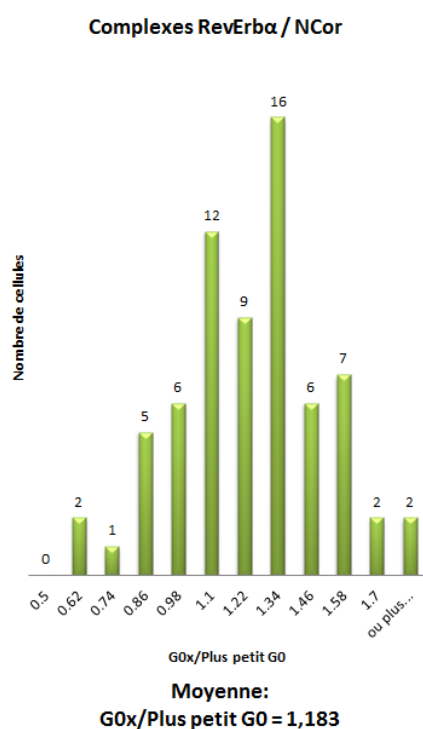
B : Séquence de NCor fourni par LabOmics pour la synthèse du plasmide Cerulean-NCor

ANNEXE 8: Histogrammes du nombre de complexes formés en N&B et tableaux de valeurs

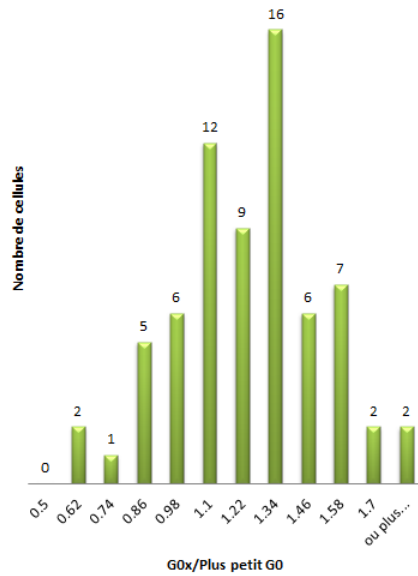
La totalité des histogrammes présentés ci-dessous regroupent les résultats du pourcentage de complexes formés en absence et en présence de ligand suivant l'homogénéité et la brillance des cellules. Le calcul de $G0x/Le$ plus petit $G0$ est en fait la $Bcc/G0$ de l'espèce la plus concentrée, il représente le nombre de complexes par rapport à l'espèce la moins concentrée. Les valeurs sont réparties entre 0 et 1 représentant respectivement 0 et 100% de complexation.

I. Histogrammes de la totalité des cellules

Les histogrammes ci-dessous présentent les pourcentages du nombre de complexes de la totalité des cellules en absence et en présence des trois ligands : hème, SGN et SD7.

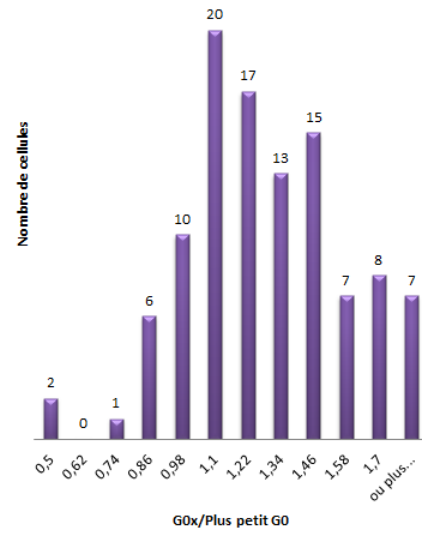


Complexes RevErba / NCor



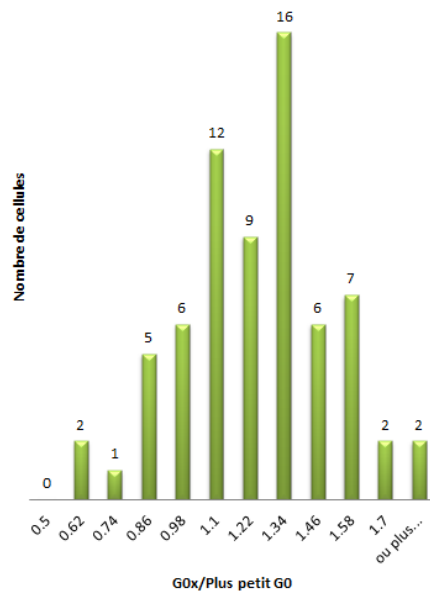
Moyenne:
G0x/Plus petit G0 = 1,183

Complexes RevErba/NCor + SGN



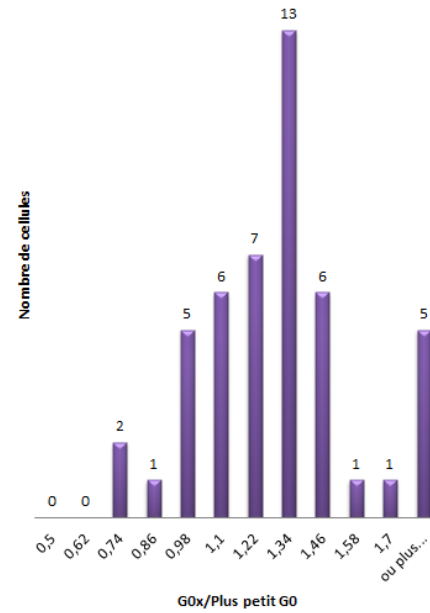
Moyenne:
G0x/Plus petit G0 = 1,23

Complexes RevErba / NCor



Moyenne:
G0x/Smaller G0 = 1.183

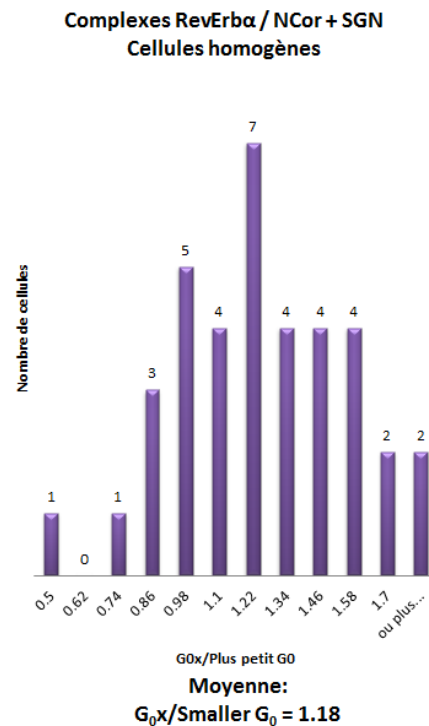
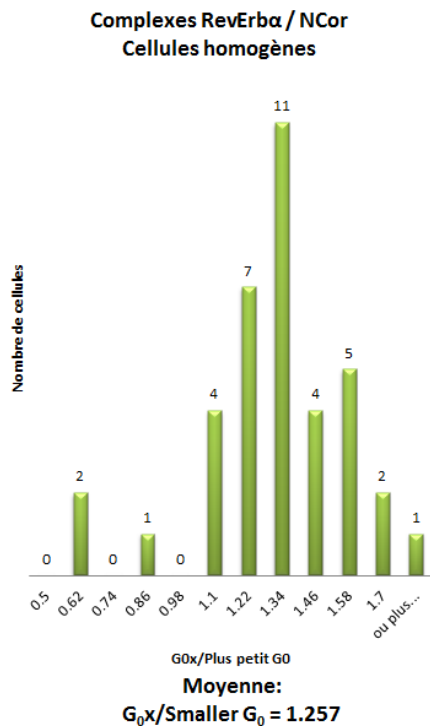
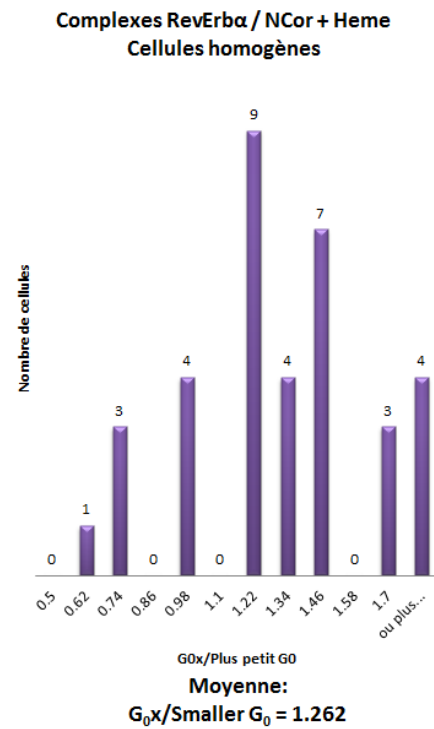
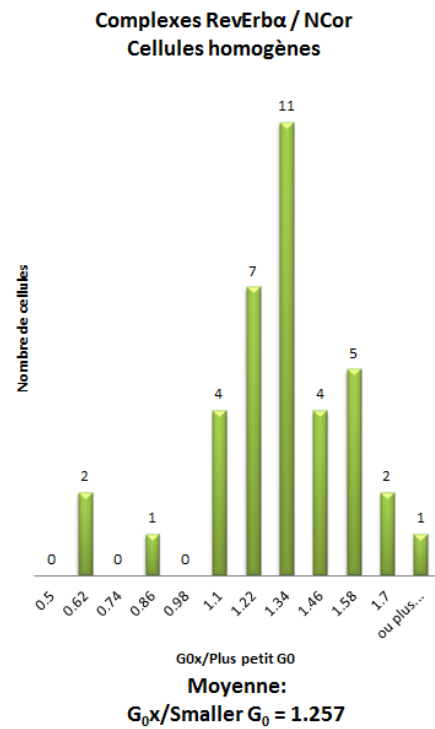
Complexes RevErba/NCor + SD7



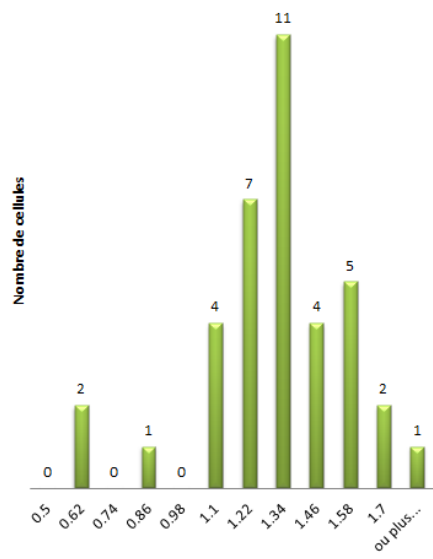
Moyenne:
G0x/Smaller G0 = 1.24

II. Histogrammes des cellules homogènes

Les histogrammes ci-dessous présentent les pourcentages du nombre de complexes des cellules homogènes uniquement, en présence des trois ligands : hème, SGN et SD7.

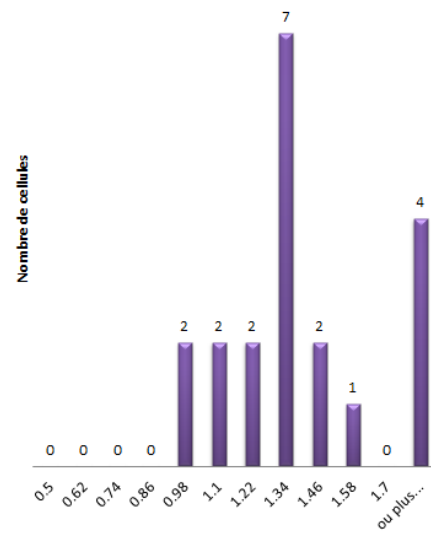


Complexes RevErba / NCor
Cellules homogènes



G0x/Plus petit G0
Moyenne:
 $G_0x/\text{Smaller } G_0 = 1.257$

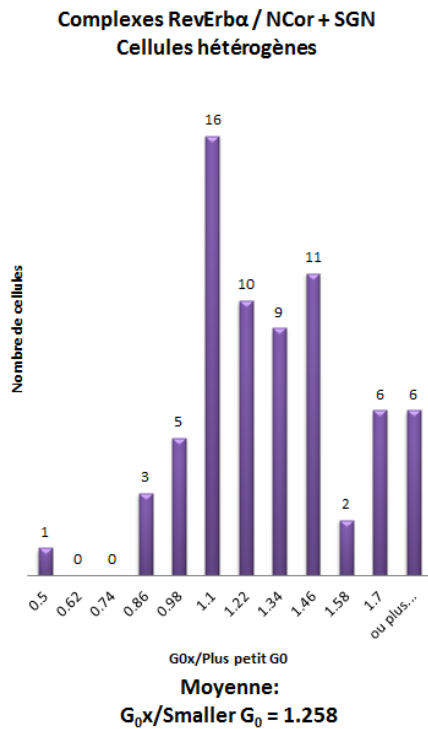
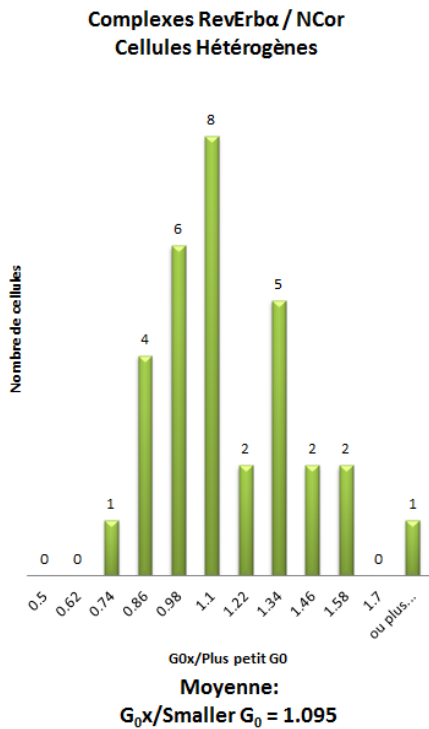
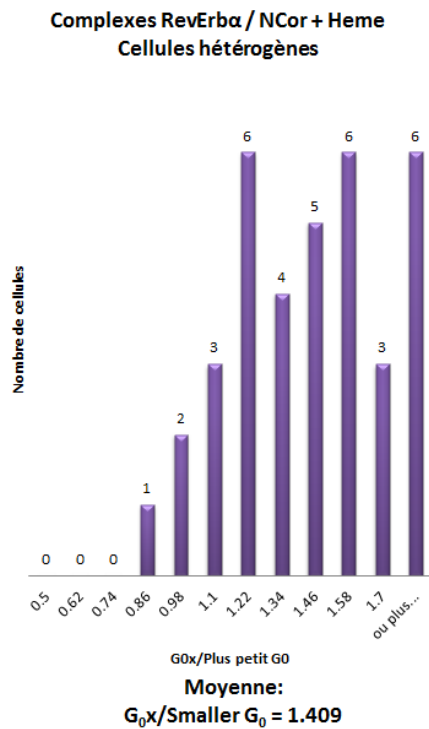
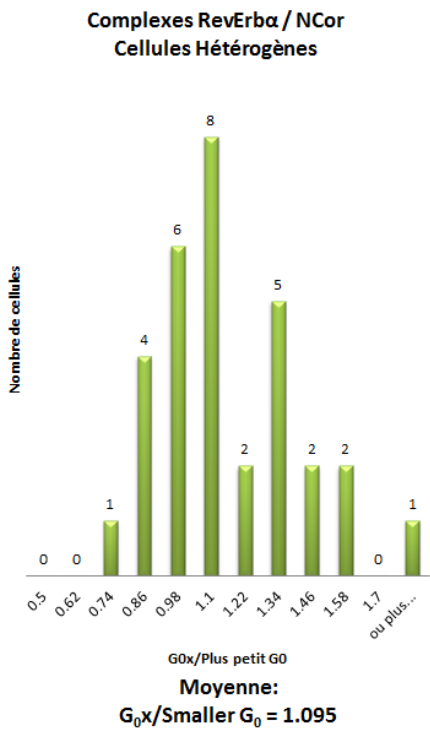
Complexes RevErba / NCor + SD7
Cellules homogènes



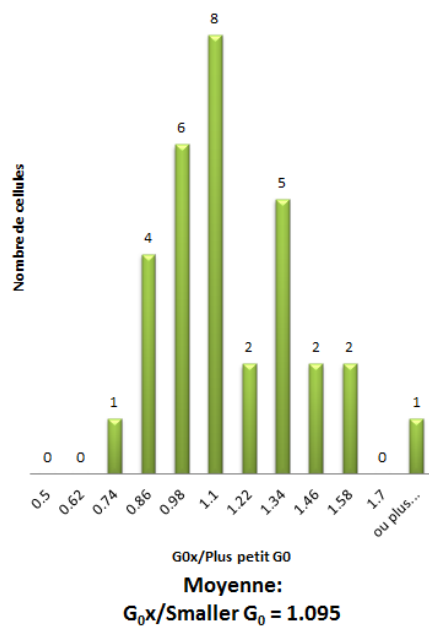
G0x/Plus petit G0
Moyenne:
 $G_0x/\text{Smaller } G_0 = 1.346$

III. Histogrammes des cellules hétérogènes

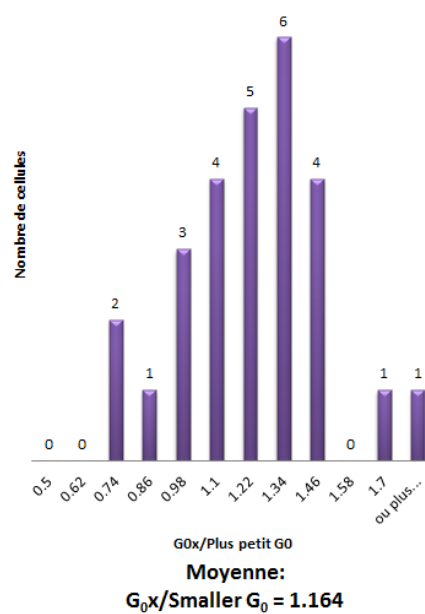
Les histogrammes ci-dessous présentent les pourcentages du nombre de complexes des cellules hétérogènes uniquement, en présence des trois ligands : hème, SGN et SD7.



Complexes RevErb α / NCor
Cellules Hétérogènes

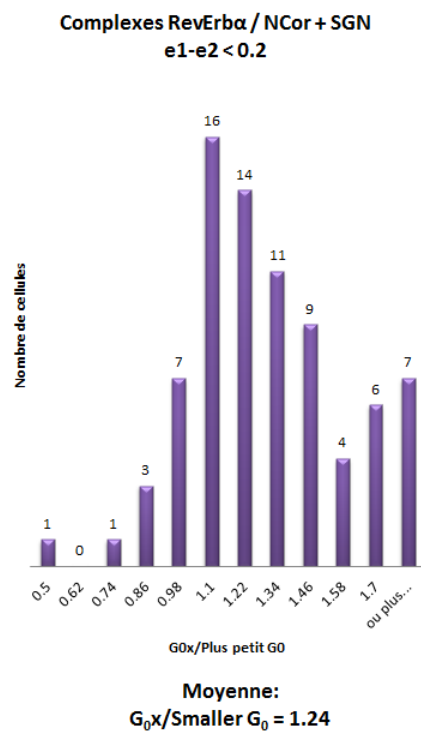
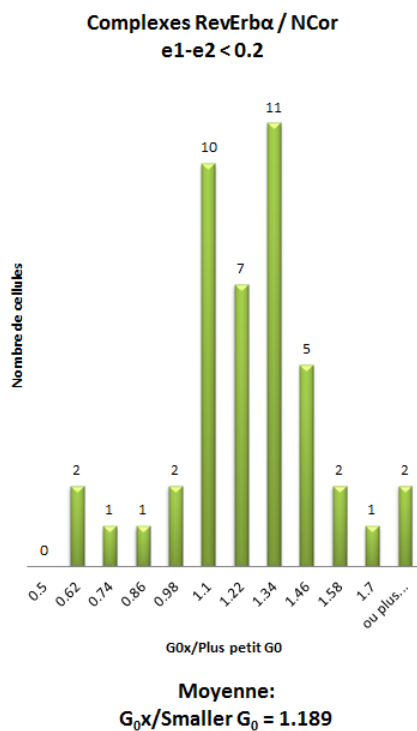
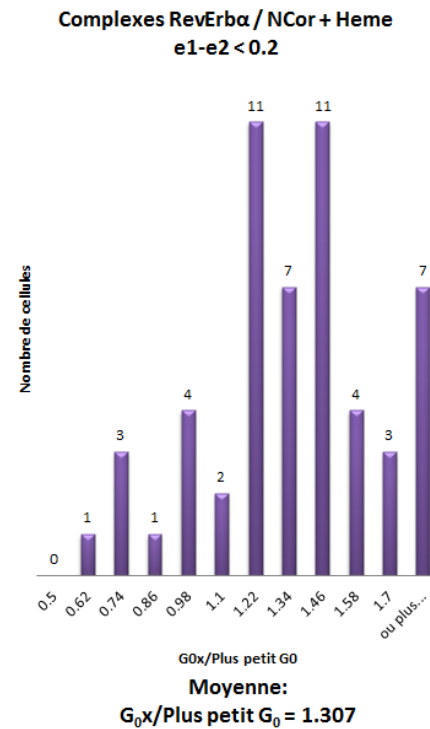
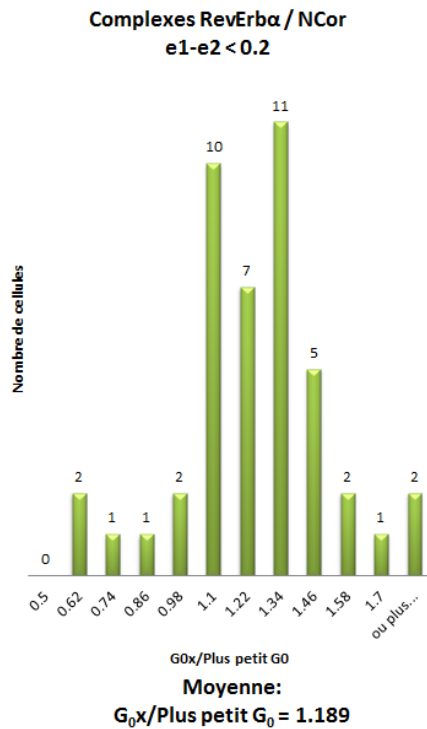


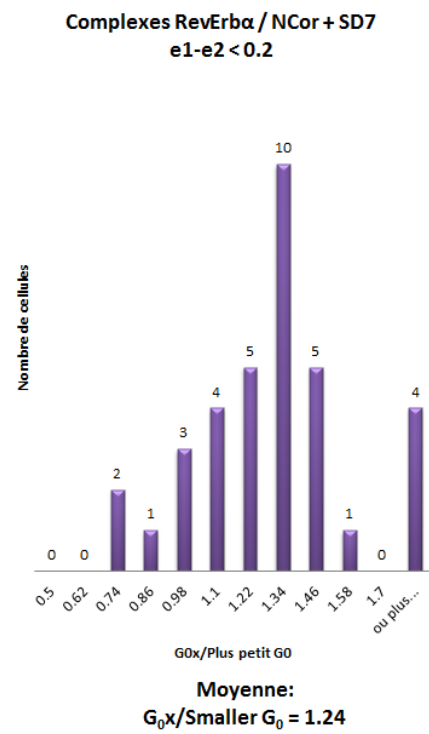
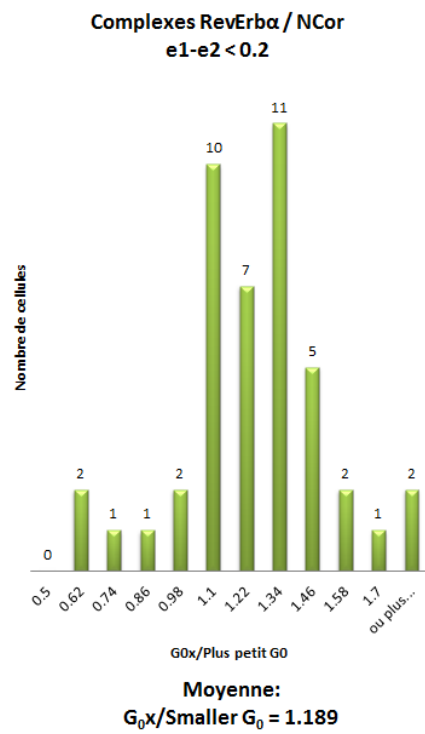
Complexes RevErb α / NCor + SD7
Cellules hétérogènes



IV. Histogrammes des cellules présentant des brillances inférieures à 0.2

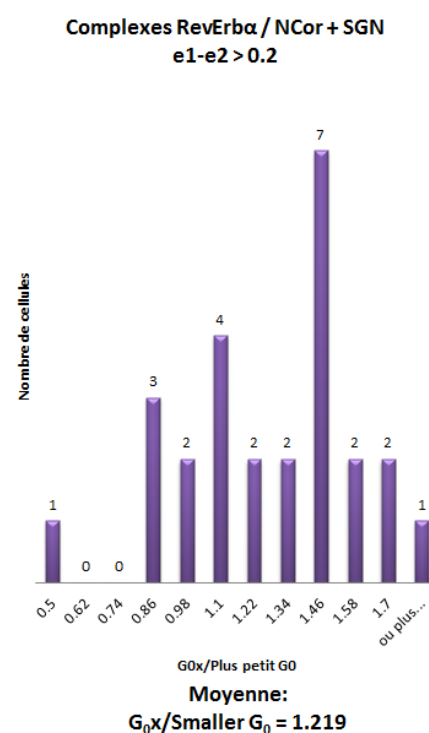
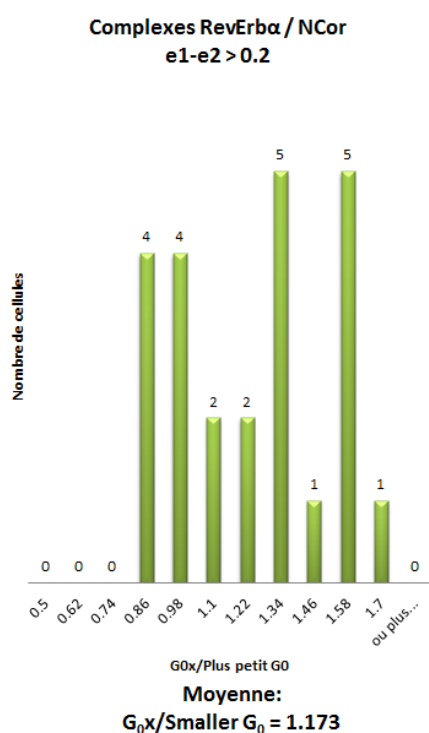
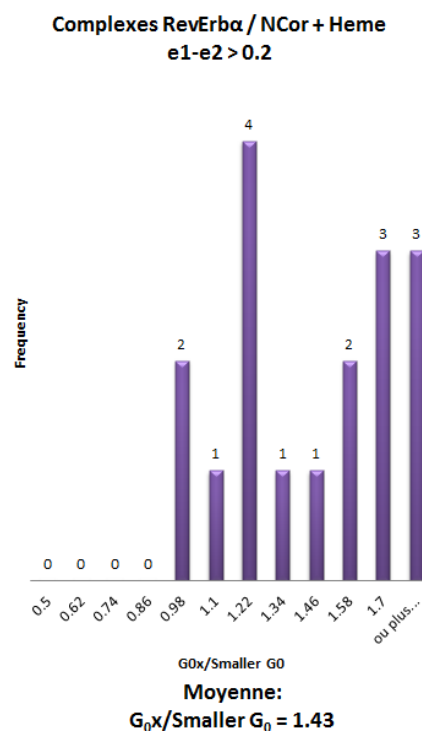
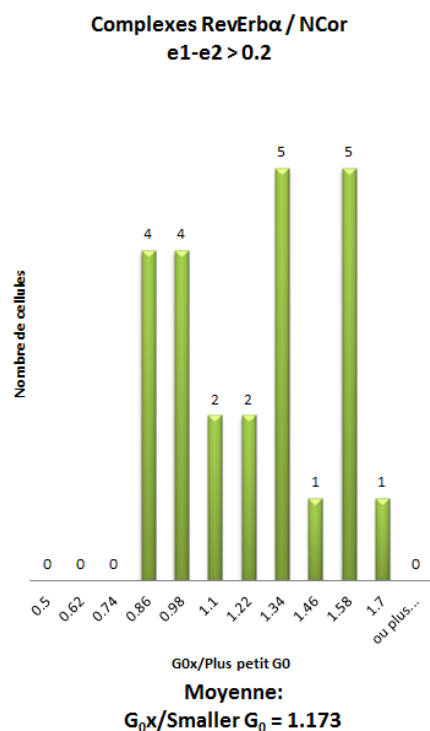
Les histogrammes ci-dessous présentent les pourcentages du nombre de complexes des cellules de brillances inférieures à 0.2 uniquement, en présence des trois ligands : hème, SGN et SD7.

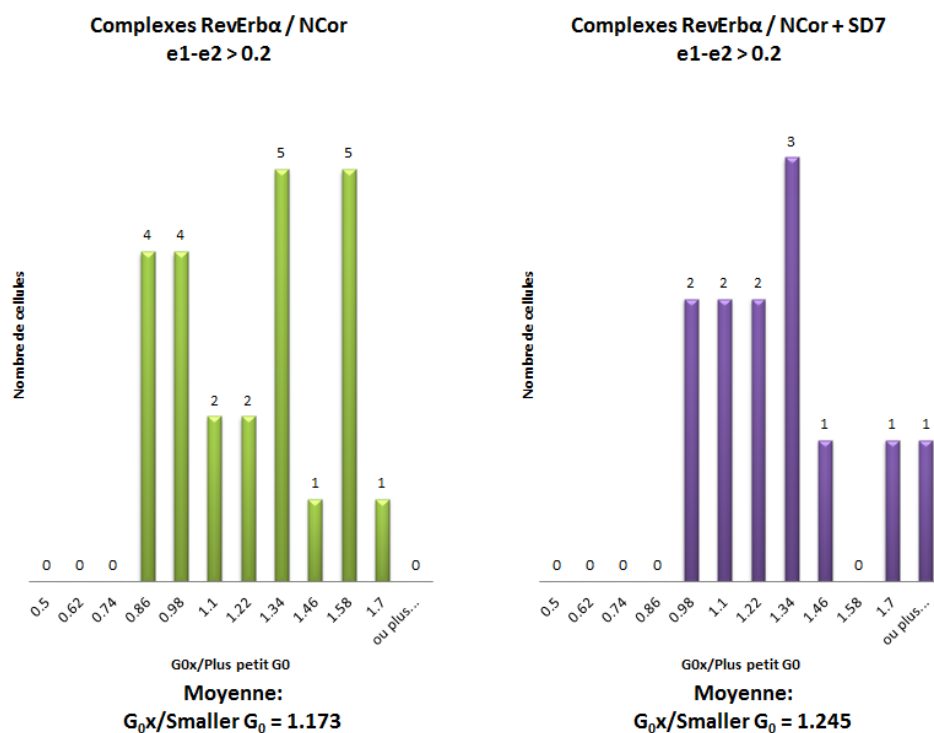




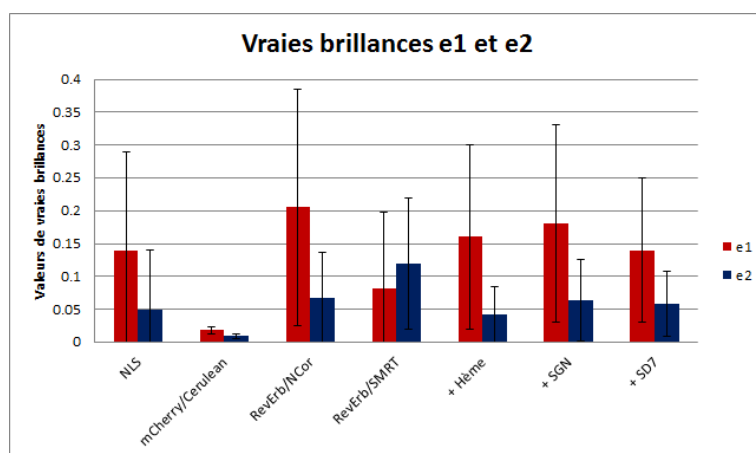
V. Histogrammes des cellules présentant des brillances supérieures à 0.2

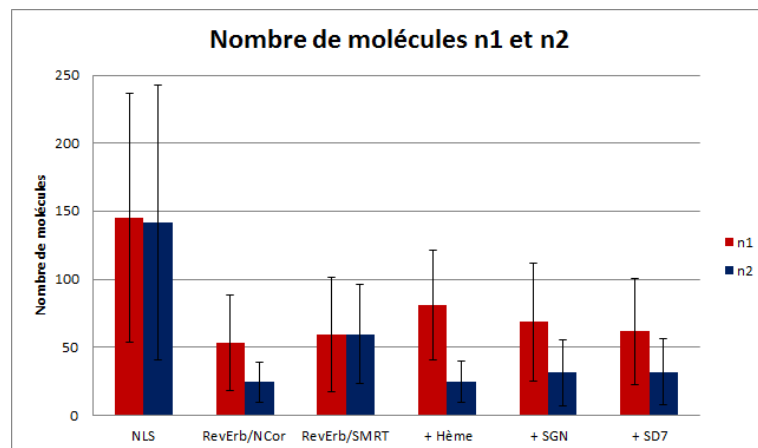
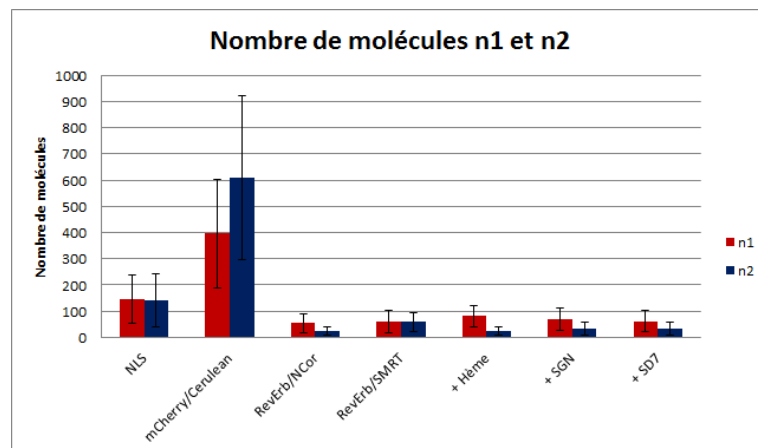
Les histogrammes ci-dessous présentent les pourcentages du nombre de complexes des cellules de brillances supérieures à 0.2 uniquement, en présence des trois ligands : hème, SGN et SD7.

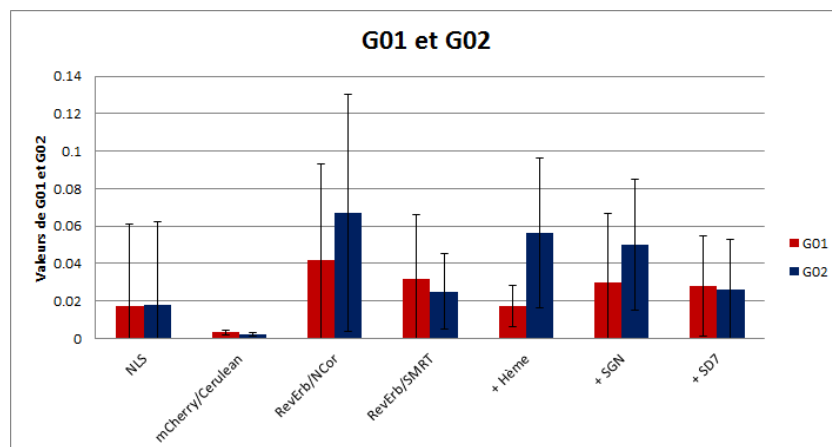
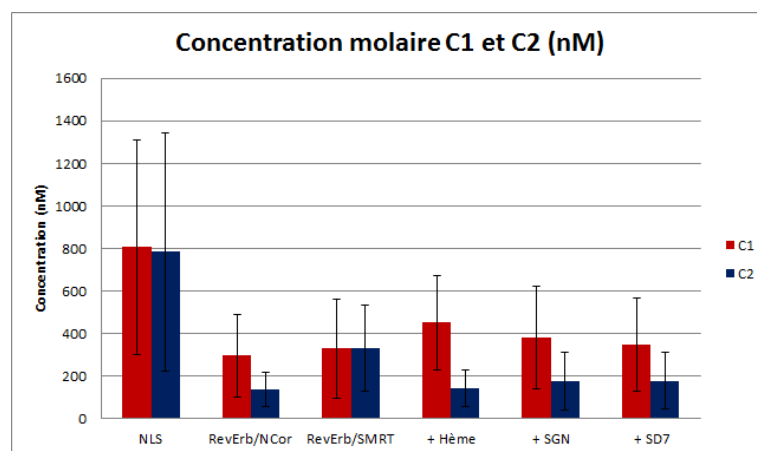
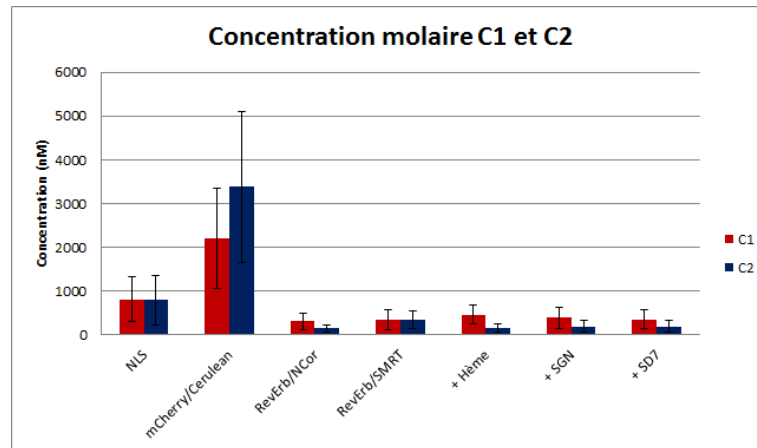


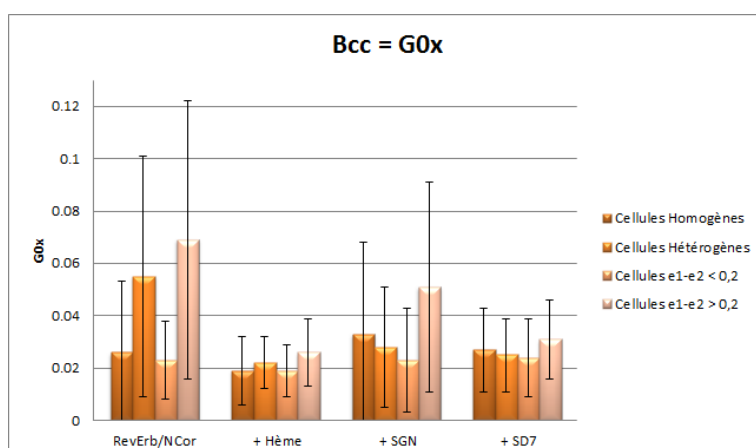
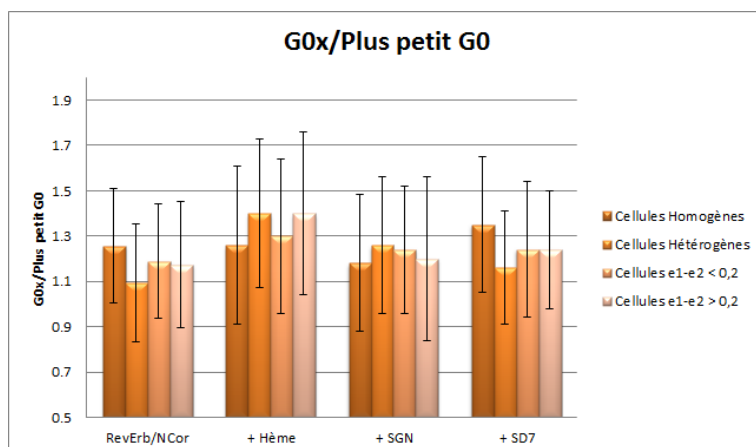
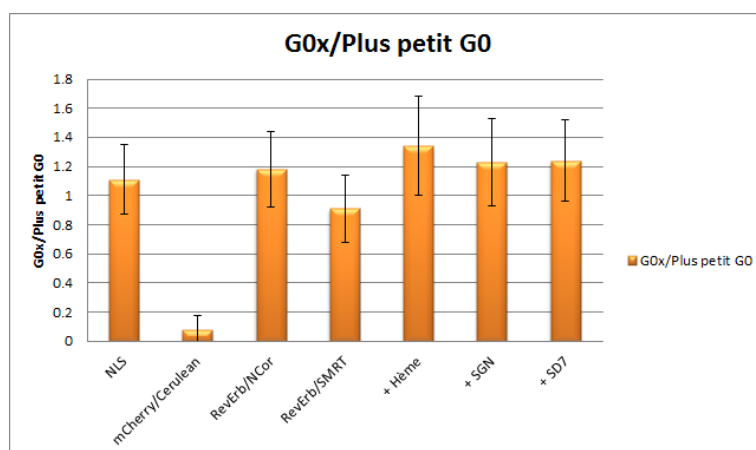
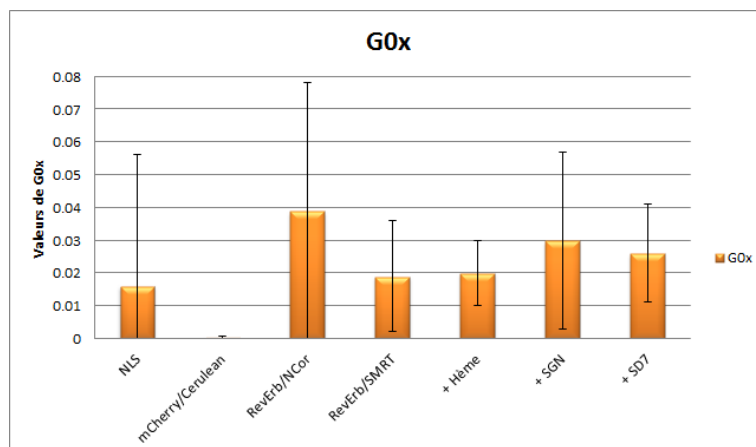


VI. Histogrammes représentant les brillances en nombre de molécules, concentration molaire, G01 et G02 et les Bcc des différents complexes









BIBLIOGRAPHIE

1. Adu-Gyamfi E, Digman MA, Gratton E and Stahelin RV. "Investigation of Ebola VP40 assembly and oligomerization in live cells using Number and Brightness analysis" (2012) Biophysical Journal vol. 102: 2517-2525
2. Baniahmad A, Köhne AC and Renkawitz R. "A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor" (1992) EMBO journal vol.11(3): 1015-1023
3. Basalobre A, Damiola F and Schibler U. "A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells" (1998) Cell vol. 93: 929-937
4. Bonnelye E, Vanacker JM, Desbiens X, Begue A, Stehelin D and Laudet V. « Rev-erb β , a new member of the nuclear receptor superfamily, is expressed in the nervous system during chicken development » (1994) Cell growth & differentiation vol. 5 : 1357-1365
5. Bourguet W, Germain P and Gronemeyer H. "Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications" (2000) Trends in Pharmacological Sciences vol. 21:381-388
6. Chen JD and Evans RM. "A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors" (1995) Nature vol. 377: 454-457
7. Declerck N and Royer CA. "Interactions in gene expression networks studied by two-photon fluorescence fluctuation spectroscopy" (2013) Methods in enzymology vol. 519(7): 203-230
8. Digman MA, Dalal R, Horwitz AR and Gratton E. « Mapping the number of molecule and brightness in the laser scanning microscope » (2008) Biophysical Journal vol. 94: 2320-2332
9. Digman MA, Wiseman PW, Choi C, Horwitz A and Gratton E. "Stoichiometry of molecular complexes at adhesions in living cells" (2009) PNAS vol. 106(7): 2170-2175
10. Downes M, Burke LJ, Bailey PJ and Muscat GEO. "Two receptor interaction domains in the corepressor, N-CoR/RIP13, are required for an efficient interaction with Rev-erbA α and RVR: physical association is dependent on the E region of the orphan receptors" (1996) Nucleic acids research vol. 24(22): 4379-4386
11. Drobizhev M, Makarov NS, Tillo SE, Hughes TE and Rebane A. "Two-photon absorption properties of fluorescent proteins" (2011) Nature Methods vol. 8(5): 393-399
12. Duez H and Staels B. "Rev-erb- α : an integrator of circadian rhythms and metabolism" (2009) J. Appl. Physiol. Vol 107(6): 1972-1980

13. Elson EL and Magde D « Fluorescence correlation spectroscopy. I . Conceptual basis and theory » (1974) Biopolymers vol. 13 : 1-27
14. Enmark E, Kainu T, Pelto-Huikko Mand Gustafsson JA. « Identification of a novel member of the nuclear receptor superfamily which is closely related to RevErb α » (1994) Biochemical and biophysical research communications vol. 204(1) : 49-56
15. Ferguson ML, Le Coq D, Jules M, Aymerich S, Declerck N and Royer CA. "Absolute quantification of gene expression in individual bacterial cells using two-photon fluctuation microscopy" (2011) Analytical Biochemistry vol. 419(2): 250-259
16. Garcia-Marcos A, Sanchez SA, Parada P, Eid J, Jameson DM, Remacha M, Gratton E and Ballesta JPG. "Yeast ribosomal stalk heterogeneity *in vivo* show by two-photon FCS and molecular brightness analysis" (2008) Biophysical Journal vol. 94: 2884-2890
17. Giguere V, Ong ES, Segui P and Evans M. "Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid" (1987) Nature vol. 330: 624-629
18. Giovani C, Gimona M, Sudol M and Yaffe M. "Modular protein domains" (2004) Wiley-VCH
19. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P and Chambon P. "Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A" (1986) Nature vol. 320: 134-149
20. Groenemeyer H and Laudet V "Transcription factors 3: nuclear receptors" (1995) Protein profile vol.2: 1173-1308
21. Guenther MG, Barak O and Lazar M. "The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3" (2001) Molecular and cellular biology vol.21(18): 6091-6101
22. Harding HP and Lazar M. "The orphan receptor Rev-ErbA α activates transcription via a novel response element" (1993) Molecular cell biology vol.13(5): 3113-3121
23. Harding HP and Lazar M. "The monomer-binding orphan receptor RevErb represses transcription as a dimer on a novel direct repeat" (1995) Molecular and cell biology vol.15(9): 4791-4802
24. Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S and Parker MG. "A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors" (1997) Nature vol. 387: 733-736
25. Hörlein AJ, Näär AM, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamel Y, Söderström M, Glass CK and Rosenfeld MG. "Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor" (1995) Nature vol.377: 397-403
26. Hu X and Lazar MA. "The CoRRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors" (1999) Nature vol. 40: 93-96

27. Hu X, Li Y and Lazar MA. "Determinants of CoRNR-Dependent repression complex assembly on nuclear hormone receptors" (2001) *Molecular and cellular biology* vol. 21(5): 1747-1758
28. Ishizuka T and Lazar MA. "The N-Cor/Histone deacetylase 3 complex is required for repression by thyroid hormone receptor" (2003) *Molecular and Cellular Biology* vol. 23(15): 5122-5131
29. James NG, Digman MA, Gratton E, Barylko B, Ding X, Albanesi JP, Matthew SG and Jameson DM. "Number and Brightness analysis of LRRK2 oligomerization in live cells" (2012) *Biophysical Journal* vol. 102: L41-L43
30. Jensen EV, Jacobson HI, Flesher JW, Saha NN, Gupta GN, Smith S, Colucci V, Shiplacoff D, Neuman HG, Desombre ER and Jungblut PW. "Estrogen receptors in target tissues" (1966). In *Steroid Dynamics* G Pincus, T Nakao and JF Tai eds – New York: Academic Press pp. 133-156
31. Kaasik KK and Lee CC. « Reciprocal regulation of haem biosynthesis an the circadian clock in mammals » (2004) *Nature* vol. 430 : 467-471
32. Kim JY, Son YL, Kim JS and Lee YC. "Molecular determinants required for selective interactions between the thyroid hormone receptor homodimer and the nuclear receptor corepressor N-Cor" (2010) *JMB* vol. 396: 747-760
33. Kumar N, Solt LA, Konkright J, Wang Y, Istrate MA, Busby SA, Garcia-Ordenez RD, Nuhant P, Burris T, Mercer BA, Hodder P, Roush WR, Rosen H, and Griffin PR. « Campaign to identify novel modulators of the Retinoic acid receptor-related Orphan Receptors (ROR) » (2009) *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*
34. Kuo MH and Allis CD. "Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation" (1998) *BioEssays* vol, 20: 615-626
35. Lazar MA, Hodin A, Darling DS and Chin WW. "A novel member of the Thyroid/Steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat *c-erbA α* transcriptional unit" (1989) *Molecular and cellular biology* vol.9: 1128-1136 McKenna NJ, Lanz RB and O'Malley BW. "Nuclear receptor coregulators: Cellular and molecular biology" (1999) *Endocrine review* vol.20 Issue3
36. Le Maire A, Teyssier C, Erb C, Grimaldi M, Alvarez S, De Lerra A, Balaguer P, Gronemeyer H, Royer CA, Germain P and Bourguet W. "A unique secondary-structure switch controls constitutive gene repression by retinoic acid receptor" (2010) *Nature Structural & Molecular Biology* vol. 17(7): 801-807
37. Li J, Wang J, Wang J, Nawaz Z, Liu JM, Qin J and Wong J. "Both corepressor proteins SMRT and NCor exist in large protein complexes containing HDAC3" (2000) *EMBO Journal* vol.19(16): 4342-4350
38. Madauss KP, Grygielko ET, Deng SJ, Sulpizio AC, Stanley TB, Wu C, Short SA, Thompson SK, Stewart EL, Laping NJ, Williams SP and Bray JD. "A structural and *in vitro* characterization

of asoprisnil: A selective progesterone receptor modulator" (2007) *Molecular Endocrinology* vol. 21(5): 1066-1081

39. Madge DE, Elson EL, Webb WW. « Thermodynamics fluctuations in a reacting system: Measurement by fluorescence correlation spectroscopy » (1972) *Physical Review Letters* vol. 29:705-708

40. Meng QJ, McMaster A, Beesley S, Lu WQ, Gibbs J, Parks D, Collins J, Farrow S, Donn R, Ray D and Loudon A. « Ligand modulation of REV-ERB α function resets the peripheral circadian clock in a phasic manner » (2008) *Journal of Cell Science* vol. 121 : 3629-3635

41. Miyajima N, Horiuchi R, Shibuya Y, Fukushima S, Matsubara K, Toyoshima K and Yamamoto T. "Two *erbA* homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus" (1989) *Cell* vol. 57: 31-39 Sap J, Munoz A, Damm K, Goldberg Y, Ghysdael J, Leutz A, Beug H and Vennström B. "The *c-erb-A* protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone" (1986) *Nature* vol.324: 635-640

42. Moutin E, Compan V, Raynaud F, Clerté C, Bouquier N, Labesse G, Fergusson ML, Fagni L, Royer CA and Perroy J. "The stoichiometry of scaffold complexes in living neurons – DLC2 functions as a dimerization engine for GKAP" (2014) *Journal of Cell Science* vol. 127: 3451-3462

43. Osz J, Pethoukhov MV, Sirigu S, Svergun DI, Moras D and Rochel N. "Solution structures of PPAR γ 2/RXR α complexes" (2012) *PPAR Research* vol. 2012

44. Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS and Hogenesch JB. "Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock" (2002) *Cell* vol. 109: 307-320

45. Pardee KI, Xu X, Reinking J, Schuetz A, Dong A, Liu S, Zhang R, Tiefenbach J, Lajoie G, Plotnikov AN, Botchkarev A, Krause HM and Edwards A « The structural basis of gas-responsive transcription by the human nuclear hormone receptor REV-ERB β » (2009) *PLOS Biology* vol. 7(2) : 384-398

46. Phelan CA, Gampe Jr RT, Lambert MH, Parks DJ, Montana V, Bynum J, Broderick M, Hu X, Williams SP, Nolte RT and Lazar MA. "Structure of Rev-erb α bound to N-CoR reveals a unique mechanism of nuclear receptor-co-repressor interaction" (2010) *Nature structural & Molecular biology* vol.17(7): 808-814

47. Raghuram S, Stayrook KR, Huang P, Rogers PM, Nosie AK, McClure DB, Burris LL, Khorasanizadeh S, Burris TP and Rastinejad F. « Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERB α and REV-ERB β » (2009) *Nature Structural & Molecular Biology* vol. 14(12) : 1207-1213

48. Reinking J, Lam MMS, Pardee K, Sampson HM, White W, Lajoie G, Edwards A and Krause HM. « The drosophila nuclear receptor E75 contains heme and is gas responsive » (2005) *Cell* vol. 122 : 195-207 Renaud JP, Harris JM, Downes M, Burke LJ and Muscat GEO.

“Structure-function analysis of the Rev-erbA and RVR ligand-binding domains reveals a large hydrophobic surface that mediates corepressor binding and a ligand cavity occupied by side chains” (2000) *Molecular Endocrinology* vol. 14(5): 700-717 Tsai MJ and O’Malley BW. “Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors” (1994) *EMBO J* vol.11: 1025-1033

49. Reppert SM and Weaver DR. “Coordination of circadian timing in mammals” (2002) *Nature* vol. 418: 935-941

50. Rosales T, Georget V, Malide D, Smirnov A, Xu J, Combs C, Knutson JR, Nicolas JC and Royer CA. “Quantitative detection of the ligand-dependant interaction between the androgen receptor and the co-activator, Tif2, in live cells using twocolor, two photon fluorescence cross-correlation spectroscopy” (2007) *European Biophysics Journal* vol. 36(2): 153-161

51. Rosny E, Groot A, Juliiian-Binard C, Gaillard J, Borel F, Pebay-Peyroula E, Fontecilla-Camps JC and Jouve HM. « *Drosophila* nuclear receptor E75 is a thiolate hemoprotein » (2006) vol. 45 : 9727-9734

52. Royer C.A and Beechem, J. M. Numerical Analysis of Binding Data : Advantage, Practical Aspects and implications, *Methods in Enzymology*, 210 : 481 (1992)

53. Savatier J, Jalaguier S, Ferguson ML, Cavaillès V and Royer C. “Estrogen receptor interactions and dynamics monitored in live cells by fluorescence cross-correlation spectroscopy” (2009) *Biochemistry* vol. 49: 772-781

54. Schwille P, Meyer-Almes FJ and Rigler R. « Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution » (1997) *Biophysical Journal* vol. 72 : 1878-1886

55. Schwille P and Heinze K. “Two-photon fluorescence cross-correlation spectroscopy” (2001) *ChemPhysChem* vol. 2(5): 269-272

56. Schwille P and Haustein E. “Fluorescence correlation spectroscopy: an introduction to its concepts and applications” (2006)

<https://www.biophysics.org/Portals/1/PDFs/Education/schwille.pdf>

57. Seol W, Mahon MJ, Lee YK and Moore DD. “Two receptor interacting domains in the nuclear hormone receptor corepressor RIP/N-Cor” (1996) *Molecular endocrinology* vol. 10: 1646-1655

58. Shaner N, Steinbach PA and Tsien RY. “A guide to choosing fluorescent proteins” (2005) *Nature Publishing Group* vol. 2(12): 905-909

59. Svoboda K. and Block S. M. “Biological applications of optical forces.” (1994) *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. Vol. 23: 247 (pages 27, 31 et 33)

60. Takacs M, Petoukhov MV, Atkinson RA, Roblin P, OGI FX, Demeler B, Potier N, Chebaro Y, Dejaegere A, Svergun DI, Moras D and Billas IM. “The asymmetric binding of PGC-1 α to the

ERR α and ERR γ nuclear receptor homodimers involves a similar recognition mechanism” (2013) PLOS one vol. 8(7)

61. Webb P, Anderson CM, Valentine C, Nguyen P, Marimuthu A, West BL, Baxter JD and Kushner PJ. “The nuclear receptor corepressor (N-Cor) contains three isoleucine motifs (I/LXXII) that serve as receptor interaction domains (IDs)” (2000) Molecular endocrinology vol.14(12): 1976-1985

62. Weidemann T and Schwill P. “Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy with continuous laser excitation in a confocal setup” (2013) Methods in Enzymology vol. 518(3): 43-70

63. Weinberg C, Thompson CC, Org ES, Lebo R, Gruol DJ and Evans RM. “The *c-erbA* gene encodes a thyroid hormone receptor” (1986) Nature vol. 324: 641-646 Yamamoto KR. “Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene network” (1985). Annual Review Genetic. 19, 209-252

64. Wen YD, Perissi V, Staszewski LM, Yang WM, Krones A, Glass CK, Rosenfeld MG and Seto E. “The histone deacetylase-3 complex contains nuclear receptor corepressors” (2000) PNAS vol. 97(13): 7202-7207

65. Woo EJ, Jeong DG, Lim MY, Jun Kim S, Kim KJ, Yoon SM, Park BC and Seong ER. “Structural insight into the constitutive repression function of the nuclear receptor RevErb β ” (2007) JMB vol. 373: 735-744

66. Wu B, Chen Y and Müller JD. “Fluorescence fluctuation spectroscopy of mCherry in living cells” (2009) Biophysical Journal vol. 96: 2391-2404

67. Xu HE, Stanley TB, Montana VG, Lambert MH, Shearer BG, Cobb JE, McKee DD, Galardi CM, Plunket KD, Nolte RT, Parks DJ, Moore JT, Kliewer SA, Willson TM and Stimmel JB. “Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPAR α ” (2002) Nature vol. 415: 813-817

68. Yang X, Downes M, Yu RT, Bookout AL, He W, Straume M, Mangelsdorf DJ and Evans M. “Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism” (2006) Cell vol.123: 801-810

69. Yin L and Lazar MA. “The orphan nuclear receptor Rev-erb α recruits the N-Cor/Histone deacetylase 3 corepressor to regulate the circadian *Bmal1* gene” (2005) Molecular endocrinology vol. 19(6): 1452-1459

70. Yin L, Wu N, Curtin JC, Qatanani M, Szewergold NR, Reid RA, Waitt DJP, Pearce KH, Wisely GB and Lazar MA. « Rev-erb α , a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways » (2007) Science vol. 318 : 1786-1789

71. Zamir I, Zhang J and Lazar MA. “Stoichiometric and steric principles governing repression by nuclear hormone receptors” (1997) Gene and Development vol. 11: 835-846

72. Zhao Q, Khorasanizadeh S, Miyoshi Y, Lazar M and Rastinejad F. "Structural elements of an orphan nuclear receptor-DNA complex" (1998) *Molecular cell* vol1: 849-861