



HAL
open science

Etude du récepteur nucléaire stéroïdien ERR en complexe avec ADN et ligands par une approche de biologie structurale intégrative

Karima Tazibt

► **To cite this version:**

Karima Tazibt. Etude du récepteur nucléaire stéroïdien ERR en complexe avec ADN et ligands par une approche de biologie structurale intégrative. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT : 2016STRAJ114 . tel-01726965

HAL Id: tel-01726965

<https://theses.hal.science/tel-01726965>

Submitted on 8 Mar 2018

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.

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

*Centre de Biologie Intégrative
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
CNRS UMR 7104 – INSERM U964*

Thèse présentée par :

Karima TAZIBT

Soutenue le **28 novembre 2016**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline : Sciences de la Vie

Spécialité : Biophysique et Biologie Structurale

**Étude du récepteur nucléaire stéroïdien ERR en
complexe avec ADN et ligands par une approche de
biologie structurale intégrative**

Rapporteurs :

**Dr. William BOURGUET
Pr. Vincent LAUDET**

Directeur de recherche, CBS, Montpellier
Professeur, OOB, UPMC, Université Paris 6, Banyuls-sur-Mer

Examineur :

Dr. Daniel METZGER

Directeur de recherche, IGBMC, Université de Strasbourg

Thèse dirigée par :

Dr. Bruno KLAHOLZ

Directeur de recherche, IGBMC, Université de Strasbourg

À mes parents

Remerciements

Tout d'abord, mes sincères remerciements s'adressent à Bruno. Merci de m'avoir accueillie et donné l'opportunité de réaliser mon doctorat au sein de ton équipe. Merci de m'avoir accordé ta confiance et de m'avoir permis de travailler dans ce riche cadre scientifique. Je ressors enrichie de cette belle expérience. Merci à toi.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury, Pr. Vincent Laudet, Dr. William Bourguet et Dr. Daniel Metzger. Merci d'avoir accepté de lire ce manuscrit et de juger mon travail.

Merci Isabelle d'avoir été là pendant ces années, pour ton aide et tout ce que tu m'as appris.

Kareem, thanks for everything! For your support every day, for your help, your advices and all the discussions we had. I learned a lot from you and working with you was a real pleasure. I wish you all the very best for the future and I wish that your efforts will be rewarded soon. Thank you!

Thanks Maria for teaching me almost everything when I just began my PhD.

Merci à tous les membres de l'équipe, actuels ou l'ayant quittée. Morgan, merci pour ton aide dans la relecture de ce manuscrit, Isabelle pour ta sympathique compagnie au labo. *Kundhavai, thanks for your help when I needed you and for providing chocolates and nice cookies ;-)* Heena for the nice tea times and discussions. *Sasha and your jocks ;-)* Rachel, pour ton aimable compagnie et ta bonne humeur, et Brice, pour ta gentillesse débordante.

Merci à celles et ceux de l'IGBMC qui ont contribué de près ou de loin à cet aboutissement.

Merci au service Baculovirus et en particulier à Nathalie pour m'avoir fourni tous ces litres de culture.

Merci à la plateforme de biologie et génomique structurales, Catherine, Florence, Pierre et Alastair pour leur disponibilité.

Merci au Dr. Sarah Cianferani et à Maxime Bourguet du LSMBO pour les expériences de spectrométrie de masse. Un grand merci à toi Maxime pour ton efficacité et ta rigueur.

Merci à Pierre Roblin pour son aide et sa patience au cours de ces nuits passées sur la ligne de lumière SWING du synchrotron SOLEIL.

Merci à mes collègues du département de Biologie Structurale Intégrative que j'ai eu plaisir à côtoyer, Damola, Nicolas, Benoît, Anna, Jason, Grigory, Mo'men, Nils, Carole, Arnaud et tous les autres.

Ces années ont été marquées par quelques belles rencontres. Petit clin d'œil aux premiers, et pas des moindres, rencontrés à nos débuts autour d'un verre, Raphaël, David et Jérôme. À tous mes acolytes de la SPB : Michel, Angélique, Justine, Iskander, Alexey, Daniya, Sandrine, Heena, Simone, Valerio, Mélanie et la liste est longue... Vous êtes géniaux ! Un grand merci à vous pour tous ces bons moments partagés (et il y en aura d'autres !), des réunions aux soirées, folles retraites, happy hours et j'en passe ! Merci à ceux qui sont partis vers de nouvelles aventures à Firas, Vladimir, Sergej, Nicolas, Claire et Benjamin.

Thanks to the tennis play'az Irina, Iskander, Mumin and Daniya for sundays spent on the courts ;-)
For the italian ones, sorry for all the cakes I did not bake ;-)

Un petit mot spécial pour les *best*, mes K'sauce adorés, Loïc et Stéphanie. On s'est connu trop tard mais on a su rattraper le temps. Merci à vous !

Je tiens enfin à remercier, ma famille qui a toujours été là. À mes frères et sœurs qui ont toujours su m'épauler. À mes parents, merci pour votre soutien sans limite et tout ce que vous avez fait pour moi. Rien de tout cela n'aurait été possible sans vous.

Table des matières

Résumé de thèse	18
Introduction	23
1. La superfamille des récepteurs nucléaires	24
1.1. Les hormones lipophiles	24
1.2. Du premier postulat à l'essor de la superfamille des récepteurs nucléaires	24
1.3. L'organisation modulaire des récepteurs nucléaires	25
1.4. Les mécanismes moléculaires de la transcription en bref	26
1.5. Classification des récepteurs nucléaires et introduction aux récepteurs orphelins	27
1.5.1. L'apparition dans le clade des Métazoaires	27
1.5.2. Les modes de liaison à l'ADN	29
1.5.2.1. Les récepteurs à activité ligand-dépendante	29
1.5.2.2. Les récepteurs orphelins	30
1.6. Introduction à la régulation endocrinienne par les hormones estrogènes	30
1.6.1. Les hormones estrogènes	30
1.6.2. Les ligands synthétiques d'ER et leurs effets sur son récepteur apparenté ERR	31
2. Le récepteur nucléaire orphelin ERR apparenté à ER	33
2.1. ERR existe sous trois isotypes α , β et γ	33
2.2. La répartition tissulaire des isotypes d'ERR	34
2.3. La régulation de l'activité transcriptionnelle d'ERR	35
2.3.1. Les protéines corégulatrices	35
2.3.1.1. Le coactivateur PGC-1 α	35
2.3.1.1.1. PGC-1 α régule les gènes du métabolisme énergétique	35
2.3.1.1.2. L'organisation structurale de PGC-1 α	35
2.3.1.2. Le corépresseur NCoR	36
2.3.2. Orchestration de l'activité d'ERR par PGC-1 α et NCoR	37
2.3.3. Les modifications post-traductionnelles	38

2.3.3.1. La sumoylation dépendante de la phosphorylation : un ralentissement de l'activité transcriptionnelle	38
2.3.3.2. L'acétylation d'ERR ralentit son activité transcriptionnelle	39
2.4. ERR α est un régulateur clef du métabolisme énergétique	39
2.4.1. Métabolisme du glucose	39
2.4.2. β -Oxydation des acides gras	40
2.4.3. Fonctions mitochondriales	40
2.4.4. Transcription d'autres récepteurs nucléaires	41
2.5. Les dérégulations d'ERR et les pathologies associées	41
2.5.1. La balance pathologique ERR α /ERR γ dans les cancers	41
2.5.2. Diabète de type II	43
2.6. Les mécanismes structuraux d'activation d'ERR	43
2.6.1. ERR est doté d'une activité transcriptionnelle constitutive	43
2.6.2. Les bases structurales de la régulation de l'activité d'ERR α par PGC-1 α	45
2.6.3. L'hélice H12 d'ERR α dicte la conformation agoniste ou antagoniste	47
2.7. L'interface protéo-nucléotidique ERR/ERRE	49
2.7.1. L'organisation du domaine DBD d'ERR	49
2.7.2. Les bases moléculaires de l'interaction ERR/ERRE	50
2.7.3. Seul le mode d'interaction du <i>core</i> DBD est conservé pour tous les types de HRE	53
2.7.3.1. Sur un demi-site 5'-AGGTCA-3' : comparaison avec l'homodimère stéroïdien ER	53
2.7.3.2. Sur un demi-site 5'-AGAACA-3' : comparaison avec l'homodimère oxo-stéroïdien MR	54
2.7.3.3. Sur un demi-site 5'-AGGTCA-3 en DR4 : l'hétérodimère TR β -RXR α	55
3. Modulation thérapeutique d'ERRα par des ligands synthétiques	56
3.1. La cible thérapeutique ERR α	56
3.2. Les bases moléculaires de l'antagonisme d'ERR α par des ligands antagonistes, les structures cristallographiques connues	57
3.2.1. Le composé 1a	57
3.2.2. Le composé 29	59
3.3. Les autres ligands antagonistes synthétiques	61

3.3.1. Le ligand synthétique agoniste inverse XCT-790, un modulateur pharmacologique spécifique d $4ERR\alpha$	61
3.3.2. Le composé A	62
3.3.3. SR16388	62
3.3.4. Le composé 14n	63
3.3.5. Structures chimiques des ligands antagonistes d' $ERR\alpha$	63
Objectifs de thèse	64
Matériels & Méthodes	68
1. Expressions et purification des trois protéines étudiées	69
1.1. LBD	69
1.2. DBD	69
1.3. $ERR\alpha$ entier	70
2. Caractérisations biochimiques et biophysiques	72
2.1. Analyse qualitative pour électrophorèse sur gel polyacrylamide (PAGE)	72
2.1.1. Conditions natives	72
2.1.2. Conditions dénaturantes	72
2.2. Fluorimétrie différentielle (<i>ThermoFluor</i>)	72
2.3. Diffusion dynamique de lumière ou <i>Dynamic Light Scattering</i> (DLS)	72
2.4. Thermophorèse à micro-échelle ou <i>MicroScale Thermophoresis</i> (MST)	73
2.5. Spectrométrie de masse ESI-TOF	73
2.6. Focalisation isoélectrique ou <i>IsoElectric Focusing</i> (IEF)	74
3. Méthodes de déterminations structurales	74
3.1. Cristallisation	74
3.1.1. Cristallisation du LBD en complexe avec les peptides et/ou le ligand agoniste inverse XCT-790	76
3.1.2. Cristallisation des complexes $ERR\alpha$ /ADN	77
3.1.2.1. Préparation des oligonucléotides	77
3.1.2.2. Cristallisation du DBD en complexes avec les oligonucléotides	77
3.1.2.3. Cristallisation du récepteur $ERR\alpha$ entier en complexe avec les oligonucléotides	77
3.2. Diffusion des rayons-X à petits angles ou <i>Small Angle X-ray Scattering</i> (SAXS)	77

Résultats & Conclusions	78
Partie I - Etude du complexe ERRα-LBD/ligand	79
1. Le domaine LBD est pur et stable pour son étude avec le ligand agoniste inverse XCT-790	80
2. Caractérisation de l'interaction XCT-790/ERRα-LBD	82
2.1. Étude préliminaire de l'interaction entre le LBD, le ligand XCT-790 et les peptides NCoR	82
2.2. Le LBD interagit avec haute affinité avec le XCT-790 et est stabilisé en sa présence	83
2.2.1. <i>Thermofluor Assay</i> : détermination d'un tampon approprié pour les expériences de MST	83
2.2.2. Détermination du K _d caractérisant les interactions entre le LBD et le XCT-790	84
3. Stoechiométrie de l'interaction LBD/XCT-790	87
4. Étude structurale du complexe LBD/XCT-790	89
4.1. Retour aux structures LBD/antagonistes connues et stratégie adoptée pour la cristallisation	89
4.2. Tests de cristallisation	91
4.2.1. Suivi parallèle par DLS	91
4.2.2. Complexes LBD/XCT-790/PF25 et LBD/XCT-790/PF26	92
4.2.3. Complexe LBD/PI251	94
4.2.4. Autre stratégie : <i>soaking</i> des cristaux du LBD en conformation <i>apo</i> en complexe avec le peptide PI251	95
Partie II - Étude de l'interface ERRα-DBD/ADN	99
1. Les protagonistes des complexes étudiés : le domaine isolé DBD et ses oligonucléotides	100
1.1. Le DBD est purifié en trois étapes de purification	100
1.2. Oligonucléotides utilisés pour la formation de complexes avec le DBD purifié	102
2. Étude structurale de complexes DBD/ADN	104
2.1. Caractérisations préalables de complexes DBD/ADN	104
2.1.1. Stabilité en fonction de la concentration saline	104
2.1.2. Étude de la stabilité du DBD par fluorimétrie différentielle (<i>Thermofluor</i>)	105
2.1.3. Complexes utilisés pour les tests de cristallisation	105
2.2. Tests de cristallisation	107
3. Le DBD est-il monomérique ou dimérique sur un ERRE ?	108
3.1. Migration sur gel en condition natives	108
3.2. Spectrométrie de masse ESI-TOF en conditions natives	111

3.3. Étude structurale en solution : diffusion de lumière à petits angles (SAXS)	114
Partie III - Étude du récepteur ERRα entier	116
1. Le récepteur entier ERR α pur est utilisé pour sa caractérisation en complexe avec ses oligonucléotides	117
2. Caractérisation de complexes ERR α /ERRE/peptide NCoR	120
2.1. ERR α est stabilisé en présence des peptides	120
2.2. La DLS confirme la stabilité des complexes	121
2.3. Interaction ERR α /ADN : exemple du promoteur du gène <i>tra</i> comparé au gène <i>rb1cc1</i>	122
3. Tests de cristallisation	125
4. Contexte biochimique de cristallisation des complexes ERR α /ADN : influence du pH	126
Discussion	128
Communications	134
Annexes	139
Bibliographie	145

Table des figures et tableaux

Figure I : Bases moléculaires de l'antagonisme d'ERR α par le composé 29_____	21
Figure 1 : Ligands naturels connus pour les récepteurs nucléaires_____	24
Figure 2 : Organisation générique d'un récepteur nucléaire avec ses différents domaines modulaires_____	26
Figure 3 : Mécanismes généraux de la régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires_____	26
Figure 4 : Phylogénie des récepteurs nucléaires_____	28
Figure 5 : Interaction des récepteurs nucléaires avec les éléments de réponse_____	29
Figure 6 : Séquences consensus des éléments de réponse reconnus par ERR et ER_____	30
Figure 7 : Les hormones estrogènes estradiol, estrol et estrone_____	31
Figure 8 : Suivi des activités d'ERR α , ERR β et ERR γ en fonction de concentrations croissantes de DES, 4-OHT et E2_____	32
Figure 9 : Pourcentages de conservation entre les isotypes d'ERR_____	33
Figure 10 : Niveau d'expression hiérarchique des isotypes d'ERR dans les différents tissus murins_____	34
Figure 11 : Organisation des domaines fonctionnels du coactivateur PGC-1 α _____	36
Figure 12 : Organisation des domaines fonctionnels du corépresseur NCoR_____	37
Figure 13 : Régulation du métabolisme oxydatif par NCoR et PGC-1 α _____	37
Figure 14 : Représentation des domaines modulaires d'ERR α et ERR γ humains et leurs sites de sumoylation_____	38
Figure 15 : Sites d'acétylation du DBD et de l'extension CTE d'ERR α _____	39
Figure 16 : ERR α régule une multitude de gènes dont les protéines sont impliquées dans les fonctions mitochondriales_____	40
Figure 17 : Structure cristallographique du LBD homodimérique d'ERR α _____	44
Figure 18 : Structure cristallographique du complexe ERR α /PGC-1 α (<i>PDB 1XB7</i>)_____	46
Figure 19 : Changement conformationnel de l'hélice H12 induit par la liaison d'un ligand agoniste sur le LBD de RXR_____	47
Figure 20 : Structure du LBD de RAR en complexe avec le corépresseur NCoR et le ligand agoniste inverse BMS493 (<i>PDB 3KMZ</i>)_____	48
Figure 21 : Superposition des structures du complexe PPAR γ /SRC-1 (PPAR γ en bleu et SRC-1 en rouge, <i>PDB 2P54</i>) avec le complexe PPAR α /SMRT (PPAR α en vert et SMRT en jaune, <i>PDB 1KKQ</i>)_____	49

Figure 22 : Alignement des séquences des DBD et des CTE des membres des familles d'ERR et ER	50
Figure 23 : Bases moléculaires de l'interaction entre ERR β et son élément de réponse ERRE	52
Figure 24 : Bases moléculaires de l'interaction entre ER α et son élément de réponse IR3	53
Figure 25 : Le <i>core</i> DBD d'ERR interagit avec le demi-site du grand sillon de la même manière que MR mais avec des déterminants structuraux différents	54
Figure 26 : Superposition du complexe ERR β /ERRE (<i>PDB 1LO1</i>) avec l'hétérodimère TR β /RXR α sur un DR4 (<i>PDB 2NLL</i>)	56
Figure 27 : Bases moléculaires de l'interaction du composé 1a dans la poche de liaison aux ligands du LBD d'ERR α (<i>PDB 2PJL</i>)	58
Figure 28 : Bases moléculaires de l'interaction du composé 29 dans la poche de liaison aux ligands du LBD d'ERR α (<i>PDB 3K6P</i>)	60
Figure 29 : Diagramme de phase	75
Figure 30 : Cristallisation en goutte assise	75
Figure 31 : Loi de Bragg	76
Figure 32 : Purification du domaine LBD par chromatographie d'affinité nickel puis par chromatographie d'exclusion stérique	81
Figure 33 : Suivi de la purification du domaine LBD sur gel dénaturant PAGE-12%	81
Figure 34 : Mesures de DLS réalisées sur le LBD purifié	82
Figure 35 : Structure chimique du XCT-790, ligand agoniste inverse ciblant spécifiquement ERR α	82
Figure 36 : Migration sur gel des complexes LBD/XCT-790/peptides en conditions natives	83
Figure 37 : Courbes de dénaturation du LBD et de complexes LBD/XCT-790 et LBD/XCT-790/PF25	85
Figure 38 : Détermination de la constante de dissociation K_d caractérisant l'interaction entre le LBD et le XCT-790	86
Figure 39 : Spectres de spectrométrie de masse pour le domaine LBD	88
Figure 40 : Spectres de spectrométrie de masse pour le complexe LBD/XCT-790	88
Figure 41 : Mesures de DLS réalisées sur les complexes LBD/XCT-790, LBD/XCT-790/PF25, LBD/XCT-790/PF26 et LBD/PI251	92
Figure 42 : Cristaux du complexes LBD/XCT-790/PF25 (haut) et le cliché de diffraction correspondant (bas)	93
Figure 43 : Cristal du supposé complexe LBD/PI251 obtenu dans les mêmes conditions publiées 0,1 M Bis-Tris pH 5,5, 0,2 M Mg(NO ₃) ₂ , 15% PEG 3350	94
Figure 44 : Cristaux du complexe LBD/PI251 obtenus dans les conditions de cristallisation A3 et A4	96
Figure 45 : Cliché de diffraction à 2,1 Å de résolution	97

Figure 46 : Structure obtenue du LBD en interaction avec le peptide PI251	98
Figure 47 : Contacts cristallins réalisés grâce au peptide PI251 de PGC-1 α	98
Figure 48 : Purification du domaine DBD par chromatographie d'affinité nickel, chromatographie d'affinité héparine et par chromatographie d'exclusion stérique	102
Figure 49 : Suivi de la purification du domaine DBD sur gel dénaturant PAGE-15%	102
Figure 50 : Exemple d'hybridation d'oligonucléotides	103
Figure 51 : Migration sur gel en conditions natives d'un complexe DBD/ADN en fonction d'un gradient de concentration de NaCl	104
Figure 52 : Courbes de dénaturation du DBD et du complexe DBD/21tra	105
Figure 53 : Migration sur gel PAGE-8% des complexes DBD/ADN en conditions natives	106
Figure 54 : Mesures de DLS réalisées sur les complexes DBD/21tra-TT, DBD/26tra-TT et DBD/29tra-AA	106
Figure 55 : Cliché de diffraction (bas) d'un cristal du supposé complexe DBD/29tra-AA (haut) à une résolution d'une dizaine d'Angströms	108
Figure 56 : Stœchiométrie de liaison du DBD sur l'oligonucléotide 21tra contenant un élément de réponse ERRE	109
Figure 57 : Stœchiométrie de liaison du DBD sur les oligonucléotides 13tra (ERRE) et 29tra-TT (ERRE)	110
Figure 58 : Stœchiométrie de liaison du DBD sur les oligonucléotides 21rb1cc1 (IR3) et 29tra-TT (ERRE)	110
Figure 59 : Stœchiométrie de liaison du DBD sur un oligonucléotide 29-ERRE/ERE	111
Figure 60 : Spectres de spectrométrie de masse pour le domaine DBD	112
Figure 61 : Spectres de spectrométrie de masse pour les complexes DBD/13tra, DBD/29tra et DBD/21rb1cc1 en conditions natives	113
Figure 62 : Expériences de diffusion de lumière à petits angles (SAXS) réalisées sur le domaine DBD	114
Figure 63 : Courbe expérimentale des intensités de diffusion du complexe DBD/27tff1 superposée aux courbes théoriques des intensités de diffusion pour un modèle monomérique (gauche) et un modèle dimérique (droite)	115
Figure 64 : Enveloppes moléculaires <i>ab initio</i> du complexe DBD/27tff1	115
Figure 65 : Purification d'ERR α par chromatographie d'affinité nickel, chromatographie d'affinité héparine et par chromatographie d'exclusion stérique	119
Figure 66 : Suivi de la pureté d'ERR α sur gel dénaturant PAGE-10%	119
Figure 67 : Mesures de DLS réalisées sur le récepteur entier	119

Figure 68 : Suivi de la stabilisation d'ERR α en fonction de la formation du complexe ternaire avec les oligonucléotides 21tra-TT, 26tra-TT et 29tra-AA et le peptide PF25 par migration sur gel PAGE-8% en conditions natives	120
Figure 69 : Mesures de DLS réalisées sur les complexes ERR α /21tra-TT/PF25, ERR α /26tra-TT/PF25 et ERR α /29tra-AA/PF25	121
Figure 70 : Détermination de la constante de dissociation K _d caractérisant l'interaction entre ERR α et l'oligonucléotide 33tra	123
Figure 71 : Détermination de la constante de dissociation K _d caractérisant l'interaction entre ERR α et l'oligonucléotide 33rb1cc1	124
Figure 72 : IEF d'ERR α et de ses complexes : le pI est de 5,5	127
Figure 73 : Migration sur gel en conditions natives des complexes avec ERR α à pH 4,4 et pH 10,3	127
Figure 74 : Alignement des séquences protéiques des ERR	141
Figure 75 : Plasmide pET24 utilisé pour le clonage du domaine LBD	142
Figure 76 : Plasmide pnEAtH utilisé pour le clonage du DBD	143
Figure 77 : Plasmide pDEST8 utilisé pour le clonage d'ERR α entier	144
Tableau 1 : Effets des ligands E2, DES, 4-OHT, bisphénol A et raloxifène sur les activités transcriptionnelles des différents isotypes d'ER et ERR	33
Tableau 2 : Niveau d'expression des isotypes d'ERR pour différents cancers	42
Tableau 3 : Structures chimiques des différents ligands antagonistes d'ERR α et leurs IC50	63
Tableau 4 : Séquences protéiques des constructions utilisées	71
Tableau 5 : Screen <i>Thermofluor</i> utilisé pour la détermination d'un tampon approprié des expériences de MST	84
Tableau 6 : Screen conçu sur la base des conditions de cristallisation des structures des complexes LBD/composé 29 (<i>PDB 3K6P</i>) et LBD/composé 1a (<i>PDB 2PJL</i>)	90
Tableau 7 : Screen conçu sur la base des conditions de cristallisation des structures des complexes LBD/PI251 (<i>PDB 3D24</i>) et LBD/composé 1a (<i>PDB 2PJL</i>)	91
Tableau 8 : Détail de la composition des solutions cryoprotectantes utilisées pour le traitement des cristaux de complexes LBD	93
Tableau 9 : Screen conçu sur la base des conditions de cristallisation des complexes LBD/PI251 et LBD/XCT-790/PF25	95
Tableau 10 : Statistiques de collecte des données de diffraction et d'affinement structural	97

Tableau 11 : Oligonucléotides utilisés pour l'études des complexes DBD/DNA_____	103
Tableau 12 : Exemple de cristaux du DBD en complexe avec les oligonucléotides 26tr α -TT et 29tr α -AA_____	107
Tableau 13 : Oligonucléotides 33tr α et 33rb1cc1 utilisés pour les expériences de MST_____	122
Tableau 14 : Cristaux obtenus lorsque les complexes ERR α /21tr α -TT/PF25, ERR α /26tr α -TT/PF25 et ERR α /29tr α -AA/PF25 ont été mis à cristalliser_____	125
Tableau 15 : Cristal obtenu pour le complexe ERR α /29tr α -AA/PF26_____	126
Tableau 16 : Masses moléculaires des molécules utilisées_____	140

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
CHAPS : 3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CTE : Carboxy-terminal extension
DBD : DNA-binding domain
DLS : Dynamic-light scattering
DMSO : Diméthyl sulfoxyde
EDTA : Ethylènediaminetetraacétique acid
ERR : Estrogène-related receptor
ERRE : Estrogène receptor related response element
ESI-TOF Electrospray ionization-Time of flight
FPLC : Fast pressure liquid chromatography
HRE : Hormone response element
HTS : High throughput Screening
IEF : Iso-électrique focusing
IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LBD : Ligand-binding domain
MST : Micro-scale thermophoresis
NCoR : Nuclear-recepteur corepressor
PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis
PEG : Polyéthylène glycol
PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α
pI : pH isoélectrique
SAXS : Small angle x-ray scattering
SDS : Sodium dodecyl sulfate
TCEP : Tris(2-carboxyéthyl)phosphine
TRIS : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

Acides aminés

Alanine, Ala, A

Arginine, Arg, R

Asparagine, Asn, N

Acide aspartique, Asp, D

Cystéine, Cys, C

Acide glutamique, Glu, E

Glutamine, Gln, Q

Glycine, Gly, G

Histidine, His, H

Isoleucine, Ile, I

Leucine, Leu, L

Lysine, Lys, K

Méthionine, Met, M

Phénylalanine, Phe, F

Proline, Pro, P

Sérine, Ser, S

Thréonine, Thr, T

Tryptophane, Trp, W

Tyrosine, Tyr, Y

Valine, Val, V

Acides nucléiques

Adénine, A

Cytosine, C

Guanine, G

Thymine, T

Uracile, U

Résumé de thèse

La superfamille des récepteurs nucléaires comprend des facteurs de transcription qui régulent l'expression d'un grand nombre de gènes importants pour la croissance des cellules eucaryotes, leur développement et leur homéostasie. Si l'activité de nombreux récepteurs nucléaires est induite par la fixation de ligands, la grande classe des récepteurs nucléaires orphelins ne présente pas de ligand naturel identifié à ce jour et fait l'objet de nombreuses études afin de comprendre leur mode de fonctionnement. L'un des plus connus est le récepteur homodimérique *Estrogen-Related Receptor* ou ERR. Ce dernier a été identifié en 1988 sur la base de la haute homologie de séquence de son domaine de liaison à l'ADN (DBD) avec celui du récepteur aux œstrogènes (ER). Le premier ERR identifié correspond à l'isotype α suivi quelques années plus tard des isotypes β et γ . Ces trois isotypes, retrouvés chez la souris et l'humain, sont exprimés de façon ubiquitaire mais à des niveaux plus élevés dans les tissus nécessitant une forte demande énergétique tels que le cœur, l'os, les reins ou le muscle squelettique. Ainsi, les ERR, jouant un rôle physiologique majeur dans le contrôle du métabolisme énergétique cellulaire, ont le potentiel de réguler un vaste panel de gènes métaboliques impliqués dans la glycolyse, le cycle des acides carboxyliques ou la chaîne de phosphorylations oxydatives. Le niveau d'expression des différentes isotypes d'ERR est corrélé à différents types de cancers. Par exemple, ERR α and ERR γ sont faiblement exprimés dans les tumeurs endométriales, colorectales ou prostatiques alors qu'à l'inverse, un niveau d'expression trop élevé d'ERR α est associé à de graves cancers agressifs du sein et des ovaires. Dans un contexte cancéreux, ERR α est surexprimé et est alors responsable d'un niveau de transcription de ses gènes cibles trop important. En effet, les ERRs régulent l'expression des gènes en se liant à des séquences spécifiques, appelées éléments de réponse, situées au niveau des régions promotrices des gènes cibles. Les ERRs se lient très spécifiquement à leur élément de réponse qui forme un demi-site étendu ou ERRE pour ERR *response element* présentant la séquence consensus TNAAGGTC A où AGGTC A est un demi-site précédé de l'extension TNA en 5' (N correspondant à un nucléotide C, A, T ou G selon les promoteurs).

À la différence de leur homologue ER α avec le 17 β -œstradiol, les ERR ne sont pas activés par les molécules estrogènes. Leur activité est alors qualifiée de constitutive car ils sont capables d'assurer la transcription de leurs gènes cibles sans avoir à fixer de ligand. Cependant, ils sont capables de fixer des petites molécules synthétiques comme ERR α avec le diéthylstilbestrol (DES) qui joue alors un rôle d'antagoniste. De plus, il a été montré qu'ERR α lie sélectivement l'agoniste inverse XCT-790 qui peut inhiber 90 à 100% de l'activité constitutive d'ERR α en bloquant ses interactions avec les protéines coactivatrices et induire, suite à la perturbation des voies métaboliques, la diminution de la prolifération cellulaire en bloquant le cycle cellulaire en transition G1/S. En outre, si les ERR peuvent agir en absence de ligands physiologiques, leur activité transcriptionnelle est finement régulée par le coactivateur *Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ coactivator 1 α* (PGC-1 α). Ce dernier est impliqué dans de multiples réponses biologiques liées à l'homéostasie énergétique, à la régulation thermique et au métabolisme du glucose expliquant pourquoi PGC-1 α est exprimé dans les tissus à haute demande énergétique. L'induction de la transcription des gènes par ERR est possible grâce à son interaction avec PGC-1 α . En fait, l'extrémité amino-terminale de PGC-1 α contient trois motifs LXXLL d'interaction aux récepteurs nucléaires hormonaux. Des expériences de mutagenèse ont montré que le troisième motif est le plus important pour les interactions avec ERR α . Ce motif adopte une structure secondaire en hélice et interagit dans le sillon hydrophobe d'interaction aux coactivateurs formé par les hélices H3, H4 et H12 du LBD également qualifié de domaine AF-2 pour *Activation Function-2* (faisant écho au domaine AF-1 situé à l'extrémité amino-terminale d'ERR et intervenant dans la régulation de ce dernier en subissant des modifications post-traductionnelles dont les effets régulateurs sont encore mal connus). Un autre corégulateur de l'activité transcriptionnelle d'ERR est NCoR (*Nuclear receptor CoRepressor*). En liant NCoR, ERR voit son activité diminuée jusqu'à son niveau basal. Cette protéine possède au niveau de son extrémité carboxy-terminale un domaine d'interaction aux récepteurs nucléaires comportant trois motifs

hydrophobes conservés de séquence type I/LXXII. Des peptides provenant de NCoR ont été utilisés pour l'étude structurale de l'inhibition d'ERR de mon projet.

Dans un contexte cancéreux, la dérégulation de l'homéostasie énergétique est souvent due à un dysfonctionnement de l'expression de PGC-1 α et/ou d'ERR α . La surexpression d'ERR α est synonyme d'un très mauvais pronostic pour les cancers du sein et des ovaires, soulignant l'importante implication d'ERR α dans la prolifération cellulaire. En conséquence, la modulation de l'activité d'ERR α en utilisant des ligands, comme des petites molécules thérapeutiques, est une façon de bloquer la croissance des tumeurs. ERR α représente donc une cible thérapeutique pertinente et des ligands pharmacologiques sont étudiés afin de bloquer les interactions entre ERR α et son coactivateur PGC-1 α . À l'échelle atomique, la compréhension des interactions stabilisant les complexes ERR α /coactivateur et ERR α /ligand apportent des informations cruciales pour des études de *drug design* permettant le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. De plus, ERR α étant surexprimé et donc responsable d'un niveau de transcription de ses gènes cibles trop important, il est judicieux de cibler également l'interface protéine/ADN. La singularité du récepteur ERR se traduit également par son style d'interaction avec l'ADN : si ERR est connu comme étant homodimérique, en raison des fortes interactions entre les LBD, et si la présence d'un unique demi-site étendu suggère la liaison d'un seul DBD, la problématique est alors de comprendre le comportement du second DBD. Cette spécificité d'interaction aiderait à cibler précisément ERR et son interface avec l'ADN.

ERR est organisé en différents domaines modulaires qui jouent chacun un rôle crucial pour le bon fonctionnement de l'ensemble du récepteur. Ce projet est divisé en trois sections principales à l'image des différents événements qui régissent l'activité d'ERR : la modulation de l'activité d'ERR par des ligands antagonistes, le mode d'interaction d'ERR avec ses séquences consensus spécifiques au niveau des promoteurs géniques et enfin une vue d'ensemble sur le récepteur entier pour comprendre l'implication des différents domaines modulaires. Pour mener à bien mon projet de thèse au Centre de Biologie Intégrative de l'IGBMC, une multitude de techniques biophysiques disponibles sur la plateforme de biologie et de génomique structurales nous permettent de décrire avec précision les interactions entre partenaires protéiques ou protéo-nucléotidiques. Ces études peuvent être complétées par la cristallographie aux rayons-X, un outil de détermination structurale à haute résolution. Le travail que j'ai mené au cours de ma thèse a permis de comprendre les comportements biochimiques des domaines isolés LBD et DBD, informations essentielles à la mise en place des expériences de caractérisation biophysique et de cristallisation.

La poche de liaison de ligands d'ERR α située sur le LBD possède en position 328 une phénylalanine (hélice 3) alors que chez ERR β , ERR γ et les ERs ce résidu correspond à une alanine. L'encombrement de cette poche hydrophobe, d'un volume de seulement 100Å³, expliquerait le caractère constitutif d'ERR α . De ce fait, la fixation d'un ligand antagoniste dans la poche induirait un réarrangement conformationnel conséquent de la phénylalanine 328 impliquant le déplacement important de la phénylalanine 510 située sur l'hélice 12. Cette dernière ayant un comportement spatial très dynamique, peut adopter une conformation agoniste ou antagoniste. Dans le cas de la fixation d'un ligand antagoniste induisant le réarrangement des phénylalanines, l'hélice 12 se positionne en conformation antagoniste dans le sillon d'interaction aux coactivateurs en réalisant des interactions hydrophobes empêchant la liaison de coactivateurs (*PDB 3K6P*). Les mêmes interactions sont observées lorsqu'un peptide activateur est lié au LBD dans sa forme *apo* stabilisant l'hélice H12 en interagissant avec cette dernière (*PDB 3D24*). Afin d'apporter plus de connaissances sur les mécanismes d'inhibition antagoniste d'ERR α , l'un de mes objectifs a été de découvrir les bases moléculaires régissant les interactions entre le LBD et son ligand. Pour cela, j'ai d'abord mis en place un protocole de purification du domaine LBD afin d'obtenir ce domaine isolé dans un état le plus stable possible et en quantité adéquate pour une étude biophysique et structurale. J'ai également optimisé la formation des complexes entre le LBD et le ligand agoniste inverse XCT-790 en présence de peptides

corépresseurs issus de NCoR afin de stabiliser l'hélice H12 dans sa conformation antagoniste. Ceci est important pour l'étape de cristallisation où les échantillons protéiques doivent être les plus homogènes et stables possibles afin de favoriser le processus de cristallisation. Des cristaux de tels complexes ont été obtenus peu de temps après le commencement de ce projet. Ils ont diffracté jusqu'à 3.5 Å de résolution mais étant donné le caractère maclé de ces cristaux et la présence de plusieurs réseaux, les données de diffraction n'ont pas pu être traitées dès même l'étape d'indexation. N'ayant pas pu reproduire ces cristaux, j'ai utilisé la stratégie de *soaking* en reproduisant les cristaux de la structure *PDB 3D24* constitués du complexe entre le LBD d'ERR α et un peptide coactivateur issu de PGC-1 α et en ajoutant le ligand XCT-790 à la goutte de cristallisation. Ces cristaux ont diffracté jusqu'à 2.1 Å mais, après résolution, la structure ne montrait malheureusement pas la présence de XCT-790 mais uniquement du LBD en interaction avec le peptide. Néanmoins, les diverses caractérisations biophysiques que j'ai effectuées confirment l'interaction de ce ligand avec ERR α . La détermination de la constante de dissociation K_d en utilisant la technique de *MicroScale Thermophoresis* souligne une forte interaction avec un K_d d'une valeur de 52 nM. La formation de ce complexe a également été confirmée par spectrométrie de masse en conditions natives en collaboration avec l'équipe du Dr. Sarah CIANFERANI du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique (LSMBO).

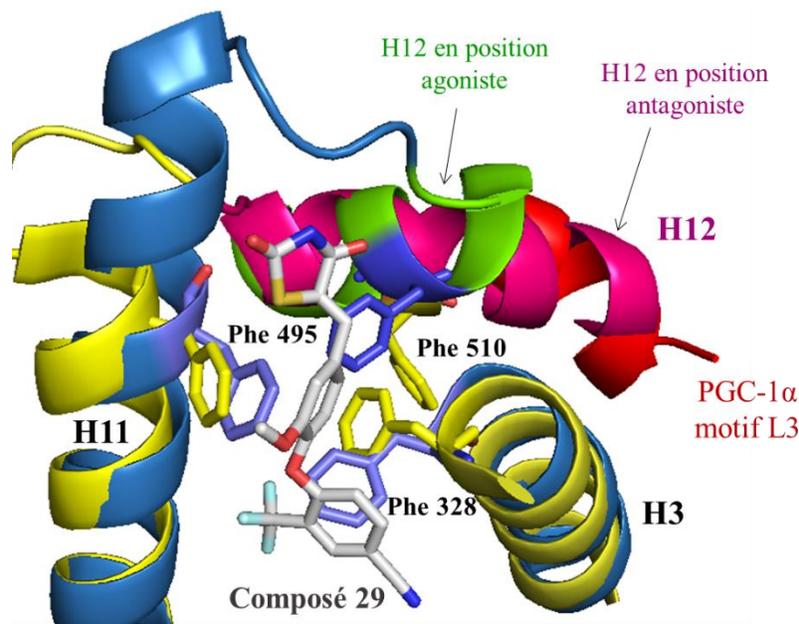


Figure I : Bases moléculaires de l'antagonisme d'ERR α par le composé 29

Superposition des structures du complexe LBD/composé 29 (bleu, *PDB 3K6P*) et du LBD *apo* en interaction avec le coactivateur PGC-1 α (LBD en bleu et PGC-1 α en rouge, *PDB 1XB7*). En présence du ligand antagoniste, l'hélice H12 se positionne à la place du motif L3 de PGC-1 α et empêche ainsi la liaison de coactivateurs.

La focalisation sur l'interface ERR/ADN permet de constater le caractère atypique des ERR. Bien qu'homodimérique, ERR se lie spécifiquement au demi-site étendu ERRE via l'un de ses DBD mais la question majeure qui reste jusqu'aujourd'hui sans réponse est celle de comprendre comment se positionne le second DBD sur les promoteurs. La seule structure de DBD d'ERR connue à ce jour est une structure RMN en solution (*PDB 1LO1*) de l'isotype β lié à un ERRE montrant que le *core*, formé des deux motifs en doigt de zinc, interagit avec le grand sillon de l'ADN et, pour stabiliser d'avantage le DBD sur sa séquence cible, d'autres interactions sont établies en 5' entre l'extension carboxy-terminale du DBD et le petit sillon où se trouvent les trois bases $5'$ -TNA- $3'$ caractérisant les ERRE. Cependant, l'ADN utilisé dans

cette structure ne possède que 13 paires de bases ne permettant pas, spatialement, la liaison du potentiel second DBD du côté 3'. Ainsi, sur cette base et afin de répondre à la problématique de la stœchiométrie des DBD sur leur ADN cible, je me suis également intéressée à l'étude des interactions du DBD de l'isotype α avec des ADN plus longs en essayant de déterminer la structure par cristallographie aux rayons-X. J'ai tout d'abord établi de zéro un protocole de purification permettant une haute pureté et stabilité du DBD en le vérifiant systématiquement biochimiquement et biophysiquement. J'ai optimisé la formation des complexes avec différents ADN et vérifié leur intégrité notamment par migration sur gel en condition native et par diffusion de lumière. Les tests de cristallisation m'ont permis d'obtenir des cristaux diffractant au mieux jusqu'à 7 Å de résolution mais cette faible résolution de diffraction n'a jamais permis d'exploiter les données de diffraction afin de résoudre la structure. Afin de néanmoins répondre à la question de la stœchiométrie des DBD sur l'ADN, l'étude en solution par *Small Angle X-ray Scattering* ou SAXS suggère la présence d'un monomère de DBD sur un oligonucléotide (suffisamment long pour accueillir un dimère) comportant l'ERRE. En complément, des expériences de spectrométrie de masse en conditions natives, également menées par l'équipe du Dr. Sarah CIANFERANI, ont permis de montrer que le DBD se comporte en tant que monomère quelle que soit la longueur des oligonucléotides comportant l'ERRE.

La compréhension du comportement des domaines isolés LBD et DBD m'a permis d'aborder l'étude du récepteur en entier, projet ambitieux étant donné la complexité de fonctionnement du récepteur que ce soit au niveau de son interaction avec l'ADN qu'avec sa liaison à des ligands. De plus, la présence dans ce cas du domaine amino-terminal AF-1 très dynamique rend cette partie du projet extrêmement complexe pour son étude biophysique et structurale. Pour s'inscrire dans la stratégie d'inhibition de l'activité d'ERR α , cette partie du projet consistait en la cristallisation du récepteur entier dans sa conformation antagoniste en interaction avec le ligand XCT-790, les peptides corepresseurs issus de NCoR (afin de stabiliser l'hélice 12) en complexe avec des promoteurs naturels comportant un ERRE. Une fois le protocole de purification d'ERR α mis en place afin d'obtenir un rendement protéique convenable et de bonne qualité, j'ai pu optimiser la formation des complexes où j'ai montré l'importance de la présence de peptide afin d'obtenir une conformation stable de ce grand complexe. J'ai mené de nombreux tests de cristallisation qui ont abouti à l'apparition de cristaux qui se sont malheureusement avérés être des cristaux de sel d'après les clichés de diffraction enregistrés au synchrotron *Swiss Light Source* (SLS). Cependant, ceci m'a permis par la suite de comprendre le contexte physico-chimique nécessaire à la cristallisation de ce grand complexe afin de mieux l'aborder à l'avenir.

Pour conclure, mon projet a permis de mener à bien l'étude fonctionnelle d'ERR par une approche isolée de ses domaines modulaires. Ainsi, j'ai pu caractériser biophysiquement les interactions entre le LBD et le ligand agoniste inverse XCT-790 et tester la cristallisation de ce complexe. Concernant l'interface ERR/ADN j'ai mis en évidence le caractère monomérique du DBD isolé sur un ERRE. L'ensemble de ces résultats font actuellement l'objet de la préparation d'une publication. À l'avenir, d'autres ligands pourront être considérés tels que le ligand antagoniste SR16388. Comme pour XCT-790, SR16388 est connu pour se fixer à ERR α et inhiber les interactions ERR α /PGC-1 α . Cependant à l'inverse de XCT-790, il possède une structure de type stéroïdienne plus proche des hormones naturelles et pouvant potentiellement être plus appropriée pour comprendre les bases moléculaires d'inhibition d'ERR α par un ligand. SR16388 pourra également être utilisé pour étudier son effet sur le récepteur entier ainsi que son effet sur l'interaction avec l'ADN en réalisant des tests de cristallisation sur la base des connaissances déjà acquises. De plus, une étude dernièrement publiée dans *Cell* démontre que le cholestérol serait un ligand activateur naturel d'ERR α (Wei *et al.*, 2016). Cette molécule pourrait également être étudiée avec le domaine isolé LBD et avec le récepteur entier pour comprendre son effet sur la fixation du second DBD qui aurait hypothétiquement tendance à se lier aux promoteurs et à induire la mécanique d'activation transcriptionnelle.

Introduction

1. La superfamille des récepteurs nucléaires

1.1. Les hormones lipophiles

Au début du vingtième siècle, des petites molécules ont été isolées sur la base de leur capacité à influencer divers événements physiologiques et certaines ont très tôt été associées à des maladies humaines. Ces petites molécules biologiquement actives, appelées hormones lipophiles, sont capables de diffuser à travers les membranes cellulaires pour passer de glandes ou de tissus endocriniens où elles sont synthétisées à leurs tissus cibles où elles agissent (figure 1). Leur classification s'organise en quatre groupes distincts : les hormones stéroïdiennes, les hormones rétinoides, les hormones thyroïdiennes et la vitamine D.

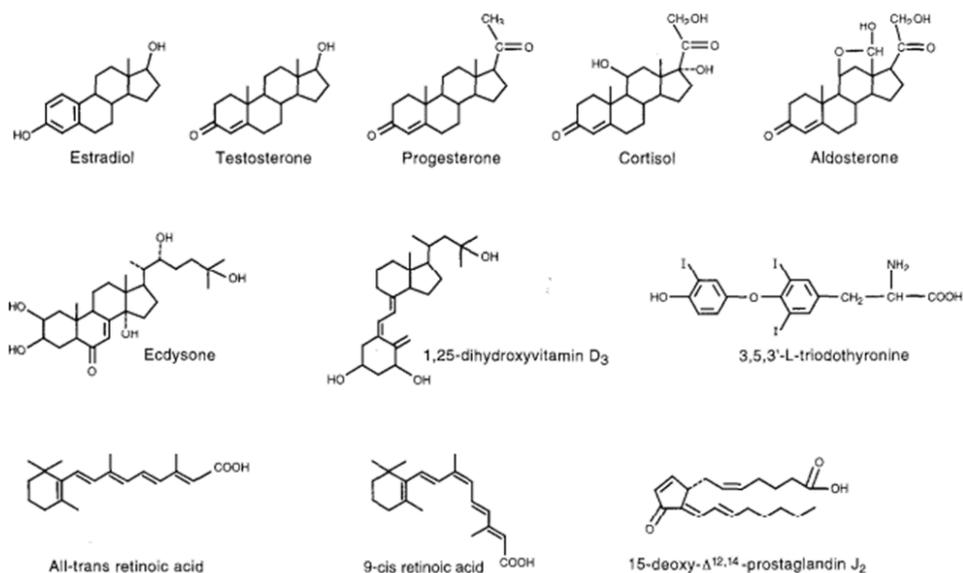


Figure 1 : Ligands naturels connus pour les récepteurs nucléaires

1.2. Du premier postulat à l'essor de la superfamille des récepteurs nucléaires

Dans les années 1960 et 1970, des études notamment sur les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes ont souligné leur effet stimulateur sur la croissance, la différenciation et le métabolisme de tissus cellulaires par des mécanismes inconnus. Sous l'influence des hormones, la stimulation de la synthèse d'ARN messagers avait été observée permettant, *in fine*, d'émettre l'idée d'une régulation de la synthèse protéique lors de l'étape de transcription génique. À la fin des années 1950, Elwood Jensen synthétisa et retraça la distribution du [³H]-estradiol particulièrement abondant dans les tissus utérins où son assimilation lui permis de penser à l'existence d'un composant liant les estrogènes qu'il nomma estrophiline et qui sera plus tard connu sous le nom du récepteur aux estrogènes ER (O'Malley, 2013). La question du mode d'action des hormones sur les réponses physiologiques prend son essor et l'hypothèse de médiateurs d'action des hormones est alors émise. En 1971, O'Malley formula le premier postulat sur le rôle régulateur des hormones stéroïdiennes. Selon ce dernier, après son entrée dans la cellule cible, l'hormone stéroïdienne se lierait à un récepteur cytoplasmique formant ainsi un complexe qui serait transporté jusqu'à l'intérieur du noyau pour agir sur la transcription génétique (O'Malley, 1971). Cette observation a été confirmée quelques années plus tard par Yamamoto qui démontre que la liaison du ligand estrogène 17 β -estradiol à son effecteur induit la translocation de ce dernier dans le noyau cellulaire et sa liaison à des régions génomiques de haute

affinité (Yamamoto *et al.*, 1975). Cependant, à cette époque, des études plus poussées pour comprendre la reconnaissance spécifique des ligands, les modes d'interactions avec le génome et donc les mécanismes de contrôle de la transcription des gènes n'étaient pas réalisables du fait des limites techniques de biochimie. Plus tard, dans les années 1980, des investigations sur les mécanismes d'action des hormones ont mené à la caractérisation biochimique, moléculaire et génétique de ces médiateurs hormonaux. Le premier d'entre eux à être identifié est le récepteur aux glucocorticoïdes suivi par le récepteur aux estrogènes. Le clonage du récepteur aux glucocorticoïdes par Evans apporta les premières connaissances sur l'organisation en domaines des récepteurs stéroïdiens (Evans, 1988). Pierre Chambon isola ensuite l'ADN complémentaire (ADNc) du gène humain de l'isotype α d'ER à partir d'une banque d'ADNc issue de cellules MCF-7 en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre ER et développés dans le laboratoire de Jensen. Chambon mena à bien la cartographie et la caractérisation des domaines fonctionnels d'ER, en l'occurrence les domaines de liaison à l'ADN et aux ligands ainsi que les régions impliquées dans les mécanismes d'activation transcriptionnelle. Ces données seront complétées en 1996, au sein du laboratoire de Gustafsson, par la découverte de l'isotype β d'ER à partir d'une banque d'ADNc issue de la prostate du rat (Kuiper *et al.*, 1996). Les décennies suivantes, marquées par la multiplication de telles découvertes, ont permis l'émergence de la superfamille des récepteurs nucléaires (RN).

1.3. L'organisation modulaire des récepteurs nucléaires

L'ensemble des RN présentent une organisation modulaire où chacun des domaines est fonctionnellement autonome (figure 2). La contribution de leurs activités respectives permet d'assurer l'activité de régulation transcriptionnelle. De l'extrémité amino-terminale à l'extrémité carboxy-terminale :

- le domaine A/B contient une fonction d'activation AF-1 (*Activation-Function 1*). Ce domaine très dynamique est le moins conservé parmi les RN en termes de longueur et de séquence. Son rôle régulateur est ligand indépendant et il est finement régulé par des modifications post-traductionnelles lui dictant le type de régulation à opérer (Wärnmark *et al.*, 2003).
- le domaine de liaison à l'ADN, DBD (*DNA-Binding Domain*) ou domaine C, hautement conservé entre RN, permet la liaison de ces derniers à leurs éléments de réponse hormonaux HRE (*Hormone-Response Element*) situés au niveau des promoteurs des gènes. La région centrale du DBD est composée d'une soixantaine d'acides aminés permettant des interactions protéo-nucléotidiques hautement spécifiques grâce à la présence de deux motifs en doigts de zinc C_4 (Freedman *et al.*, 1988). Pour beaucoup de RN, une extension d'une vingtaine de résidus du côté carboxyterminal, appelée CTE, sans structure déterminée, permet un meilleur ancrage sur le HRE. Cette partie CTE se trouve au début du domaine charnière (*hinge*) qui fait le lien avec le LBD. Le *hinge* joue un rôle important dans l'orientation structurale des DBD sur leurs éléments de réponse par rapport aux LBD.
- le domaine de liaison du ligand, LBD (*Ligand Binding Domain*) ou domaine E contient la fonction d'activation ligand-dépendante AF-2 (*Activation-Function 2*) et la poche de liaison aux ligands régulateurs. Le LBD est la pierre angulaire du complexe de transcription permettant le recrutement de corégulateurs protéiques qui initient des changements conformationnels permettant l'activation ou la répression de gènes cibles. Ce domaine est modérément conservé entre les récepteurs nucléaires reflétant la multiplicité de ligands existant pour les divers RN. Il est structuralement organisé en sandwich $\alpha\beta\alpha$ composé de douze hélices α antiparallèles et d'un feuillet β (s1-s2) (Huang *et al.*, 2010).
- le domaine F n'est présent que chez certains membres de la famille des RN et est localisé à l'extrémité carboxy-terminale. Il est variable en termes de taille et de séquence comme pour les isotypes α et β d'ER de

tailles respectives de 42 et 30 résidus avec moins de 25% d'identité de séquence. Bien que les effets du domaine F sur la transcription restent complexes, quelques études montrent que ce dernier interagit avec des corégulateurs protéiques tels que SRC-1 ou RIP-140. De plus, comme le montre sa structure cristallographique, le domaine F participe à l'homodimérisation des LBD de ER α (Skafar *et al.*, 2008).



Figure 2 : Organisation générique d'un récepteur nucléaire avec ses différents domaines modulaires

1.4. Les mécanismes moléculaires de la transcription en bref

Les RN, également appelés facteurs de transcription, agissent à travers leur association avec les séquences spécifiques de l'ADN appelés éléments de réponse hormonaux qui peuvent être trouvées au niveau des promoteurs, des *enhancers* ou des *silencers* géniques. Les RN exercent leur rôle de régulateur de la transcription à travers leur association avec l'ARN polymérase II qui réalise la transcription de l'ADN en ARN pré-messager, qui subira une série de maturations post-transcriptionnelles avant d'être enfin traduit en protéine. Cette régulation est médiée par des interactions spécifiques de complexes protéiques avec les RN. Ces protéines sont coactivatrices ou corepressives selon l'événement transcriptionnel à réguler. En général, pour les transcriptions ligand-dépendantes, les RN, n'ayant pas de ligand lié, recrutent ces complexes protéiques de corepression comme le complexe NCoR/SMRT qui possède une activité de désacétylation des histones grâce à SMRT et peut ainsi contribuer au maintien de la conformation compacte de la chromatine où les facteurs activateurs de la transcription n'ont pas accès. La liaison d'un ligand activateur par les RN induit la dissociation de ces complexes de répression et l'association de protéines coactivatrices. Ces dernières incluent notamment le complexe SWI/SNF qui possède une activité ATP-dépendante de remodelage de la chromatine et travaille de concert avec le grand complexe CBP/p300 et

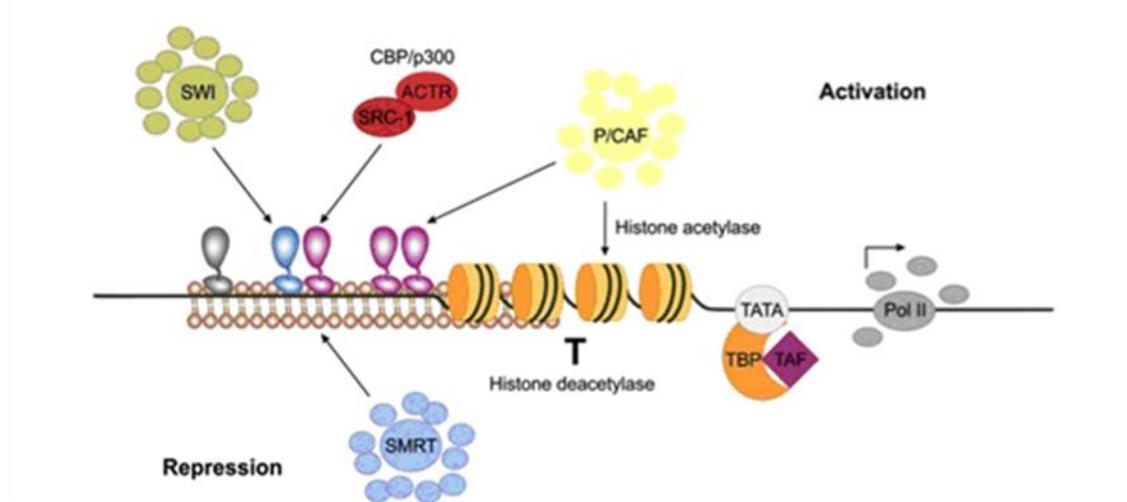


Figure 3 : Mécanismes généraux de la régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires

Le récepteur nucléaire sur son HRE est lié aux corepresseurs et aux HDAC qui contribuent au maintien de l'état compact de la chromatine permettant la répression de la transcription. Lors de l'activation, les complexes coactivateurs sont recrutés ainsi que les HAT induisent la décondensation locale de la chromatine pour l'assemblage et la stabilisation du complexe de pré-initiation constitué des facteurs généraux de transcription et de l'ARN polymérase II.

Introduction into molecular medicine, Nagy 2011

pCAF qui apportent leurs activités intrinsèques d'acétylation des histones. La chromatine est alors localement décondensée et expose les régions d'assemblage du complexe multiprotéique de préinitiation composé des différents facteurs généraux de transcription et de l'ARN polymérase II (figure 3) (Renaud *et al.*, 2000).

1.5. Classification des récepteurs nucléaires et introduction aux récepteurs orphelins

1.5.1. L'apparition dans le clade des Métazoaires

La classification phylogénétique des RN est construite sur la base de la diversité de fonctionnement des LBD. La fonction transcriptionnelle des LBD peut être ligand-dépendante car elle est activée par la liaison spécifique d'un ligand dans la poche hydrophobe du LBD stabilisant ce dernier pour le recrutement de protéines coactivatrices afin d'induire la transcription de gènes cibles. Son activation peut être ligand-indépendante chez les RN qualifiés de récepteurs constitutivement actifs car leurs LBD sont capables d'adopter une conformation active et assurer la transcription génique en absence de ligand (Bridgham *et al.*, 2010).

Si la plupart des RN sont activés par des hormones qui leur sont spécifiques, d'autres ne possèdent pas de ligand naturel. En effet, un certain nombre d'entre eux comme le récepteur apparenté à ER, ERR (*Estrogen-Related Receptor*), sont dits orphelins et, bien qu'assurant pleinement leurs rôles de facteurs de transcription, ils ne possèdent pas de ligand naturel connu à ce jour. Des hypothèses ont été proposées pour expliquer les origines des RN classiques, liant leurs ligands naturels, et les RN orphelins. Une première idée indiquerait que les récepteurs orphelins liaient initialement des ligands et leur diversification à travers la duplication génique au cours de l'évolution leur a fait perdre cette capacité à lier des ligands. La théorie alternative, plus sérieusement considérée, suggérerait que la liaison d'un ligand a été acquise au cours de l'évolution des RN. Par conséquent, le récepteur ancestral serait orphelin et l'ensemble des récepteurs liant un ligand auraient gagné cette capacité durant l'évolution (Escriva *et al.*, 2000 ; Laudet & Gronemeyer, 2002).

Cette seconde hypothèse impliquerait que de nombreuses synapomorphies enrichissant les mécanismes moléculaires de la régulation allostérique de la transcription par la liaison d'un ligand soient apparus *de novo* au cours de l'évolution pour apporter complexité et innovation. Les RN apparaissent ainsi dans la branche des Métazoaires et sont absents du génome des champignons, des plantes, des choanoflagellés et des procaryotes. Un ancêtre commun situé à l'embranchement des Métazoaires serait initiateur de l'expansion des RN par duplications géniques et quelques pertes survenues par la suite (Bridgham *et al.*, 2010). Les RN stéroïdiens sont retrouvés à partir de l'embranchement des vertébrés quoique le RN orphelin ERR serait apparu plus tôt dans l'évolution puisqu'il est présent chez les placozoaires (figure 4) mais également dans le génome de *Drosophila melanogaster* (Thornton *et al.*, 2000). Ainsi, un nombre important de RN ont été identifiés dans les génomes des vertébrés et sont présents au nombre de 48 chez l'Homme (*Homo sapiens*), 47 chez le rat (*Rattus norvegicus*) et 49 chez la souris (*Mus musculus*) (Zhao *et al.*, 2015).

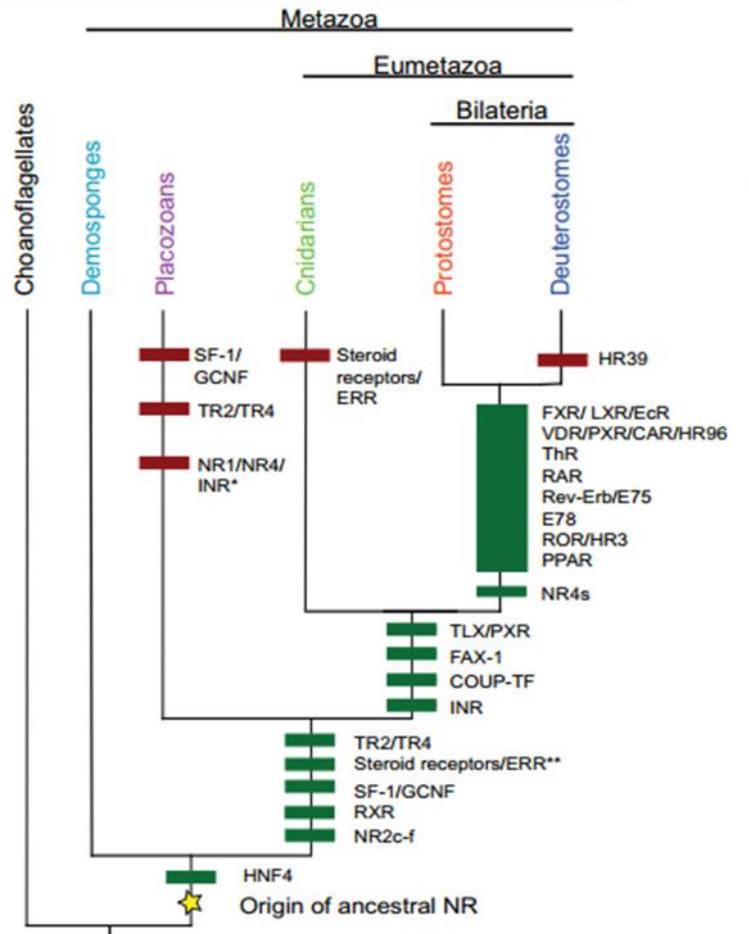


Figure 4 : Phylogénie des récepteurs nucléaires

L'ancêtre commun des RN (étoile) serait apparu à l'embranchement des Métazoaires où des événements de duplications géniques (vert) et de pertes (rouge) régissent les diversifications des RNs. HNF-4 = Hepatic-Nuclear factor 4, NR2c-f = Nuclear Receptor subfamily 2, RXR = Retinoid X Receptor, SF-1 = Steroidogenic Factor 1, GCNF = Germ Cell Nuclear Factor, ERR = Estrogen-Related Receptor, TR = Testicular Receptor, INR = Invertebrate-specific Nuclear Receptor, COUP-TF = Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor, FAX-1 = Fasciculation of axons protein, TLX = tailless proteins, NR4 = Nuclear Receptor 4, PPAR = Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, ROR = Retinoid-Orphan Receptor, Rev-Erb = Reverse Erb-receptor, RAR = Retinoic-Acid Receptor, ThR = Thyroid-hormone Receptor, VDR = Vitamin D Receptor, PXR = Pregnane X Receptor, CAR = Constitutive Androstane Receptor

1.5.2. Les modes de liaison à l'ADN

1.5.2.1. Les récepteurs à activité ligand-dépendante

De manière générale, il existe une corrélation entre la liaison aux éléments de réponse et le mode de dimérisation des RN qui se positionnent sur les HRE en adoptant diverses géométries selon le type d'élément de réponse. Au niveau des promoteurs, ces derniers présentent des séquences consensus spécifiques que reconnaissent les RN grâce à la liaison via leur DBD. Elles se décrivent le plus souvent par la présence de deux demi-sites de six paires de bases orientés soit en tête-à-queue ou *direct repeat* (DR) soit en tête-à-tête de manière palindromique ou *inverted repeat* (IR). Les sites hexamériques sont séparés entre eux par un nombre de paires de bases variables, le plus souvent entre 0 et 5. L'unicité d'un HRE se définit par quatre critères : la séquence nucléotidique de ses demi-sites, leur orientation, la séquence et la longueur qui les séparent.

L'hétérodimérisation des RN avec le partenaire RXR suit une polarisation variable des DBD sur l'ADN car RXR peut occuper l'un ou l'autre des demi-sites $5'$ -AGGTCA $^{-3'}$ des éléments de réponse en DR. En effet, associé à RAR, RXR occupe l'hexamère en $5'$ sur les DR2 et DR5 alors que cette polarité est inversée sur un DR1 (Rastinejad *et al.*, 2000). Il occupe également l'hexamère en $5'$ lorsqu'il est associé à VDR sur un DR3, et à TR et LXR sur un DR4 (Orlov *et al.*, 2012 ; Lou *et al.*, 2014 ; Rastinejad *et al.*, 1995). Les partenaires de RXR sont divisés en deux groupes. Les hétérodimères avec PPAR, LXR et FXR dits permissifs sont activés par la liaison d'un ligand agoniste ciblant RXR et inversement pour les hétérodimères avec RAR, TR, et VDR dits non-permissifs où un ligand agoniste cible le partenaire de RXR. Les RN se liant à l'ADN sous forme homodimérique tels que les récepteurs stéroïdiens aux progestérones (PR), aux androgènes (AR), aux glucocorticoïdes (GR) et aux minéralocorticoïdes (MR) reconnaissent les deux demi-sites consensus $5'$ -AGAACA $^{-3'}$ ou dans le cas de ER $5'$ -AGGTCA $^{-3'}$ arrangés en *inverted repeat* palindromiques et séparés par trois paires de bases (IR3) (figure 5) (Roemer *et al.*, 2006 ; Helsen *et al.*, 2012 ; Hudson *et al.*, 2014 ; Schwabe *et al.*, 1993).

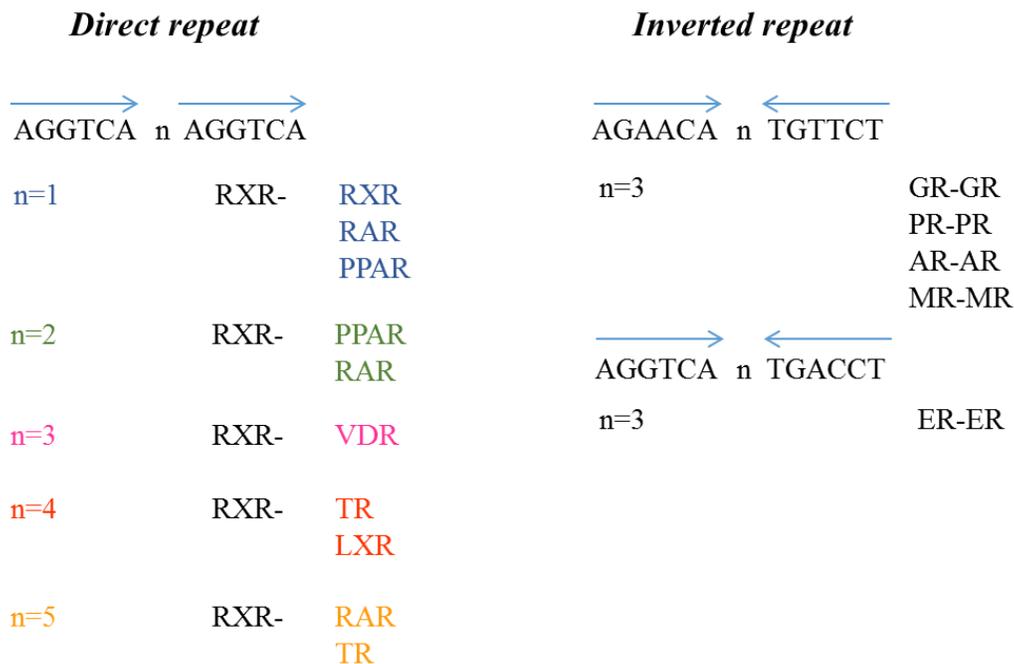


Figure 5 : Interaction des récepteurs nucléaires avec les éléments de réponse

1.5.2.2. Les récepteurs orphelins

Les RN orphelins se lient à l'ADN le plus souvent sur un demi-site unique précédé d'une extension d'un certain nombre de paires de bases en 5'. Par exemple, Nurr1 (*Nuclear receptor related 1*) se lie à un demi-site étendu formé de l'hexamère 5'-AGGTCA^{-3'} précédé en 5' d'une séquence riche en nucléotides A/T longue de 1 à 6 paires de bases. De la même manière, NGFI-B (*Nerve Growth Factor-Induced-B*) se lie sur un élément de réponse formé uniquement d'un demi-site 5'-AGGTCA^{-3'} précédé en 5' d'une extension de trois nucléotides (Meinke *et al.*, 1999).

Pour assurer son rôle de facteur de transcription, ERR se lie au niveau des régions cis-régulatrices des promoteurs géniques situées le plus souvent à une centaine de nucléotides du site d'initiation de la transcription. Diverses études sur les nombreux gènes et notamment ceux impliqués dans le métabolisme ont permis de déterminer la séquence de l'élément de réponse par lequel il interagit avec l'ADN de manière très spécifique. Cet élément de réponse, appelé demi-site étendu ERRE, de séquence consensus 5'-TNAAGGTCA^{-3'}, se caractérise par un unique demi-site de six paires de bases 5'-AGGTCA^{-3'} précédé en 5' d'une extension de trois paires de bases TNA (où N représente l'un des quatre nucléotides A, G, C ou T) (Vanacker *et al.* 1999). À la fin des années 1990, plusieurs gènes régulés par ERR ont été caractérisés par génomique fonctionnelle tels que la lactoferrine, l'ostéopontine, l'aromatase ou *tff1* (Lu *et al.*, 2001 ; Yang *et al.*, 1998 ; Yang *et al.*, 1996 ; Vanacker *et al.*, 1999). Les promoteurs de ces gènes contiennent l'élément de réponse ERRE, dont la séquence varie en fonction des gènes bien que 5'-TCAAGGTCA^{-3'} soit la plus retrouvée, comme caractérisée dans les cellules cancéreuses MCF-7 (ER-positif). Certains promoteurs comme celui du gène *tff1*, sont régulés par les deux récepteurs ER et ERR sur un site élément de réponse combinant un ERRE et un ERE (figure 6) (Deblois *et al.*, 2009).



Figure 6 : Séquences consensus des éléments de réponse reconnus par ERR et ER

Les positions des nucléotides sont précisées de 1 à 9 pour ERRE, de 1 à 15 pour ERE et de 1 à 18 pour ERRE/ERE. La fréquence de distribution des nucléotides le long des éléments de réponse est représentée selon la taille des caractères (statistiques calculées sur la base des liaisons de ERR α et ER α . ERRE : ERR-response element, ERE : ER-response element, ERRE/ER : ERRE-embedded ER.

1.6. Introduction à la régulation endocrinienne par les hormones estrogènes

Les hormones stéroïdiennes sont divisées en deux classes selon leur lieu de synthèse et d'action. D'une part, les corticostéroïdes (synthétisés dans le cortex surrénal) se composent des deux hormones : les glucocorticoïdes et les minéralocorticoïdes. D'autre part, les stéroïdes sexuels (synthétisés dans les gonades et le placenta) comptent trois hormones : les androgènes, les progestérones et les estrogènes. Chacune de ces hormones stéroïdiennes se lie spécifiquement à un RN portant le même nom.

1.6.1. Les hormones estrogènes

Les hormones estrogènes ciblent les tissus incluant les seins, l'endomètre, les os, le cerveau, le foie et le cœur et jouent un rôle important notamment dans la détermination sexuelle, la fertilité, la grossesse et le système cardiovasculaire. Dérivées de leur précurseur cholestérol, ces hormones ont une structure chimique

formée de quatre cycles carbonés. Le cholestérol est dans un premier temps converti en progestines puis en androgènes et enfin en estrogènes par une série de réactions enzymatiques. Les estrogènes sont principalement synthétisés dans les ovaires avant la ménopause puis dans les tissus périphériques tels que le tissu adipeux pour les femmes ménopausées. Les estrogènes physiologiquement naturels, aussi appelés endoestrogènes, existent au nombre de trois selon le nombre de groupes hydroxyles qu'ils présentent : l'estrone, l'estradiol et l'estriol (figure 7). Ces trois hormones se lient avec des affinités différentes au récepteur aux estrogènes ER. L'estradiol est la forme prédominante et possède la plus haute affinité pour ER suivie par l'estradiol et l'estrone. Les pics de concentration des estrogènes à la puberté contribuent au développement des caractères sexuels secondaires chez la femme. L'estriol est synthétisée dans le foie et le placenta et joue un rôle majeur au cours de la grossesse. Quant à l'estradiol et l'estrone, ils interviennent respectivement au cours des phases de pré- et post-ménopause. (Blair *et al.*, 2000). Le 17 β -estradiol, aussi abrégé E2 du fait de ses deux fonctions hydroxyles, est l'hormone sexuelle majeure beaucoup plus efficace que les autres estrogènes. Son isomère 17 α -estradiol est présent à des quantités négligeables et n'a, à l'inverse, aucun effet féminisant. Aucun effet spécifique du 17 α -estradiol lié à l'âge, au sexe ou à la fonction de certains organes n'a d'ailleurs été caractérisé à ce jour (Moos *et al.*, 2009).

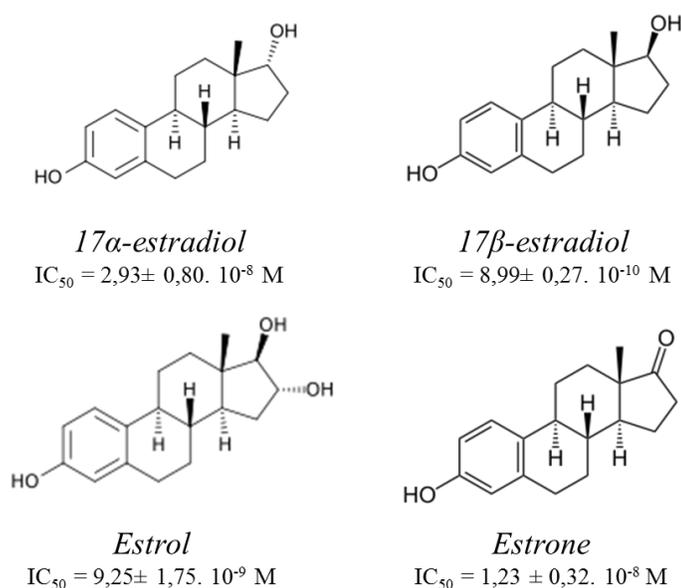


Figure 7 : Les hormones estrogènes estradiol, estrol et estrone

L'isomère 17 β -estradiol est la forme prédominante la plus affine avec un IC_{50} de 0,89 nM.

1.6.2. Les ligands synthétiques d'ER et leurs effets sur son récepteur apparenté ERR

L'activité transcriptionnelle d'ER fait l'objet de modulations thérapeutiques par des molécules synthétiques qui se lient au domaine LBD. Souvent prescrit pour mimer l'action des endoestrogènes dans le cadre de dérégulations endocriniennes, le xenoestrogène diéthylstilbestrol (DES) se comporte comme agoniste d'ER α et ER β pour promouvoir leurs activités transcriptionnelles. La modulation de l'activité d'ER est également associée à l'utilisation de modulateurs sélectifs dits SERM (*Selective Estrogen Receptor Modulators*). Ces derniers présentent la capacité d'agir comme agoniste et antagoniste d'ER α de façon tissu-dépendante. Le 4-hydroxytamoxifène (4-OHT) est le traitement le plus prescrit pour le traitement du cancer du sein pour son caractère antagoniste de l'activité d'ER. Le raloxifène, souvent prescrit pour le traitement

de l'ostéoporose chez la femme ménopausée, permet le ralentissement de la dégradation osseuse et agit comme antagoniste des activités des deux isotypes d'ER.

Le récepteur orphelin apparenté à ER, ERR, présente une forte homologie de séquence avec ER mais ne lie pas l'hormone naturelle 17β -estradiol. De plus, selon les isotypes α , β et γ d'ERR, les ligands synthétiques DES et 4-OHT sont capables d'influencer l'activité des différentes isotypes d'ERR. En effet, le suivi du déplacement du coactivateur PGC-1 α en fonction de concentrations croissantes de DES et 4-OHT, avec E2 pris pour contrôle négatif, permet d'affirmer que le DES inhibe les trois isotypes d'ERR et que le 4-OHT est un antagoniste d'ERR β et ERR γ uniquement, et n'a aucun effet sur ERR α (figure 8) (Chisamore *et al.* 2008). Ceci s'explique par le fait que le 4-OHT ne se lie pas à la poche de liaison aux ligands d'ERR α . En effet, la mutation F328A au niveau de la poche de liaison aux ligand d'ERR α permet la liaison du 4-OHT et une inhibition de l'activité de ce récepteur (Coward *et al.*, 2001). Le raloxifène et E2, respectivement antagoniste et agoniste des deux isotypes d'ER α , ne se lient pas aux ERR et n'ont donc aucun effet sur leurs activités (Chisamore *et al.* 2008).

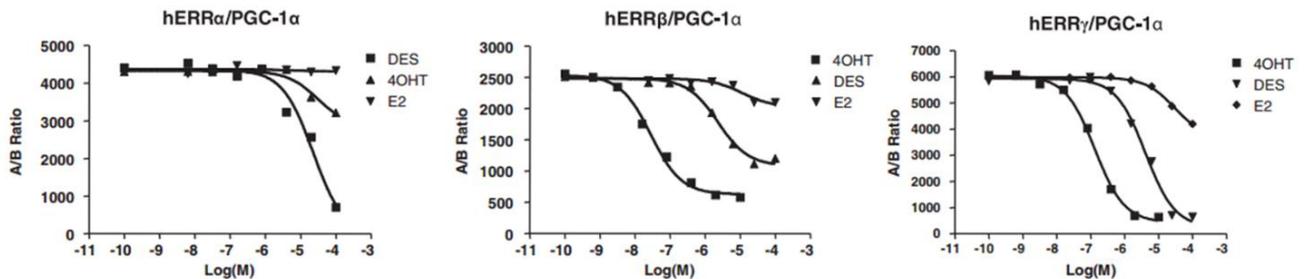


Figure 8 : Suivi des activités d'ERR α , ERR β et ERR γ en fonction de concentrations croissantes de DES, 4-OHT et E2.

L'inhibition est évaluée en suivant la dissociation de PGC-1 α . Les isoformes ERR β et ERR γ sont inhibées par la liaison du DES et du 4-OHT alors que ERR α l'est uniquement avec le DES et ne lie pas le 4-OHT. Le contrôle réalisé avec E2 témoigne de son inefficacité sur les ERR.

Le bisphénol A (BPA) ou 2,2-bis-(4-hydroxyphenyl)-propane est un xenoestrogène très étudié du fait de ses effets de perturbateur endocrinien sur de nombreuses fonctions physiologiques. ERR α ne lie pas le BPA. Ce ligand se lie extrêmement fortement à ERR γ avec un K_d de 5,5 nM alors que son affinité est moindre pour les ER ($K_d = 0,2 \mu\text{M}$). Son efficacité de liaison est telle qu'il est capable de dissocier le 4-OHT de la poche de liaison d'ERR γ et positionne ainsi son hélice H12 en position agoniste sans la présence de coactivateurs (Matsushima *et al.*, 2007 ; Okada *et al.*, 2008). Étant donné qu'ERR γ est fortement exprimé dans le système nerveux central fœtal et le placenta, sa présence peut causer de sérieux effets néfastes sur les nouveaux nés. Ce phénomène a d'ailleurs été observé pour le développement embryonnaire de *zebrafish* chez qui le BPA induit une malformation des otolithes de manière ERR γ -dépendante (Tohmé *et al.*, 2014)

Les activités de ces différents ligands sur ER et ERR sont résumées dans le tableau 1.

	E2	DES	4-OHT	Bisphénol A	Raloxifène
ERα	agoniste	agoniste	antagoniste	Agoniste	antagoniste
ERβ	agoniste	agoniste	antagoniste	Agoniste	antagoniste
ERRα		antagoniste			
ERRβ		antagoniste	antagoniste	antagoniste	
ERRγ		antagoniste	antagoniste	agoniste	

Tableau 1 : Effets des ligands E2, DES, 4-OHT, bisphénol A et raloxifène sur les activités transcriptionnelles des différentes isotypes d'ER et ERR.

2. Le récepteur nucléaire orphelin ERR apparenté à ER

2.1. ERR existe sous trois isotypes α , β et γ

La famille des ERR représente un archétype des récepteurs nucléaires orphelins. En effet, si aucun ligand naturel n'est connu à ce jour comme régulateur de leur activité, les membres de la famille des ERR, les isotypes α , β et γ , jouent un rôle central dans la régulation de nombreuses voies métaboliques et régulent ainsi un vaste réseau de gènes impliqués dans la biogénèse et la fonction mitochondriales. Les deux premiers membres de la famille des ERR, ERR α et ERR β , ont été découverts en 1988 à partir du rein et du cœur murins dans le but de cloner des récepteurs aux hormones stéroïdiennes génomiquement proches du récepteur aux œstrogènes ER. ERR α a d'abord été identifié sur la base de sa haute similarité de séquence protéique avec le domaine DBD d'ER α . ERR β a été identifié à son tour grâce à l'ADNc d'ERR α (Giguère *et al.* 1988). Une dizaine d'années plus tard, le troisième membre ERR γ a été identifié du fait de son homologie avec ERR β (Heard *et al.*, 2000). D'un point de vue phylogénétique, ERR β et ERR γ sont plus proches entre eux qu'avec ERR α . La comparaison de leurs séquences protéiques souligne une conservation variable des différents domaines en prenant l'isotype ERR α comme référence. Ainsi, respectivement pour ERR β et ERR γ , le domaine A/B est conservé à 29% et 17%, le domaine DBD est conservé à 90% pour les deux, 65% et 59% pour le domaine charnière et 64% et 63% pour le LBD. Le domaine carboxy-terminal F n'est présent que chez ERR β (figure 9) (May, 2014).



Figure 9 : Pourcentages de conservation entre les isotypes d'ERR.

Adapté de May, 2014

2.2. La répartition tissulaire des isotypes d'ERR

Les trois isotypes d'ERR sont exprimées de façon relativement variable au sein des différents tissus de l'organisme. Le récepteur $ERR\alpha$ est celui qui est exprimé de façon ubiquitaire et en quantité la plus abondante par rapport à $ERR\beta$ et $ERR\gamma$ (figure 10). Il intervient dans le métabolisme lipidique et l'homéostasie énergétique et son expression se fait à un niveau élevé dans les organes du système nerveux central (tels que les yeux, la corde spinal ou l'hypothalamus), du système gastro-intestinal (estomac, colon, duodénum) et du système cardiovasculaire (aorte, cœur, poumons). $ERR\alpha$ est aussi fortement exprimé dans les tissus à haute activité métabolique tels que les reins, les muscles et dans les tissus adipeux blancs et bruns. Cependant, il reste modérément exprimé dans les tissus à activité endocrinienne (tels que la thyroïde ou le pancréas), le système immunitaire (rate et thymus), l'appareil reproducteur, les os et la peau (Giguère *et al.*, 1988 ; Bookout *et al.*, 2006). L'isotype $ERR\beta$ est la moins abondante dans les tissus. Elle est toutefois abondamment exprimée dans le système nerveux central et l'est plus modérément dans les tissus endocrinien, gastro-intestinal, cardiovasculaire et reproducteur. $ERR\beta$ est absent dans les systèmes immunitaire et structural (Giguère *et al.*, 1988). Enfin, l'isotype $ERR\gamma$ est modérément exprimée dans les systèmes nerveux central, gastro-intestinal et cardiovasculaire et l'est faiblement dans les tissus endocrinien, immunitaire et reproducteur. $ERR\gamma$ est absent dans le système structural (Bookout *et al.*, 2006). En outre, l'expression de différents membres de la famille ERR suit un rythme circadien. La quantité de transcrits d' $ERR\gamma$ présente notamment un pic en période diurne dans les tissus adipeux bruns et dans le foie alors que pendant, cette même période la quantité de transcrits $ERR\alpha$ est moins prononcée dans ces tissus. Il existerait donc un lien moléculaire entre l'horloge circadienne et la régulation de l'énergie métabolique (Yang *et al.*, 2006).

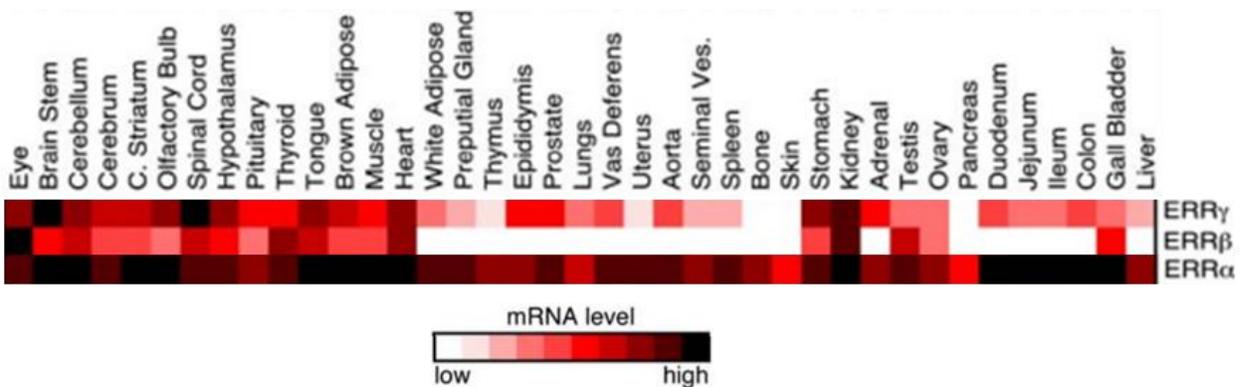


Figure 10 : Niveau d'expression hiérarchique des isotypes d'ERR dans les différents tissus murins.

La distribution tissulaire des ARNm de la plus faible à la plus élevée est représentée en un gradient de couleur, respectivement, du blanc au noir. Adapté de Bookout 2006.

2.3. La régulation de l'activité transcriptionnelle d'ERR

2.3.1. Les protéines corégulatrices

2.3.1.1. Le coactivateur PGC-1 α

2.3.1.1.1. PGC-1 α régule les gènes du métabolisme énergétique

La protéine PGC-1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor- γ Coactivator 1 α*) a été initialement caractérisée en 1998 comme coactivateur des récepteurs nucléaires PPAR γ et TR pour activer l'expression de la protéine mitochondriale UCP-1 (*Uncoupling Protein-1*). PGC-1 α est fortement exprimé dans les tissus à demande énergétique tels que le tissu adipeux brun, le cœur ou le muscle squelettique. Son expression est également importante dans le cerveau et les reins alors qu'il est moins exprimé dans le foie et très faiblement dans le tissu adipeux blanc. Dans le tissu adipeux brun et le muscle squelettique, PGC-1 α est un régulateur clef de la thermogénèse qui se réfère à l'énergie dissipée en réponse aux changements des conditions environnementales telles que l'exposition au froid. En effet, PGC-1 α favorise l'expression de UCP-1 qui dissipe le gradient électrochimique mitochondrial en permettant l'entrée des protons dans la matrice induisant une production de chaleur (Puigserver *et al.*, 1998). En outre, PGC-1 α intervient dans le développement cardiaque où il régule l'expression de diverses protéines de la chaîne de transport d'électrons, de la biogénèse mitochondriale et de la β -oxydation des acides gras (Lehman *et al.*, 2000). Le jeûne induit une forte augmentation de l'expression de PGC-1 α , qui à son tour, stimule la gluconéogenèse hépatique en permettant l'expression des protéines clefs qui sont la phosphoenolpyruvate kinase (PEPCK), la fructose-1-6 biphosphatase et la glucose-6-phosphatase (Yoon *et al.*, 2001). En plus de son rôle prospère sur le métabolisme oxydatif mitochondrial dans le muscle squelettique, PGC-1 α y induit également l'expression du transporteur de glucose Glut-4 permettant l'absorption intracellulaire du glucose (Michael *et al.*, 2001). ERR α et PGC-1 α interviennent ensemble dans l'autorégulation de l'expression d'ERR α en se liant au promoteur du gène *esrra*. Ainsi, l'expression d'ERR α augmente significativement quand l'expression de son coactivateur PGC-1 α est induite par l'exposition au froid, le jeûne et l'activité physique. Quand le niveau de ces protéines est significativement élevé, elles s'engagent alors ensemble en aval dans la régulation d'un panel de gènes.

2.3.1.1.2. L'organisation structurale de PGC-1 α

Un coactivateur transcriptionnel se définit comme une protéine ou un complexe protéique qui favorise la transcription génique en se liant à des facteurs de transcription mais sans interagir directement de manière séquence-spécifique avec l'ADN (Puigserver *et al.*, 2003). La protéine PGC-1 α humaine est constituée de 798 acides aminés. Sa partie amino-terminale est composée de trois motifs LXXLL (où L est une leucine et X est un résidu quelconque) d'interactions avec les RN dont le premier est compris dans le domaine TAD (*Transcription Activation Domain*). Les trois motifs L1, L2 et L3 s'étendant respectivement des résidus 88 à 92, 144 à 148 et 210 à 214 (figure 11). Si PGC-1 α interagit avec une multitude de RN, il active ces derniers de façon ligand-dépendante pour ER, PPAR ou PXR α et de façon ligand-indépendante pour HNF-4 α ou ERR. La mécanique de la transcription génique se caractérise par le remodelage et la décondensation de la chromatine pour permettre l'accès aux sites de liaison cibles des différents protagonistes impliqués dans l'initiation de la transcription. Pour cela, PGC-1 α ne possède pas l'activité enzymatique intrinsèque dite d'acétyltransférase ou HAT (*Histone Acetyltransferase*) permettant l'acétylation des histones et ainsi le remodelage chromatinien. Cependant, ce coactivateur recrute au niveau de sa partie amino-terminale des protéines telles que SRC-1 (*Steroid-Receptor Coactivator-1*) ou CREB (*cAMP-Response-Element-Binding protein*) qui possèdent cette activité HAT (Puigserver *et al.*, 1999). La partie carboxy-terminale contient

deux domaines de *RNA processing* permettant l'interaction avec l'ARN : le domaine riche en arginine et sérine dit RS (résidus 565 à 631) et le domaine RRM (*RNA-Recognition Motif*) (résidus 677 à 709) (figure 11) (Puigserver *et al.*, 1998). Ces domaines permettent l'interaction avec la partie carboxy-terminale de l'ARN polymérase II et, entre autres, ses facteurs d'élongation CDK9 (*Cyclin-Dependant Kinase 9*) et cycline T (Monsalve *et al.*, 2000). La présence de deux séquences NLS (*Nuclear Localization Signal*) (326 à 333, et 627 à 633 et 651 à 667) permettent à PGC-1 α de se localiser dans le noyau pour assurer ses fonctions. L'activité de PGC-1 α y est régulée par la phosphorylation par la p58 MAP kinase de ses résidus T262, S265 et T298 permettant à PGC-1 α de renforcer son activité et d'augmenter sa stabilité (Puigserver *et al.*, 2001).

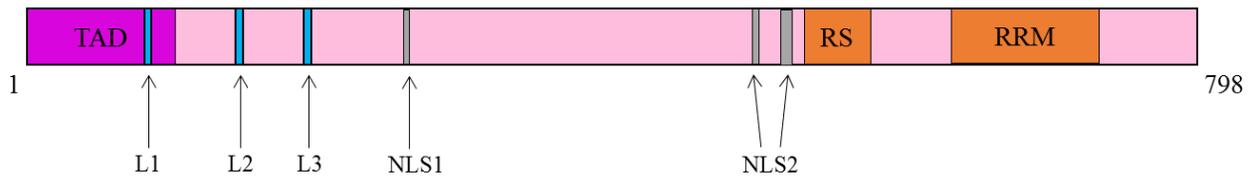


Figure 11 : Organisation des domaines fonctionnels du coactivateur PGC-1 α

Les motifs hydrophobes de type LXXLL sont représentés en bleu. L2 et L3 interagissent avec diverses récepteurs nucléaires. Le motif L3 interagit spécifiquement avec ERR. TAD : Transcription Activation Domain, RS : Arginine/Sérine-rich motif, RRM : RNA-binding Motif (677 à 709), NLS : Nuclear Localization Signal (NLS1 : 326 à 333, NLS2 : 627 à 633 et 651 à 667)

2.3.1.2. Le corépresseur NCoR

La protéine NCoR (*Nuclear-receptor CoRepressor*) compte 2453 résidus et avoisine une masse moléculaire de 270 kDa. Identifiée en 1995, NCoR réprime l'activité transcriptionnelle de RN de façon ligand-indépendante (Hörlein *et al.*, 1995). En effet, au niveau de sa partie carboxy-terminale, NCoR est doté de trois motifs hydrophobes d'interaction de type I/LXXII avec les RN : IDVII (1949-1953), ICQII (2073-2077) et LEDII (2276-2280) (Pérez-Schindler *et al.*, 2012). Hörlein a montré que NCoR interagit avec TR et RAR via la partie charnière *hinge* (faisant le lien entre le DBD et le LBD) et non pas avec le LBD où se lient les coactivateurs (Hörlein *et al.*, 1995). NCoR ne possède pas d'activité enzymatique de désacétylation. C'est pourquoi, pour réprimer l'initiation de la transcription, l'histone déacétylase HDAC-3 se lie au niveau de la partie 1496-1965 de NCoR avec l'aide des régions SANT-1 et SANT-2 (respectivement 436-484 et 624-672) qui permettent un recrutement coopératif des protéines du complexe HDAC telles que GPS2. Ainsi, la désacétylation de la queue amino-terminale des histones induit une augmentation du degré de compaction de la chromatine et une diminution de l'expression génique (Li *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2002). Les deux régions SANT (*SWI3*, *ADA2*, *N-CoR* et *TFIIIB*) servent également au recrutement de protéines de la machinerie de sumoylation telles que Pias1 et Ub9 qui assurent la sumoylation des lysines 152, 1117 et 1330 respectivement situées au niveau des domaines de régulation RD I et RD III (RD : *Repression Domain*). Cependant, ces sumoylations n'affectent pas la liaison de NCoR avec HDAC-3 (figure 12) (Tiefenbach *et al.*, 2006).



Figure 12 : Organisation des domaines fonctionnels du corépresseur NCoR

Les motifs d'interaction aux récepteurs de type I/LXXII sont représentés en bleu à l'extrémité amino-terminale. RD : Repression Domain, SANT : SWI3, ADA2, N-CoR et TFIIB

2.3.2. Orchestration de l'activité d'ERR par PGC-1 α et NCoR

NCoR est exprimé ubiquitairement. Sa délétion des cellules musculaires murines montre une augmentation du métabolisme oxydatif se traduisant par une augmentation de l'expression des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale telles que la succinate déshydrogénase ou la NADH déshydrogénase. La délétion de PGC-1 α induit une diminution de l'expression de ces protéines ce qui souligne le fait que PGC-1 α et NCoR partagent la régulation des mêmes gènes du métabolisme oxydatif en ayant des effets opposés sur leur expression. De plus, NCoR interagit avec ERR α pour inhiber son activité transcriptionnelle (figure 13) (Pérez-Schindler *et al.*, 2012).

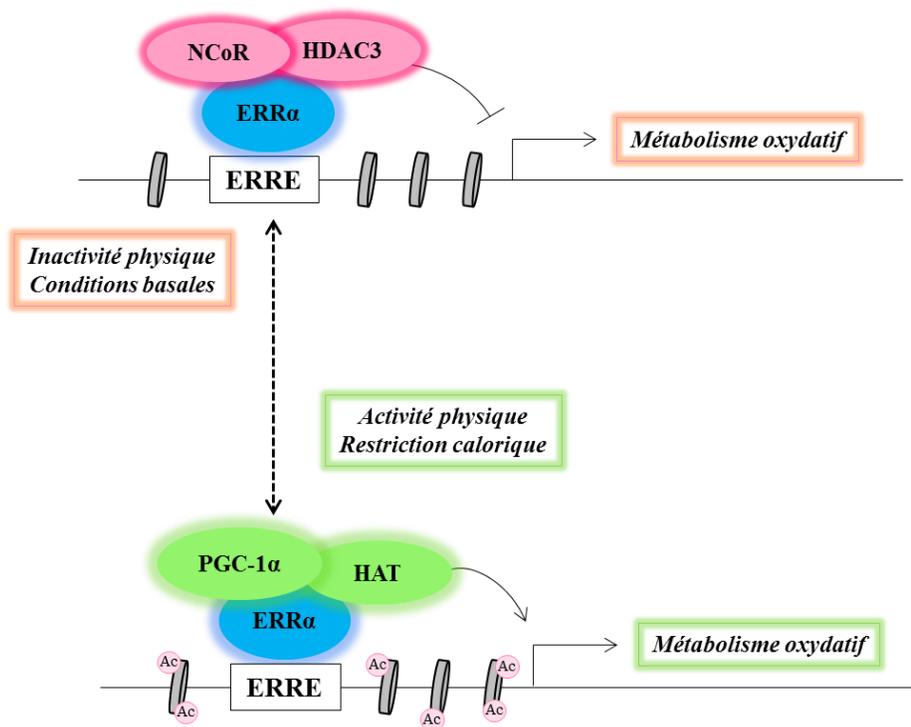


Figure 13 : Régulation du métabolisme oxydatif par NCoR et PGC-1 α

Sous des conditions d'inactivité physique, NCoR inhibe l'activité d'ERR α en recrutant des protéines HDAC pour désacétyler la chromatine et bloquer l'expression des gènes du métabolisme oxydatif. A l'inverse, PGC-1 α est activé par l'activité physique et la restriction calorique. Il active alors ERR et recrute des protéines HAT pour acétyler la chromatine et induire la fixation du complexe de pré-initiation pour transcrire les gènes du métabolisme oxydatif. Ac : groupement acétyle. Adapté de Pérez-Schindler, 2012.

2.3.3. Les modifications post-traductionnelles

En l'absence de ligands naturels connus, la régulation de l'activité transcriptionnelle d'ERR est d'une importance cruciale pour le bon déroulement de son activité. Pour cela, l'activité de ce récepteur orphelin est dynamiquement régulée, tant par le recrutement de protéines corégulatrices que par la participation de modifications post-traductionnelles.

2.3.3.1. La sumoylation dépendante de la phosphorylation : un ralentissement de l'activité transcriptionnelle

Les ERR font l'objet de modifications post-traductionnelles au niveau de motifs appelés PDSM (*Phosphorylation-Dependant Sumoylation Motif*), caractérisés par la séquence consensus Ψ KXE/DXXSP (où Ψ est un acide aminé hydrophobe et X un acide aminé quelconque). Ce motif PDSM subit des réactions biochimiques de sumoylation dont le prérequis est une phosphorylation préalable sur ce même motif. ERR α , ERR β et ERR γ possèdent respectivement au niveau de leurs domaines amino-terminaux A/B les motifs PDSM ¹³-IKAEPASP²⁰, ¹⁶-IKTEPSSP²³ et ³⁹-IKTEPSSP⁴⁶ (figure 14). Des études réalisées sur ERR α et ERR γ indiquent que des phosphorylations, respectivement sur les Ser19 et Ser45, permettent la sumoylation sur les Lys14 et Lys40, respectivement. Les mutations Lys19Arg et Lys40Arg se traduisent par une augmentation très marquée de l'activité transcriptionnelle d'ERR α et ERR γ . De plus, les mutations des Ser19 et Ser45 en résidu alanine rendent une phosphorylation impossible et ont pour conséquence une absence de sumoylation sur les résidus lysine du motif se reflétant par une augmentation importante de l'activité des ERR. Par conséquent, la modification post-traductionnelle par sumoylation régule l'activité transcriptionnelle des ERR en la diminuant. Elle n'a par contre aucun effet sur la location subcellulaire du récepteur et sur sa liaison à l'ADN (Tremblay *et al.*, 2008).

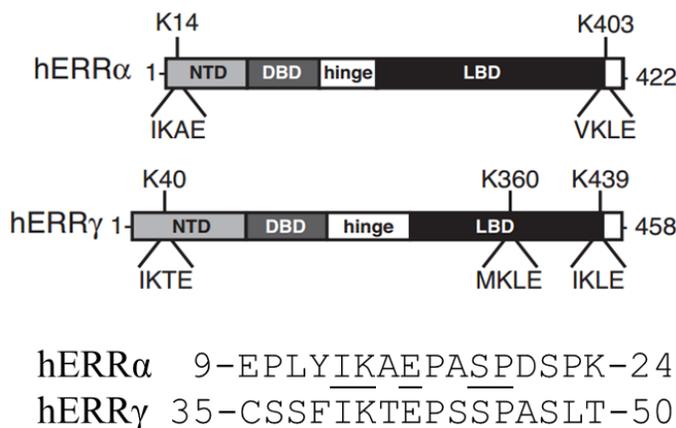


Figure 14 : Représentation des domaines modulaires d'ERR α et ERR γ humains et leurs sites de sumoylation
 Pour ces deux isotypes, les séquences du NTD contenant les motifs de Sumoylation de type Ψ KXE/DXXSP sont alignées.

Par ailleurs, d'autres sites de sumoylation sont présents du côté carboxy-terminal à proximité des domaines AF2 du LBD. Cependant, seul le motif de sumoylation Ψ KXE/D est présent : ⁴⁰¹-VKLEGKVP⁴⁰⁹ chez ERR α , et ³⁵⁹-MKLEKEEF³⁶⁶ et ⁴³⁸-IKLEGKP⁴⁴⁵ chez ERR γ . Cette modification n'a toutefois pas d'effet sur l'activité de ERR (Vu *et al.*, 2007 ; Tremblay *et al.*, 2008).

2.3.3.2. L'acétylation d'ERR ralentit son activité transcriptionnelle

L'activité d'ERR peut être également dictée par des événements d'acétylation. En interagissant avec $ERR\alpha$, l'acétyltransférase pCAF (*p300 Coactivation Associated Factor*) catalyse l'acétylation des quatre lysines 129, 138, 160 et 162 étant toutes situées sur le DBD au niveau du second motif en doigt de zinc et de l'extension CTE (figure 15). Les autres isotypes β et γ d'ERR présentent le même profil d'acétylation au niveau de leurs DBD respectifs indiquant que la famille ERR est une cible commune de pCAF. Le résultat de ces acétylations par pCAF se traduit par une diminution significative de la capacité du complexe $ERR\alpha/PGC-1\alpha$ à induire la transcription des gènes cibles tels que *got1* qui code pour l'aspartate aminotransférase cytoplasmique. Un équilibre s'opère toutefois par des mécanismes de désacétylation assurés par les activités de HDAC8 et Sirt1. Ces dernières interagissent directement avec le DBD et catalysent la désacétylation de ses lysines 129, 138, 160 et 162 ayant pour conséquence une augmentation de la liaison d' $ERR\alpha$ à l'ADN via son DBD et de son activité transcriptionnelle. En conclusion, il existe une dynamique entre l'acétylation et la désacétylation du DBD d'ERR entre pCAF et Sirt1 ou HDAC8 pour, respectivement, diminuer et augmenter l'activité transcriptionnelle (Wilson *et al.*, 2010).

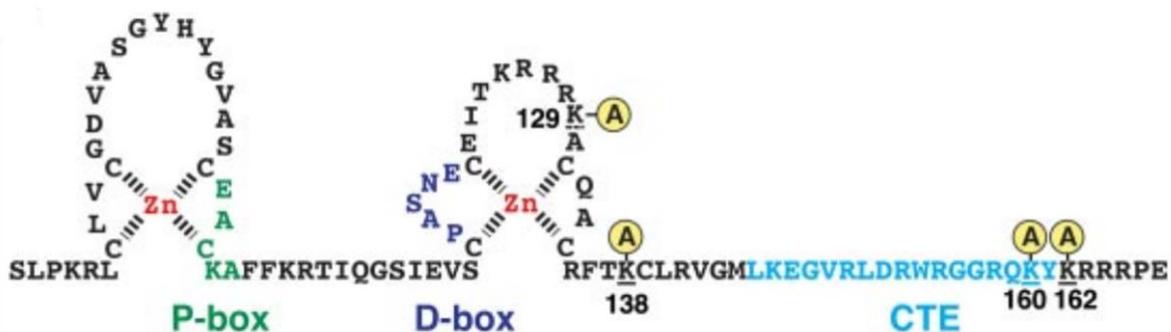


Figure 15 : Sites d'acétylation du DBD et de l'extension CTE d' $ERR\alpha$

Les sites d'acétylation sont les lysines 129, 138, 160 et 162. Les deux structures secondaires en doigts de zinc et les régions remarquables *P-box*, *D-box* et *CTE* sont respectivement représentées en vert, bleu marine et bleu ciel.

2.4. $ERR\alpha$ est un régulateur clef du métabolisme énergétique

L'implication d' $ERR\alpha$ dans la régulation d'un très large panel de gènes fait de lui un véritable orchestrateur du métabolisme cellulaire. Le réseau de gènes qu'il contrôle implique l'ensemble des fonctions mitochondriales, de la production d'énergie à la β -oxydation des acides gras en passant par la chaîne respiratoire ou le cycle des acides tricarboxyliques. Quelques exemples sont détaillés dans cette section.

2.4.1. Métabolisme du glucose

Le glucose cellulaire est hautement régulé par la glycolyse où il est converti, via une série de réactions biochimiques, en pyruvate. Ce dernier entre ensuite dans le cycle des acides carboxyliques pour être converti en acétyl-coenzyme A grâce au grand complexe pyruvate déshydrogénase (PDC). Le PDC est régulé de façon post-traductionnelle par des phosphorylations réversibles par les pyruvate déshydrogénase kinases 1, 2, 3 et 4, ces phosphorylations conduisant à l'inactivation du PDC. L'inhibition du PDC permet alors de basculer de la glycolyse au cycle des acides carboxyliques. Le gène *pdk4* de la pyruvate déshydrogénase kinase 4 (PDK 4) est positivement régulé par $ERR\alpha$ en association avec son coactivateur $PGC-1\alpha$ (Araki *et al.*, 2006). Par ailleurs, la synthèse de glucose lors de la gluconéogenèse fait intervenir la

phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK). Son expression est induite par le récepteur GR en s'associant à PGC-1 α (Yoon *et al.*, 2001). ERR α , en se liant sur son élément de réponse ERRE situé au niveau du promoteur de *pepck*, interfère avec le recrutement de PGC-1 α par GR et se comporte ici comme antagoniste de la transcription (Herzog *et al.*, 2006) soulignant la complexité des rôles joués par ERR.

2.4.2. β -Oxydation des acides gras

L'enzyme medium-chain acyl-coenzyme A Dehydrogenase (MCAD) catalyse la première étape de la β -oxydation des acides gras au sein de la mitochondrie. Elle est fortement exprimée dans les tissus utilisant les acides gras comme substrat énergétique et son niveau d'expression est donc fortement régulé dans les tissus à forte demande énergétique tels que le cœur, les reins et le foie. L'étude des voies de signalisation contrôlant le niveau de MCAD a permis d'identifier, dans la partie proximale du promoteur du gène *mcad*, un ERRE de séquence consensus 5'-TCAAGGTCA-3' où la liaison d'ERR α a été confirmée par des expériences de retard sur gel EMSA (Sladek *et al.*, 1997) et par des analyses montrant une diminution de l'expression de MCAD en présence d'un ARN interférent ciblant l'isotype ERR α (Schreiber *et al.*, 2003). D'autres gènes régulés par ERR α incluent *acadm*, *mlycd*, *etfdh*.

2.4.3. Fonctions mitochondriales

L'analyse du génome a permis l'identification d'un nombre conséquent de gènes sous le contrôle transcriptionnel d'ERR α . En effet, ERR α et PGC-1 α sont coexprimés dans les tissus à haute demande énergétique. Ensemble, ils assurent l'expression de plus de 150 gènes impliqués dans les fonctions mitochondriales comme la chaîne de phosphorylations oxydatives (par exemple, *cycs*, *cox5b*, *ndufa5*) et le cycle des acides carboxyliques (par exemple, *fh1*, *idh3a*, *me3*) (figure 16) (Giguère *et al.*, 2008). L'enzyme MCAD intervenant dans la première étape de la β -oxydation des acides gras est également exprimée de la même manière. De plus, ERR α est impliqué dans le contrôle de la biogénèse et de la maintenance mitochondriales en régulant le niveau des mitofusines 1 et 2, protéines de la membrane mitochondriale participant à la fusion mitochondriale et au maintien cohésif de cet organelle (Cartoni *et al.*, 2005).

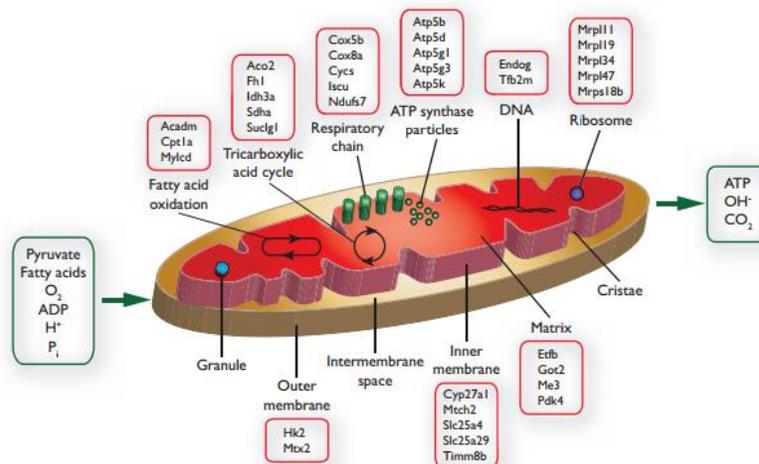


Figure 16 : ERR α régule une multitude de gènes dont les protéines sont impliquées dans les fonctions mitochondriales.

Quelques exemples de gènes régulés par ERR α sont précisés dans les encadrés rouges. Les encadrés verts montrent les métabolites et les molécules impliquées dans la production d'énergie par la mitochondrie.

2.4.4. Transcription d'autres récepteurs nucléaires

Au-delà de la transcription d'un large panel de protéines, $ERR\alpha$ en association avec $PGC-1\alpha$ permet également sa propre expression via le gène *esrra* dont le promoteur polymorphique contient une à quatre copies de l'élément de réponse ERRE. Ce polymorphisme et la synergie entre $ERR\alpha$ et $PGC-1\alpha$ permet une amplification de l'expression d' $ERR\alpha$ en fonction du nombre d'ERRE puisque l'activation de la transcription est notamment plus importante lorsque le promoteur *esrra* contient trois copies d'ERRE plutôt que deux (Laganière *et al.*, 2004).

Le RN aux hormones thyroïdiennes TR existe sous deux isotypes α et β qui régulent l'expression de gènes notamment dans les gonades adultes où il est coexprimé avec $ERR\alpha$. Le promoteur du gène *tra* est ciblé et activé par $ERR\alpha$ dont l'élément de réponse consensus ERRE se trouve en position -443 du promoteur *tra*. À l'inverse, le promoteur de *tr\beta* ne contient aucun site ERRE soulignant la spécificité de $ERR\alpha$ pour $TR\alpha$ (Vanacker *et al.*, 1998).

Du fait de son implication complexe dans le métabolisme énergétique, le dysfonctionnement de l'activité d'ERR et de son interactome est souvent synonyme de défaillances homéostatiques représentant notamment un accélérateur à la prolifération tumorale.

2.5. Les dérégulations d'ERR et les pathologies associées

2.5.1. La balance pathologique $ERR\alpha/ERR\gamma$ dans les cancers

Dans la famille ERR, les isotypes $ERR\alpha$ et $ERR\gamma$ sont les deux protagonistes responsables des tumeurs cancéreuses. En plus des cancers du sein et des ovaires, ils sont également impliqués dans ceux du colon (Cavallini *et al.*, 2005), de l'endomètre (Fujimoto *et al.*, 2009) et de la prostate (Fujimura *et al.*, 2007) où les cas les plus agressifs sont corrélés à la forte expression d' $ERR\alpha$ et une faible expression d' $ERR\gamma$ (tableau 3). $ERR\beta$, quant à lui, joue plutôt un rôle prépondérant dans le développement embryonnaire et ne témoigne pas à ce jour d'un caractère de marqueur cancéreux.

L'importante implication d' $ERR\alpha$ et $ERR\gamma$ dans le contrôle cellulaire de l'énergie métabolique suggère leur participation dans le métabolisme dérégulé des cellules cancéreuses. Ces derniers se lient aux promoteurs géniques des enzymes glycolytiques via les ERRE et induisent notamment l'expression de l'hexokinase, l'énolase ou l'aldolase, enzymes clefs des réactions biochimiques de la glycolyse. La surexpression d' $ERR\alpha$ et $ERR\gamma$ dans les cellules cancéreuses active fortement l'expression de ces enzymes. Les cellules cancéreuses vouent alors une préférence à la glycolyse aérobie, phénomène connu sous le nom de l'effet Warburg, et favorisent ainsi leur prolifération cellulaire aboutissant souvent à des phénotypes très agressifs (Cai *et al.*, 2012). L'expression d' $ERR\alpha$ peut également favoriser la progression du cancer du sein en régulant positivement les gènes impliqués dans les fonctions oxydatives de la mitochondrie.

Des études cliniques ont révélé qu' $ERR\alpha$ représente un biomarqueur chez les patientes souffrant du cancer du sein puisque sa très forte expression se traduit par un diagnostic défavorable (Ariazi *et al.*, 2002). $ERR\alpha$ est retrouvé dans 55% des cancers du sein invasifs où il est détecté dans les noyaux cellulaires de carcinomes. Le niveau d'ARNm d' $ERR\alpha$ est souvent supérieur à celui d' $ER\alpha$ dans un grand nombre de cancers du sein et ce niveau est encore plus élevé dans les tumeurs dites ER-négatives où ER n'est plus exprimé (Suzuki *et al.*, 2004). En temps normal, $ER\alpha$ et $ERR\alpha$ se partagent la régulation de la transcription de gènes communs comme les gènes de la lactoferrine, l'ostéopontine, l'aromatase et *tff1* (Yang *et al.*, 1996 ; Vanacker *et al.*, 1998 ; Yang *et al.*, 1998 ; Lu *et al.*, 2001). $ERR\alpha$ devient alors dans un contexte

cancéreux le régulateur majeur de ces gènes et des nombreuses signalisations cellulaires qui en découlent faisant de lui une cible thérapeutique potentielle. Quelques analyses précliniques ont notamment montré que la réduction du niveau d'ARN messagers de $ERR\alpha$ par l'ARN interférent miR-137 se traduisait par la diminution des capacités de migration et de prolifération des cellules cancéreuses (Zhao *et al.*, 2012). Une approche similaire en utilisant la technique de l'ARNm d' $ERR\alpha$ a montré une diminution de la prolifération de cellules malignes de cancers du sein ER-négatifs (Stein *et al.*, 2008). Alors qu'une forte expression d' $ERR\alpha$ est synonyme d'un mauvais diagnostic cancéreux, la surexpression d' $ERR\gamma$ est retrouvée dans les tumeurs ER-positives où $ER\alpha$ est présent et fonctionnel répondant à la présence d'estrogènes. De ce fait, $ERR\gamma$ représente un biomarqueur clinique corrélé à diagnostic cancéreux favorable (Ariazi *et al.*, 2002).

Les différents cas de cancers des ovaires étudiés par Sun *et al.* révèlent que les expressions d' $ERR\alpha$ et $ERR\gamma$ sont augmentées correspondant, respectivement, à 57,6% et 48,5% des cas. Cependant, la progression tumorale est plus lente dans ces cancers $ERR\gamma$ -positifs faisant de lui un biomarqueur favorable pour le diagnostic du cancer des ovaires. Aussi, l'activité d' $ERR\gamma$ peut être plus facilement inhibée par les traitements anticancéreux (par exemple, la molécule 4-OHT notamment utilisée dans les thérapies contre le cancer du sein). $ERR\alpha$ est, quant à lui, un marqueur tumoral défavorable et est responsable de la progression tumorale rapide et foudroyante de la maladie se traduisant par une durée de vie moyenne des patientes plus courte comparée à celle des cas $ERR\gamma$ -positifs (Sun *et al.*, 2005).

Les niveaux d'expression des isotypes d'ERR pour différents cancers sont résumés dans le tableau 2.

Tumeurs cancéreuse	$ERR\alpha$	$ERR\beta$	$ERR\gamma$
Ovaires <i>Niveau d'expression</i> <i>Corrélié à</i>	Haut Survie diminuée	<i>n.d.</i>	Haut Survie prolongée
Colon <i>Niveau d'expression</i> <i>Corrélié à</i>	Haut Etat aggravé	<i>n.d.</i>	Bas (pas différences entre les états normal et cancéreux)
Endomètre <i>Niveau d'expression</i> <i>Corrélié à</i>	Haut Etat aggravé et invasif	Bas	Bas
Prostate <i>Niveau d'expression</i> <i>Corrélié à</i>	Haut Cancer avancé	Bas	Bas (pas différences entre les états normal et peu avancé du cancer)
Sein <i>Niveau d'expression</i> <i>Corrélié à</i>	Haut Mauvais diagnostic	<i>n.d.</i>	Moyen Issue favorable

Tableau 2 : Niveau d'expression des isotypes d'ERR pour différents cancers

2.5.2. Diabète de type II

Le diabète de type II, ou diabète non insulino-dépendant, se caractérise par un dysfonctionnement mitochondrial. En effet, des défaillances au niveau de la chaîne d'oxydation des acides gras, en l'occurrence une dérégulation des enzymes le gouvernant, induit une augmentation des métabolites intracellulaires coenzyme A et diacylglycérol. Les voies de signalisation en aval étant dérégulées, l'absorption du glucose via le transporteur membranaire Glut 4 est alors fortement diminuée. De plus, l'expression du panel de gènes mitochondriaux impliqués dans la chaîne de phosphorylations oxydatives étant sous-régulée, l'exocytose des vésicules d'insuline dans les cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques en est impactée (Lowell *et al.*, 2005). La restauration de l'expression de ces gènes est possible grâce à l'introduction de PGC-1 α de manière dépendante à la présence d'ERR α (Mootha *et al.*, 2003). ERR α ayant un effet négatif sur l'expression de la PEPCK intervenant dans la gluconéogenèse (Herzog *et al.*, 2006), il est intéressant de diminuer l'activité d'ERR α afin de normaliser le niveau de glucose plasmatique.

2.6. Les mécanismes structuraux d'activation d'ERR

2.6.1. ERR est doté d'une activité transcriptionnelle constitutive

Si la plupart des récepteurs sont capables d'agir en réponse à un signal hormonal, ERR est un récepteur nucléaire orphelin pour lequel aucun ligand naturel régulant son activité a été identifié à ce jour. Il possède toutefois une activité constitutive puisqu'il est entièrement capable d'assurer ses fonctions de facteur de transcription. La régulation de son activité se réalise alors par la liaison de multiples protéines corégulatrices et également par quelques modifications post-traductionnelles survenant sur les domaines modulaires de ERR.

La structure cristallographique des LBD d'ERR α avec le motif L3 de PGC-1 α révèle que ces derniers sont homodimériques et que chacun des monomères de LBD sont structurellement formés par douze hélices α antiparallèles et d'un feuillet β (figure 17a). Leur interface d'homodimérisation se caractérise par d'étroites interactions entre les hélices 9 et 10. La Gln407 réalise des liaisons hydrogènes avec l'Asp434 de l'autre monomère tout comme l'Arg411 avec l'Asp434 et l'Asn432 ainsi que l'Arg485 avec la Gln486. La Leu479 s'engage dans des interactions hydrophobes avec les Leu428, 478, et 481 du monomère voisin et la Pro482, dans des interactions Van der Waals avec la Pro482 (figure 17b) (Kallen *et al.*, 2004). La poche de liaison aux ligands du LBD d'ERR α est formée par les chaînes latérales aromatiques des phénylalanines 328 (H3), 495 (H11) et 510 (H12), ce qui fait d'elle une poche *apo* très hydrophobe et relativement encombrée avec un volume de seulement 100Å³ (figure 17c). Cette caractéristique serait due à la présence de la phénylalanine 328 qui correspond à une alanine chez ERR β , ERR γ et ER α (Chen *et al.*, 2001).

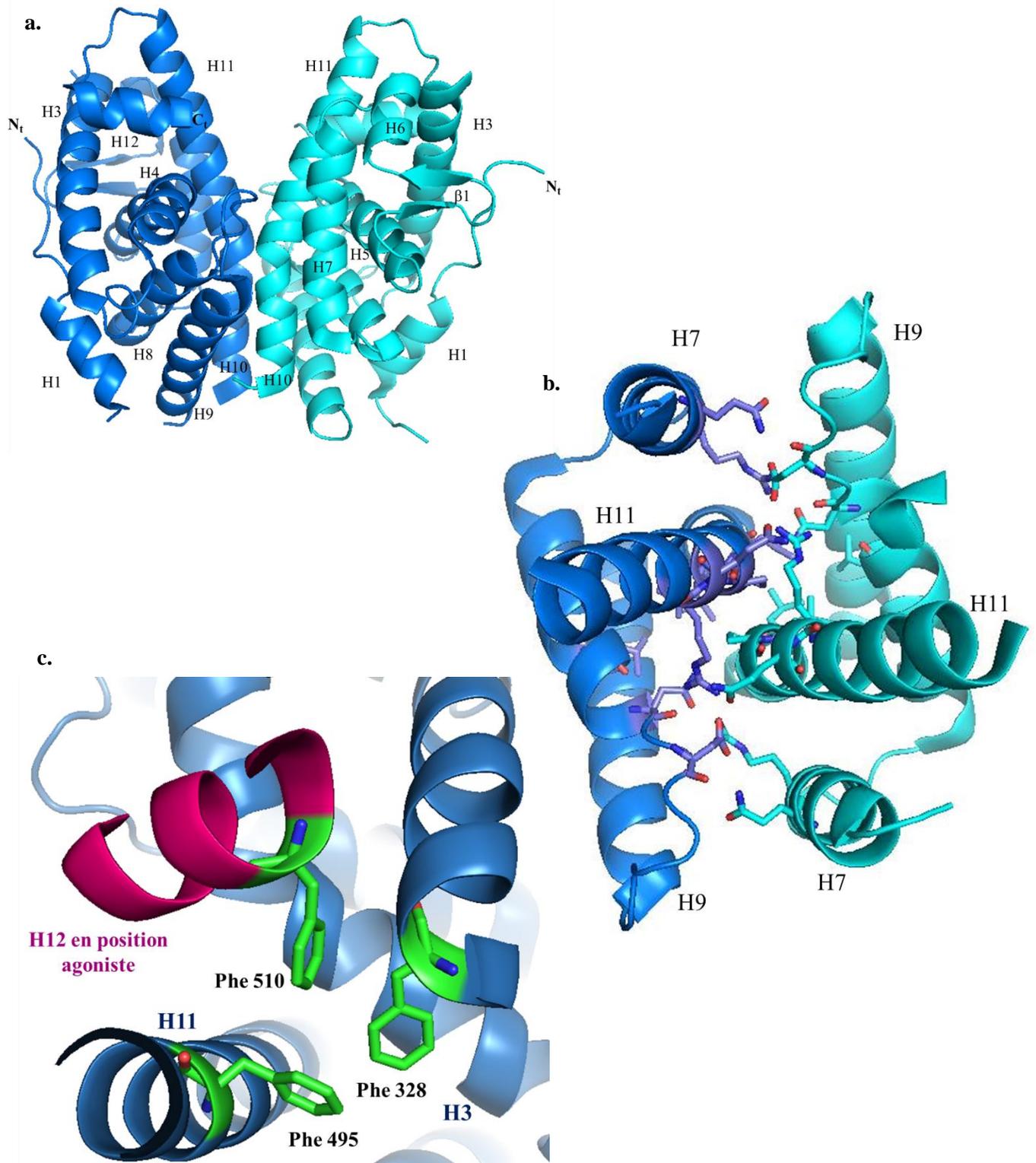


Figure 17 : Structure cristallographique du LBD homodimérique d'ERR α

a. Le LBD est constitué de 12 hélices α antiparallèles et de un feuillet β (s1-s2). L'interface d'homodimérisation est formée par les hélices 9 et 10. **b.** Interface d'homodimérisation entre LBDs vue du dessus **c.** La poche de liaison aux ligand de 100Å³ est totalement comblée par les chaînes latérales des Phe328 (H3), 495 (H11) et 510 (H12). De façon constitutive, l'hélice H12 se trouve en position agoniste.

2.6.2. Les bases structurales de la régulation de l'activité d'ERR α par PGC-1 α

PGC-1 α interagit avec ERR α au niveau de la région AF-2 du LBD et induit l'activation de la transcription. Par exemple, le complexe PGC-1 α /ERR α , en se liant sur le gène *mcad* sur un élément de réponse ERRE, induit l'expression de la protéine correspondante impliquée dans la production d'énergie mitochondriale dans les cellules cardiaques où PGC-1 α , ERR α et MCAD sont fortement exprimés de façon simultanée (Huss *et al.*, 2002). L'interaction entre PGC-1 α et ERR α se fait préférentiellement avec le motif inversé LXXLL L3 (LLXYL), véritable médiateur de cette interaction se caractérisant par une constante de dissociation K_d de 0,6 μ M pour le peptide ²⁰⁵RPASELLKYLT²¹⁶ (Huss *et al.*, 2002 ; Kallen *et al.*, 2004). La délétion de ce motif se traduit en effet par une perte totale de l'interaction et de l'expression génique en aval. Les motifs L1 et L2 permettent, quant à eux, de renforcer les interactions et la stabilité du complexe PGC-1 α /ERR α (Huss *et al.*, 2002). Pour des fragments plus longs de PGC-1 α contenant les trois motifs LXXLL, la liaison sur un homodimère de LBD d'ERR s'opère de manière asymétrique uniquement sur l'un des LBD. Sur de tels fragments de PGC-1 α , la liaison à très haute affinité s'opère via le motif principal L3 (K_d respectifs de 62nM et 47nM pour ERR α et ERR γ) alors que le motif L2 participe au renforcement de la liaison à haute affinité car la mutation de ce dernier induit une perte conséquente de l'affinité pour ERR α et ERR γ dont les K_d sont alors respectivement de 119 nM et 91 nM (Takacs *et al.*, 2013).

La structure cristallographique des LBD d'ERR α avec le motif L3 de PGC-1 α révèle que ces derniers sont homodimériques et que chacun des monomères de LBD est structuralement formé par douze hélices α antiparallèles et d'un feuillet β (figure 18a). Cette structure (*PDB IXB7*) révèle que le peptide de PGC-1 α (²⁰⁵RPASELLKYLT²¹⁶), dont la cystéine a été mutée en alanine, adopte une structure en hélice α amphipathique et forme une pince électrostatique avec les résidus Lys340 et Glu512 situés respectivement sur les hélices 3 et 12 du LBD (Renaud *et al.* 2000). Le sillon d'interaction aux coactivateurs est formé par les hélices 3, 4 et 12. En effet, par son côté hydrophobe (formé par les chaînes latérales hydrophobes Leu210, Leu211, Tyr213, Leu214 et amphipathiques Glu209, Thr21), les Leu210 et Leu214 constituant le motif L3 LLXYL sont ancrées dans le sillon d'interaction avec le LBD en réalisant des interactions de Van der Waals respectivement avec l'Ile336 (H3), la Met354 (H4), la Glu512 (H12) et la Met513 (H12), et avec la Lys340 (H3), la Phe345 (H4), la Gln353 (H4), la Met354 (H4) et la Leu357 (H4) (figure 18b) (Kallen *et al.*, 2004).

Une autre structure du complexe entre le LBD d'ERR α et le motif L3 de PGC-1 α publiée en 2008 (Greschik *et al.*, 2008) dévoile quelques interactions additionnelles que réalise le peptide de PGC-1 α de séquence ¹⁹⁸QQQKPQRRPCSELLKYLTND²¹⁹ contenant le motif L3 avec la boucle H8/H9 du LBD. En effet, les résidus amino-terminaux du motif LXXYL forment des contacts avec les hélices H4 et H12 mais également avec la boucle H8/H9. L'Arg205 du peptide PGC-1 α réalise une liaison hydrogène médiée par une molécule d'eau avec la Ser337 de la boucle H8/H9 et deux autres liaisons hydrogène avec l'Ala420 (H12) et la Gln262 (H4). En plus d'empêcher l'homodimérisation d'ERR α entier sur l'ADN, des mutations dirigées au sein de cette boucle H8/H9 causent aussi une perte de l'interaction de PGC-1 α soulignant l'importance de cette dernière dans les mécanismes d'activation d'ERR α . De plus, la chimère contenant la boucle issue d'ER α permet de tirer les mêmes conclusions ce qui témoigne de son importance pour la discrimination entre ERR α et ER α (figure 18c).

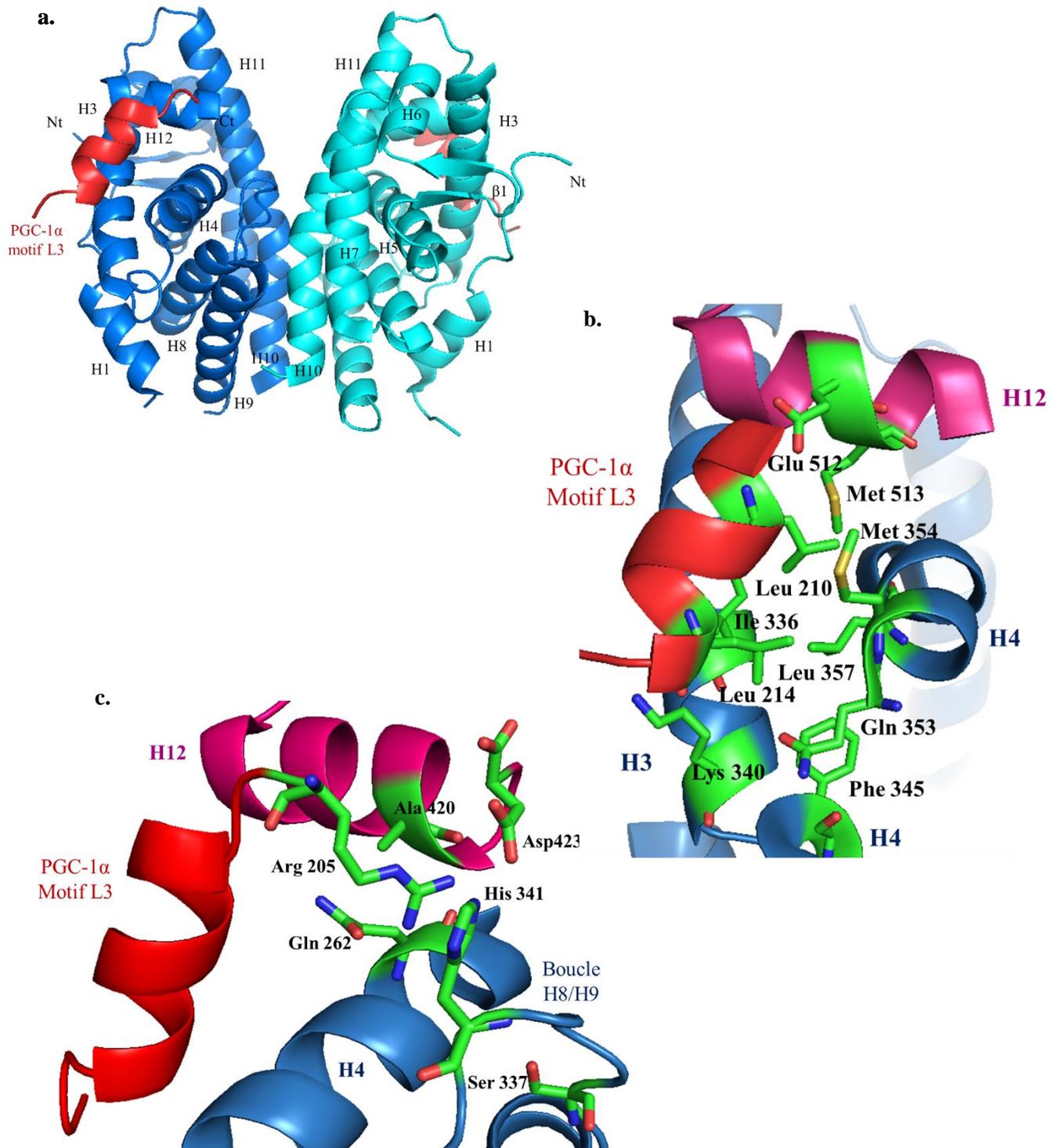


Figure 18 : Structure cristallographique du complexe $ERR\alpha$ /PGC-1 α (PDB 1XB7)

a. Homodimère des LBD de $ERR\alpha$ en interaction avec le motif L3 de PGC-1 α lié au sillon d'interaction hydrophobe des coactivateurs. **b.** Bases moléculaires de liaison de PGC-1 α dans le sillon d'interaction aux coactivateurs. Les Leu210 et Leu214 du motif L3 LLXYL (le peptide PGC-1 α est représenté en rouge) interagissent avec les chaînes latérales des résidus des hélices H3, H4 et H12 (les résidus impliqués sont représentés en vert). **c.** Détails de l'interaction de PGC-1 α avec la boucle H8/H9 du LBD de $ERR\alpha$ (PDB 3D24)

2.6.3. L'hélice H12 d'ERR α dicte la conformation agoniste ou antagoniste

Un modèle décrivant la mécanique de l'hélice d'activation H12 indique que cette dernière alterne entre les positions agoniste et antagoniste de manière ligand-dépendante. En effet, la comparaison des structures du LBD de RXR en conformation *apo* et *holo* avec le ligand agoniste acide 9-cis-rétinoïque (9CR) montre que l'hélice H12 du LBD *apo* se trouve connectée aux hélices H1 et H3, alors que dans le cas du LBD *holo* ayant fixé le 9CR, elle adopte une nouvelle position où elle participe à la formation d'un sillon de liaison aux coactivateurs formé alors par les hélices H3, H4 et H12. Ces mécanismes d'activation par l'hélice H12 retrouvés chez d'autres RN suggère qu'il existe un équilibre entre l'état où H12 est stabilisée en conformation *apo* et l'état où elle est déplacée et stabilisée par la liaison d'un ligand (figure 19) (Egea *et al.*, 2000).

ERR étant orphelin, son cas est particulier. Étant donné qu'il ne lie pas de ligand agoniste (selon ce qui est connu à ce jour), il se trouve par défaut dans un état constitutivement actif où son l'hélice H12 participe à la composition de la poche de liaison aux ligands (figure 17c). Elle contribue également à la formation du sillon de liaison aux coactivateurs où se lie PGC-1 α . Ainsi, cet état *apo* du LBD d'ERR est différent de celui décrit pour RXR. La conformation *holo* du LBD d'ERR est quant à elle décrite dans les structures cristallographiques où la liaison des ligands antagonistes induit un basculement de l'hélice H12 qui s'accommode dans le sillon de liaison aux coactivateurs pour en empêcher la liaison. L'hélice H12 se caractérise par un comportement spatial très dynamique et se comporte ainsi en véritable interrupteur *on/off* de l'activité transcriptionnelle de ERR α . Les détails moléculaires de l'induction de cet état antagoniste seront décrits plus loin dans cette introduction pour le ligand cyclohexylmethyl-(1-p-tolyl-1H-indol-3-ylmethyl) ou composé 1a (Kallen *et al.*, 2007). Notamment, il est intéressant de constater que les mécanismes d'antagonisme sont différents entre ERR α et ERR γ . En effet, en conformation *apo* et en interaction avec le motif LXXLL du coactivateur SRC-1, l'hélice H12 de ERR γ se trouve en conformation agoniste (de la même position que pour ERR α) et interagit avec le peptide SRC-1 pour le stabiliser dans le sillon. En présence des ligands 4-OHT ou DES, la Phe435 (correspondant à la Phe495 chez ERR α) subit une importante rotation vers l'extérieur de la poche de liaison aux ligands et se retrouve face à l'hélice H12 qui, pour éviter toute gêne stérique, se dissocie du LBD qui est alors incapable de recruter un coactivateurs (Greschik *et al.*, 2004).

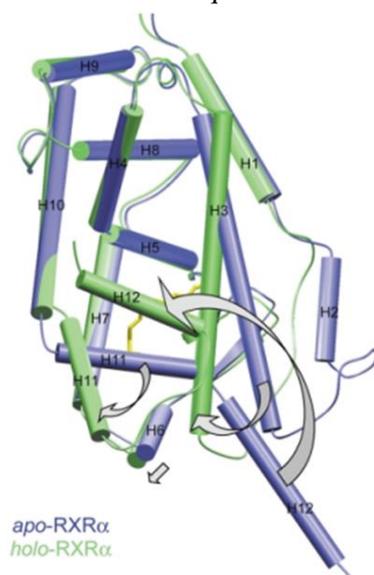


Figure 19 : Changement conformationnel de l'hélice H12 induit par la liaison d'un ligand agoniste sur le LBD de RXR.

Le positionnement induit de H12 en position agoniste permet la formation du sillon de liaison aux coactivateurs. Les flèches illustrent les déplacements des hélices H3, H6, H11 et H12. (Egea *et al.*, 2000)

Comment ERR peut basculer de son état constitutivement actif à un état de répression ? Des explications quant à la mécanique structurale régissant cet événement ont été apportées pour d'autres RN comme RAR dont l'interaction de son LBD avec NCoR en complexe avec l'agoniste inverse BMS493 soulève un mode d'interaction intéressant. Bien qu'occupant le sillon d'interaction aux coactivateurs dans le cas de l'inhibition par un ligand antagoniste, l'hélice H12 n'adopte pas de position définie et présente un dynamisme important. De plus, le peptide utilisé issu de NCoR et contenant le motif d'interaction aux RN se structure en hélice α au niveau de sa partie carboxy-terminale qui s'insère dans le sillon d'interaction aux coactivateurs. Son côté amino-terminal s'engage dans un feuillet β antiparallèle avec l'extrémité carboxy-terminale de l'hélice H11 (figure 20) (Le Maire *et al.*, 2010).

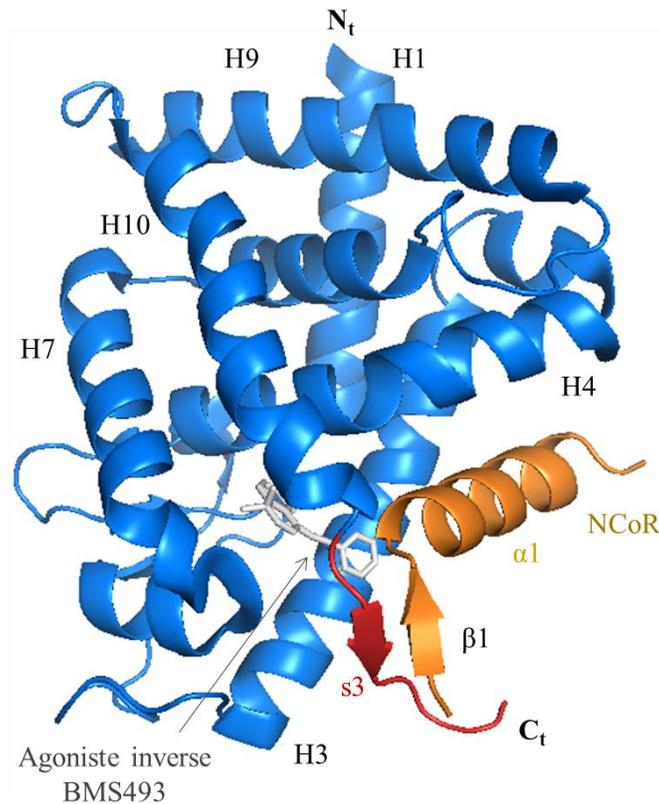


Figure 20 : Structure du LBD de RAR en complexe avec le corépresseur NCoR et le ligand agoniste inverse BMS493 (PDB 3KMZ)

NCoR occupe le sillon de liaison aux coactivateurs son association se traduit par la formation du feuillet $\beta 1$ entre sa partie amino-terminale et l'extrémité carboxy-terminale de l'hélice H11.

La comparaison avec l'effet de la liaison d'un ligand antagoniste sur le LBD souligne l'existence de réarrangements structuraux différents selon que le ligand soit antagoniste ou agoniste inverse comme en témoigne l'étude de la structure du LBD de PPAR α avec le corépresseur SMRT (*Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptors*) qui contient également des motifs hydrophobes d'interactions de type I/LXXII. La structure cristallographique du complexe PPAR α -LBD/SMRT stabilisé par le ligand antagoniste GW6471 indique que le motif d'interaction de SMRT adopte une structure en hélice α en s'insérant dans le sillon hydrophobe formé par les hélices 3, 4 et 12 alors que l'extrémité carboxy-terminale

de l'hélice H11 reste parfaitement structurée. Cette structure illustre le repositionnement de l'hélice H12 en conformation antagoniste qui interagit faiblement avec l'hélice H3 en libérant l'espace nécessaire pour accommoder le peptide de SMRT dans le sillon d'interaction aux coactivateurs (Xu *et al.*, 2002). La superposition de cette structure antagoniste de PPAR α /SMRT avec la structure agoniste PPAR γ /SRC-1 révèle que le site de liaison de SMRT correspond partiellement au sillon de liaison du coactivateur SRC-1 (figure 21) (Sierra *et al.*, 2007).

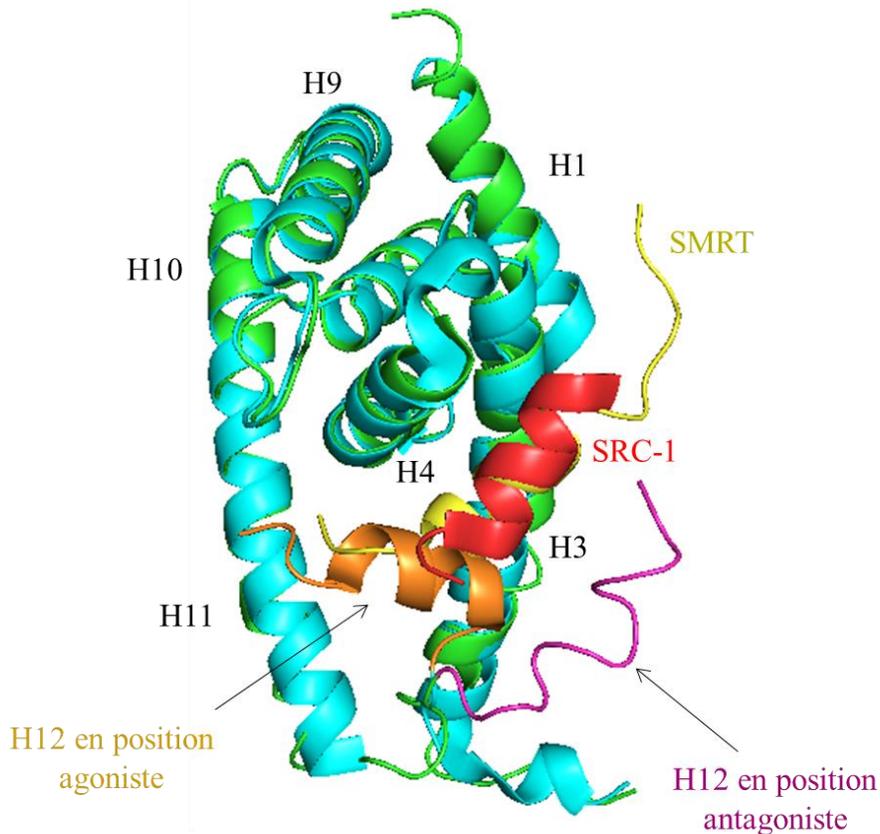


Figure 21 : Superposition des structures du complexe PPAR γ /SRC-1 (PPAR γ en bleu et SRC-1 en rouge, *PDB 2P54*) avec le complexe PPAR α /SMRT (PPAR α en vert et SMRT en jaune, *PDB 1KKQ*)

En présence du coactivateur SRC-1, l'hélice H12 se positionne en position agoniste alors que la liaison de corépresseur SMRT dans le sillon de liaison aux coactivateurs induit sa déstructuration globale et sa faible interaction avec l'hélice H3.

2.7. L'interface protéo-nucléotidique ERR/ERRE

2.7.1. L'organisation du domaine DBD d'ERR

Le *core* DBD est formé des deux structures en doigts de zinc C₄C₄ où deux atomes de zinc sont coordonnés chacun par quatre résidus cystéine. Ces doigts de zinc s'organisent en hélices α 1 et α 2 orientées perpendiculairement lorsque le DBD est lié à son élément de réponse où α 1 est génériquement appelée hélice de reconnaissance car elle se lie sur les demi-sites des éléments de réponse au niveau du grand sillon de l'ADN. Les deux régions appelées *P-box* et *D-box* sont variables entre les différents RN. Alors que, la *P-box* est connue pour reconnaître et interagir avec les demi-sites, la *D-box* réalise le plus souvent des interactions entre monomères de DBD pour permettre leur dimérisation coopérative (Zhao *et al.*, 1998 ; Schwabe *et al.*, 1993).

L'extension du côté carboxy-terminale CTE commence après les deux résidus conservés glycine et méthionine (GM) qui terminent le *core* DBD. Les résidus de la CTE sont cruciaux pour la reconnaissance de l'ADN par les récepteurs orphelins, pour réaliser des interactions de haute affinité. Par exemple, les récepteurs Rev-Erb, SF-1 ou NGFI-B sont dotés au sein de leur CTE d'un motif appelé GRIP (pour les acides aminés G, R, I et P) qui interagit avec l'extension 5' au niveau du petit sillon permettant la stabilisation d'un monomère de DBD sur un demi-site étendu (Zhao *et al.*, 1998). Chez ERR, les régions *T-box* et *A-box* de la CTE correspondent à ces résidus et renforcent la stabilisation de forte affinité d'un DBD sur son élément de réponse. Par exemple, la *A-box* correspond au motif GRIP chez NGFI-B et assure son interaction avec les bases AT de l'extension 5' (figure 22) (Meinke *et al.*, 1999).



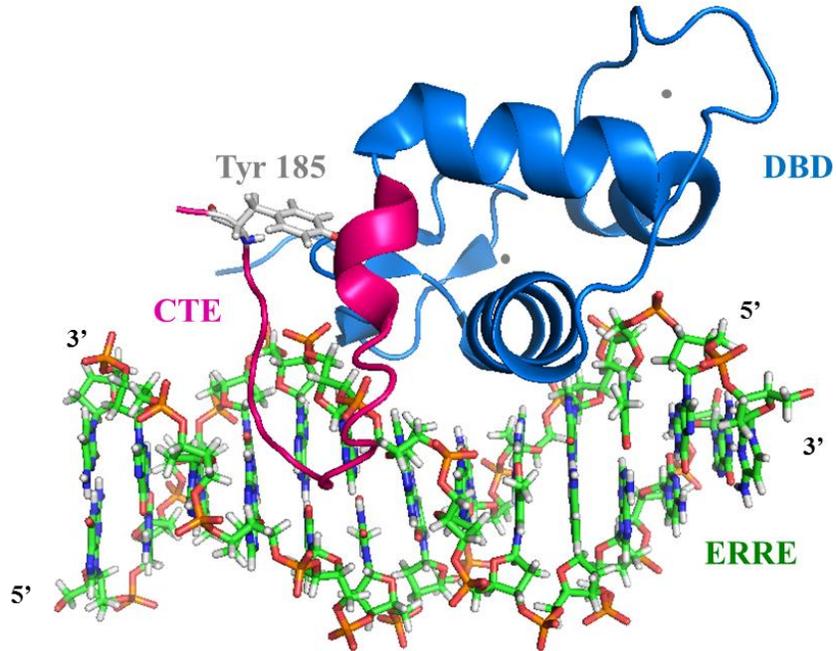
Figure 22 : Alignement des séquences des DBD et des CTE des membres des familles d'ERR et ER. Les cystéines coordonnant l'atome de zinc au sein des deux structures secondaires en doigt de zinc sont surlignées en jaune. La tyrosine de la CTE en interaction avec la poche hydrophobe du DBD est également surlignée en orange. Les résidus basiques de la CTE en interactions avec le petit sillon de l'ADN sont surlignés en bleu. Les différentes séquences remarquables *P-box*, *D-box*, *T-box* et *A-box* participant à la structuration du DBD sur l'ADN sont indiquées. Les structures secondaires adoptées par les différentes régions du DBD sont précisées sous l'alignement de séquence. Adapté de Gearhart *et al.* 2003.

2.7.2. Les bases moléculaires de l'interaction ERR/ERRE

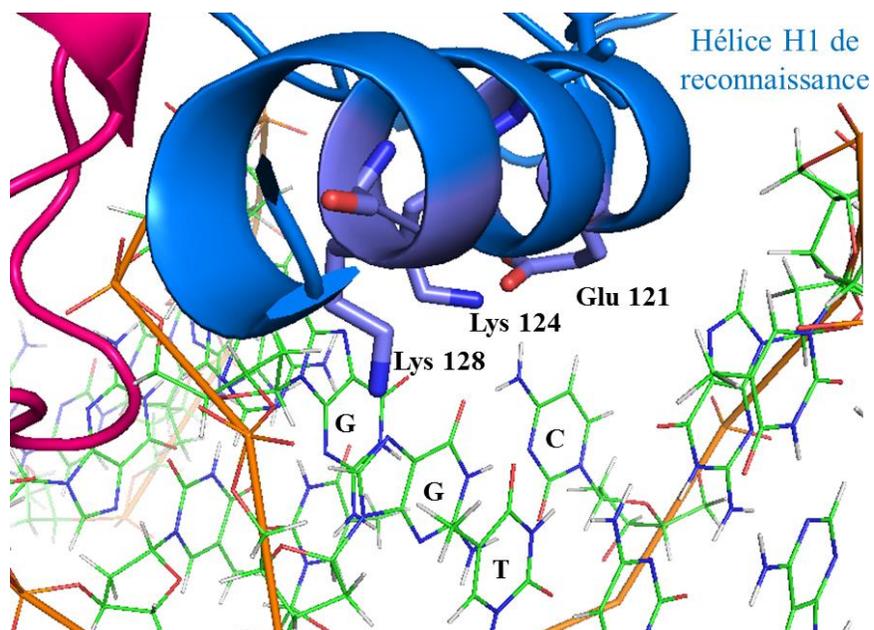
La seule structure de DBD d'ERR connue à ce jour est une structure RMN en solution sur un oligonucléotide de treize paires de bases $5'$ -GCTCAAGGTCACG $^{-3'}$ contenant un demi-site étendu ERRE $5'$ -TCAAGGTCA $^{-3'}$. Le *core* DBD représenté en bleu sur la figure 23a interagit via sa première hélice α , appelée hélice de reconnaissance, avec le grand sillon de l'ADN où se situe le demi-site $5'$ -AGGTCA $^{-3'}$ et forme un angle de 60° avec l'axe de l'ADN. Cette hélice de reconnaissance est engagée dans des interactions spécifiques entre ses chaînes latérales des résidus Glu121, Lys124 et Lys128 et les bases nucléotidiques G8, G7 et G8, et T9 respectivement (figure 23b). Elle réalise également des contacts électrostatiques et des liaisons hydrogènes avec le squelette phosphate en impliquant les résidus Tyr115, Arg129, Gln132, Arg152, Gln156, Arg174 et Arg177 contribuant ainsi à renforcer la liaison du DBD avec l'ADN (figure 23d). La partie CTE, quant à elle, est hautement flexible en solution comme le montre les analyses de RMN où les déplacements chimiques NOE sont assimilables à une structure non-ordonnée. La présence d'ADN lui permet de réaliser des interactions dans le petit sillon constitué de l'extension $5'$ -TCA $^{-3'}$ en $5'$. En effet, les résidus constituant la région *T-box* allant de la Lys170 à la Val173 s'organisent en hélice 3_{10} et cette Val173 s'insère entre la Phe127 et l'Ile131 de l'hélice de reconnaissance du DBD. Le motif RGGR de la *A-box* (résidus Arg179, Gly180, Gly181 et Arg182) sont totalement insérés dans le petit sillon pour y interagir spécifiquement avec les bases nucléotidiques (figure 23c et 23d). De plus, la tyrosine 185 est insérée dans une poche hydrophobe à la surface du DBD formée entre les résidus conservés GM et le motif *T-box*. La substitution de cette tyrosine par une alanine induit une chute drastique de l'interaction avec l'ADN se traduisant par une constante de dissociation passant de 7,1 nM à 44,0 nM (Gearhart *et al.*, 2003). Ceci

souligne ainsi l'importance de l'extension CTE et les étroits contacts qu'elle réalise avec les structures du *core* DBD pour garantir une association de haute affinité entre le DBD et son élément de réponse ERRE en permettant une réelle cohésion de ce complexe.

a.



b.



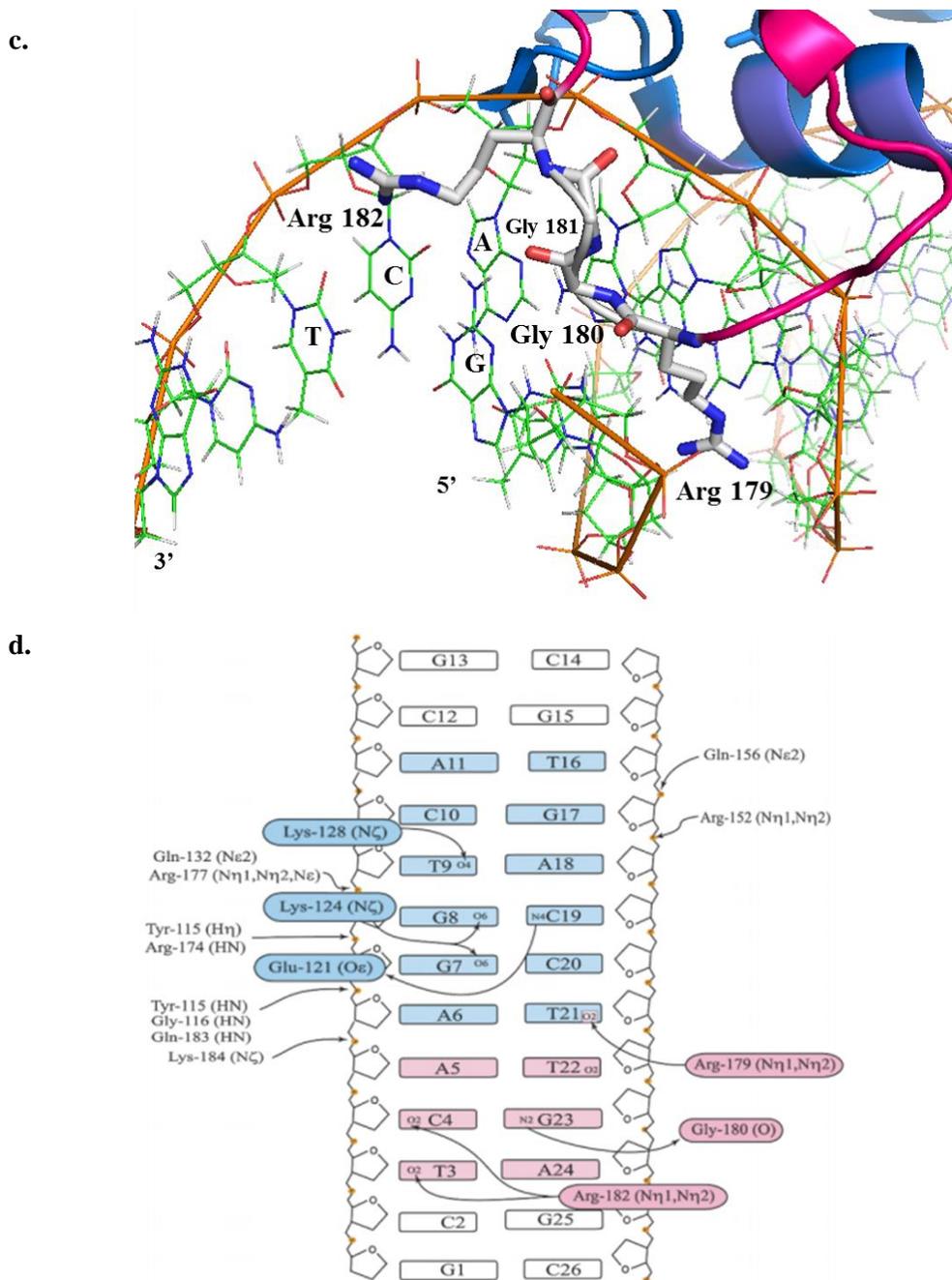


Figure 23 : Bases moléculaires de l'interaction entre ERRβ et son élément de réponse ERRE

a. Structure RMN en solution du complexe DBD/ERRE. Le résidu tyrosine 185 de la CTE interagit avec la poche hydrophobe du DBD pour stabiliser le complexe. Les atomes de zinc sont représentés par les deux points gris. **b.** L'hélice de reconnaissance H1 du DBD (bleu) est en interaction avec le grand sillon où se situe le demi-site étendu $5'$ -AGGTCA $^{-3'}$. Les résidus Glu121, Lys124 et Lys128 interagissent respectivement avec les bases C19, G7 et G8, et T9. **c.** L'extension CTE (rose) interagit avec le petit sillon via son motif RGGR de *A-box* ancré dans le petit sillon. Les résidus Arg179, Gly180 et Arg182 interagissent respectivement avec les bases T21, G23, et T3 et C4. **d.** Détails des contacts intermoléculaires à l'interface protéo-nucléotidique entre ERR et son élément de réponse ERRE $5'$ -TCAAGGTCA $^{-3'}$ au niveau du grand sillon (bleu) et du petit sillon (rose).

2.7.3. Seul le mode d'interaction du core DBD est conservé pour tous les types de HRE

2.7.3.1. Sur un demi-site $5'$ -AGGTCA $^{-3'}$: comparaison avec l'homodimère stéroïdien ER

La comparaison de cette structure du DBD monomérique d'ERR β sur son ERRE avec la structure cristallographique des DBD du récepteur homodimérique stéroïdien ER sur un élément de réponse IR3 soulève quelques caractéristiques intéressantes quant à l'archétype de la surface d'interaction ERR/ERRE. Alors que des études par RMN montrent que le DBD d'ER est monomérique en solution (Nardulli *et al.*, 1991), la structure cristallographique d'ER révèle une liaison d'un homodimère de DBD sur un élément de réponse IR3 $5'$ -AGGTCACAGTGGACCT $^{-3'}$ démontrant une interdépendance de ces derniers pour leur homodimérisation coopérative. L'interface de dimérisation des DBD orientés en tête-à-tête est formée par le motif *D-box* 45 -PATNQ $^{-48}$ où l'Ala45 réalise des contacts de Van der Waals avec le même résidu du monomère voisin. La Thr50 d'un des monomères réalise des liaisons hydrogènes avec la Pro44 de l'autre monomère, tout comme la Ser58 avec la Met42 et les Thr46 entre elles. Comme pour le DBD d'ERR, les hélices amphipatiques $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont disposées perpendiculairement l'une par rapport à l'autre et chacun des DBD d'ER interagit avec un demi-site grâce aux résidus de son hélice de reconnaissance Glu25, Lys28, Lys32 et Arg33 en réalisant des liaisons hydrogènes avec les paires de bases (*PDB 1HCQ*) (figure 24). Ces résidus sont également conservés chez ERR et réalisent les mêmes types d'interactions dans le grand sillon. Alors que l'extension CTE du DBD d'ERR permet un réel ancrage de la protéine sur son élément de réponse, l'extrémité C-terminale du DBD d'ER ne réalise aucun contact avec l'ADN et ne semble pas participer à la stabilisation des DBD sur l'IR3 (Schwabe *et al.*, 1993).

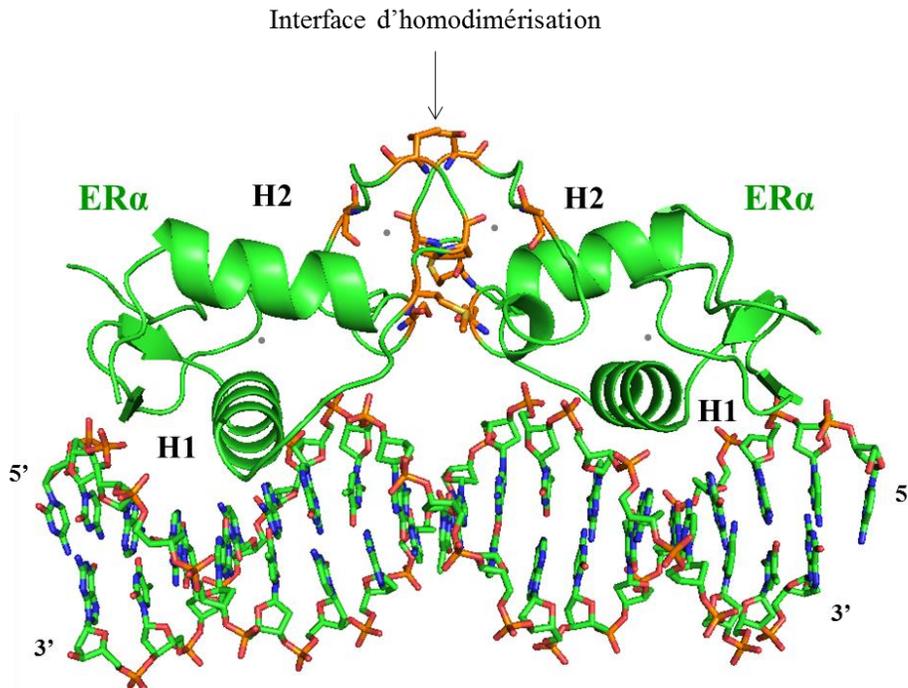


Figure 24 : Bases moléculaires de l'interaction entre ER α et son élément de réponse IR3

Les hélices de reconnaissance H1 de chacun des DBD interagissent avec le grand sillon où se situe le demi-site étendu $5'$ -AGGTCA $^{-3'}$ identique à celui du ERRE. Les résidus de la *D-box* impliqués formant l'interface d'homodimérisation sont représentés en orange.

2.7.3.2. Sur un demi-site $5'$ -AGAACA $^{-3'}$: comparaison avec l'homodimère oxo-stéroïdien MR

Dans le cas des récepteurs homodimériques oxo-stéroïdiens qui reconnaissent des HRE IR3 contenant les demi-sites $5'$ -AGGTCA $^{-3'}$, la structure globale adoptée par le *core* DBD et son hélice de reconnaissance reste identique. Toutefois, afin de se lier spécifiquement à son demi-site $5'$ -AGAACA $^{-3'}$ plutôt qu'au $5'$ -AGGTCA $^{-3'}$, les déterminants structuraux d'interactions dans le grand sillon diffèrent de ceux d'ER et ERR. Par exemple, le récepteur MR, sur le GRE-IR3 $3'$ -TCTTGTCTCACAAGA $^{-5'}$, se lie à son demi-site du grand sillon notamment via des interactions entre la Lys624 et la G3 et entre la Val25 et l'Arg629 respectivement avec les T13 et G12 du brin complémentaire. Comme pour ER, l'extrémité carboxy-terminale du DBD de MR ne réalise pas de contacts avec l'ADN et ne semble pas participer à la stabilisation des DBD sur l'IR3 (*PDB 4TNT*) (figure 25) (Hudson *et al.*, 2014).

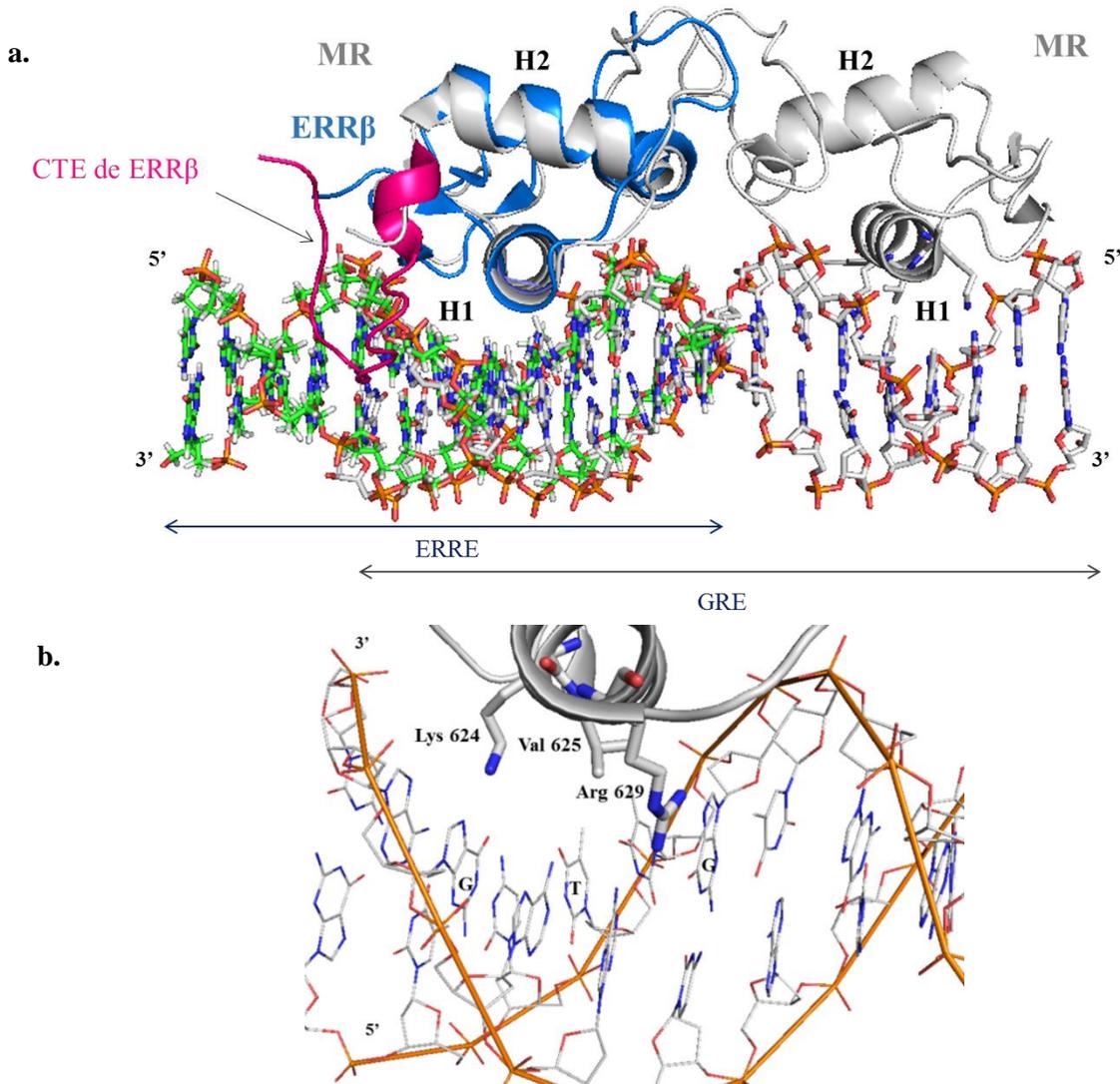


Figure 25 : Le *core* DBD d'ERR interagit avec le demi-site du grand sillon de la même manière que MR mais avec des déterminants structuraux différents

a. Superposition du complexe ERRβ/ERRE (ERRβ en bleu et ERRE en vert, *PDB 1LO1*) avec l'homodimère de MR sur un GRE (représentés en gris, *PDB 4TNT*). **b.** L'hélice H1 interagit avec le demi-site $5'$ -AGAACA $^{-3'}$. Ses résidus Lys624, Val625 et Arg629 interagissent respectivement avec les bases G3, T13 et G12. Ces déterminants structuraux sont différents de ceux observés chez ER et ERR sur leurs demi-site $5'$ -AGGTCA $^{-3'}$.

2.7.3.3. Sur un demi-site $5'$ -AGGTCA $^{-3}$ en DR4 : l'hétérodimère TR β /RXR α

Pour comprendre l'implication de sa partie CTE dans la stabilisation sur l'ADN, la structure du DBD d'ERR β peut être comparée à l'hétérodimère des DBD de TR β /RXR α orientés en tête-à-queue sur un promoteur DR4 $5'$ -AGGTCATTTTCAGGTCA $^{-3}$ où RXR α occupe le demi-site en $5'$ (*PDB 2NLL*). La superposition du DBD d'ERR β sur le monomère de TR β montre que le positionnement du *core* DBD de ERR β correspond parfaitement avec celui de TR β sur un demi-site $5'$ -AGAACA $^{-3}$ où l'hélice de reconnaissance H1 réalise bien les mêmes interactions (également retrouvées chez ER). L'hélice 3_{10} est également présente chez TR β . Alors que la CTE d'ERR β interagit avec le petit sillon et est stabilisée fortement par les contacts hydrophobes de sa Tyr185 avec le *core* DBD, la partie carboxy-terminale de TR β traverse le petit sillon et se projette loin de l'ADN en se structurant en hélice α . La stabilisation de l'hétérodimère TR β /RXR α sur le DR4 est rendue possible grâce à des interactions électrostatiques entre la *D-box* de RXR α et la *T-box* TR β (figure 26) (Rastinejad *et al.*, 1995).

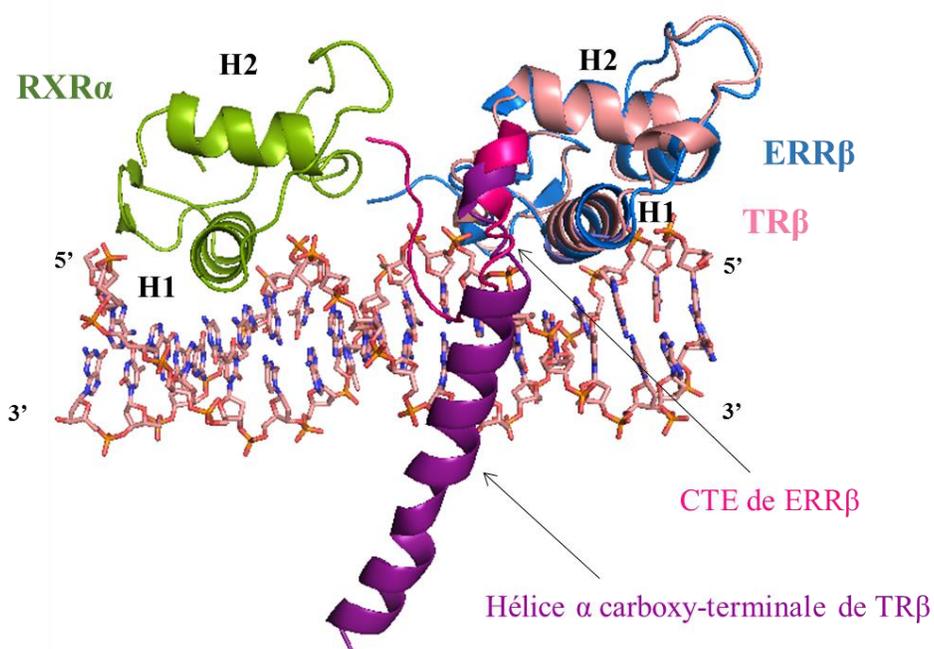


Figure 26 : Superposition du complexe ERR β /ERRE (*PDB 1LO1*) avec l'hétérodimère TR β /RXR α sur un DR4 (*PDB 2NLL*).

L'extrémité carboxy-terminale de TR β se structure en longue hélice α sans s'insérer dans le petit sillon comme la CTE d'ERR β .

De plus, la structure adoptée par le DBD d'ERR β sur son ERRE est très similaire en tous points à celle du DBD du récepteur orphelin NGFI-B qui se lie également sur un demi-site étendu sous forme monomérique et dont la partie CTE interagit avec l'extension en $5'$ du petit sillon (Meinke *et al.*, 1999). Alors que la stabilisation d'homo- ou d'hétérodimères sur un élément de réponse est permise par d'étroites interactions entre les DBD, la liaison d'un monomère de DBD sur un élément de réponse nécessite la présence des déterminants structuraux présents sur la CTE qui représente alors un véritable médiateur pour l'ancrage du DBD sur son demi-site et la cohésion de ce complexe.

Les nombreuses structures cristallographiques du domaine LBD d'ERR démontrent que ces derniers s'associent fortement sous forme homodimérique et représentent donc le vecteur d'homodimérisation du récepteur entier ERR. La structure RMN du DBD d'ERR β renseigne sur les bases moléculaires et les déterminants structuraux impliqués dans la stabilisation d'un DBD sur un ERRE. Ces observations

soulèvent néanmoins une problématique majeure quant à l'interface protéo-nucléotidique entre ERR et son élément de réponse ERRE. Si la présence d'un unique demi-site étendu suggère la liaison d'un seul DBD, comment se positionne le second DBD sur les promoteurs que régule ERR ? En absence d'un second demi-site de fixation, quel est son rôle dans la formation des complexes pro-transcriptionnels ? Ces questions restent à ce jour sans réponse et témoignent du caractère atypique d'ERR. De plus, étant donné l'implication de ce récepteur orphelin dans de nombreuses voies de signalisations énergétiques centrales à l'échelle cellulaire et dans un certain nombre de pathologies, il est capital de comprendre les bases moléculaires qui régissent son fonctionnement.

3. Modulation thérapeutique d'ERR α par des ligands synthétiques

3.1. La cible thérapeutique ERR α

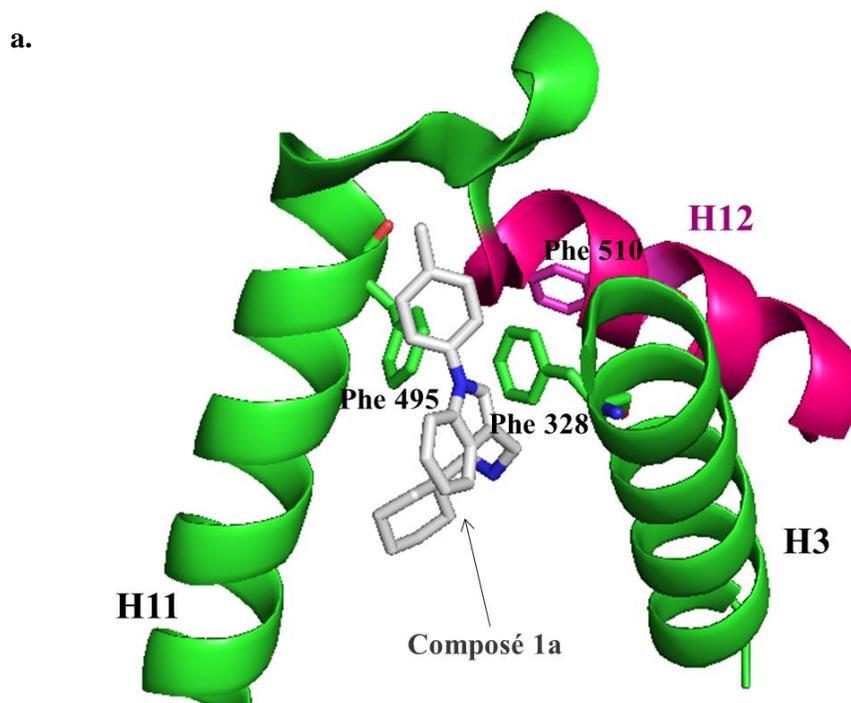
Les deux isotypes ERR α et ERR γ sont toutes les deux impliquées dans la régulation du métabolisme énergétiques. Leur dérégulation s'inscrit dans la caractérisation de nombreux phénotypes cancéreux. Cependant, dans les cas de cancers du sein les plus graves, ERR α est extrêmement surexprimé et les voies métaboliques énergétiques qu'il régule sont alors suractivées et favorisent la profération tumorale. ERR α travaille de concert avec ER α en stimulant un certain nombre de gènes stéroïdogéniques en commun. Le lien relativement étroit entre leurs voies de signalisation peut potentiellement expliquer les résistances aux antiestrogènes observées notamment pour les traitements des tumeurs ER α -positives. De plus, au sein de la famille des ERR, l'isotype α représente un objet d'étude attrayant quant à sa régulation par des ligands synthétiques. En effet, l'alignement des résidus composant sa poche de liaison aux ligands avec ceux d'ERR γ révèle la présence d'une alanine chez ERR γ correspondant à la phénylalanine 328 d'ERR α (cette alanine est également présente chez ERR β et ER α). L'encombrement de la poche d'ERR α par ses phénylalanines se traduit alors par un volume relativement petit par rapport à celui d'ERR γ , respectivement 100 Å³ et 230 Å³. Cette particularité d'ERR α se reflète sur sa capacité réduite à lier certains ligands synthétiques comme le 4-OHT ou le BPA alors que ERR γ en est capable. Il est toutefois nécessaire de pouvoir cibler l'activité d'ERR α , cible thérapeutique de premier plan, par des ligands étant donné son implication dans diverses pathologies.

In fine, ce sont ces particularités d'ERR α qui sont utilisées comme stratégie pour cibler spécifiquement son activité lorsqu'il est le protagoniste impliqué dans un diagnostic médical plutôt défavorable. C'est pourquoi, les bases moléculaires de l'antagonisme d'ERR α sont étudiées dans le cadre de mon projet afin d'apporter les connaissances indispensables qui, à plus long terme, serviront pour le *drug design* de composés thérapeutiques novateurs qui permettront de moduler très spécifiquement l'activité d'ERR α . A ce jour, plusieurs études par criblage HTS (*High Throughput Screening*) de banques de composés ont permis d'identifier des ligands antagonistes ciblant spécifiquement ERR α et qui sont incapables de se lier aux autres isotypes d'ERR. Des structures cristallographiques du LBD d'ERR α avec de tels ligands ont d'ailleurs été publiées dans la dernière décennie et dévoilent les mécanismes structuraux de l'antagonisme de ce récepteur (Kallen *et al.*, 2007 ; Patch *et al.*, 2011). Si ces structures apportent d'ores et déjà quelques bases moléculaires, il est néanmoins nécessaire de les compléter par des études avec d'autres ligands antagonistes tels que le XCT-790 afin d'apporter un panel plus important de connaissances pour mener à bien les futurs projets de *drug design*.

3.2. Les bases moléculaires de l'antagonisme d'ERR α par des ligands antagonistes, les structures cristallographiques connues

3.2.1. Le composé 1a

À l'état *apo*, l'hélice H12 se trouve en conformation agoniste car ERR α est constitutivement actif. Pour comprendre la mécanique du rôle joué par l'hélice H12, il est judicieux de comparer les structures des états *apo* (en présence de PGC-1 α) et *holo* (en présence d'un ligand antagoniste). Le composé 1a ((1-p-tolyl-1H-indol-3-ylméthyl)-amine) est un dérivé du composé 1b initialement identifié par HTS (tableau 3). La liaison de ce composé à la poche de liaison du LBD d'ERR α induit un déplacement des parties amino-terminale et carboxy-terminale respectivement des hélices H3 et H11 pour l'accommodation du ligand. La Phe328 adopte une nouvelle conformation qui a pour conséquence un déplacement de la Phe510 de l'hélice H12 afin d'éviter une gêne stérique avec la Phe328 (figure 27a). L'hélice H12 opère alors un important déplacement et adopte une nouvelle position en interagissant directement dans le sillon d'interaction aux coactivateurs ce qui ne permet plus la liaison de coactivateurs comme PGC-1 α (figure 27c). En effet, en conformation antagoniste les résidus Met513 et Met517 de l'hélice H12 réalisent des interactions hydrophobes pour stabiliser l'hélice dans le sillon de manière identique à ce qui a été observé pour PGC-1 α car les mêmes types d'interactions sont observées avec les deux Leu210 et Leu214 du motif L3 LLXYL pour stabiliser PGC-1 α dans le sillon d'interaction aux coactivateurs. La cohésion du complexe LBD/composé 1a est renforcée par une stabilisation de H12 dans ce sillon par des interactions électrostatiques entre la Lys508 (H12) et l'Asp329 (H3), et une liaison hydrogène entre la Met506 (H12) et la Gln358 (H4) (figure 27b) (Kallen *et al.*, 2007). Par conséquent, la position de H12 dans l'une de ces conformations est dictée par les Phe328 et Phe510 selon la liaison de PGC-1 α ou d'un ligand antagoniste.



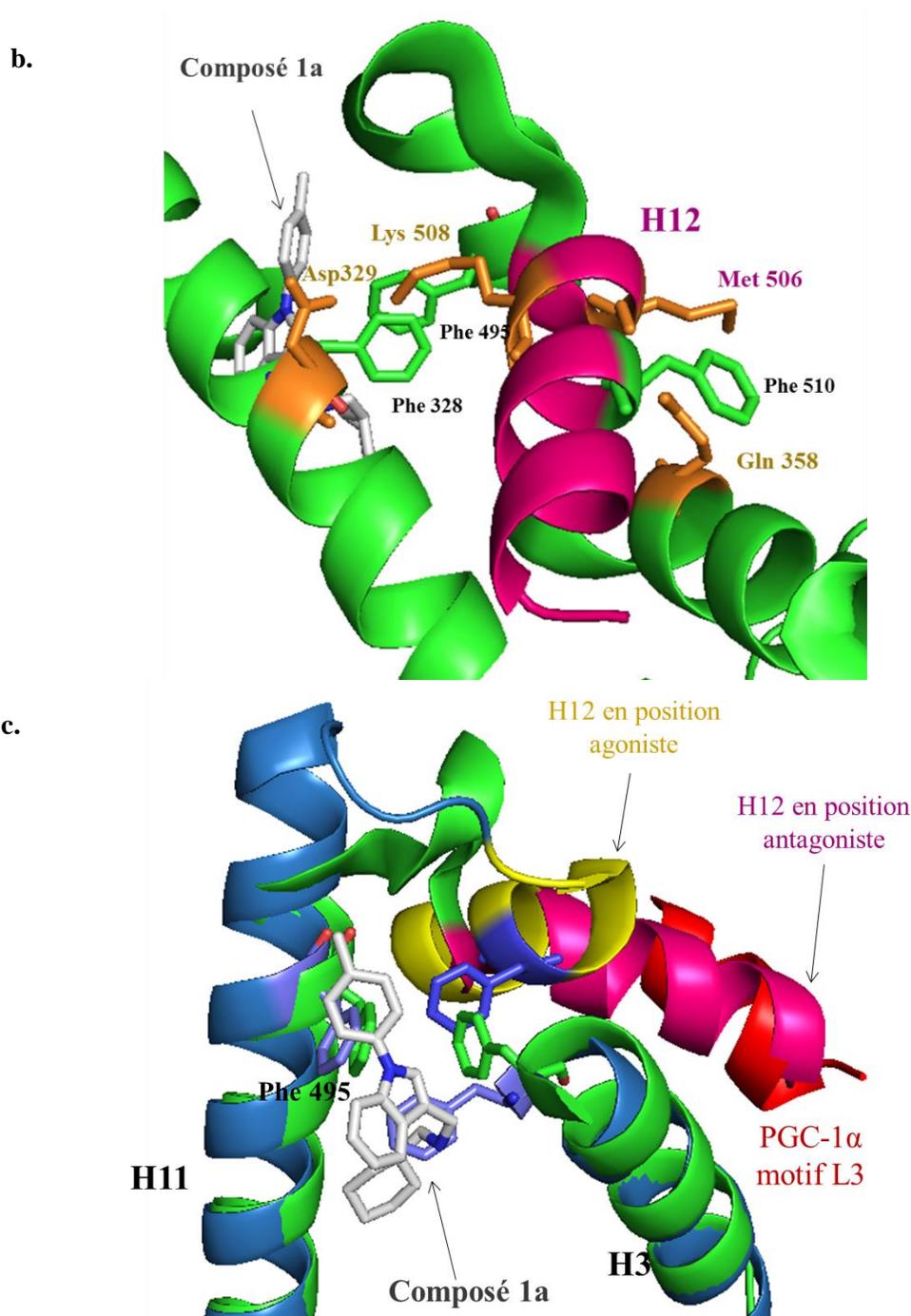


Figure 27 : Bases moléculaires de l'interaction du composé 1a dans la poche de liaison aux ligands du LBD d'ERR α (PDB 2PJJ)

a. Positionnement du composé 1a dans la poche de liaison aux ligands. Sa liaison induit un déplacement des phénylalanines de la poche. Les Phe495 (H11) et Phe328 (H3) réalisent des interactions π - π via leurs cycles aromatiques. Le Phe510 (H12) subit une rotation important induisant un déplacement important de l'hélice H12 en position antagoniste.

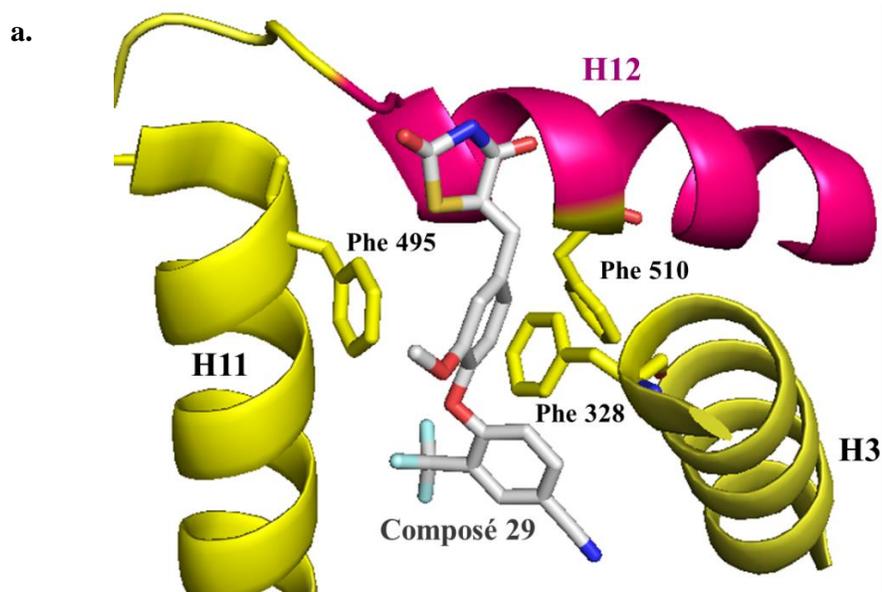
b. Stabilisation de l'hélice H12 en position antagoniste dans le sillon d'interaction aux coactivateurs. L'hélice H12 réalise des interactions électrostatiques entre la Lys 508 (H12) et l'Asp329 (H3) et une liaison hydrogène avec la Met506 (H12) et la Gln358 (H4).

c. Superposition des structures du complexe LBD/composé 1a (vert, PDB 2PJJ) et du LBD *apo* en interaction avec le coactivateur PGC-1 α (LBD en bleu et PGC-1 α en rouge, PDB 1XB7). En présence du ligand antagoniste, l'hélice H12 se positionne à la place du motif L3 de PGC-1 α et empêche la liaison de coactivateurs. Le mécanisme de passage à l'état antagoniste se caractérise notablement par une structuration de la boucle H11/H12

3.2.2. Le composé 29

Le composé 29 synthétique (4-[4-(2,4-Dioxothiazolidin-5-ylidèneméthyl)-2-méthoxyphénoxy]-3-trifluorométhylbenzonitrile) inhibe spécifiquement la liaison d'ERR α avec des protéines coactivatrices (tableau 3). Alors que l'IC₅₀ déterminé à partir de l'inhibition de la liaison entre un peptide de SRC2 et ERR α est de 40 nM, le composé 29 ne présente quasiment aucune efficacité sur ERR γ (IC₅₀ = 2,8 μ M), ER α et ER β (IC₅₀ > 6,3 μ M). Bien que pouvant se comporter comme agoniste pour ER α (IC₅₀ = 0,9 μ M) et ER β (IC₅₀ = 1,6 μ M), le composé 29 n'induit pas la prolifération cellulaire des cellules MCF-7 (E2-dépendantes) faisant de ce ligand un composé pertinent dans le traitement ciblé des cancers du sein. La co-cristallisation avec les LBD d'ERR α a permis de déterminer les bases moléculaires du mécanisme d'antagonisme par le composé 29 (*PDB 3K6P*). La poche de liaison contenant le composé 29 subit des réarrangements structuraux similaires à ceux du composé 1a. En effet, la Phe 328 de l'hélice H12 subit une rotation importante. Comparée à la conformation *apo*, l'hélice H11 est légèrement déplacée vers l'extérieur de la poche créant un élargissement de cette dernière du fait de la liaison du ligand (figure 28a et 28b). En présence du composé 29, la boucle H11-H12 subit une distorsion conséquente permettant de positionner l'hélice H12 dans une conformation antagoniste empêchant ainsi la liaison de coactivateurs protéiques. D'ailleurs, cette position correspond à la celle du peptide de PGC-1 α dans la conformation *apo* du LBD, lorsque ERR α est constitutivement actif (figure 28b) (Patch *et al.*, 2011).

En outre, la partie diaryl-éther du composé 29 se trouve enfouie dans la poche hydrophobe où elle réalise des interactions Van der Waals. Le cycle vanilloïde du composé 29 s'intercale entre les Phe495 et Phe328 et s'engage dans des interactions de stabilisations Van der Waals avec la Phe495. Ceci diffère de la structure avec le composé 1a où la liaison de ce dernier induit des interactions π - π entre les cycles aromatiques des Phe495 et Phe328. De plus, le groupement très hydrophobe trifluorométhyle CF₃, également présent dans le ligand XCT-790, est stabilisé par de nombreuses interactions avec les chaînes latérales des résidus Leu398 (boucle H6-H7), Val491 (H11), Leu405 (H6), Leu401 (H6), Val366 (H5), Met362 (H5), Phe495 (H11), et Met506 (H12) (figure 28c) (Patch *et al.*, 2011).



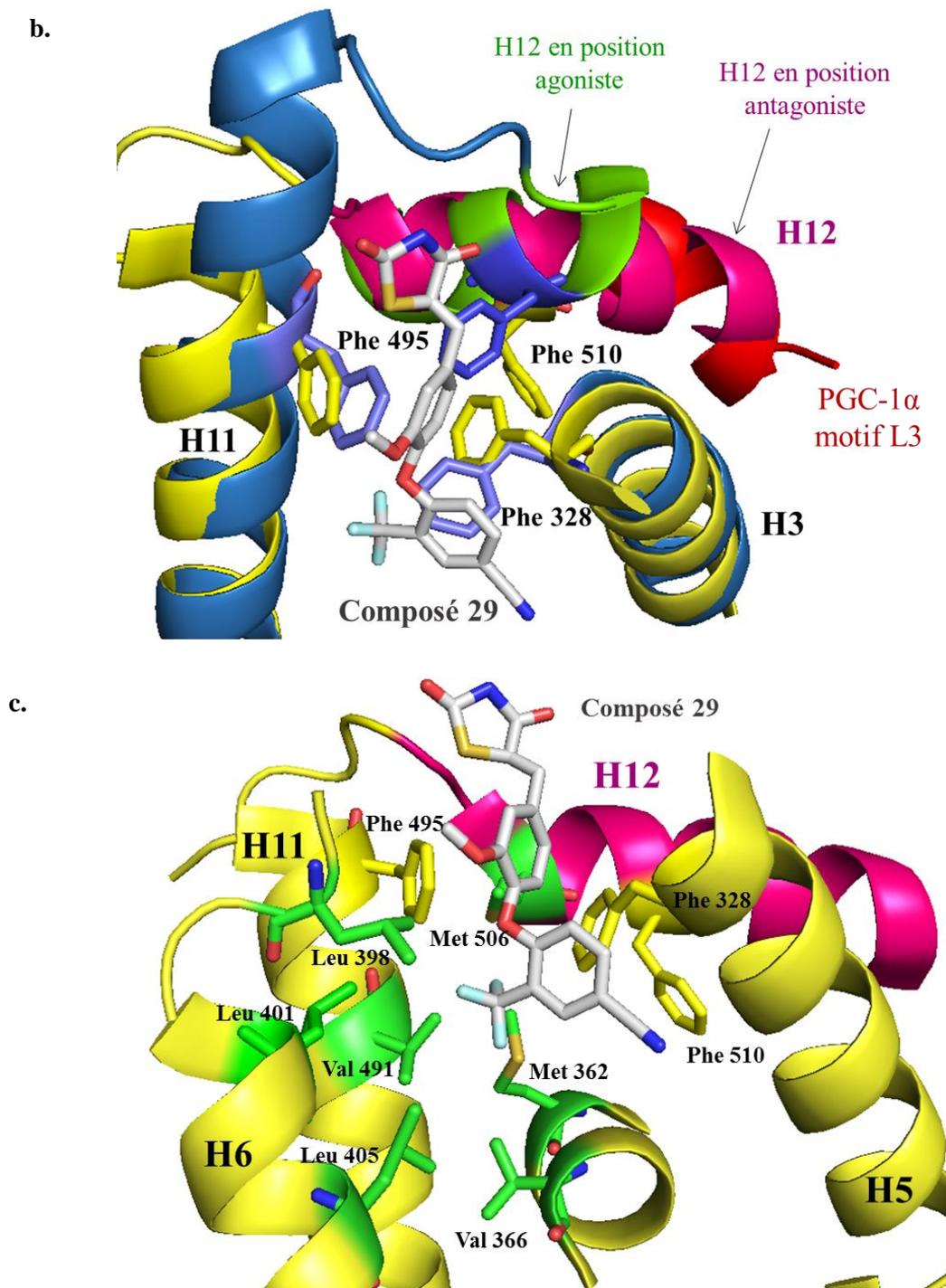


Figure 28 : Bases moléculaires de l'interaction du composé 29 dans la poche de liaison aux ligands du LBD d'ERR α (*PDB 3K6P*)

a. Positionnement du composé 29 dans la poche de liaison aux ligands. De manière identique à celle observée pour le composé 1a, la liaison du composé 29 induit un déplacement des phénylalanines de la poche d'interaction aux ligands. L'hélice H12 est déplacée en position antagoniste dans le sillon d'interaction des coactivateurs. **b.** Superposition des structures du complexe LBD/composé 29 (bleu, *PDB 3K6P*) et du LBD *apo* en interaction avec le coactivateur PGC-1 α (LBD en bleu et PGC-1 α en rouge, *PDB 1XB7*). En présence du ligand antagoniste, l'hélice H12 se positionne à la place du motif L3 de PGC-1 α et empêche ainsi la liaison de coactivateurs. **c.** Détails des interactions du groupement trifluorométhyle CF $_3$ hydrophobe avec les chaînes latérales des résidus de la boucle H6/H7 et des hélices H5, H6 et H11.

3.3. Les autres ligands antagonistes synthétiques

3.3.1. Le ligand synthétique agoniste inverse XCT-790, un modulateur pharmacologique spécifique d'ERR α

De manière similaire à ERR, PGC-1 α est fortement exprimé dans les tissus à forte demande énergétique suite à l'exposition à divers stress physiologiques. Si son profil d'expression reste encore mal compris, le niveau d'expression de PGC-1 α reste inchangé dans les tumeurs primitives du sein et est fortement diminué dans les cas les plus agressifs (Jiang *et al.*, 2003). PGC-1 α et ERR travaillent de concert comme régulateurs majeurs de la transcription du réseau de gènes métaboliques pour maintenir une homéostasie énergétique normale dans les cellules. PGC-1 α induit l'expression d'ERR α et régulent ensemble la transcription de leurs gènes cibles. L'interaction entre ces deux protagonistes peut donc faire l'objet de modulation thérapeutique pour les cas pathologiques. Une forte expression d'ERR α dans les tumeurs cancéreuses humaines est corrélée à un mauvais diagnostic démontrant l'implication prédominante d'ERR α dans la prolifération cellulaire. Le composé synthétique XCT-790 ((2E)-3-(4-{[2,4-bis(trifluorométhyl)benzyl]oxy}-3-méthoxyphényl)-2-cyano-N-[5-(trifluorométhyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]acrylamide) a été identifié par HTS (*High-Throughput Screening*) à partir d'une banque de composés chimiques (tableau 3) (Busch *et al.*, 2004). XCT-790 interagit de manière hautement spécifique avec ERR α et a la capacité de bloquer les cellules en transition G1/S du cycle cellulaire permettant ainsi de freiner la prolifération cellulaire et la tumorigénèse. Il est totalement inactif contre ERR γ et ER α (Willy *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2010). En effet, la présence d'un ARNm ciblant ERR α induit une incapacité pour XCT-790 de bloquer le développement cellulaire soulignant son action ERR α -dépendante (Bianco *et al.*, 2009). Grâce au XCT-790, il est possible d'inhiber spécifiquement l'activité d'ERR α sans affecter la signalisation propre à ER α .

La transfection *in vivo* de cellules avec le mutant ERR α -F328A (où la phénylalanine 328 de la poche d'interaction aux ligands est remplacée par une alanine) suivi d'un traitement au XCT-790 induit une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'ERR α indiquant clairement que XCT-790 se lie dans la poche de liaison aux ligands du LBD et, étonnement, qu'il assure une activité d'agoniste chez ce mutant ERR α -F328A (Willy *et al.*, 2004). L'interaction entre le XCT-790 et ERR α *wt* se caractérise par un IC₅₀ de 370 nM et l'agoniste inverse XCT-790 est capable d'inhiber l'activité constitutive d'ERR α à près de 100%. Son action s'explique par le fait qu'il perturbe spécifiquement l'interaction d'ERR α avec le motif LXXLL caractérisant les protéines coactivatrices, en l'occurrence PGC-1 α ou SRC-1 (Willy *et al.*, 2004 ; Busch *et al.*, 2004). De plus, en altérant l'expression d'ERR α et PGC-1 α , XCT-790 induit une diminution de l'expression des gènes mitochondriaux qu'ils ciblent. La masse mitochondriale est également diminuée et la dérégulation du potentiel membranaire mitochondrial $\Delta\Psi_m$ conduit à une augmentation des espèces réactives oxygénées ROS (*Reactive Oxygen Species*) activant les caspases 3/7, 8 et 9 menant à l'apoptose cellulaire (Wu *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2010). La dégradation d'ERR α par le protéasome a aussi été observée sous l'effet de XCT-790 (Lanvin *et al.*, 2007).

Ainsi, la modulation de l'activité d'ERR α par la molécule synthétique XCT-790 représente une solution prometteuse pour bloquer la progression tumorale. ERR α étant ciblé très spécifiquement par XCT-790, il représente alors une cible thérapeutique pertinente pour les traitements cancéreux. Le ligand XCT-790, à fort potentiel pharmacologique, est étudié dans le cadre de ma thèse afin de comprendre les mécanismes structuraux par lesquels il perturbe le complexe ERR α /coactivateur. La structure cristallographique du complexe ERR α /XCT-790 serait donc porteuse d'informations capitales concernant les bases moléculaires fondamentales qui apporteront les connaissances nécessaires pour les études par *drug design*.

En se basant sur les structures cristallographiques connues d'ERR α lié à des ligands synthétiques (composé 1a et composé 29), quelques hypothèses peuvent être émises quant aux mécanismes structuraux

attendus pour l'inhibition de l'activité constitutive d'ERR α . La taille relativement importante du XCT-790 comparée à celles des composés 1a et 29 (tableau 3) et la présence de ses trois groupements volumineux trifluorométhyles impliquerait que son accommodation dans la poche de liaison aux ligands induise un déplacement important des hélices H3, H4 et H12. La participation de la Phe328 dans l'initiation de ces réarrangements est un point à considérer sérieusement étant donné que sa mutation en alanine se caractérise par une activité agoniste. De plus, le mode de repositionnement structural de H12 après la liaison de XCT-790 reste l'équation à résoudre. Ce projet étant mené en présence du peptide corépresseur NCoR, il est judicieux de considérer la structure du complexe RAR-LBD/NCoR en présence de l'agoniste inverse BMS493 où l'interaction étroite du peptide corépresseur avec le LBD par un feuillet β conduit à un comportement dynamique de H12. En contrepartie, que donnerait la structure d'un complexe formé uniquement du LBD de ERR α avec le XCT-790 ? Diverses hypothèses quant aux mécanismes d'antagonisme d'ERR α par XCT-790 peuvent être émises. En effet, les structures d'ERR α avec les composés 1a et 29 ont été réalisées en absence de tout peptide corégulateur et témoignent d'un positionnement de l'hélice H12 dans le sillon d'interactions aux coactivateurs pour empêcher la liaison de PGC-1 α .

3.3.2. Le composé A

Le composé A (N-[(2Z)-3-(4,5-dihydro-1,3-thiazol-2-yl)-1,3-thiazolidin-2-ylidène]-5H dibenzo[a,d][7]annulène-5-amine) identifié par HTS pour des recherches cliniques, est un antagoniste hautement spécifique d'ERR α (tableau 3). La liaison du composé avec le complexe ERR α /PGC-1 α induit une dissociation de PGC-1 α ce qui a permis de caractériser une interaction de haute affinité du composé A avec un IC₅₀ de 170 nM. Aucune interaction n'était observée avec ERR β , ERR γ , ER α et ER β (Chisamore *et al.*, 2008). La liaison du composé A inhibe l'activité constitutive d'ERR α et diminue l'association avec ses promoteurs géniques cibles induisant une suppression de l'expression des protéines ERR α , MCAD, aromatasase, PDK4, ostéopontine, tff1 ou encore PGC-1 α . De plus, comme le XCT-790, le composé A induit la protéolyse d'ERR α via le protéasome. *In vivo*, pour les lignées cellulaires issues de tumeurs cancéreuses du sein ER positives et négatives, respectivement MCF-7 et BT-20, le composé A ralentit la prolifération cellulaire. Ceci est supporté par une diminution de la masse de xenogreffes utérines chez la souris et de l'expression de nombreux gènes y étant sous le contrôle d'ERR α . Le composé A perturbe la signalisation cellulaire relative à l'énergie métabolique médiée par ERR α dans les cellules tumorales (Chisamore *et al.*, 2009).

3.3.3. SR16388

La molécule SR16388 ((E)-3-hydroxy-7 α -méthyl-21-[20-(N,N,-diméthylamino)éthoxy]-19-norprégnane-1,3,5(10),17(20)-tétraène) (tableau 3) est un agoniste inverse d'ERR α étant donné qu'elle inhibe spécifiquement son activité constitutive et sa liaison à PGC-1 α avec un EC₅₀ de 700 \pm 100 nM. Ce composé n'a aucun effet sur ERR β et ERR γ (EC₅₀ > 10 μ M). Il peut par contre inhiber ER α (EC₅₀ = 200 \pm 200 nM) et ER β (EC₅₀ = 500 \pm 200 nM). De plus, SR16388 empêche le recrutement d'ERR α sur son élément de réponse ERRE, par exemple pour les gènes *esrra* ou *mcad*, notamment dans les cellules tumorales MCF-7. Certaines protéines n'étant pas exprimées la prolifération cellulaire est diminuée. Un exemple est le ralentissement de 61% de la progression de tumeurs de la prostate (Duellman *et al.*, 2010).

3.3.4. Le composé 14n

Le composé 14n (2-aminophényl-(1-(3-isopropylphényl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-méthan-one) inhibe l'activité transcriptionnelle d'ERR α avec un IC₅₀ de 0,021 μ M (tableau 3). Il permet la réduction du niveau d'ARNm des protéines PDK4, MCAD et d'ERR α lui-même dans les cellules MCF-7. Il induit alors une baisse de la prolifération de ces cellules tumorales. Cependant, il n'a pas été démontré si ce ligand cible spécifiquement ERR α plutôt que ERR β et ERR γ (Xu *et al.*, 2013).

3.3.5. Structures chimiques des ligands antagonistes d'ERR α

Ligands	Structures chimiques	IC ₅₀
XCT-790		0.500 μ M
SR16388		0.700 μ M
Composé 29 (PDB 3K6P)		0.040 μ M
Composé A		0.170 μ M
Composé 1a (PDB 2PJJ)		0.190 μ M
Composé 14n		0,021 μ M

Tableau 3 : Structures chimiques des différents ligands antagonistes d'ERR α et leurs IC₅₀

Objectifs de thèse

Chez les mammifères, la superfamille des récepteurs nucléaires joue un rôle déterminant dans la régulation et le bon fonctionnement de divers événements physiologiques. Si la majorité d'entre eux sont régulés par leurs ligands naturels, d'autres sont dits orphelins car leurs ligands naturels ne sont pas encore connus à ce jour. Parmi ceux-ci, le récepteur aux hormones stéroïdiennes ERR (*Estrogen-Related Receptor*) est apparenté au récepteur des estrogènes ER (*Estrogen Receptor*). ERR régule la transcription de divers gènes impliqués dans le métabolisme énergétique cellulaire en se liant spécifiquement au niveau des promoteurs à la séquence consensus de type 5'-TNAAGGTCA-3' formée d'un demi-site unique 5'-AGGTCA-3' précédé par trois nucléotides 5'-TNA-3'. ERR est exprimé sous différentes isotypes α , β et γ dont les niveaux d'expression plus ou moins élevés sont associés à un mauvais pronostic oncologique. En effet, la surexpression d'ERR α est responsable du développement tumorigénique dans les cas les plus graves de cancer du sein et des ovaires alors que ERR γ est faiblement exprimé dans les tumeurs de la prostate ou de l'endomètre. Si ERR est orphelin, son activité peut cependant être régulée par la liaison de ligands synthétiques antagonistes. Toutefois, des comportements différents sont observés parmi ses isotypes quant à la fixation de ces ligands. En effet, l'antagoniste DES se lie à ERR γ et ERR α alors que le 4-OHT, une molécule largement prescrite dans le traitement du cancer du sein, ne se fixe pas sur ERR α à l'inverse des autres isotypes. Cette particularité d'ERR α et son rôle central dans la signalisation cellulaire du métabolisme font de lui une cible thérapeutique spécifique et pertinente afin de contrer la croissance des tumeurs cancéreuses. Étant donnée l'importante implication d'ERR α en santé publique et le grand intérêt dont cette protéine fait l'objet en tant que cible thérapeutique, j'ai choisi de consacrer ma thèse à la compréhension du comportement biochimique et moléculaire de ce récepteur nucléaire.

Le caractère orphelin d'ERR, la régulation de son activité encore incomprise aujourd'hui et son action dans la transcription génétique au sein des grandes voies métaboliques cellulaires soulignent l'individualité de cette protéine et font d'elle un objet d'étude d'autant plus attrayant. Étant donnée l'implication modulaire des différents domaines structuraux et la complexité de leurs mécanismes d'action, ce projet est divisé en trois principales sections à l'image des différents événements qui régissent l'activité d'ERR : dans un premier temps, la modulation de l'activité d'ERR par des ligands antagonistes, dans un deuxième temps, le mode d'interaction d'ERR avec ses séquences consensus spécifiques au niveau des promoteurs géniques et enfin une vue globale sur l'ensemble du récepteur pour comprendre l'implication de ses différents domaines modulaires dans son activité.

Le domaine de liaison aux ligands LBD (*Ligand Binding Domain*) joue un rôle majeur dans la régulation de l'activité d'ERR. Il représente la cible de protéines corégulatrices et de ligands (encore inconnus) qui ont un effet activateur ou répresseur sur l'activité transcriptionnelle d'ERR selon le contexte cellulaire. L'activité constitutive de l'isotype α serait dû à sa poche de liaison aux ligands de seulement 100 Å³. La présence de la Phe328 sur l'hélice H3, correspondant chez ERR β , ERR γ et les ERs à une alanine, encombrerait cette poche et serait ainsi responsable du caractère constitutif d'ERR α . De ce fait, la fixation d'un ligand antagoniste dans la poche induirait un réarrangement conformationnel conséquent de la Phe328 impliquant le déplacement important de la Phe510 située sur l'hélice H12. Cette dernière, ayant un comportement spatial très dynamique, peut adopter une conformation agoniste ou antagoniste. Dans le cas de la fixation d'un ligand antagoniste induisant le réarrangement des phénylalanines, l'hélice 12 se positionne en conformation antagoniste dans le sillon de liaison aux coactivateurs en réalisant des interactions hydrophobes évitant la liaison de coactivateurs (*PDB 3K6P*). Les mêmes interactions sont observées lorsqu'un peptide activateur est lié au LBD dans sa forme *apo* stabilisant l'hélice H12 en interagissant avec cette dernière (*PDB 3D24*). L'atténuation de l'activité constitutive d'ERR α représente alors l'événement à cibler à l'échelle moléculaire et constitue une stratégie de traitement pour les cancers ERR α -dépendants. Dans le cadre de mon projet, j'ai utilisé le ligand agoniste inverse XCT-790 ciblant spécifiquement ERR α . Des études *in vivo* de l'activité biologique d'ERR α en présence du XCT-790 ont montré que la liaison de ce dernier à ERR α conduit à une perturbation des interactions avec le motif canoniques LXXLL des protéines coactivatrices induisant une inhibition de 90 à 100% de l'activité constitutive d'ERR α . La prolifération cellulaire est alors ralentie dû au blocage du cycle cellulaire en

transition G1/S de façon $ERR\alpha$ -dépendante. D'autres caractéristiques ont été déterminées quant aux mécanismes d'antagonisme du LBD notamment grâce aux structures cristallographiques du LBD en complexe avec les composés 1a et 29 qui illustrent les événements moléculaires de l'inhibition de l'activité constitutive d' $ERR\alpha$. Afin d'apporter une vision plus riche sur le concept d'antagonisme de l'activité d' $ERR\alpha$, mon objectif était donc en partie orienté vers la compréhension des bases moléculaires qui régissent ce mécanisme d'inhibition en déterminant la structure tridimensionnelle à l'échelle moléculaire du complexe entre le LBD d' $ERR\alpha$ et le XCT-790 en présence de peptides corépresseurs issus de NCoR par cristallographie aux rayons-X. L'utilisation de corépresseurs s'appuie sur les structures cristallographiques déjà connues, notamment des LBD de RAR et PPAR, qui démontrent l'importance de leur participation dans la stabilisation du LBD en conformation agoniste. En parallèle, il est crucial de comprendre le comportement biochimique du LBD pour mener à bien la cristallisation du complexe. Ce dernier doit alors être biochimiquement et biophysiquement caractérisé. La mise en place du protocole de purification du LBD est nécessaire pour mener ensuite une étude de la stabilité et la stœchiométrie des complexes LBD/XCT-790 et LBD/XCT-790/peptides notamment par DLS (*Dynamic-Light Scattering*) ou par spectrométrie de masse en conditions natives. Les données structurales tirées de cette étude concernant les déterminants structuraux régissant les interactions LBD/ligand aideront au *drug design* de nouvelles molécules thérapeutiques permettant de cibler spécifiquement l'activité d' $ERR\alpha$ et ainsi de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Le domaine de liaison à l'ADN DBD (*DNA Binding Domain*) correspond au domaine d'interaction spécifique avec les séquences promotrices des gènes cibles. Ces interactions sont possibles grâce à la présence des deux motifs d'interactions à l'ADN structurés en doigt de zinc, très conservés entre récepteurs nucléaires. ERR se lie très spécifiquement à son élément de réponse de type $5'$ -TNAAGGTCA $^{-3}$ ' appelé demi-site étendu ERRE car il est formé d'un demi-site unique précédé par trois nucléotides. Si ERR est homodimérique du fait des fortes interactions inter-domaines de son LBD, la structure RMN du DBD de $ERR\beta$ suggère la liaison d'un seul DBD sur un unique demi-site étendu. La problématique soulevée est alors de comprendre le comportement spatial du second DBD. Dans le cadre de ce projet de thèse, l'un de mes objectifs est de comprendre à l'échelle moléculaire les interactions chimiques réalisées au niveau de cette interface protéo-nucléotidique et tout particulièrement de comprendre le comportement stœchiométrique des DBD sur un ERRE. Pour cela, j'ai travaillé avec le domaine isolé DBD d' $ERR\alpha$ comprenant la partie centrale, qui est constituée des deux structures en doigt de zinc, et de l'extension carboxy-terminale CTE connue pour renforcer l'ancrage du DBD sur un ERRE en interagissant avec le petit sillon de l'ADN. La première étape consiste en la mise en place du protocole de purification du DBD, suivie de la caractérisation de sa stabilité en complexe avec des oligonucléotides, par des techniques biochimiques et biophysiques afin d'envisager les tests de cristallisation. En parallèle, des expériences de spectrométrie de masse et de SAXS permettent de répondre à cette problématique de stœchiométrie adoptée par les DBD sur un ERRE.

Comment est dictée la topologie adoptée par ERR sur un ERRE suite à sa régulation par des ligands et des corégulateurs protéiques ? Pour répondre à cette question, il est judicieux de considérer les études des domaines isolés LBD et DBD et de les transposer à l'ensemble du récepteur pour permettre d'interpréter la communication inter-domaines et de comprendre comment un ligand à effet agoniste ou antagoniste peut agir en aval sur le mode d'interaction d'ERR à l'ADN. Cette partie du projet, concernant l'étude du comportement d' $ERR\alpha$ entier, représente un véritable challenge étant donné la complexité de fonctionnement du récepteur qui est notamment illustrée par la présence, dans ce cas, du domaine aminoterminal A/B prédit comme étant extrêmement dynamique rendant plus complexe l'étude biophysique et structurale du récepteur entier $ERR\alpha$. Ainsi, pour s'inscrire dans la stratégie d'inhibition de son activité, mon projet s'oriente sur l'étude ambitieuse d' $ERR\alpha$ à l'état antagoniste en complexe ternaire avec un ERRE, le ligand inverse agoniste XCT-790 et des peptides corépresseurs NCoR par cristallographie aux rayons-X. Ceci implique l'étude physico-chimique de tels complexes, de l'optimisation du protocole de purification d' $ERR\alpha$ jusqu'à son étude structurale.

Cette étude de biologie structurale du récepteur nucléaire orphelin $ERR\alpha$ a donc pour objectif majeur de lever le voile sur les mécanismes moléculaires qui régissent l'activité de cette cible thérapeutique, depuis la régulation de son activité par les LBD jusqu'à son mode de liaison sur l'élément de réponse ERRE par les DBD pour l'initiation des événements pro-transcriptionnelles en aval. Ce projet s'organise donc autour d'une étude des domaines modulaires LBD et DBD isolés. D'une part, la fixation du ligand agoniste inverse XCT-790 sur le LBD permet de déterminer les mécanismes structuraux de l'antagonisme de $ERR\alpha$, et d'autre part, l'étude du DBD permet de comprendre l'organisation qu'il adopte sur les séquences promotrices ERRE. La transposition des comportements de ces domaines isolés à l'ensemble du récepteur $ERR\alpha$ facilitera alors son étude fonctionnelle, afin de déterminer les communications inter-modulaires permettant d'assurer son rôle de régulateur de la transcription.

Matériel & Méthodes

1. Expressions et purification des trois protéines étudiées

1.1. LBD

La construction LBD de hERR α (résidus 189 à 423) (GenBank™ accession number NP_004442) (tableau 4) est clonée dans un plasmide pET24 (contenant le gène de résistance à la kanamycine) permettant d'intégrer une étiquette hexa-histidine à son extrémité amino-terminale. La transformation est réalisée avec la souche chimocompétente *Escherichia coli* (*E.coli*) BL21 (DE3). Les cellules transformées sont mises en culture en LB/kanamycine à 37°C sous agitation. Lorsque l'absorbance à 260nm (A_{260}) atteint 0,4 la température est alors diminuée à 18°C. L'expression protéique est induite lorsque A_{260} atteint 0,7 avec 0,1 mM d'isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) (*Euromedex*) et pendant seize heures. Les cellules sont ensuite centrifugées deux fois 20 minutes à 4000 rpm (rotor JS-4.2, *Beckman*) et stockées à -20°C.

Les culots bactériens décongelés sont suspendus dans du tampon de lyse contenant 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 5 mM Imidazole et 1 mM TCEP supplémenté d'inhibiteurs de protéases cOmplete EDTA-free (*Roche*). Pour dégrader les membranes cellulaires, du lysozyme (200 U/ μ L) est ajouté à l'échantillon. Le tout est ensuite homogénéisé à l'aide d'un ULTRA-TURRAX® T25 Digital (*Ika*) et incubé pendant 30 minutes sur glace puis 5 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite soniquées (*Sartorius LABSONIC® P*) sur glace pendant 2 minutes à 50% d'amplitude en alternant 0,5 seconde de *pulse-on* et 0,5 seconde de *pulse-off*. Le lysat est centrifugé à 45000 rpm (rotor 50.2 Ti, *Beckman*) pendant 45 minutes.

Le surnageant dans lequel se trouve le LBD soluble est clarifié avec les filtres Minisart® de 5 μ m (*Sartorius stedim*) et chargé sur colonne d'affinité nickel His-Trap FFCrude-5mL (*GE Healthcare*®) connectée à un système FPLC Äkta Purifier (*GE Healthcare*®) et pré-équilibrée avec le tampon de lyse. L'élution est réalisée par paliers avec des concentrations de 25 mM, 75 mM and 200 mM d'imidazole sur respectivement 8, 10 et 10 volumes de colonne.

Les fractions correspondant au pic d'élution du LBD sont réunies et la concentration protéique est déterminée en utilisant la technique de Bradford. L'étiquette hexa-histidine est ensuite clivée en utilisant la thrombine (stock à 1U/ μ L, *Millipore*) en présence de 5mM final de Ca²⁺ comme cofacteur enzymatique. L'échantillon est incubé sur la nuit à 4°C et l'efficacité du clivage est suivie sur gel dénaturant SDS-PAGE 12%. La protéine clivée de son étiquette est ensuite concentrée, centrifugée 30 minutes à 25000 g (rotor 5427 R, *Eppendorf*) et injectée sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique Superdex 200 (*GE Healthcare*®) ($V_0 = 49,8$ mL, $V_t = 121$ mL) préalablement équilibrée dans le tampon 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl et 1 mM TCEP. La pureté de la protéine élue est vérifiée sur gel dénaturant SDS-PAGE 12%.

1.2. DBD

La construction DBD de mERR α (résidus 70 à 170) (tableau 4) (GenBank™ accession number U_85259) est clonée dans le plasmide pNEAtH (contenant le gène de résistance à l'ampicilline) permettant d'intégrer une étiquette hexa-histidine à son extrémité amino-terminale. La transformation est réalisée avec la souche chimocompétente *E.coli*. pRARE, contenant le plasmide pRARE codant les ARNt rares d'*E.coli* et le gène de résistance au chloramphénicol. Les cellules transformées sont mises en culture en milieu LB/Ampicilline/Chloramphénicol à 37°C, sous agitation. Lorsque A_{260} atteint 0,4, la température est diminuée à 25°C. L'expression protéique est induite lorsque A_{260} atteint 0,7 avec 1 mM IPTG (*Euromedex*) pendant trois heures.

Les cellules sont ensuite centrifugées deux fois 20 minutes à 4000 rpm (rotor JS-4.2, *Beckman*) et stockées à -20°C. Les culots bactériens décongelés sont suspendus dans du tampon de lyse composé de 20

mM Tris/HCl pH 8,0, 400 mM NaCl, 10% glycérol, 1mM CHAPS, 5 mM Imidazole et 1 mM TCEP, supplémentés d'inhibiteurs de protéases cOmplete EDTA-free (Roche), de lysozyme (200 U/μL) pour dégrader les membranes cellulaires et de Benzonase® (10 kU/μL, Novagen) pour digérer l'ADN contaminant. Les cellules sont ensuite homogénéisées à l'aide d'un ULTRA-TURRAX® T25 Digital (Ika), incubées sur glace pendant 30 minutes puis incubées à 37°C pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite soniquées (Sartorius LABSONIC® P) sur glace pendant 2 minutes à une amplitude de 50% en alternant 0,5 seconde de *pulse-on* et 0,5 seconde de *pulse-off*. Le lysat est centrifugé à 45000 rpm (rotor 50.2 Ti, Beckman) pendant 45 minutes.

Le surnageant, contenant le DBD soluble, est clarifié avec les filtres Minisart® de 5μm (Sartorius stedim) et chargé sur colonne d'affinité nickel His-Trap FF Crude-5mL (GE Healthcare®) connectée à un système FPLC Äkta Purifier (GE Healthcare®) et pré-équilibrée avec le tampon de lyse. L'éluion est réalisée par paliers avec des concentrations de 25mM, 75mM and 200mM d'imidazole sur respectivement 8, 10 et 10 volumes de colonne.

Les fractions correspondant au pic d'éluion du DBD sont réunies et la concentration protéique est mesurée avec la technique de Bradford. L'étiquette hexa-histidine est clivée à la thrombine (stock à 1U/μL, Millipore) en présence de 5 mM final de Ca²⁺ comme cofacteur enzymatique. L'échantillon est incubé sur la nuit à 4°C et l'efficacité du clivage est suivie sur gel dénaturant SDS-PAGE 15%.

Une chromatographie d'affinité héparine est ensuite réalisée afin d'éliminer les acides nucléotidiques contaminants et les protéines contaminantes ne se liant pas spécifiquement à l'ADN. Deux tampons sont utilisés : le tampon A contenant 20mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM CHAPS et 1mM TCEP, et le tampon B contenant 20mM Tris/HCl pH 8,0, 1,5 M NaCl, 1mM CHAPS et 1mM TCEP. La concentration en sel de l'échantillon protéique est ajustée à 150 mM en utilisant le tampon A avant d'être injecté sur la colonne d'héparine HiPrep FF Crude 16/10 (GE Healthcare®) pré-équilibrée dans 150mM NaCl. Après une étape de lavage à 150mM NaCl (sur 3 volumes de colonne), un gradient de sel de 150 mM à 1,5 M (sur 10 volumes de colonne) est appliqué pour l'éluion.

Le DBD élué est concentré et centrifugé 30 minutes à 25000 g (rotor 5427 R, Eppendorf). Il est finalement injecté sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique Superdex 75 (GE Healthcare®) (V₀ = 49,8 mL, V_t = 121 mL) préalablement équilibrée dans le tampon d'éluion composé de 50 mM Bis-Tris pH 7,0, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂ et 1mM TCEP. La pureté du DBD élué est vérifiée sur gel dénaturant SDS-PAGE 15%.

1.3. ERRα entier

Le récepteur entier mERRα (résidus 1 à 422) (GenBank™ accession number U_85259) (tableau 4) est exprimé par le service Baculovirus de l'IGBMC en cellules d'insectes provenant du lépidoptère *Spodoptera frugiperda* en utilisant la souche *Sf21*. Ces cellules sont infectées par le baculovirus ayant intégré le bacmide pDEST8 contenant la construction de ERRα. La protéine est exprimée pendant 72 heures à 23°C dans un milieu SF900-II (Gibco).

Les cellules sont ensuite centrifugées à 800 g (rotor JS-4.2, Beckman) pendant 20 minutes puis resuspendues dans une solution PBS/10% glycérol puis centrifugées de nouveau de la même manière. Les culots sont ensuite stockés à -80°C. Les culots cellulaires décongelés sont suspendus dans du tampon de lyse composé de 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 400 mM NaCl, 10% glycérol, 1 mM CHAPS, 5 mM Imidazole et 1 mM TCEP, supplémentés d'inhibiteurs de protéases cOmplete EDTA-free (Roche) et de Benzonase® (10 kU/μL, Novagen). Les cellules sont ensuite homogénéisées à l'aide d'un ULTRA-TURRAX® T25 Digital (Ika) puis soniquées (Sartorius LABSONIC® P) sur glace pendant 2 minutes à une amplitude de 50%

en alternant 0,5 seconde de *pulse-on* et 0,5 seconde de *pulse-off*. Le lysat est centrifugé à 45000 rpm (rotor 50.2 Ti, *Beckman*) pendant 45 minutes.

Le surnageant contenant la protéine ERR α soluble est clarifiée avec les filtres Minisart[®] de 5 μ m (*Sartorius stedim*) et chargé sur colonne d'affinité nickel His-Trap FF Crude-5 mL (*GE Healthcare*[®]) connectée à un système FPLC Äkta Purifier (*GE Healthcare*[®]) et pré-équilibrée dans le tampon de lyse. L'élution est réalisée par paliers avec des concentrations de 15 mM, 30 mM et 100 mM d'imidazole sur respectivement 8, 10 et 10 volumes de colonne. Les fractions correspondant au pic d'élution d'ERR α sont réunies et la concentration protéique est mesurée avec la technique de Bradford.

Comme pour le DBD, une chromatographie d'affinité héparine est ensuite réalisée afin d'éliminer les acides nucléotidiques et les protéines contaminants. Deux tampons sont utilisés : le tampon A contenant 20mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM CHAPS et 1mM TCEP, et le tampon B contenant 20mM Tris/HCl pH 8,0, 1,5 M NaCl, 1mM CHAPS et 1mM TCEP. La concentration en sel de l'échantillon protéique est ajustée à 150 mM en utilisant le tampon A avant d'être injecté sur la colonne d'héparine HiPrep FF Crude 16/10 (*GE Healthcare*[®]) pré-équilibrée dans 150mM NaCl. Après une étape de lavage à 150mM NaCl (sur 3 volumes de colonne), un gradient de sel de 150 mM à 1,5 M (sur 10 volumes de colonne) est appliqué pour l'élution.

ERR α élué est concentré puis centrifugé 30 minutes à 25000 g (rotor 5427 R, *Eppendorf*). Il est ensuite injecté sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique Superdex 200 (*GE Healthcare*[®]) ($V_0 = 49,8$ mL, $V_t = 121$ mL) préalablement équilibrée dans le tampon d'élution composé de 20 mM Tris pH 7,5, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂ et 1 mM TCEP. La qualité de la protéine est vérifiée sur gel dénaturant SDS-PAGE 10%.

<p>Séquence du LBD de hERRα (189-423)</p> <p>¹⁸⁹GSKTAAPVNALVSHLLVVEPEKLYAMPDPAGPDGHLPAVATLCDLFDREIVVTISWAKSIPGFSSLS LSDQMSVLQSVWMEVLVLGVAQRSLPLQDELAFEAEDLVLDEEGARAAGLGELGAALLQLVRRRLQALRLE REEYVLLKALALANSDSVHIEDAEAVEQLREALHEALLEYEAGRAGPGGGAERRRAGRLLLLTLPLLRQT AGKVLAHFYGVKLEGKVPMHKLFLEMLEAMMD⁴²³</p>
<p>Séquence du DBD de mERRα (70-170)</p> <p>⁷⁰SHMVLSSLPKRLCLVCGDVASGYHYGVASCEACKAFFKRTIQGSIEYSCPASNECEITKRRRKACQAC RFTKCLRVMGMLKEGVRLDRVRGGRQKYKRRPEVDPL¹⁷⁰</p>
<p>Séquence de mERRα entier (1-422)</p> <p>¹MSSQVVGIEPLYIKAEPASPDSPKGSSETETEPVTLASGPAPARCLPGHKEEEDGEGAGSGEQSGK LVLSSLPKRLCLVCGDVASGYHYGVASCEACKAFFKRTIQGSIEYSCPASNECEITKRRRKACQACRFT KCLRVMGMLKEGVRLDRVRGGRQKYKRRPEVDPLPFPFPAGPLAVAGGPRKTAPVNALVSHLLVVEPE KLYAMPDPASPAGPDGHLPAVATLCDLFDREIVVTISWAKSIPGFSSLSLSDQMSVLQSVWMEVLVLGVAQR SLPLQDELAFEAEDLVLDEEGARAAGLDLGAALLQLVRRRLQALRLEREEYVLLKALALANSDSVHIEDA EAVEQLREALHEALLEYEAGRAGPGGGAERRRAGRLLLLTLPLLRQTAGKVLAHFYGVKLEGKVPMHKLF LEMLEAMMD⁴²²</p>

Tableau 4 : Séquences protéiques des constructions utilisées

2. Caractérisations biochimiques et biophysiques

2.1. Analyse qualitative pour électrophorèse sur gel polyacrylamide (PAGE)

2.1.1. Conditions natives

La technique de PAGE en conditions natives permet une analyse qualitative des protéines dans leur conformation native. Celles-ci sont séparées au cours de l'électrophorèse selon leur charge nette, leur taille et leurs conformations). Cette technique permet donc en particulier de détecter les interactions protéine/protéine et protéine/acides nucléiques.

L'électrophorèse est réalisée sur des gels de polyacrylamide 8% tamponné à pH 10,3 en Tris/Ammoniaque à 4°C dans un tampon composé de 20 mM Tris et 4mM ammoniaque. Une première électrophorèse est réalisée sans échantillon à 2W pendant 40 minutes afin d'éliminer les contaminants potentiels (acide acrylique, ions persulfates, ammonium, ARN, etc.). Les échantillons protéiques sont ensuite chargés sur le gel, et une seconde électrophorèse est réalisée à 2W avec une durée variable selon les protéines. La révélation est faite au bleu de Coomassie.

2.1.2. Conditions dénaturantes

Les analyses sur gel en condition dénaturantes permettant de suivre la pureté des protéines sont réalisées à température ambiante sur des gels SDS-PAGE, de pourcentage variable selon les protéines, dans un tampon composé de 25 mM Tris-Base, 250 mM glycine et 5% SDS. La révélation est faite au bleu de Coomassie.

2.2. Fluorimétrie différentielle (ThermoFluor)

La technique de ThermoFluor, ou Thermal Shift Assay, utilise la propriété du fluorochrome SYPRO® Orange (*Thermo Fisher Scientific*) à se fixer sur les régions hydrophobes des protéines et à ne fluorescer qu'à cette condition. Elle permet ainsi de suivre la dénaturation d'une protéine (et donc, l'exposition de ses régions hydrophobes) en fonction de la température, dans des conditions prédéfinies (pH, ligand, additif, etc.). Pour cela, l'augmentation de la fluorescence du SYPRO® Orange est mesurée à 570 nm après excitation à 473 nm dans un thermocycleur RT-PCR MiniOpticon (*BIO-RAD*). Les données sont analysées à l'aide du logiciel Opticon Monitor 3.

Dans chaque puit d'un plaque PCR, 18 µL d'un tampon à tester sont mélangés à 5 µL de protéine à une concentration comprise entre 1 et 2 mg/mL et 7 µL de SYPRO® Orange dilué 200 fois. Un gradient thermique de 20°C à 95°C est appliqué et la fluorescence dans chaque puit est mesurée par le thermocycleur à chaque incrémentation d'un degré. La température de fusion (T_m , melting temperature), correspondant à la température à laquelle la moitié de l'échantillon est dénaturé, est alors calculée pour évaluer la stabilité de la protéine.

2.3. Diffusion dynamique de lumière ou Dynamic Light Scattering (DLS)

La DLS est utilisée pour vérifier l'homogénéité d'un échantillon protéique en en déterminant les paramètres dynamiques tels que la taille des particules et la polydispersité. Un faisceau de lumière monochromatique est dirigé sur l'échantillon. Du fait du mouvement brownien des particules, les intensités de diffusion qu'elles émettent fluctuent avec le temps et sont enregistrées par un détecteur pour la détermination des paramètres dynamiques des particules.

Les mesures de DLS sont réalisées à 25°C avec le spectromètre DynaPro DLS (Wyatt), qui émet un laser rouge ($\lambda=830$ nm) en utilisant une cuvette de quartz ($l=1$ cm) pouvant accueillir 3 μ L d'échantillon protéique concentré à 1 mg/mL ou plus, et préalablement centrifugé 15 minutes à 25000 g à 4°C pour éliminer les potentiels agrégats. Pour chaque mesure, les valeurs moyennes de dix acquisitions sont calculées pour obtenir des paramètres statistiquement significatifs.

2.4. Thermophorèse à micro-échelle ou MicroScale Thermophoresis (MST)

La technique de MST est utilisée pour détecter les interactions protéiques en se basant sur un gradient microscopique de température généré par un laser infra-rouge. Tout changement dans la couche d'hydratation, la charge et la forme d'une biomolécule affecte son mouvement thermophorétique.

Les mesures d'interactions ont été réalisées avec l'appareil Monolith™ NT.115 (*Nanotemper technologies GmbH, Munich*) et les données ont été analysées en utilisant la version 2.0.2.1334 du logiciel *NT Affinity Analysis*. Une espèce marquée par un fluorochrome est titrée par une autre espèce pour en déduire une courbe sigmoïde de dissociation. Les mesures sont réalisées en utilisant des capillaires avec un revêtement Premium (MST Premium coated). Ainsi, les constantes de dissociation sont calculées à partir des variations de fluorescence induits par les mouvements de thermophorèse des particules suite au chauffage localisé produit par le laser infra-rouge.

Les mesures d'interactions entre le LBD et le ligand agoniste inverse XCT-790 ont été réalisées en marquant le LBD avec le réactif NT-647 du kit Monolith NT Protein Labeling kit RED-MALEIMIDE, qui porte le groupe réactif maleimide modifiant les résidus cystéines. Une concentration constante de 120 nM de LBD marqué est titrée avec des concentrations croissantes de XCT-790 de 0,94 μ M à 15 μ M. Le tampon utilisé pour les dilutions sérielles 1:1 est composé de 20 mM bis-tris pH 6,5, 200 mM NaCl et 1 mM TCEP. Les données sont enregistrées à 25°C pour des puissances d'excitation et de laser-IR respectivement de 40% et 20%. Les mesures sont reproduites sur 8 expériences indépendantes et les signaux de thermophorèse enregistrés pour chacun des 16 capillaires sont normalisés. La fluorescence normalisée est représentée en fonction de la concentration de XCT-790 donnant une courbe sigmoïdale où les écarts type (SEM pour $n \geq 1$) sont déterminés pour chacun des points.

Les mesures d'interaction entre le récepteur entier ERR α et des oligonucléotides de 33 paires de bases ont été réalisées en marquant ERR α avec le réactif NT-647 du kit Monolith NT Protein Labeling kit RED-NHS, qui porte le groupe réactif NHS-ester modifiant les fonctions amines primaires des résidus lysines. Une concentration constante de 25 nM d'ERR α marqué est titré avec des concentrations croissantes d'oligonucléotide de 0,76 μ M à 25 μ M. Le tampon utilisé pour les dilutions sérielles 1:1 est composé de 20 mM tris pH 7,5, 150 mM KCl, 0,5 mM CHAPS et 1 mM TCEP. Les données sont enregistrées à 24°C pour des puissances d'excitation et de laser-IR respectivement de 30% et 20%. Les mesures sont reproduites sur 9 et 3 expériences indépendantes respectivement pour les oligonucléotide 33tra et 33rb1cc1. Les signaux thermophorétiques enregistrés pour chacun des 16 capillaires sont normalisés et la fluorescence en résultant est représentée en fonction de la concentration en oligonucléotide donnant une courbe sigmoïdale où les écarts type (SEM pour $n \geq 1$) sont déterminés pour chacun des points.

2.5. Spectrométrie de masse ESI-TOF

Les caractérisations par spectrométrie de masse ESI-TOF en conditions natives sont réalisées sur le spectromètre Synapt G2 HDMS en collaboration avec l'équipe du Dr. Sarah CIANFERANI du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique de Strasbourg. Les protéines LBD et DBD sont purifiées et complexées avec leurs partenaires respectifs. Le tampon des échantillons est échangé contre 150 mM acétate d'ammonium pH 7,0 en utilisant les colonnes de dessalage Zeba™ Spin (*Thermo Fisher*).

2.6. Focalisation isoélectrique ou IsoElectric Focusing (IEF)

L'IEF est une technique hautement résolutive permettant la séparation de protéines selon leur point isoélectrique (pI). Les gels *PhastGel IEF media* (*GE Healthcare*®) utilisés sont constitués de polyacrylamide et de Pharmalyte® comme espèce ampholyte permettant de générer un gradient stable et linéaire de pH pendant la migration. Les complexes protéiques sont concentrés à 0,25 µg/µL et sont déposés dans les puits du gel, ainsi qu'un marqueur de pH couvrant une large gamme de pH allant de 3,5 à 9,5 (*GE Healthcare*).

La migration est réalisée sur un *Phast System* (*Pharmacia LKB*) en trois étapes de migration. La première étape (2000 V, 2,5 mA, 3,5 W, 15°C, 75 Vh) permet d'instaurer le gradient de pH au sein du gel où les unités de pH diminuent graduellement en partant de l'anode vers la cathode. Lors de la deuxième étape (200 V, 2,5 mA, 3,5 W, 15°C, 15 Vh), les échantillons sont déposés automatiquement sur le gel et la migration débute doucement à 200 V pour assurer une bonne pénétration des protéines dans le gel. Enfin, le voltage est augmenté pour la troisième et dernière étape (2000 V, 2,5 mA, 3,5 W, 15°C, 410 Vh) pour que les protéines migrent jusqu'à la zone du gel où le pH correspond à leur pI. Le résultat de la migration est finalement révélé au bleu de Coomassie.

3. Méthodes de déterminations structurales

3.1. Cristallisation

La condition primordiale à la résolution d'une structure tridimensionnelle d'une protéine d'intérêt par cristallographie aux rayons X est l'obtention d'un cristal dont la qualité de diffraction est hautement influencée par la pureté de la protéine et le processus de formation du cristal. La protéine d'intérêt se trouve initialement à l'état soluble dans un tampon adéquat et l'objectif est de diminuer significativement sa solubilité pour atteindre un état de sursaturation. En pratique, ceci équivaut à rechercher des conditions de précipitation où la protéine peut atteindre cet état et former des points de nucléation où s'initie la croissance d'un cristal. La sursaturation protéique autour des points de nucléation permet la constitution d'un cristal en trois dimensions. La variation de quelques paramètres physicochimiques permet d'aboutir à cet objectif :

- la température
- le pH, permettant de jouer avec l'état d'ionisation des résidus à la surface de la protéine
- la concentration de la protéine
- la concentration en sel
- la présence de polymères, comme les poly-éthylènes glycol (PEG), permettant d'altérer les contacts entre le solvant et l'environnement de la protéine

La thermodynamique régissant la formation de points de nucléation et la croissance d'un cristal est gouvernée par le diagramme de phase où la concentration protéique est représentée en fonction de la concentration en agent précipitant (figure 29). La courbe de solubilité divise cet espace en deux zones de sous-saturation et de sursaturation. Chaque point de cette courbe correspond à une concentration à laquelle la solution protéique est en équilibre avec l'agent précipitant. Dans la région de sous-saturation, située sous la courbe de solubilité, la solution n'est pas suffisamment concentrée et/ou l'agent précipitant n'est pas suffisamment concentré. Le processus de cristallisation ne peut alors pas s'initier. Dans la région de

sursaturation, au-dessus de la courbe de solubilité, pour une concentration d'agent précipitant donnée, la protéine a une concentration supérieure à celle de l'équilibre de solubilité. En fonction de la cinétique pour atteindre l'équilibre et le niveau de sursaturation, cette région peut être divisée en trois zones. Dans la zone de précipitation, la concentration de la protéine est trop excessive, conduisant à sa séparation de la solution en formant des agrégats amorphes. En zone de nucléation, la concentration protéique élevée conduit à son agrégation sous forme cristalline se caractérisant par la formation de microcristaux. Dans zone métastable, la nucléation est encore possible à condition d'apporter un point initiateur par ensemencement par des amorces (*seeds*). La formation d'un cristal bien ordonné devrait idéalement commencer par la formation d'un point de nucléation dans la zone de nucléation, tandis que la croissance du cristal à partir de ce point

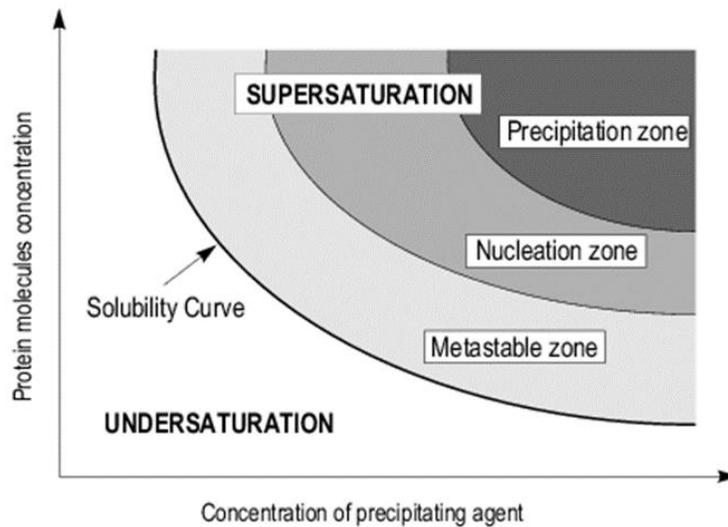


Figure 29 : Diagramme de phase

de nucléation s'accompagne ensuite d'un retour dans la zone métastable.

La technique de cristallisation utilisée dans le cadre de ce projet est la diffusion de vapeur en goutte assise. Dans un compartiment scellé, une goutte de cristallisation est déposée sur une cupule surélevée par rapport au réservoir (figure 30). Cette goutte a été préalablement diluée de moitié dans la solution de cristallisation du réservoir. L'excès de volume du réservoir par rapport à la goutte de cristallisation est idéalement 50 à 250 fois supérieur. Pour atteindre un équilibre osmotique avec le réservoir, la goutte se

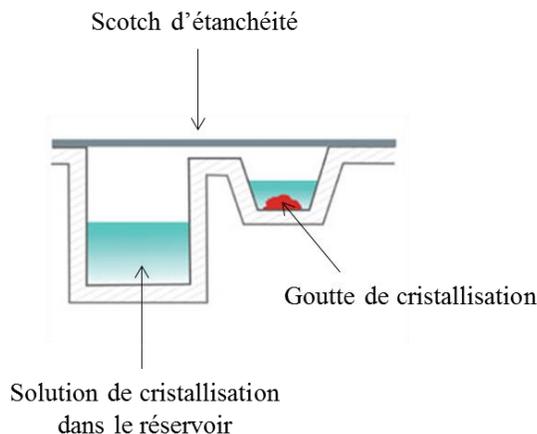


Figure 30 : Cristallisation en goutte assise

déshydrate par diffusion de vapeur, ce qui permet d'augmenter les concentrations en agent précipitant (salting-out) et en protéine au sein de la goutte, favorisant ainsi la progression vers l'état de sursaturation.

Les rayons X sont diffractés par les cristaux obtenus permettant d'en générer des clichés de diffraction spécifiques. La longueur d'onde λ des rayons X incidents est du même ordre de grandeur que la distance d entre chaque plan du réseau cristallin. Selon la loi de Bragg, au sein d'un cristal arrangé périodiquement, deux rayons incidents parallèles interagissant avec deux atomes sur un plan vertical émettront des rayons diffractant dont l'une interférence est égale à $2d\sin\theta$ où θ est l'angle de diffraction. Cette interférence est constructive uniquement si elle introduit une phase égale λ permettant d'émettre la loi : $2d\sin\theta=n\lambda$ (figure 31). Lorsqu'une diffraction satisfait à la loi de Bragg, des tâches de diffraction sont observables sur le cliché enregistré sur le détecteur, témoignant d'un bon agencement des réseaux cristallins.

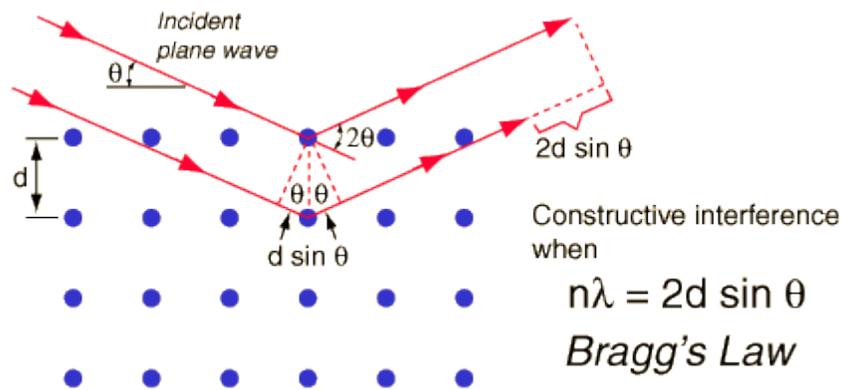


Figure 31 : Loi de Bragg

3.1.1. Cristallisation du LBD en complexe avec les peptides et/ou le ligand agoniste inverse XCT-790

Les complexes LBD/peptides sont réalisés en ajoutant trois excès molaires des différents peptides utilisés et synthétisés par le service de synthèse peptidique de l'IGBMC : le motif 3 de PGC-1 α (PI251)¹⁹⁸-QQQKQRRPCSELLKYLTTNDD⁻²¹⁹, le motif 2 de NCoR (PF25)²⁰⁶⁸-TLADHICQIITQDFAR⁻²⁰⁸³ et le motif 3 de NCoR (PF26)²²⁷¹-ASNGLGLEDIIRKALMGS⁻²²⁸⁷. Le ligand agoniste inverse XCT-790 est dissout dans 100% de DMSO pour obtenir une concentration finale de 10 μ M. XCT-790 est également ajouté à raison de trois excès molaires par rapport au LBD pour former les complexes dans lesquels il intervient.

Les complexes protéiques à une concentration d'environ 10 mg/mL sont utilisés pour réaliser des gouttes de cristallisation d'un volume total de 800nL (400nL + 400nL) par le robot Mosquito (*TTP Labtech*) à 20°C en utilisant des boîtes de type MRC2 ou MRC3 (*Swissci*). Les boîtes de cristallisation sont ensuite conservées dans le robot imageur (*Rock Imager – Formulatrix*) à 20°C. Ce robot prend régulièrement des photos de chacune des gouttes de cristallisation pour permettre leur suivi.

Les cristaux obtenus ont été testés sur la ligne ID29 (ESRF, Grenoble) équipée d'un détecteur Pilatus 6M. L'intégration des données de diffraction a été réalisée avec le logiciel *XDS*. La résolution de la structure a été réalisée par remplacement moléculaire avec le logiciel *Phaser* en utilisant la structure connue du LBD d'ERR α en complexe avec PGC-1 α (*PDB 3D24*). L'affinement et la construction du modèle atomique ont

respectivement été effectués grâce aux logiciels *Phenix* et *Coot*. Enfin, les figures ont été réalisées avec *Pymol*.

3.1.2. Cristallisation des complexes *ERRα*/ADN

3.1.2.1. Préparation des oligonucléotides

Les oligonucléotides d'intérêts comportant les éléments de réponse (*Sigma-Aldrich*) sont hybridés entre brins complémentaires. Pour cela, les oligonucléotides sous forme lyophilisée sont d'abord centrifugés à 25000 g puis suspendus dans une solution composée de 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 1% DMSO, 0,1 mM EDTA et 1 mM MgCl₂ à une concentration finale d'environ 1 mM. Les concentrations exactes après solubilisation sont mesurées pour mélanger les mêmes quantités d'oligonucléotides complémentaires. L'hybridation est réalisée sur la machine PCR T100™ Thermal Cycler (*BIO-RAD*) en chauffant les oligonucléotides à 95°C pendant 2 minutes. Pendant 40 cycles, la température est ensuite diminuée à raison de 1,5°C toutes les 1min15 jusqu'à atteindre 4°C. L'efficacité de l'hybridation est vérifiée sur gel d'acrylamide 20% et la révélation est réalisée au bleu de toluidine.

3.1.2.2. Cristallisation du DBD en complexes avec les oligonucléotides

Les complexes DBD/ADN sont réalisés en mélangeant deux excès molaires de DBD monomérique pour un oligonucléotide. Les complexes à une concentration d'environ 5 mg/mL sont utilisés pour former des gouttes de cristallisation de 800 nL (400 nL + 400 nL) à l'aide du robot Mosquito (*TTP Labtech*) à 20°C, en utilisant des boîtes de type MRC2 ou MRC3 (*Swissci*) avec les screens de cristallisation disponibles sur la plateforme de cristallisation de l'IGBMC (DBD/RAR-RXR, The PEGs (*Qiagen*), PACT (*Hampton Research*), JCSG+ (*Qiagen*), Nucleix (*Qiagen*), ProComplex (*Qiagen*), Wisard I & II (*Emerald Biosciences*), Midas (*Molecular Dimensions*)). Les boîtes de cristallisation sont conservées dans le robot imageur Rock Imager (*Formulatrix*) à 20°C. Les tests de diffraction ont été réalisés à partir de la source de rayons X de l'IGBMC dotée d'une anode tournante Rigaku FR-X et d'un détecteur Pilatus 100K.

3.1.2.3. Cristallisation du récepteur *ERRα* entier en complexe avec les oligonucléotides

Les complexes *ERRα*/ADN sont réalisés avec un ratio équimolaire. Les complexes à une concentration de 1 à 2 mg/mL sont utilisés pour former des gouttes de cristallisation de 800 nL (400 nL + 400 nL) à l'aide du robot Mosquito (*TTP Labtech*) à 20°C en utilisant des boîtes de type MRC2 ou MRC3 (*Swissci*) avec les screens de cristallisation disponibles sur la plateforme de cristallisation de l'IGBMC (DBD/RAR-RXR, The PEGs (*Qiagen*), PACT (*Hampton Research*), JCSG+ (*Qiagen*), Nucleix (*Qiagen*), ProComplex (*Qiagen*), Wisard I & II (*Emerald Biosciences*), Midas (*Molecular Dimensions*)). Les boîtes de cristallisation sont conservées dans le robot imageur Rock Imager (*Formulatrix*) à 4°C. Les tests de diffraction ont été réalisés sur la ligne PXI-X06SA, détecteur Eiger (PSI-SLS, Villigen, Suisse).

3.2. Diffusion des rayons X à petits angles ou Small Angle X-ray Scattering (SAXS)

Le SAXS est une technique de détermination structurale à basse résolution qui permet d'obtenir des paramètres moyens de taille et de forme de particules en solution. Pour cela, un faisceau de rayons X monochromatique est appliqué sur un échantillon dont les intensités de diffusion sont collectées sur un détecteur.

Les données de diffusion aux rayons X en solution sont collectées sur la ligne de lumière Swing du synchrotron SOLEIL (Gif-sur-Yvette, France) et sont analysées avec le programme Foxtrot. Les calculs du profil de diffusion sont réalisés à partir de la structure en solution connue du DBD d'*ERRβ* en complexe avec un oligonucléotide (PDB 1LO1), superposé avec les données de diffusion expérimentalement obtenues,

sont réalisés, avec le logiciel CRY SOL (Atsas). L'enveloppe moléculaire *ab initio* est calculée avec le programme DAMMIF (Atsas).

Résultats & Conclusions

Partie I

Étude du complexe $ERR\alpha$ -LBD/ligand

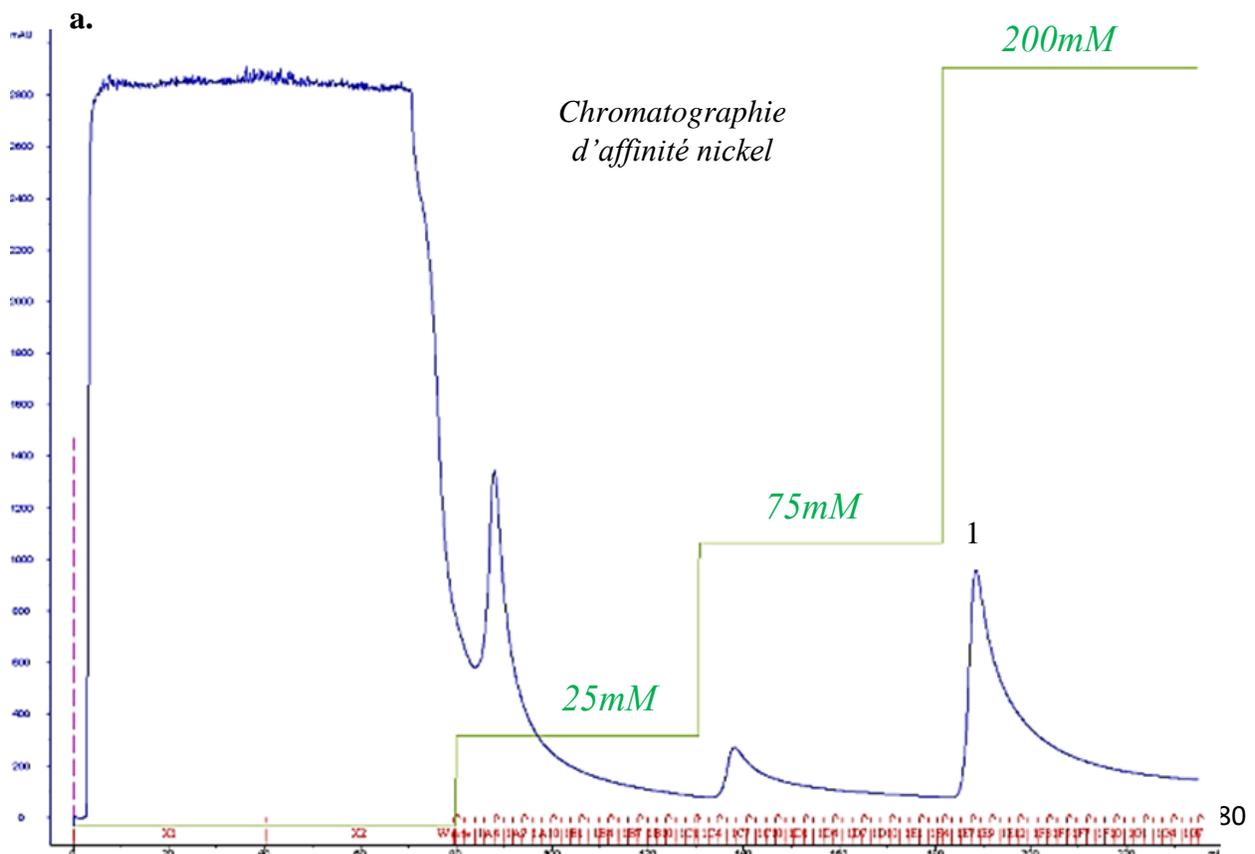
Cette partie du projet concerne l'étude de l'inhibition d' $ERR\alpha$ par le ligand agoniste inverse XCT-790. Cette étude vise à déterminer les bases moléculaires qui caractérisent $ERR\alpha$ dans un état antagoniste induit par XCT-790. Cet inhibiteur fixant spécifiquement le domaine d'interaction aux ligands, LBD, d' $ERR\alpha$, c'est ce domaine qui a été choisi pour l'étude des interactions mises en œuvre lors de leur liaison, en présence de peptides corepresseurs de NCoR contenant les motifs d'interaction I/LXXII aux récepteurs nucléaires. Le comportement biochimique de ces complexes est donc étudié afin de mener à bien l'étude structurale par cristallographie et, *in fine*, de déterminer la structure du LBD d' $ERR\alpha$ avec le XCT-790.

Le LBD a été purifié et utilisé pour former des complexes avec le ligand XCT-790 et les peptides de NCoR. L'interaction entre le LBD et le XCT-790 a été caractérisée par la détermination de la constante de dissociation K_d par thermophorèse à micro-échelle. Les stœchiométries d'interaction du XCT-790 et des peptides avec le LBD ont été étudiées par spectrométrie de masse en conditions natives et la stabilité de ces complexes a été suivie par fluorimétrie différentielle et diffusion dynamique de lumière. Des tests de cristallisation du LBD ont été réalisés en présence des peptides et du ligand, et également avec un peptide coactivateurs de PGC-1 α utilisé comme contrôle qualité du LBD.

L'optimisation de la purification du LBD a permis d'obtenir une protéine dimérique en quantités et qualité nécessaires pour l'étude biophysique et structurale des différents complexes. Les résultats obtenus par fluorimétrie différentielle et diffusion dynamique de lumière ont montré la stabilisation du LBD par le XCT-790. L'interaction du XCT-790 et du LBD a été caractérisée par un K_d de 51,78 nM. Les expériences de spectrométrie de masse en conditions natives ont indiqué qu'une molécule de XCT-790 se liait sur chacun des monomères, alors que la liaison des peptides n'a pas été observée. Les monodispersités des complexes ont été mesurées en parallèle des tests de cristallisation. Des cristaux ont été obtenus mais leur diffraction n'a pas permis d'en déterminer la structure et de confirmer la liaison de NCoR et du XCT-790. D'autres cristaux supposés contenir le complexe du LBD avec PGC-1 α ont été utilisés pour des expériences de trempage (*soaking*) avec le XCT-790. Toutefois, la résolution de la structure a permis de constater la présence du peptide coactivateur de PGC-1 α , qui n'a donc pas permis au XCT-790 de s'insérer dans la poche de liaison aux ligands du LBD.

1. Le domaine LBD est pure et stable pour son étude avec le ligand agoniste inverse XCT-790

Le domaine LBD a été purifié par chromatographie liquide en deux étapes : une première étape de chromatographie d'affinité sur une résine chélatée au nickel a permis d'éliminer la majeure partie des contaminants protéiques, puis une étape de « polissage » par chromatographie d'exclusion stérique a permis d'éliminer les éventuels agrégats et autres contaminants subsistant. Les profils d'élution pour ces deux étapes de purification sont présentés sur la figure 32 et l'efficacité de chacune des étapes de purification est analysée par migration électrophorétique sur gel PAGE-12% en conditions dénaturantes (figure 33). Lors de la première étape d'affinité au nickel, le LBD est élué par compétition à environ 180 mM d'imidazole (figure 32a). L'analyse sur gel SDS-PAGE indique que le LBD est déjà très pur à l'issue de cette étape. Le clivage de l'étiquette hexa-histidine par la thrombine est réalisée efficacement comme le montre le léger retard de migration sur le gel (figure 33). Le LBD est ensuite injecté sur colonne de chromatographie d'exclusion stérique Superdex 200 16/60 et élué à 80mL (figure 32b). La migration sur gel d'un échantillon du pic d'élution montre clairement que le LBD est très pur. Comme le montre le chromatogramme, un autre pic est élué entre 45 et 50 mL. Son analyse indique qu'il ne s'agit pas d'une espèce protéique, réfutant particulièrement l'hypothèse d'une oligomérisation du LBD (figure 33). S'il a été vérifié sur gel que le LBD est relativement pur après ces deux étapes de chromatographie, son homogénéité a aussi été vérifiée par diffusion dynamique de lumière (DLS pour *Dynamic Light Scattering*) (figure 34). La moyenne des paramètres mesurés sur les dix acquisitions réalisées montre une rayon hydrodynamique moyen de 3,38 nm pour une masse moléculaire relative de 58 kDa, ce qui corrobore l'état dimérique du LBD, en incluant sa couche hydrodynamique. De plus, le faible pourcentage de polydispersité évalué à 12,2% indique que le LBD purifié est homogène en solution.



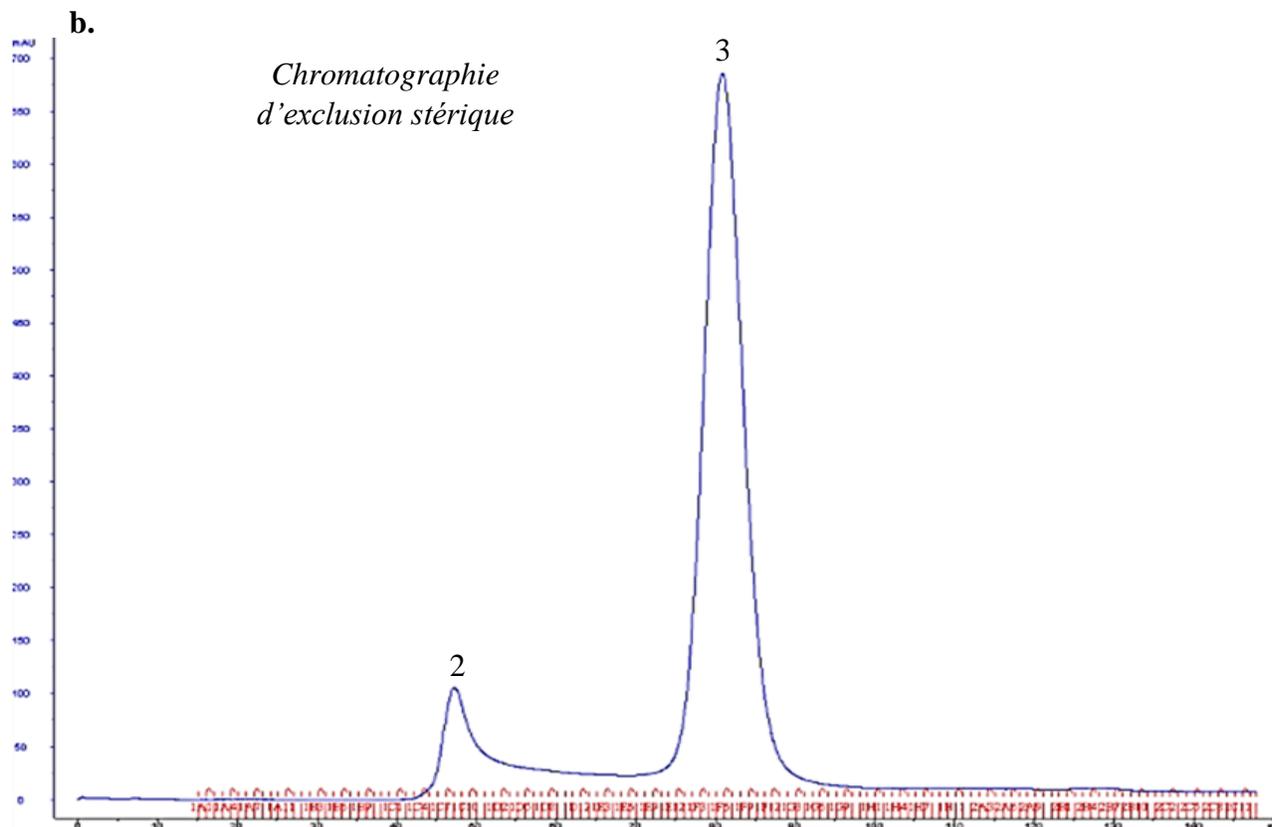


Figure 32 : Purification du domaine LBD par chromatographie d'affinité nickel puis par chromatographie d'exclusion stérique

a. Chromatogramme d'élution de la chromatographie d'affinité nickel. Le pic d'élution du LBD est annoté par « 1 ». En vert sont représentées les trois concentrations croissantes d'imidazole en millimolaire (mM). (Le LBD est élué à 180mM.)

b. Chromatogramme d'élution de la chromatographie d'exclusion stérique. Le pic d'élution du LBD, annoté par « 3 » se situe à 80mL. Le pic « 2 » ne correspond pas à une espèce protéique.

Sur les chromatogrammes, les unités d'absorbances (en mAu) sont représentées en fonction du volume (en mL). Les fractions d'élutions sont représentées en rouge au niveau de l'axe des abscisses.

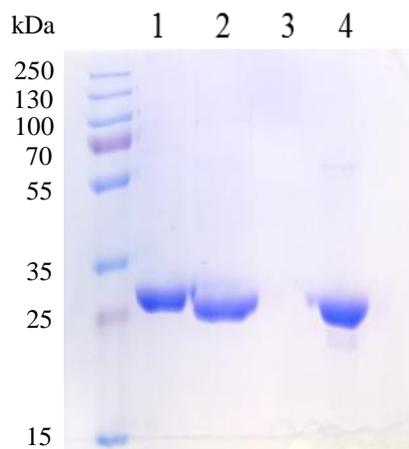
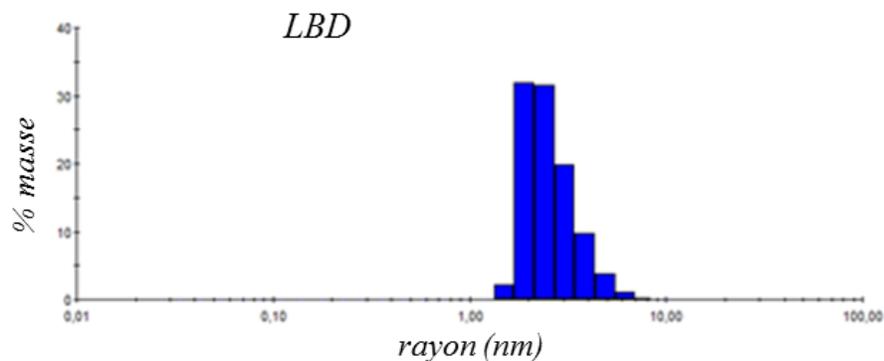


Figure 33 : Suivi de la purification du domaine LBD sur gel dénaturant PAGE-12%

1. LBD élué après la chromatographie d'affinité nickel. 2. LBD après une nuit d'incubation avec la thrombine pour cliver le tag hexa-histidine. 3. Espèce non protéique élué à environ 40mL au cours de la filtration sur gel : pic « 2 » sur le chromatogramme de la figure 32b. 4. LBD élué à environ 80mL lors de la filtration sur gel.

5µg de protéines sont chargés dans chacun des puits. Le gel est coloré au bleu de Coomassie.



	Temp. (°C)	Rayon (nm)	%Pd	Mw-R (kDa)
LBD	25,3	3,38	12,2	58

Figure 34 : Mesures de DLS réalisées sur le LBD purifié

Le poids moléculaire relatif estimé est de 58 kDa correspondant à un dimère de LBD avec sa couche d'eau. Le pourcentage de masse est représenté en fonction du rayon hydrodynamique exprimé en nm.

2. Caractérisation de l'interaction XCT-790/ERR α -LBD

Afin de s'inscrire dans la logique de l'étude structurale de l'inhibition de l'activité d'ERR α par des ligands, j'ai utilisé le ligand agoniste inverse XCT-790 (C₂₃H₁₃F₉N₄O₃S) spécifique d'ERR α . Ce ligand synthétique, qui ne présente pas de structure stéroïdienne, est présenté sur la figure 35.

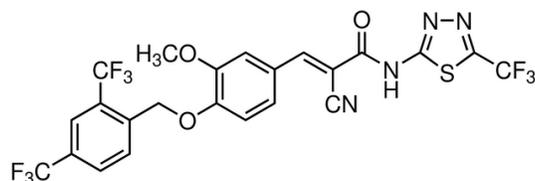


Figure 35 : Structure chimique du XCT-790, ligand agoniste inverse ciblant spécifiquement ERR α

2.1. Étude préliminaire de l'interaction entre le LBD, le ligand XCT-790 et les peptides NCoR

Le LBD purifié est utilisé pour former un complexe avec le XCT-790 et avec les peptides dits PF25 et PF26, issus de la protéine corépressive NCoR, correspondant respectivement au motif 2 de séquence²⁰⁶⁸⁻²⁰⁸³ TLADHICQIITQDFAR²⁰⁸³ et au motif 3 de séquence²²⁷¹⁻²²⁸⁷ ASNLGLEDIIRKALMGS²²⁸⁷. La formation des complexes est suivie par migration électrophorétique sur gel PAGE-8% en conditions natives (figure 36a). Le LBD seul est utilisé comme témoin. Le XCT-790 étant solubilisé dans 100% de DMSO, un contrôle LBD/DMSO est également effectué pour attester de l'effet potentiellement dénaturant et/ou précipitant du DMSO sur la protéine. Au vu du résultat après migration, en comparant le LBD seul au LBD/DMSO, le DMSO, à une concentration finale d'environ 5%, n'a pas d'effet sur la stabilité du LBD. Les complexes formés (LBD/XCT-790, LBD/PF25, LBD/PF26, LBD/PF25/XCT-790 et LBD/PF26/XCT-790) migrent tous au même niveau et aucun retard de migration significatif n'est visible, ne permettant pas d'affirmer avec certitude que le ligand et les peptides se lient au LBD. Un test a été réalisé avec les complexes LBD/XCT-790, LBD/XCT-790/PF25 et LBD/XCT-790/PF26 sur gel de type Phast (GE Healthcare®)

dénaturant SDS-PAGE, incluant un gradient d'acrylamide de 8% à 25%, permettant une meilleure résolution. Cependant, même avec ce type de gel, aucun retard de migration n'a pu être observé (figure 36b).

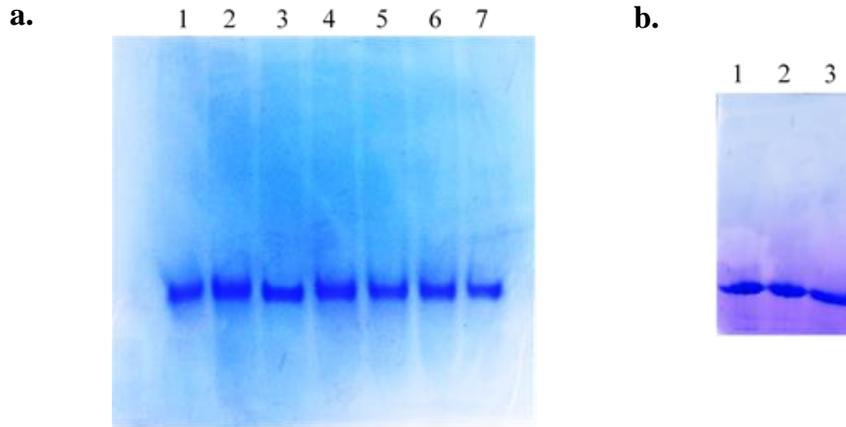


Figure 36 : Migration sur gel des complexes LBD/XCT-790/peptides en conditions natives

a. Profil de migration sur gel natif PAGE-8% : 1. LBD seul, 2. LBD/DMSO, 3. LBD/XCT-790, 4. LBD/PF25, 5. LBD/PF26, 6. LBD/PF25/XCT-790, 7. LBD/PF26/XCT-790. $3\mu\text{g}$ de protéines sont déposés dans chacun des puits.
b. Profil de migration sur gel natif *Phast* imposant un gradient d'acrylamide de 8% à 25% : 1. LBD/XCT-790, 2. LBD/PF25/XCT-790, 3. LBD/PF26/XCT-790. $1\mu\text{g}$ de protéine est déposé dans chacun des puits.

2.2. *Le LBD interagit avec haute affinité avec le XCT-790 et est stabilisé en sa présence*

Parallèlement à la détermination des bases moléculaires d'interactions entre le LBD et le XCT-790, il était important de mesurer l'affinité du XCT-790 pour son récepteur, une information importante à prendre en compte, notamment pour la stratégie à adopter pour les essais de cristallisation. En ce sens, la constante de dissociation K_d de ce complexe a été déterminée grâce à la technique de thermophorèse à micro-échelle (MST, *Microscale Thermophoresis* développée par *Nanotemper technologies GmbH, Munich*). Le LBD, marqué sur ses cystéines par le fluorophore NT-647-NHS, est titré par le ligand XCT-790. Les premiers tests pour ces expériences ont été réalisés dans le tampon de chromatographie d'exclusion stérique utilisé lors de la purification. Les courbes de thermophorèse observées présentaient un caractère « bosselé », signe de la présence d'agrégats protéiques au sein de l'échantillon. Ces phénomènes d'agrégation s'observant notamment en présence d'une solution tampon non appropriée, cette dernière a été optimisée en termes de pH et de concentration saline en utilisant la technique de fluorimétrie différentielle (DSF, *Differential-Scanning Fluorimetry*), aussi appelée *Thermofluor Assay*.

2.2.1. *Thermofluor Assay : détermination d'un tampon approprié pour les expériences de MST*

La technique de *Thermofluor Assay* permet de suivre la dénaturation des protéines au cours d'un gradient croissant de température, et d'en déterminer un paramètre T_m , aussi appelé température de demi-dénaturation. Selon les conditions de solution tampon, plus le T_m est élevé, plus la protéine ou le complexe protéique est stable. Un screen de 24 solutions tampons a été mis au point, afin de tester des gammes de concentrations salines et de pH allant respectivement de 50 mM à 400 mM de NaCl et de 6,0 à 8,0, en utilisant le Bis-Tris et le Tris comme molécules tampon (tableau 5). Ces expériences ont été réalisées sur le

LBD seul comme contrôle et sur les complexes LBD/XCT-790 et LBD/XCT-790/PF25 pour suivre la stabilisation du LBD après fixation du ligand ou du peptide corépresseur.

	1	2	3	4	5	6
A	50 mM NaCl 100 mM Bis-Tris pH 6,0	100 mM NaCl 100 mM Bis-Tris pH 6,0	200 mM NaCl 100 mM Bis-Tris pH 6,0	250 mM NaCl 100 mM Bis-Tris pH 6,0	300 mM NaCl 100 mM Bis-Tris pH 6,0	400 mM NaCl 100 mM Bis-Tris pH 6,0
B	50 mM NaCl 100 mM Bis-Tris pH 6,5	100 mM NaCl 100 mM Bis-Tris pH 6,5	200 mM NaCl 100 mM Bis-Tris pH 6,5	250 mM NaCl 100 mM Bis-Tris pH 6,5	300 mM NaCl 100 mM Bis-Tris pH 6,5	400 mM NaCl 100 mM Bis-Tris pH 6,5
C	50 mM NaCl 100 mM Bis-Tris pH 7,0	100 mM NaCl 100 mM Bis-Tris pH 7,0	200 mM NaCl 100 mM Bis-Tris pH 7,0	250 mM NaCl 100 mM Bis-Tris pH 7,0	300 mM NaCl 100 mM Bis-Tris pH 7,0	400 mM NaCl 100 mM Bis-Tris pH 7,0
D	50 mM NaCl 100 mM Tris pH 8,0	100 mM NaCl 100 mM Tris pH 8,0	200 mM NaCl 100 mM Tris pH 8,0	250 mM NaCl 100 mM Tris pH 8,0	300 mM NaCl 100 mM Tris pH 8,0	400 mM NaCl 100 mM Tris pH 8,0

Tableau 5 : Screen Thermofluor utilisé pour la détermination d'un tampon approprié des expériences de MST
Une gamme de concentration de NaCl (de 50mM à 400mM) est testée pour les différents pH (à 100mM) Bis-Tris à pH 6,0, 6,5 et 7,0 et Tris à pH 8,0.

Les résultats présentés sur la figure 37 montrent le suivi de l'intensité de fluorescence en fonction de la température en degré Celsius (°C). Parmi tous les tampons testés, le Bis-Tris à pH 6,5 est celui pour lequel les T_m du LBD, seul ou en complexe avec le ligand et le peptide, sont les plus élevés, suggérant que ce tampon permet une meilleure stabilité. Par ailleurs, la fluorescence initiale à 20°C est supérieure pour le LBD seul par rapport au complexe LBD/XCT-790, indiquant que le LBD *apo* expose des régions hydrophobes au solvant, ce qui ne semble plus être le cas en présence du XCT-790. Ceci suggère une meilleure structuration du LBD ainsi qu'une stabilisation accrue. De plus, l'ajout du XCT-790 induit une augmentation significative du T_m , passant de 52°C à 58°C, ce qui conforte l'idée d'une meilleure stabilité et solubilité du LBD en présence de ce ligand (figure 37a). La courbe de fluorescence du complexe LBD/XCT-790/PF25 présente la même allure que celle du complexe LBD/XCT-790 et indique également un T_m de 58°C (figure 37b). Pour le LBD seul et pour les deux autres complexes, pour un même pH, la variation de concentration en sel n'a pas d'influence sur le T_m . Ainsi, pour la suite des expériences de MST, le tampon choisi fut le suivant : 20 mM Bis-Tris pH 6,5, 200 mM NaCl et 1 mM TCEP.

2.2.2. Détermination du K_d caractérisant les interactions entre le LBD et le XCT-790

La technique de MST permet de quantifier les interactions entre biomolécules en mesurant les mouvements thermophorétiques de ces dernières sous l'influence d'un gradient de température. L'un des deux partenaires, marqué par un fluorophore, est tenu à concentration constante et titré par la seconde molécule non marquée. Les changements locaux de fluorescence sous l'effet du gradient de température provoqué par un laser permettent la détermination précise de la constante de dissociation K_d .

Le nouveau tampon (20 mM Bis-Tris pH 6,5, 200 mM NaCl et 1 mM TCEP) déterminé par fluorescence différentielle a permis de mener à bien les expériences de MST. Les signaux thermophorétiques de huit expériences différentes sont enregistrés et normalisés. La figure 38a montre que les comportements thermophorétiques sont reproductibles d'une mesure à l'autre. Aussi, l'absence de variations aléatoires dans les courbes confirme bien que la protéine ne s'agrège pas dans ce nouveau tampon. La fluorescence

normalisée est représentée en fonction de la concentration de XCT-790 résultant en une courbe de liaison sigmoïdale (figure 38b). Le K_d calculé de l'interaction entre le LBD et le XCT-790 est de 51,78 nM.

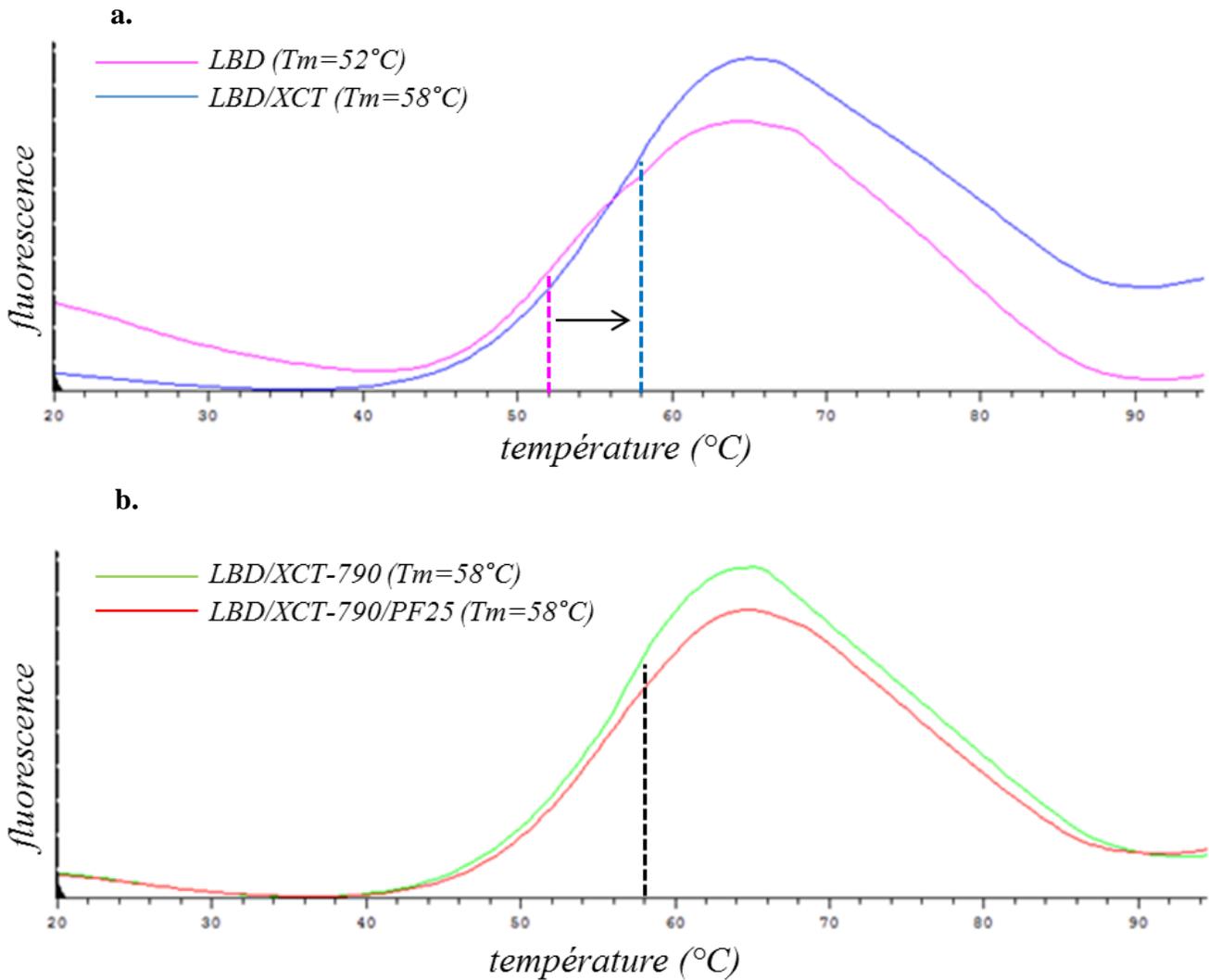


Figure 37 : Courbes de dénaturation du LBD et de complexes LBD/XCT-790 et LBD/XCT-790/PF25

a. La dénaturation du LBD (rose) est comparée à celle du complexe LBD/XCT-790 (bleu). Le LBD est plus stable en présence du XCT-790 **b.** La dénaturation du complexe LBD/XCT-790 est comparée à celle du complexe LBD/XCT-790/PF25. La stabilité est inchangée entre les deux complexes. La fluorescence est représentée en fonction de la température allant de 20°C à 95°C.

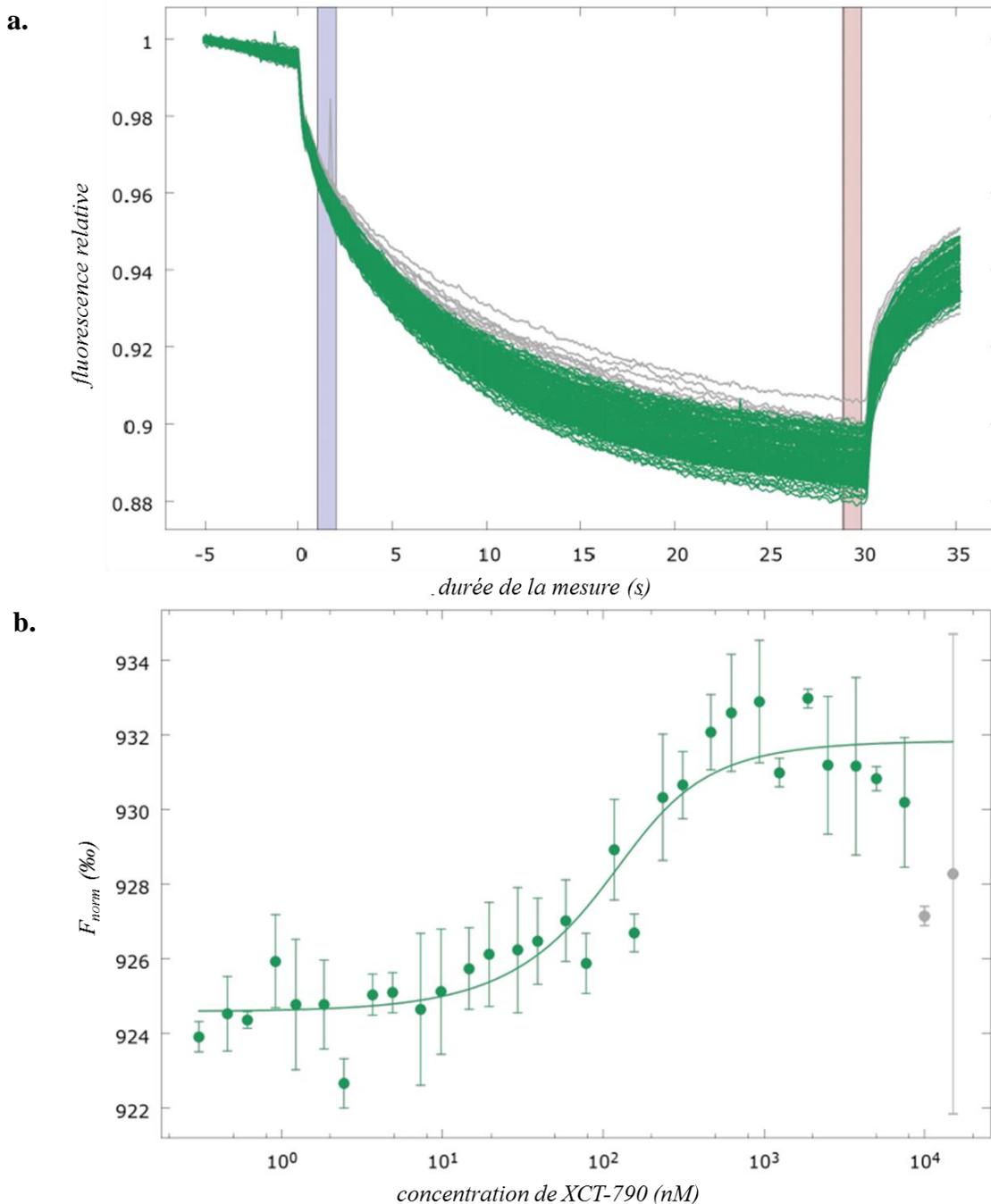


Figure 38 : Détermination de la constante de dissociation K_d caractérisant l'interaction entre le LBD et le XCT-790.

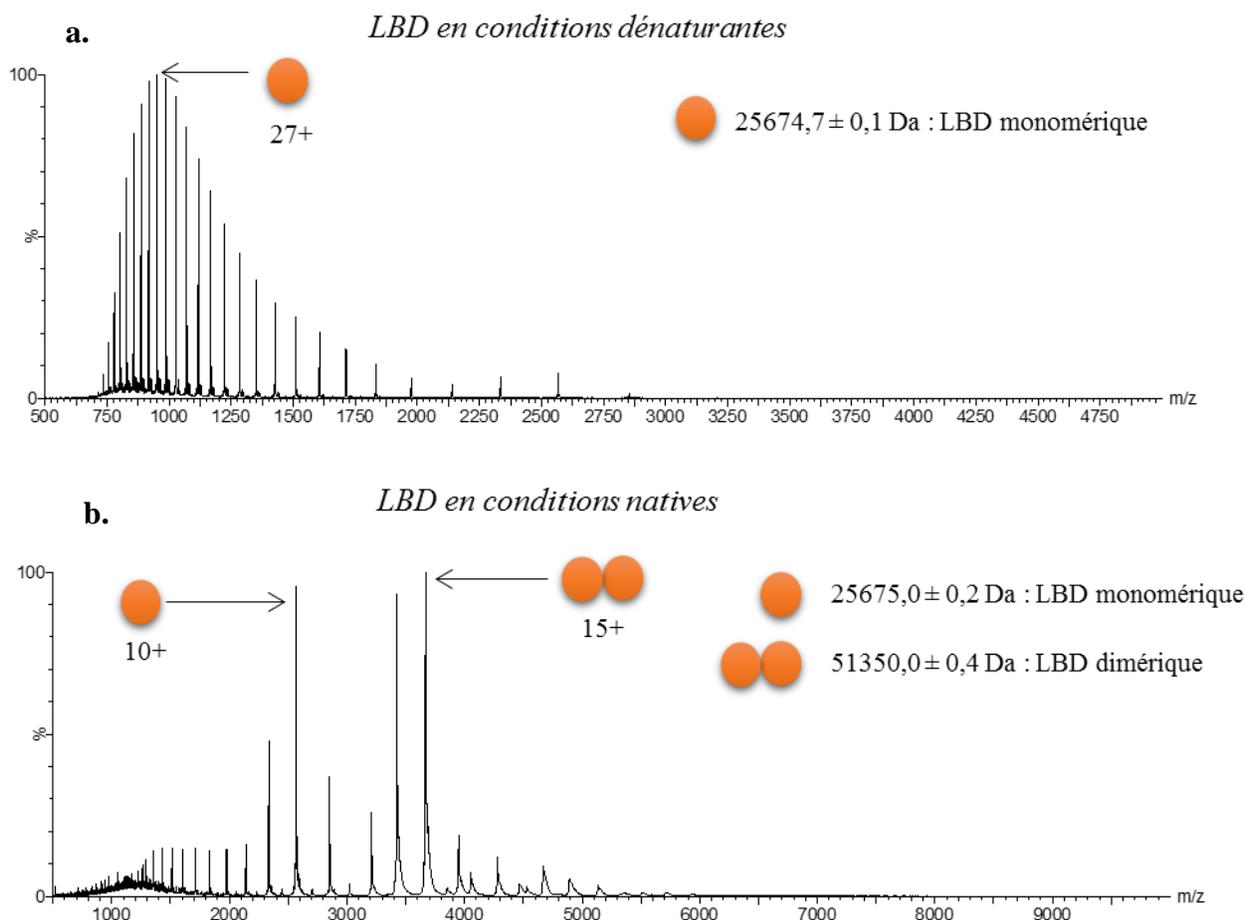
Le LBD marqué est tenu à concentration constante et est titré en fonction de concentrations croissantes de XCT-790.

a. Courbes de thermophorèse où la fluorescence normalisée sur huit mesures est représentée en fonction du temps de mesure en secondes. Les données sont enregistrées à 25°C pour des puissances d'excitation et de laser-IR respectivement de 40% et 20%. Le moment de thermophorèse pris en compte pour le tracé de la courbe de liaison sigmoïdale est représenté par les barres bleue et rose. Les courbes grisées correspondent aux mesures non significatives qui n'ont pas été prises en compte pour l'expérience. **b.** Sigmoïde de liaison permettant la détermination du K_d . Les barres d'erreur sur les huit mesures sont représentées pour chaque point ($\chi^2 = 3,11$; $SER = 1,01$). Les points grisés correspondent aux données non significatives non prises en compte pour la détermination du K_d . La concentration de XCT-790 varie de 0,94 μM à 15 μM pour une concentration constante de LBD marqué de 120 nM.

3. Stœchiométrie de l'interaction LBD/XCT-790

Dans le but de déterminer la stœchiométrie de liaison du XCT-790 sur un dimère de LBD et de vérifier la liaison des peptides de NCoR en présence du XCT-790, des expériences de spectrométrie de masse ESI-TOF (*Electro Spray Ionisation – Time Of Flight*) en condition natives ont été menées. Les données ont été enregistrées pour le domaine LBD seul et pour les complexes suivants : LBD/DMSO, LBD/XCT-790, LBD/PF25, LBD/PF26, LBD/XCT-790/PF25 et LBD/XCT-790/PF26. Un premier contrôle a été réalisé pour le LBD seul en condition dénaturantes et a permis de confirmer que ce domaine est détectable en phase gazeuse et que sa masse moléculaire mesurée correspond à sa masse moléculaire théorique, indiquant qu'il n'a pas subi de dégradation (figure 39a). Un second contrôle du domaine LBD seul a ensuite été réalisé en conditions natives et indique que des espèces monomériques et dimériques, en proportions quasi-égales, sont présentes en solution (figure 39b).

Le ligand XCT-790 est une molécule très hydrophobe solubilisée dans du DMSO pur, solvant organique pouvant, à partir d'une certaine quantité, induire la précipitation et la dénaturation des protéines. Pour vérifier que le DMSO n'a pas d'effet néfaste sur le LBD, un spectre LBD/DMSO a été mesuré comme contrôle. Une mesure à un voltage de 80 V indique une équivalence de monomère et de dimère alors qu'une mesure à 120 V induit la dissociation d'une partie des dimères en monomères (figure 39c). Pour conclure, la présence de DMSO au sein des complexes n'a pas d'influence sur la qualité du LBD et n'induit ni sa dénaturation ni sa précipitation.



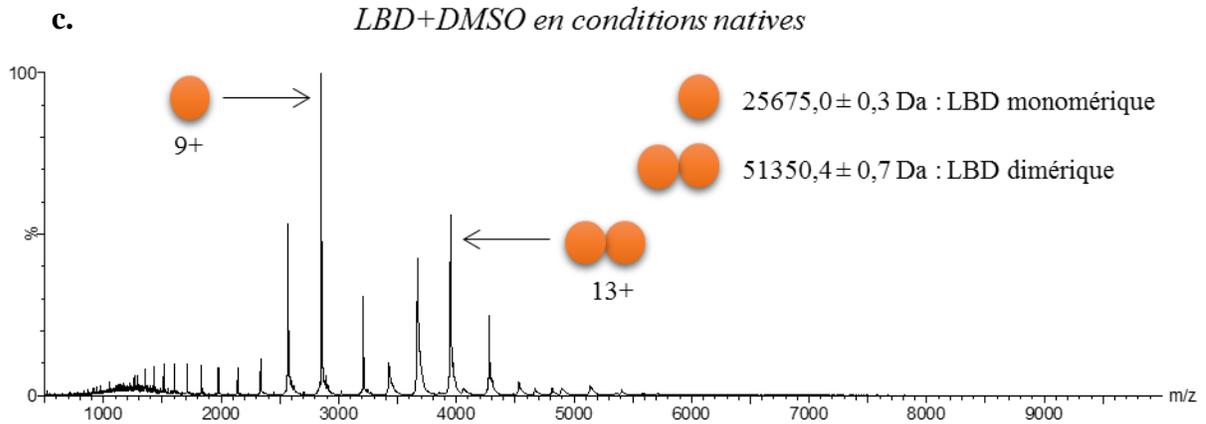


Figure 39 : Spectres de spectrométrie de masse pour le domaine LBD

a. LBD seul en conditions dénaturantes ($V_c=40V$, $P_i=2mbar$), **b.** LBD seul en conditions natives ($V_c=80V$, $P_i=6mbar$), **c.** LBD+DMSO en conditions natives ($V_c=120V$, $P_i=6mbar$). Le pourcentage d'intensité est représenté en fonction du rapport m/z. Les différentes espèces présentes sont indiquées par une flèche. Un monomère de LBD est représenté par un rond orange.

Les mesures du complexe LBD/XCT-790 montrent une prédominance de formes dimériques où une molécule de XCT-790 est liée sur chacun des monomères. De très faibles pourcentages d'autres espèces sont également observés : des LBD dimériques avec uniquement une molécule de XCT-790 liée sur l'un des deux monomères, des monomères de LBD avec une molécule de XCT-790 liée et des monomères de LBD *apo* (figure 40). En conclusion, malgré la présence d'espèces minoritaires, les dimères de LBD lient une molécule de XCT-790 sur chacun de leur monomères, permettant de définir une stoechiométrie 2:2.

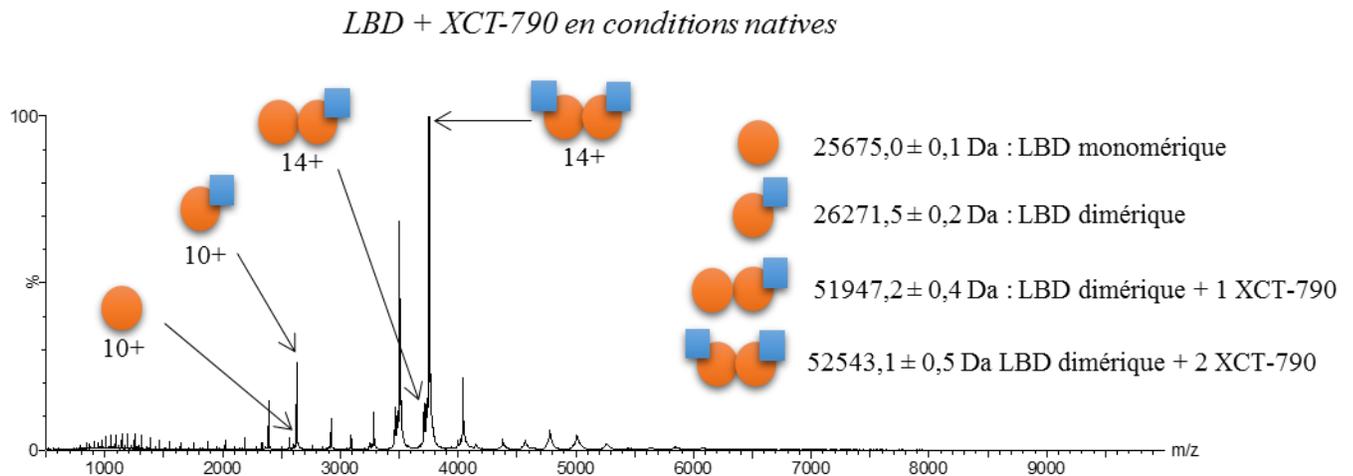


Figure 40 : Spectres de spectrométrie de masse pour le complexe LBD/XCT-790

Le spectre est enregistré sous des conditions natives ($V_c=80V$, $P_i=6mbar$). Le pourcentage d'intensité est représenté en fonction du rapport m/z. Les différentes espèces présentes sont indiquées par une flèche. Un monomère de LBD est représenté par un rond orange et une molécule de ligand XCT-790 est représentée par un carré bleu.

Afin de vérifier la fixation et la stœchiométrie des peptides de NCoR PF25 et PF26, des mesures avec ces derniers ont été réalisées avec et sans le XCT-790. Les complexes LBD/PF25 et LBD/PF26 sans ligand présentent des spectres identiques à celui obtenu pour l'expérience contrôle du LBD seul en condition dénaturantes. En effet, seul le LBD est retrouvé sous ses formes monomériques et dimériques et aucun des peptides n'est détecté. En présence du XCT-790, des résultats similaires à ceux du complexe LBD/XCT-790 sont observés, indiquant que les peptides ne sont pas détectés au sein des complexes. Le XCT-790, quant à lui, est bien fixé au LBD avec cependant une prédominance de l'espèce 2:1 (une molécule de XCT-790 par dimère) pour le complexe LBD/XCT-790/PF25 et 2:2 pour le complexe LBD/XCT-790/PF26. L'absence de peptides peut s'expliquer par leur dissociation lors de l'étape de dessalage, leur affinité pour le LBD étant certainement moindre par rapport à celle du XCT-790, ou par un voltage imposé trop important.

4. Étude structurale du complexe LBD/XCT-790

4.1. Retour aux structures LBD/antagonistes connues et stratégie adoptée pour la cristallisation

Les études du LBD d'ERR α avec des ligands antagonistes ont permis de déterminer les deux structures avec les molécules appelées composé 29 et composé 1a respectivement en 2011 et en 2007 (Patch *et al.* 2011, Kallen *et al.* 2007). Le complexe LBD/composé 29 a été cristallisé à 4°C dans une solution de cristallisation composée de 0,1 M PIPES pH 6,5, 0,2 M NaSCN, 1,4 M (NH₄)₂SO₄ tandis que le complexe LBD/composé 1a a été cristallisé dans 0,1 M HEPES pH 7,5, 0,2 M MgCl₂, 12% PEG 400 également à 4°C. Sur la base de ces conditions et dans l'idée d'étudier le LBD avec le ligand agoniste inverse XCT-790, un screen de cristallisation a été conçu, regroupant ces conditions connues ainsi que des conditions proches (tableau 6). De plus, en 2008, la structure du LBD a été présentée en complexe avec un peptide issu du coactivateur protéique PGC-1 α (Greschik *et al.* 2008). Ce peptide, appelé PI251, contient le motif canonique d'interaction aux récepteurs nucléaires LXXLL (¹⁹⁸-QQQKPQRRPCSELLKYLTNDD⁻²¹⁹). Ce complexe a été cristallisé dans les conditions 0,1 M Bis-Tris pH 5,5, 0,2 M Mg(NO₃)₂, 15% PEG 3350 à 20°C. Bien qu'il s'agisse de la structure d'une conformation agoniste du LBD, cette condition de cristallisation a également été prise en considération pour la mise au point d'un autre screen, incluant des paramètres de la condition de cristallisation du complexe LBD/composé 1a, comme par exemple, le PEG 400 comme agent précipitant (tableau 7). Ces conditions ont été testées sur le complexe LBD/XCT-790, ainsi que sur le complexe LBD/PI251 servant de contrôle positif pour confirmer la qualité du LBD purifié et la reproductibilité de la cristallisation. Des screens commerciaux, disponibles sur la plateforme de biologie et génomique structurales de l'IGBMC, ont également été testés.

	1	2	3	4	5	6	
A	0,08M	0,10M	0,20M	0,25M	0,30M	0,35M	0,1M PIPES pH 6,5
	1,4M (NH ₄) ₂ SO ₄						
B	1,0M	1,2M	1,4M	1,6M	1,8M	2,0M	0,1M PIPES pH 6,5
	0,20M NaSCN						
C	0,08M	0,10M	0,20M	0,25M	0,30M	0,35M	0,1M BTP pH 5,5
	15% PEG 3350						
D	10%	13%	15%	16%	18%	20%	0,1M BTP pH 5,5
	0,20M Mg(NO ₃) ₂						

Tableau 6 : Screen conçu sur la base des conditions de cristallisation des structures des complexes LBD/composé 29 (PDB 3K6P) et LBD/composé 1a (PDB 2PJJ).

Ligne A : Pour un tampon à 0,1M PIPES pH 6,5, la concentration de sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄ est tenue constante à 1,4M alors que la concentration de thiocyanate de sodium NaSCN est augmentée graduellement de 0,08M à 0,35M.

Ligne B : Pour un tampon à 0,1M PIPES pH 6,5, la concentration de thiocyanate de sodium NaSCN est tenue constante à 0,2M alors que la concentration de sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄ est augmentée graduellement de 1,0M à 2,0M.

Ligne C : Pour un tampon à 0,1M BTP pH 5,5, la concentration de PEG 3350 est tenue constante à 15% alors que la concentration de nitrate de magnésium Mg(NO₃)₂ est augmentée graduellement de 0,08M à 0,35M.

Ligne D : Pour un tampon à 0,1M BTP pH 5,5, la concentration de nitrate de magnésium Mg(NO₃)₂ est tenue constante à 0,20M alors que la concentration de PEG3350 est augmentée graduellement de 10% à 20%.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	9%	12%	15%	18%	21%	24%	9%	12%	15%	18%	21%	24%	0,1M Bis-Tris pH 5,5
	0,20 M Mg(NO ₃) ₂						0,20 M Mg(NO ₃) ₂						
B	0,08M	0,12M	0,16M	0,20M	0,24M	0,28M	0,08M	0,12M	0,16M	0,20M	0,24M	0,28M	0,1M Bis-Tris pH 5,5
	15% PEG 400						15% PEG 3350						
C	9%	12%	15%	18%	21%	24%	9%	12%	15%	18%	21%	24%	0,1M NaCaCo pH 5,5
	0,20 M Mg(NO ₃) ₂						0,20 M Mg(NO ₃) ₂						
D	0,08M	0,12M	0,16M	0,20M	0,24M	0,28M	0,08M	0,12M	0,16M	0,20M	0,24M	0,28M	0,1M NaCaCo pH 5,5
	15% PEG 400						15% PEG 3350						
E	9%	12%	15%	18%	21%	24%	9%	12%	15%	18%	21%	24%	0,1M Hepes pH 7,5
	0,20 M Mg(NO ₃) ₂						0,20 M Mg(NO ₃) ₂						
F	0,08M	0,12M	0,16M	0,20M	0,24M	0,28M	0,08M	0,12M	0,16M	0,20M	0,24M	0,28M	0,1M Hepes pH 7,5
	15% PEG 400						15% PEG 3350						
G	9%	12%	15%	18%	21%	24%	9%	12%	15%	18%	21%	24%	0,1M Tris pH 7,5
	0,20 M Mg(NO ₃) ₂						0,20 M Mg(NO ₃) ₂						
H	0,08M	0,12M	0,16M	0,20M	0,24M	0,28M	0,08M	0,12M	0,16M	0,20M	0,24M	0,28M	0,1M Tris pH 7,5
	15% PEG 400						15% PEG 3350						
	PEG 400						PEG 3350						

Tableau 7 : Screen conçu sur la base des conditions de cristallisation des structures des complexes LBD/PI251 (PDB 3D24) et LBD/composé 1a (PDB 2PJL).

Ligne A : Pour un tampon à 0,1M bis-tris pH 5,5, la concentration de nitrate de magnésium $Mg(NO_3)_2$ est tenue constante à 0,20M alors que les concentrations de PEG400 et PEG3350 sont augmentées graduellement de 9% à 24%.

Ligne B : Pour un tampon à 0,1M bis-tris pH 5,5, les concentrations de PEG400 et PEG3350 sont tenues constantes à 15% alors que la concentration de nitrate de magnésium $Mg(NO_3)_2$ est augmentée graduellement de 0,08M à 0,28M.

Ligne C : Pour un tampon à 0,1M NaCaCo pH 5,5, la concentration de nitrate de magnésium $Mg(NO_3)_2$ est tenue constante à 0,20M alors que les concentrations de PEG400 et PEG3350 sont augmentées graduellement de 9% à 24%.

Ligne D : Pour un tampon à 0,1M NaCaCo pH 5,5, les concentrations de PEG400 et PEG3350 sont tenues constantes à 15% alors que la concentration de nitrate de magnésium $Mg(NO_3)_2$ est augmentée graduellement de 0,08M à 0,28M.

Ligne E : Pour un tampon à 0,1M HEPES pH 7,5, la concentration de nitrate de magnésium $Mg(NO_3)_2$ est tenue constante à 0,20M alors que les concentrations de PEG400 et PEG3350 sont augmentées graduellement de 9% à 24%.

Ligne F : Pour un tampon à 0,1M HEPES pH 7,5, les concentrations de PEG400 et PEG3350 sont tenues constantes à 15% alors que la concentration de nitrate de magnésium $Mg(NO_3)_2$ est augmentée graduellement de 0,08M à 0,28M.

Ligne G : Pour un tampon à 0,1M tris pH 7,5, la concentration de nitrate de magnésium $Mg(NO_3)_2$ est tenue constante à 0,20M alors que les concentrations de PEG400 et PEG3350 sont augmentées graduellement de 9% à 24%.

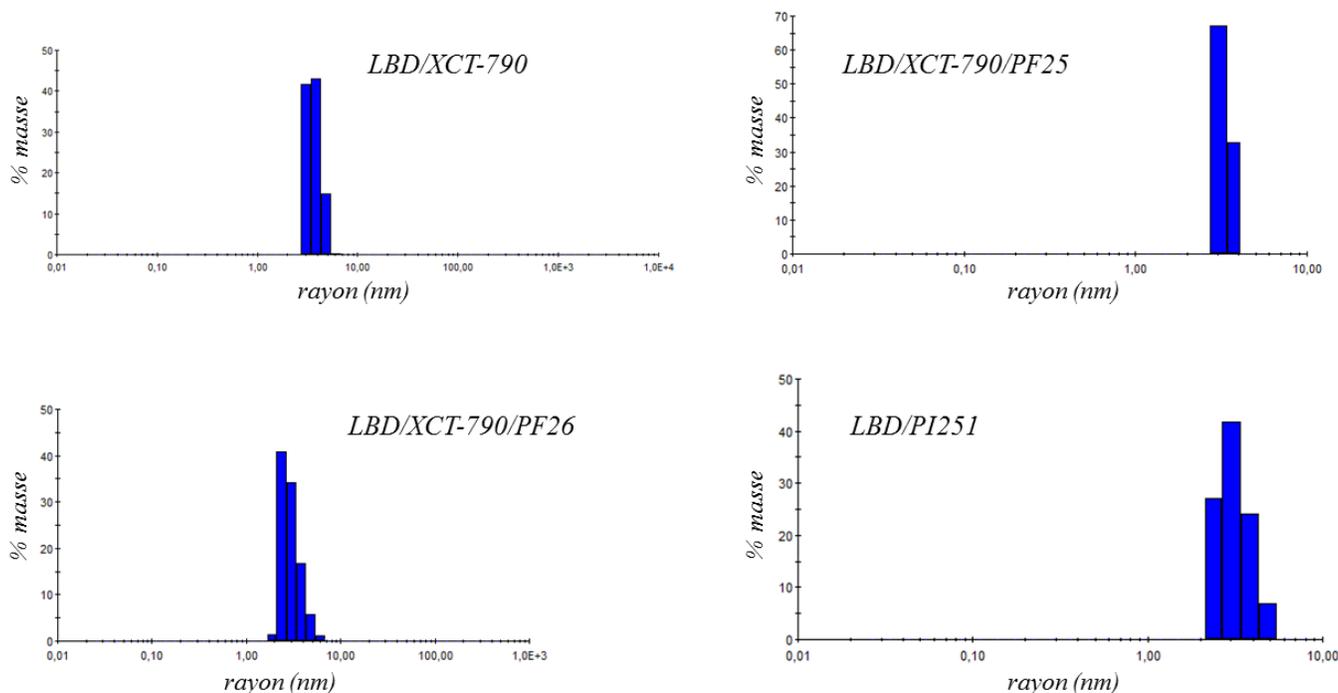
Ligne H : Pour un tampon à 0,1M tris pH 7,5, les concentrations de PEG400 et PEG3350 sont tenues constantes à 15% alors que la concentration de nitrate de magnésium $Mg(NO_3)_2$ est augmentée graduellement de 0,08M à 0,28M.

4.2. Tests de cristallisation

Les tests de cristallisation ont été réalisés simultanément sur les complexes préformés LBD/PI251 et LBD/XCT-790/peptide. Les screens présentés dans les tableaux 6 et 7, ainsi que de nombreux screens commerciaux ont été utilisés pour ces essais. Des températures d'incubation de 4°C et 20°C ont été testées

4.2.1. Suivi parallèle par DLS

Lors des expériences de cristallisation, les échantillons utilisés ont été systématiquement analysés par DLS, afin de confirmer l'homogénéité des complexes protéiques. Pour la cristallisation des protéines, un faible index de polydispersité est en effet synonyme d'une plus forte probabilité de nucléation et d'une meilleure croissance des cristaux, bien que d'autres paramètres influencent le processus de cristallisation, tels que la température, la nature chimique des conditions précipitantes, la concentration protéique, etc. Les mesures réalisées sur les complexes LBD/XCT-790, LBD/XCT-790/PF25, LBD/XCT-790/PF26 et LBD/PI251 sont présentées sur la figure 9, où la moyenne des paramètres sur dix acquisitions indique respectivement : 4,29 nm, 3,44 nm, 3,45 nm et 3,54 nm pour le rayon hydrodynamique des particules ; 102 kDa, 61 kDa, 61 kDa et 65 kDa pour la masse moléculaire relative ; et 21,0%, 6,7%, 10,3% et 10,0% pour le pourcentage de polydispersité. Il est intéressant de noter que ce pourcentage de polydispersité est plus faible en présence des peptides, ce qui témoigne d'une meilleure homogénéité des complexes. À l'inverse, le complexe LBD/XCT-790 présente un pourcentage de polydispersité, un rayon et une masse plus élevés (figure 41). Toutefois, les valeurs de polydispersité obtenues pour les complexes sont globalement favorables à la réalisation des tests de cristallisation.



	Temp. (°C)	Rayon (nm)	%Pd	Mw-R (kDa)
LBD/XCT-790	25,0	4,29	21,0	102
LBD/XCT-790/PF25	25,0	3,44	6,7	61
LBD/XCT-790/PF26	25,0	3,45	10,3	61
LBD/PI251	25,0	3,54	10,0	65

Figure 41 : Mesures de DLS réalisées sur les complexes LBD/XCT-790, LBD/XCT-790/PF25, LBD/XCT-790/PF26 et LBD/PI251

Sur les diagrammes, le pourcentage de masse est représenté en fonction du rayon des particules en nanomètre (nm) (haut). Les paramètres caractérisant les particules sont résumés dans le tableau (bas).

4.2.2. Complexes LBD/XCT-790/PF25 et LBD/XCT-790/PF26

Des tests de cristallisation ont été menés sur les complexes préformés LBD/XCT-790/PF25 et LBD/XCT-790/PF26. Après trois semaines, des cristaux du complexe LBD/XCT-790/PF25 d'environ 90 µm sont apparus dans la condition 0,1 M Na Cacodylate pH 6,0, 0,16 M Mg(NO₃)₂, 15% PEG3350 (figure 42). Une fois leur croissance achevée, ces cristaux ont été récoltés et congelés sur boucle dans l'azote liquide, préalablement traités avec différentes solutions de cryoprotection, présentées dans le tableau 8.

Solution cryoprotectante	Composition
1	0,1 M NaCaCo pH 6,0, 0,2 M Mg(NO ₃) ₂ , 15% PEG 3350 et 5% éthylène glycol
2	0,1 M NaCaCo pH 6,0, 0,2 M Mg(NO ₃) ₂ et 25% éthylène glycol
3	0,1 M NaCaCo pH 6,0, 0,2 M Mg(NO ₃) ₂ , 15% PEG 400 et 5% éthylène glycol

Tableau 8 : Détail de la composition des solutions cryoprotectantes utilisées pour le traitement des cristaux de complexes LBD

Des données de diffraction n'ont pu être obtenues uniquement pour les cristaux traités avec le cryoprotectant n°3, pour lesquels une résolution de 3.5 Å a pu être atteinte. Cependant, il n'était pas possible d'indexer les réflexions afin d'en déterminer un groupe d'espace. Le caractère plutôt allongé des tâches de diffraction semblable à un cliché de diffraction de poudre indique en effet un chevauchement de plusieurs réseaux au sein du cristal (figure 42). Ce mauvais conditionnement de l'empilement cristallin témoigne probablement d'un mauvais processus de cristallisation ou d'une perturbation du réseau survenue lors de la congélation des cristaux.

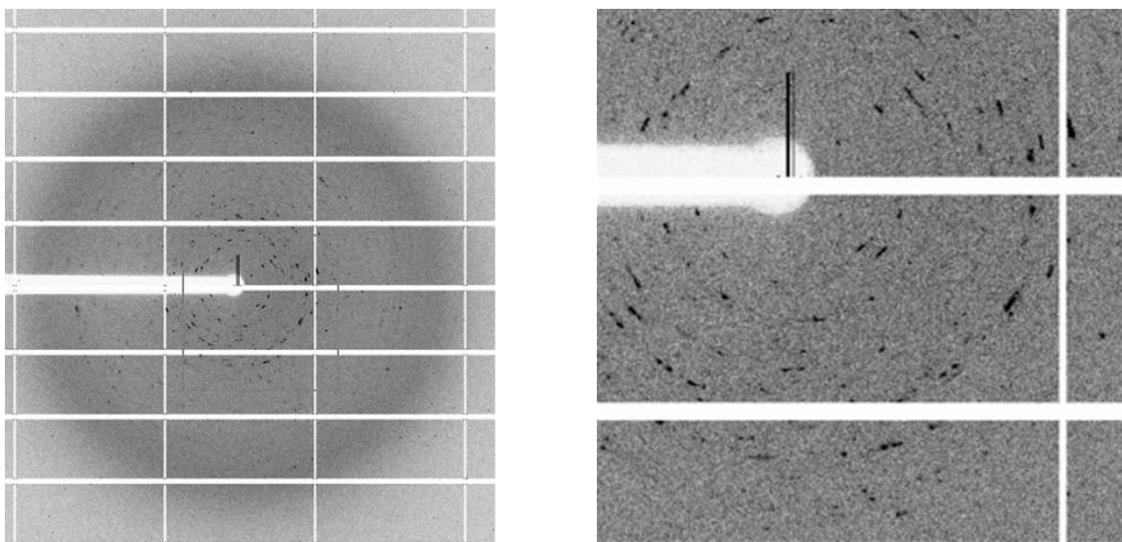


Figure 42 : Cristaux du complexes LBD/XCT-790/PF25 (haut) et le cliché de diffraction correspondant (bas)
 Les tâches de diffraction mesurées ne permettent pas de déterminer le groupe d'espace car elles présentent des formes plutôt allongées similaires à une diffraction de poudre.

4.2.3. Complexe LBD/PI251

Les tests de cristallisation avec le complexe LBD/PI251 utilisé comme contrôle positif ont abouti au bout de trois semaines à l'apparition d'un cristal dans les mêmes conditions que celles qui avaient été publiées (0.1 M Bis-Tris pH 5,5, 0.2 M $Mg(NO_3)_2$, 15% PEG 3350) (figure 43). La reproductibilité de ces cristaux confirme ainsi la qualité du LBD purifié pour son utilisation pour les tests de cristallisation. Le cristal obtenu a été utilisé pour mettre en œuvre la technique dite de *cross-seeding* en utilisant les complexes préformés LBD/XCT-790/PF25 et LBD/XCT-790/PF26. Pour cela, un nouveau screen de conditions de cristallisation a été conçu basé sur les conditions de cristallisation du complexe LBD/XCT-790/PF25 définies ci-dessus. Ce screen est composé de 0.1 M Na Cacodylate pH 6,0, de concentrations croissantes de PEG 3350 (de 6% à 16%) et de nitrate de magnésium $Mg(NO_3)_2$ (de 0,10 M à 0,16 M). Cependant, après trois semaines d'incubation à 20°C, aucun cristal n'est apparu.

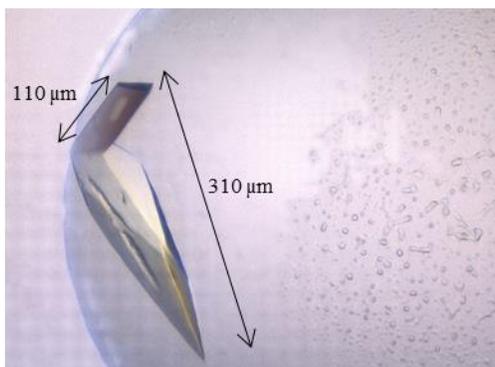


Figure 43 : Cristal du supposé complexe LBD/PI251 obtenu dans les mêmes conditions publiées 0,1 M Bis-Tris pH 5,5, 0,2 M $Mg(NO_3)_2$, 15% PEG 3350.

Suite aux essais infructueux de *cross-seeding*, un nouveau screen de cristallisation a été conçu en combinant les conditions de cristallisation des complexes LBD/PI251 (0.1 M Bis-Tris pH 5.5, 0.2 M $Mg(NO_3)_2$, 15% PEG 3350) et LBD/XCT-790/PF25 (0,1 M Na Cacodylate pH 6,0, 0,16 M $Mg(NO_3)_2$, 15% PEG3350). Un changement a toutefois été opéré pour la condition du LBD/PI251 où le Bis-Tris a été remplacé par du Bis-Tris-Propane, tout en conservant une valeur de pH de 5,5. Des concentrations croissantes en sel $Mg(NO_3)_2$ et en précipitant PEG 3350 (respectivement de 0,08 M à 0,30 M et de 7% à 29%), ainsi que des valeurs de pH de 6,0 et 6,5 en Na Cacodylate ont été utilisées (tableau 9). De nouveaux tests ont été réalisés en présence des trois différents peptides. De nouveaux tests ont été réalisés en présence des trois différents peptides. De plus, l'affinité entre le LBD et le ligand XCT-790 étant élevée (pour rappel, un K_d de 51,78 nM a été déterminé par MST), la cristallisation de ce complexe sans peptide a également été mise en place.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,08M	0,10M	0,12M	0,14M	0,16M	0,18M	0,20M	0,22M	0,24M	0,26M	0,28M	0,30M	0,1 M BTP pH 5,5
	15% PEG 3350												
B	7%	9%	11%	13%	15%	17%	19%	21%	23%	25%	27%	29%	0,1 M NaCaCo pH 6,0
	0,16 M Mg(NO ₃) ₂												
C	0,08M	0,10M	0,12M	0,14M	0,16M	0,18M	0,20M	0,22M	0,24M	0,26M	0,28M	0,30M	0,1 M NaCaCo pH 6,5
	15% PEG 3350												
D	7%	9%	11%	13%	15%	17%	19%	21%	23%	25%	27%	29%	0,1 M NaCaCo pH 6,5
	0,16 M Mg(NO ₃) ₂												
E	0,08M	0,10M	0,12M	0,14M	0,16M	0,18M	0,20M	0,22M	0,24M	0,26M	0,28M	0,30M	0,1 M NaCaCo pH 6,5
	15% PEG 3350												
F	7%	9%	11%	13%	15%	17%	19%	21%	23%	25%	27%	29%	0,1 M NaCaCo pH 6,5
	0,16 M Mg(NO ₃) ₂												

Tableau 9 : Screen conçu sur la base des conditions de cristallisation des complexes LBD/PI251 et LBD/XCT-790/PF25

Ligne A : Pour un tampon à 0,1 M Bis-Tris pH 5,5, la concentration de nitrate de magnésium PEG 3350 est tenue constante à 15% alors que la concentration de Mg(NO₃)₂ est augmentée graduellement de 0,08 M à 0,30 M.

Ligne B : Pour un tampon à 0,1 M Bis-Tris pH 5,5, la concentration de Mg(NO₃)₂ est tenue constante à 0,16 M alors que la concentration de PEG 3350 est augmentée graduellement de 7% à 29%.

Ligne C : Pour un tampon à 0,1 M NaCaCo pH 6,0, la concentration de nitrate de magnésium PEG 3350 est tenue constante à 15% alors que la concentration de Mg(NO₃)₂ est augmentée graduellement de 0,08 M à 0,30 M.

Ligne D : Pour un tampon à 0,1 M NaCaCo pH 6,0, la concentration de Mg(NO₃)₂ est tenue constante à 0,16 M alors que la concentration de PEG 3350 est augmentée graduellement de 7% à 29%.

Ligne E : Pour un tampon à 0,1 M NaCaCo pH 6,5, la concentration de nitrate de magnésium PEG 3350 est tenue constante à 15% alors que la concentration de Mg(NO₃)₂ est augmentée graduellement de 0,08 M à 0,30 M.

Ligne F : Pour un tampon à 0,1 M NaCaCo pH 6,5, la concentration de Mg(NO₃)₂ est tenue constante à 0,16 M alors que la concentration de PEG3350 est augmentée graduellement de 7% à 29%.

4.2.4. Autre stratégie : soaking des cristaux du LBD en conformation apo en complexe avec le peptide PI251

Le screen précédent a permis d'obtenir des cristaux pour le complexe LBD/PI251 qui sont apparus seulement après une dizaine de jours dans les conditions A3 et A4, respectivement 0,1 M BTP pH 5,5, 0,12 M Mg(NO₃)₂, 15% PEG 3350 et 0,1 M BTP pH 5,5, 0,14 M Mg(NO₃)₂, 15% PEG3350 (alors que, pour rappel, ils étaient apparus après trois semaines dans la condition 0,1 M Bis-Tris pH 5,5, 0,2 M Mg(NO₃)₂, 15% PEG 3350). Ces cristaux nouvellement apparus présentaient cependant la même forme hexagonale et étaient longs de 200 µm à 250 µm (figure 44). Ils ont été utilisés pour réaliser des essais de *soaking* avec le ligand XCT-790 en solution dans 100% de DMSO. Le ligand a été ajouté de deux manières différentes aux gouttes de cristallisations contenant les cristaux : 1 µL de ligand a été déposé directement sur la goutte de cristallisation, ou, 1 µL de ligand a été déposé à côté de la goutte de cristallisation avant de créer un « pont » entre ces deux gouttes afin de permettre une diffusion par équilibre du ligand. Après une semaine

d'incubation, les cristaux ont été récoltés en utilisant le cryoprotectant 0,1 M BTP pH 5,5, 0,14 M $Mg(NO_3)_2$, 35% PEG 3350 et congelés.

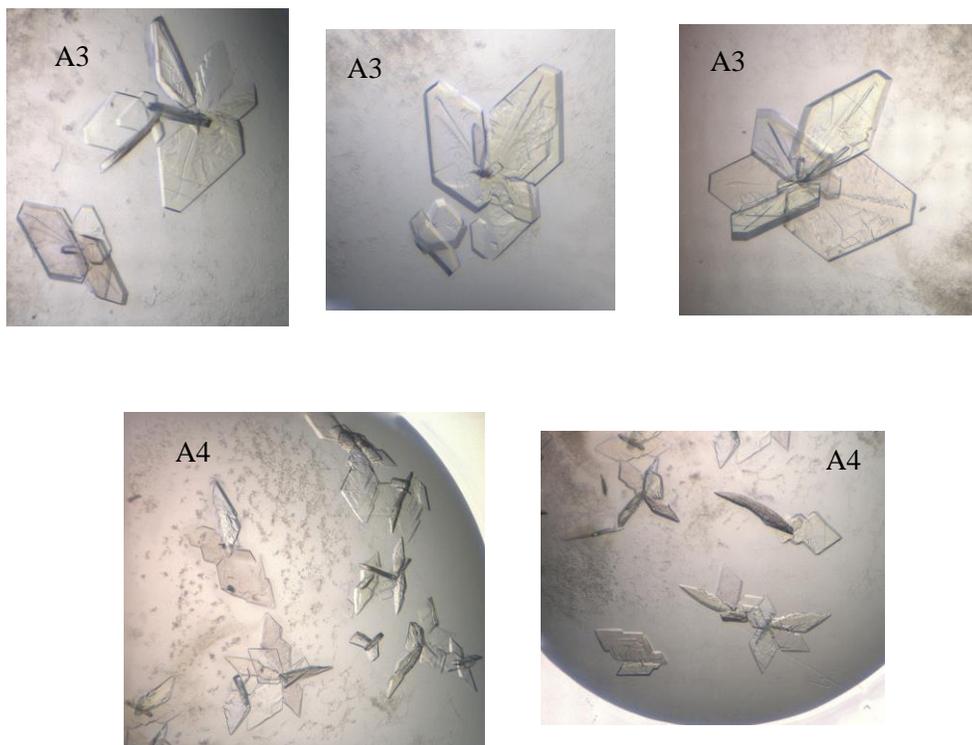


Figure 44 : Cristaux du complexe LBD/PI251 obtenus dans les conditions de cristallisation A3 et A4

A3 : 0,1M BTP pH 5,5, 120mM $Mg(NO_3)_2$, 15% PEG3350

A4 : 0,1M BTP pH 5,5, 140mM $Mg(NO_3)_2$, 15% PEG3350

L'un des cristaux testés, dont le cliché correspondant est présenté sur la figure 45, a diffracté jusqu'à 2,1 Å de résolution. Les statistiques de collecte de données et d'affinement sont présentés dans le tableau 10. La résolution de la structure par remplacement moléculaire montre la présence du LBD dimérique où un peptide PI251 interagit avec chacun des monomères dans le sillon d'interaction (figure 46a). Le ligand XCT-790, quant à lui, ne se trouve pas dans la poche d'interaction des ligands du LBD. En effet, les contacts cristallins réalisés sont caractérisés par des interactions entre le peptide PI251 et le LBD de l'unité asymétrique voisine rendant impossible l'insertion du XCT-790 dans la poche (figure 47). La liaison du XCT-790 dans la poche n'est réalisable que si le PI251 se retire du sillon pour y laisser interagir l'hélice H12 et induire la fixation du XCT-790 pour permettre au LBD de s'arranger en conformation antagoniste.

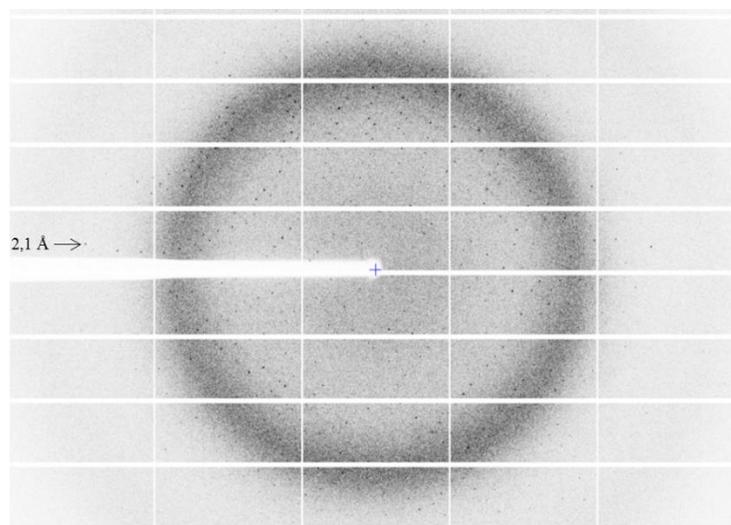


Figure 45 : Cliché de diffraction à 2,1 Å de résolution

Collecte de données	
Résolution	85 Å - 2,1 Å (2,14 Å – 2,10 Å)
Groupe d'espace	P2 ₁
Paramètres de maille	a = 59,38 Å ; b = 55,24 Å ; c = 80,38 Å β = 94,86°
R _{meas}	7,7% (32,8%)
I/σ	16,7 (2)
Nombre de réflexions	26739 (509)
Complétude	87,1% (33,5%)
Redondance	2,9 (2,1)
Affinement	
Résolution	80 Å - 2,1 Å
R _{cryst}	22,81%
R _{free}	28,54%
Liaisons	
r.m.s.d. longueur liaison	0,008 Å
r.m.s.d. longueur liaison	1,012°
angle dièdre	19,32 Å
Diagramme de Ramachandran	
favorable	94,50%
permise	4,13%
défavorable	1,38%

Tableau 10 : Statistiques de collecte des données de diffraction et d'affinement structural

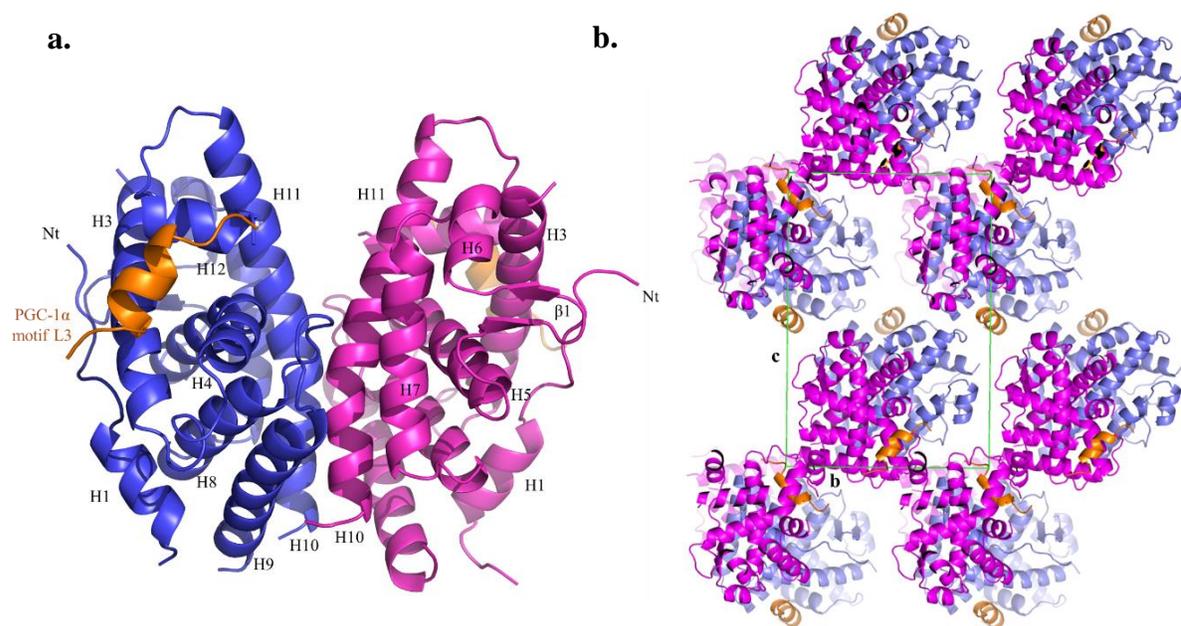


Figure 46 : Structure obtenue du LBD en interaction avec le peptide PI251

a. Homodimère des LBD d'ERR α en interaction avec le motif L3 de PGC-1 α lié au sillon d'interaction hydrophobe des coactivateurs. Le ligand XCT-790 est absent. **b.** Arrangement cristallin des molécules de LBD selon un groupe d'espace P2₁. Les côtés b et c de l'unité asymétrique sont indiqués.

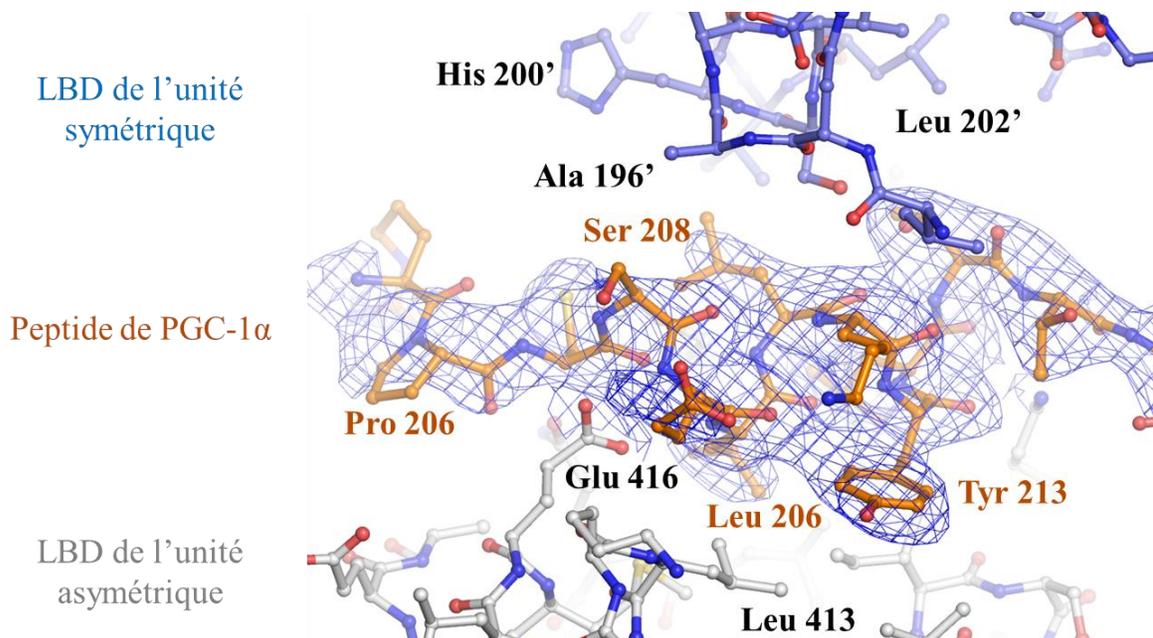


Figure 47 : Contacts cristallins réalisés grâce au peptide PI251 de PGC-1 α

La structure du peptide est contournée par sa densité électronique à 0,8 σ .

Partie II

Étude de l'interface ERR α -DBD/ADN

Cette partie du projet se focalise sur l'interface ERR/ADN, et en particulier sur le mode d'interaction du DBD avec le demi-site étendu ERRE. Le DBD d'ERR α fera donc l'objet de l'étude dans la suite de ce manuscrit. Sa stœchiométrie est étudiée sur différents oligonucléotides de longueurs variables, contenant un ERRE et l'élément de réponse IR3. L'objectif est de comprendre la mécanique d'interaction des DBD sur un ERRE et d'en déterminer les déterminants structuraux par cristallographie aux rayons X.

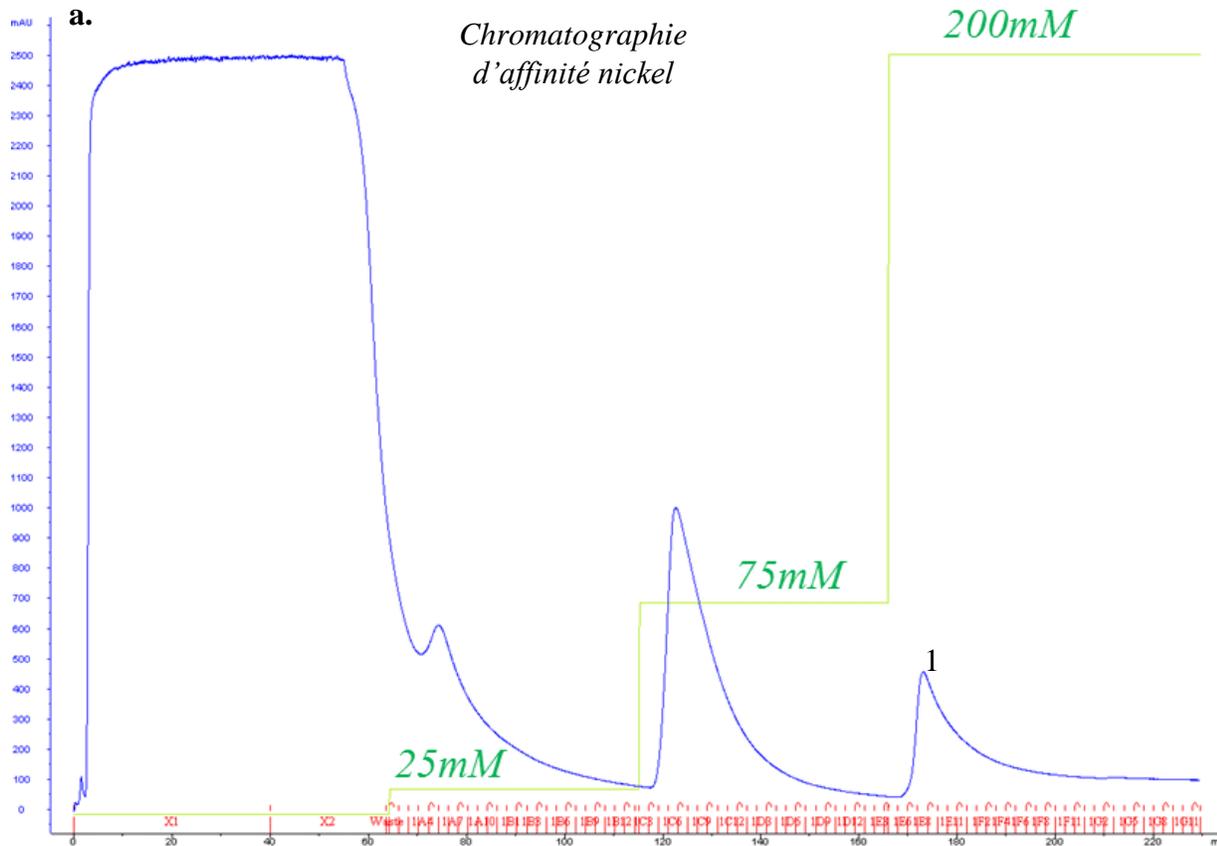
Le DBD purifié a été utilisé pour former des complexes avec différents oligonucléotides contenant le demi-site étendu ERRE. La stabilité des complexes a été évaluée par fluorimétrie différentielle et diffusion dynamique de lumière pour mener à bien les essais de cristallisation. En parallèle, les techniques de retard sur gel et de spectrométrie de masse en conditions natives ont été mises en œuvre pour répondre à la problématique de la stœchiométrie adoptée par les DBD sur un ERRE.

La purification du DBD, une fois optimisée, a permis d'obtenir une protéine très pure utilisée pour la formation de complexes dont la caractérisation biophysique a démontré la stabilité satisfaisante pour les essais de cristallisation. Les expériences de retard sur gel et de spectrométrie de masse ont montré que le DBD se liait sous la forme de monomère sur un ERRE quelle que soit la longueur de l'oligonucléotide. Curieusement, le DBD se lie aussi sous la forme de monomère sur un IR3 alors que ce dernier présente deux demi-sites. Cependant, les cristaux obtenus n'ont diffracté au mieux qu'à 7Å de résolution, ne permettant pas de résoudre la structure.

1. Les protagonistes des complexes étudiés : le domaine isolé DBD et ses oligonucléotides

1.1. Le DBD est purifié en trois étapes de purification

Le domaine DBD a été purifié par un procédé chromatographique mettant en œuvre trois étapes. Une première étape de chromatographie d'affinité sur une résine chélatée au nickel a permis d'éliminer la majeure partie des contaminants protéiques ; puis une chromatographie d'affinité sur résine héparinée a permis d'éliminer notamment les acides nucléiques contaminants. Enfin, une dernière étape de chromatographie d'exclusion stérique a permis un polissage final du DBD et d'éliminer les éventuels agrégats et autres contaminants subsistant. Les profils d'élution de ces différentes étapes sont présentés dans la figure 48. La qualité du DBD à chacune des étapes a été vérifiée par migration sur gel d'électrophorèse PAGE-15% en conditions dénaturantes (figure 49). Lors de la première étape, le DBD est élué par compétition à environ 180 mM d'imidazole (figure 48a). Le clivage de l'étiquette hexa-histidine est réalisé par la thrombine et le gel SDS-PAGE indique un clivage efficace et total, puisque la totalité du DBD migre légèrement plus bas. Bien qu'il soit déjà relativement pur après cette première étape de purification, comme le montre le gel SDS-PAGE (figure 49a), il est important d'éliminer toutes traces de contaminants d'ADN (non visibles sur le gel), d'autant que l'objectif de cette étude est la formation de complexes protéine/ADN spécifiques. Pour cela, une étape d'affinité à l'héparine est réalisée dans un deuxième temps. Le DBD est élué à 660 mM de NaCl et le profil d'élution montre d'autres espèces éluées à plus basses concentrations salines. Après migration sur gel SDS-PAGE, ces espèces s'avèrent être de nature protéique et nucléotidique (figures 48b et 49a). Pour finir, le DBD est chargé sur une colonne Superdex 75 16/60 de chromatographie d'exclusion stérique et élué à 70 mL (figure 48c). La figure 49b montre le DBD élué tout au long du pic d'élution et témoigne de sa haute pureté.



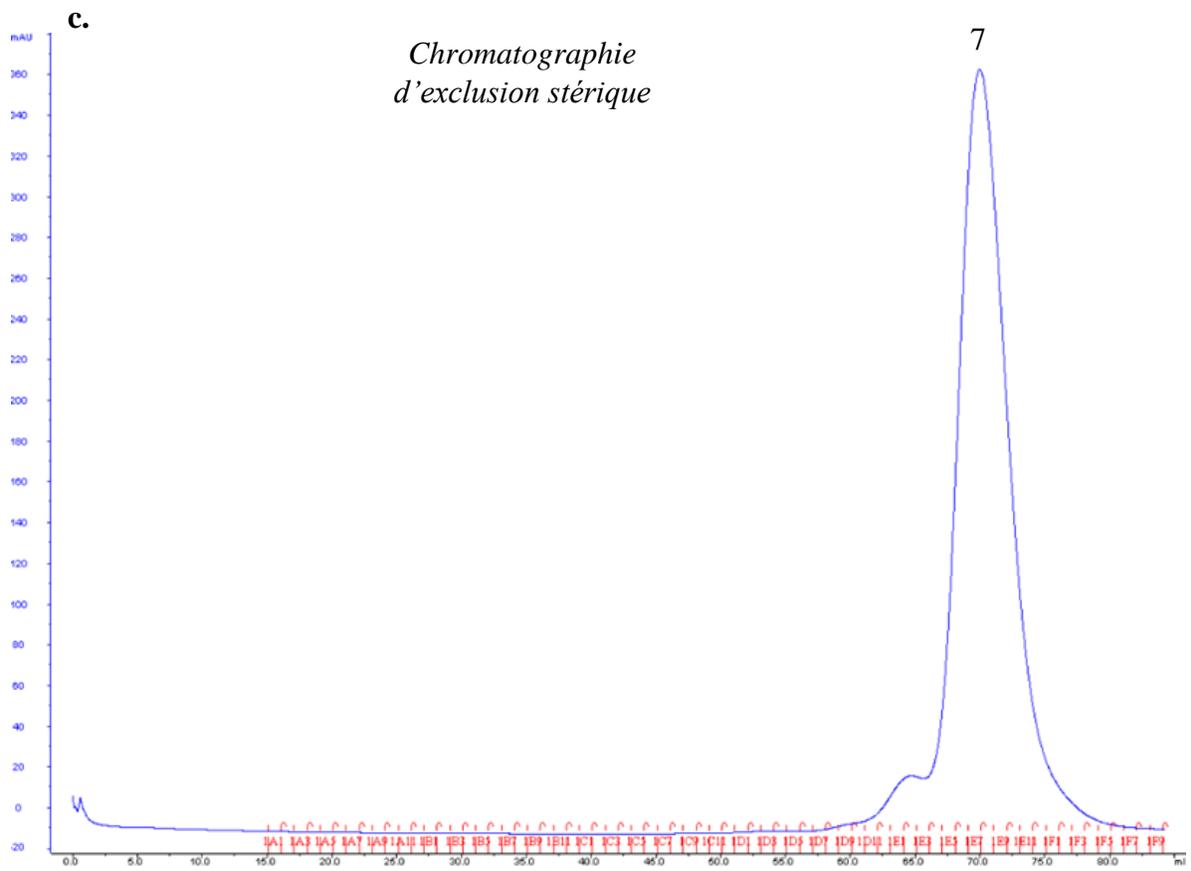
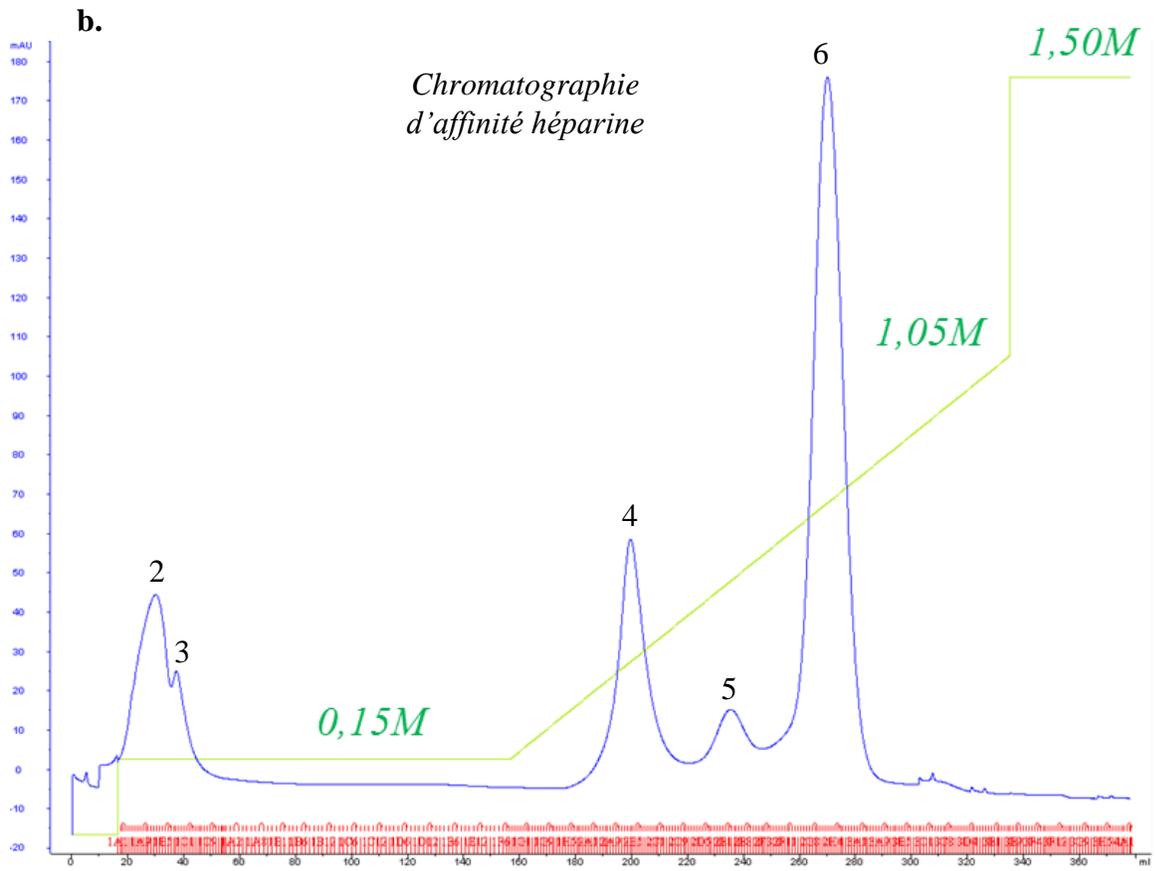


Figure 48 : Purification du domaine DBD par chromatographie d'affinité nickel, chromatographie d'affinité héparine et par chromatographie d'exclusion stérique.

a. Chromatogramme d'élution de la chromatographie d'affinité nickel. Le pic d'élution du DBD est annoté par « 1 ». En vert sont représentées les trois concentrations croissantes d'imidazole en millimolaire (mM). (Le DBD est élué à 180 mM.) **b.** Chromatogramme d'élution de la chromatographie d'affinité héparine. Le DBD est élué à une concentration de NaCl de 660 mM. Le pic d'élution du DBD est annoté par « 6 ». **c.** Chromatogramme d'élution de la chromatographie d'exclusion stérique. Le pic d'élution du DBD, annoté par « 7 » se situe à 70mL. Sur les chromatogrammes, les unités d'absorbances (en mAu) sont représentées en fonction du volume (en mL). Les fractions d'élutions sont représentées en rouge au niveau de l'axe des abscisses.

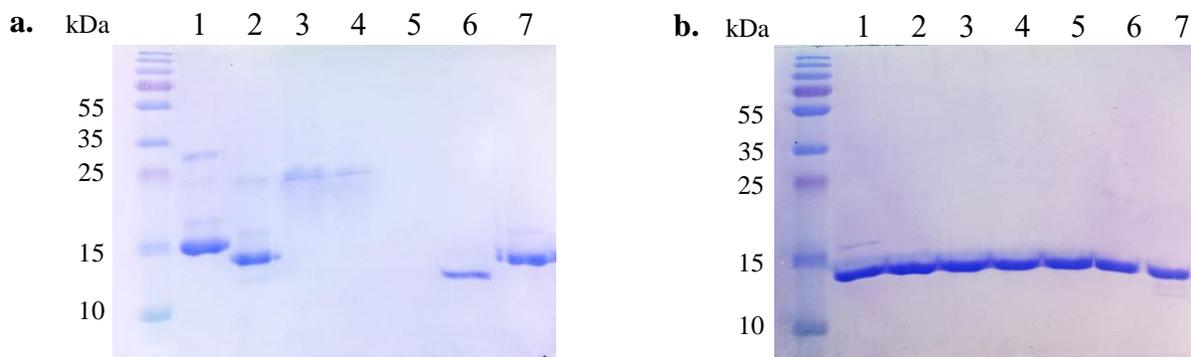


Figure 49 : Suivi de la purification du domaine DBD sur gel dénaturant PAGE-15%

a. 1. DBD élué après la chromatographie d'affinité nickel, 2. DBD après une nuit d'incubation avec la thrombine pour cliver le tag hexa-histidine, 3., 4., 5. Espèces non protéiques, 6. Espèce protéique, 7. DBD élué après la chromatographie d'affinité héparine **b.** de 1. à 7. : DBD élué le long du pic d'élution « 7 »
5µg de protéines sont chargés dans chacun des puits. Le gel est coloré au bleu de Coomassie.

1.2.Oligonucléotides utilisés pour la formation de complexes avec le DBD purifié

Pour l'étude du DBD en interaction avec l'élément de réponse ERRE, différents oligonucléotides correspondant à des promoteurs naturels de gènes régulés par ERRα ont été utilisés. Ces oligonucléotides varient en taille et présentent des extrémités franches ou cohésives. Ces derniers sont listés dans le tableau 11.

Ces oligonucléotides, synthétisés sous forme simple brin, devaient dans un premier temps être hybridés entre brins complémentaires. L'hybridation a été vérifiée sur gel d'acrylamide 20% en conditions natives. L'exemple de la figure 20 montre l'hybridation des oligonucléotides 21trα et 21rb1cc1 avec un contrôle négatif (simple brin) permettant de confirmer l'absence d'un excès de simple brin pour les oligonucléotides hybridés.

Nom de l'oligonucléotide	Gène	Séquence	Élément de réponse	Expérience
13tra	<i>tra</i>	5' GCTCAAGGTCAC 3' 3' CGAGTTCCAGTG 5'	ERRE	Gels natifs, ESI-TOF
21tra	<i>tra</i>	5' TGTCAAGGTCACACAGTGAG 3' 3' CAGTTCCAGTGTGTCACTCA 5'	ERRE	Cristallisation, gels natifs
21tra-TT	<i>tra</i>	5' TTGTCAAGGTCACACAGTGAG 3' 3' CAGTTCCAGTGTGTCACTCAA 5'	ERRE	Cristallisation, gels natifs, DLS
21rb1cc1	<i>rb1cc1</i>	5' - CAAAGAAGGTCAAATTCACCT -3' 3' - TTTCTTCCAGTTTAAGTGGAG -5'	IR3	Gels natifs
26tra-TT	<i>tra</i>	5' TTTGTCAAGGTCACACAGTGAGTTAC 3' 3' ACAGTTCCAGTGTGTCACTCAATGAA 5'	ERRE	Cristallisation, gels natifs, DLS
27tff1	<i>tff1</i>	5' GGATTAAGGTCAGGTTGGAGGAGACTC 3' 3' CCTAATTCCAGTCCAACCTCCTCTGAG 5'	ERRE	SAXS
29tra-AA	<i>tra</i>	5' AATTGTCAAGGTCACACAGTGAGTTACCG 3' 3' AACAGTTCCAGTGTGTCACTCAATGGCTT 5'	ERRE	Cristallisation, gels natifs, DLS, ESI-TOF

Tableau 11 : Oligonucléotides utilisés pour l'études des complexes DBD/DNA

Les séquences nucléotidiques sont présentées et les éléments de réponse ERRE ou IR3 sont indiquées en rouge. Pour les ERRE, les extensions de trois nucléotides en 5' sont soulignées. Les noms, les gènes de provenance et les expériences réalisées pour chacun de ces oligonucléotides sont également précisés.

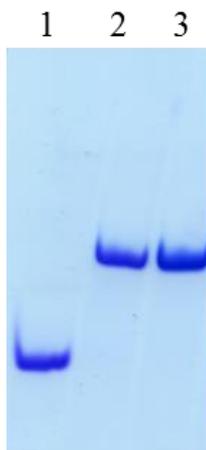


Figure 50 : Exemple d'hybridation d'oligonucléotides

1. simple brin 21tra, 2. double brin 21tra, 3. double brin 21rb1cc1.

Environ 10µg d'ADN sont chargés par puit. L'ADN est révélé au bleu de toluidine.

2. Étude structurale de complexes DBD/ADN

2.1. Caractérisations préalables de complexes DBD/ADN

2.1.1. Stabilité en fonction de la concentration saline

La stabilité de complexes protéiques ou protéo-nucléotidiques n'est optimale que dans une certaine gamme de concentrations salines. Par exemple, une concentration trop importante en sel peut déstabiliser l'interaction entre les deux partenaires et conduire à leur dissociation. Ceci est aussi valable pour les concentrations trop faibles en sel qui induisent une précipitation du complexe. Cette information est importante pour concevoir les essais de cristallisation et pour prévoir et comprendre le comportement du complexe selon la concentration en sel dans la solution.

Ainsi, pour suivre l'évolution de la stabilité du complexe DBD/ADN, un gradient croissant de concentration en NaCl a été imposé à un complexe DBD/ADN préformé et son comportement a été suivi par migration sur gel d'électrophorèse PAGE-8% en conditions natives. Les concentrations de NaCl utilisées sont de 70 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM et 500 mM. Le DBD seul (sans ADN) est utilisé comme contrôle de cette expérience. Du fait de son pI théorique (9,64), quasiment égal au pH du gel (10,3), il ne pénètre pas dans le gel, comme l'atteste l'absence de bande sur la figure 51. En présence d'ADN en revanche, le complexe migre dans le gel. Aucune dissociation n'est visible jusqu'à 400 mM. Le complexe présente cependant des signes d'instabilité à partir de 500 mM (figure 51).

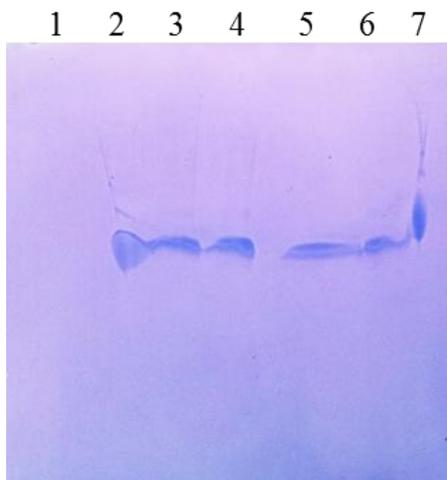


Figure 51 : Migration sur gel en conditions natives d'un complexe DBD/ADN en fonction d'un gradient de concentration de NaCl

1. DBD seul, 2. 70 mM, 3. 100 mM, 4. 200 mM, 5. 300 mM, 6. 400 mM, 7. 500 mM.

3µg de protéines sont chargés dans chacun des puits. Le gel est coloré au bleu de Coomassie.

2.1.2. Étude de la stabilité du DBD par fluorimétrie différentielle (Thermofluor)

Pour suivre la stabilité du DBD au sein des complexes, des expériences de *Thermofluor* ont été réalisées afin de déterminer la température de demi-dénaturation T_m du DBD seul et en complexe avec l'oligonucléotide 21tra (figure 52). L'évolution de la fluorescence est présentée en fonction d'un gradient de température en °C. La solution utilisée présente la même composition que celle utilisée pour l'étape de chromatographie d'exclusion stérique.

Les deux courbes présentes la même allure, avec cependant une fluorescence plus importante dans le cas du DBD seul. Ceci s'explique par une exposition plus importante de ses parties hydrophobes où se lie le fluorophore SYPRO. En revanche, un T_m de 57,5°C est déterminé pour le DBD seul et le DBD complexé à l'oligonucléotide 21tra. La stabilité du DBD n'est donc pas améliorée par sa liaison à l'ADN.

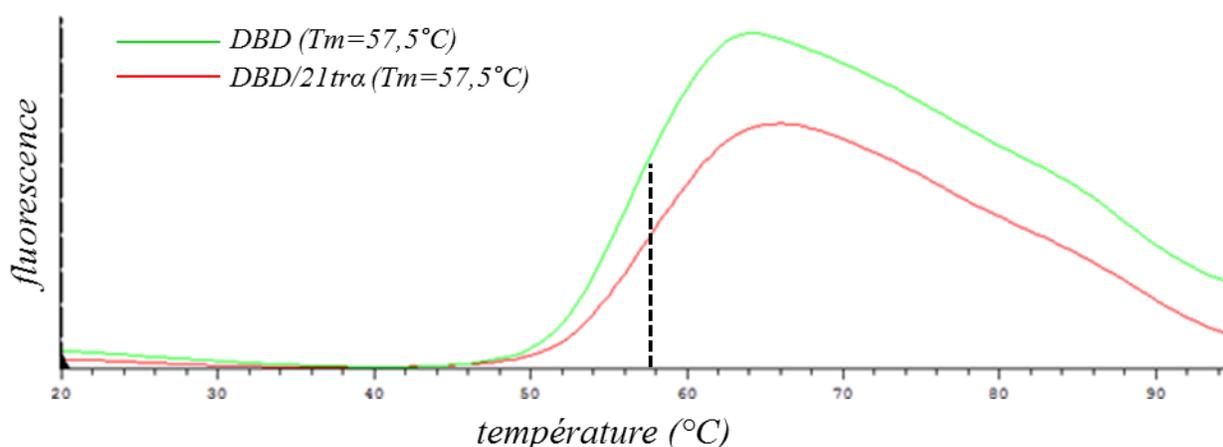


Figure 52 : Courbes de dénaturation du DBD et du complexe DBD/21tra

La dénaturation du DBD (vert) est comparée à celle du complexe DBD/21tra (rouge). La stabilité du DBD est inchangée en présence d'ADN. La fluorescence est représentée en fonction de la température allant de 20°C à 95°C.

2.1.3. Complexes utilisés pour les tests de cristallisation

Le DBD issu de la purification est utilisé pour la formation des complexes DBD/ADN utilisés en cristallisation. Les différents oligonucléotides utilisés sont présentés dans le tableau 11. Après formation des complexes, leur homogénéité est vérifiée sur gel d'électrophorèse PAGE-8% en conditions natives. La figure 53 montre la migration du DBD seul en tant que contrôle, et des complexes qu'il forme avec les oligonucléotides 21tra-TT, 26tra-TT, 29tra-AA. Ces complexes se présentent tous sous forme d'une unique bande sur le gel, témoignant de la présence d'une conformation unique.

Pour confirmer cette observation, des mesures de DLS sont systématiquement réalisées en parallèle des essais de cristallisation et renseignent sur la présence éventuelle d'espèces minoritaires, qui ne sont pas toujours visibles sur un gel. Les mesures présentées sur la figure 54 ont été réalisées sur le DBD seul et sur les complexes DBD/21tra-TT, DBD/26tra-TT et DBD/29tra-AA. Les résultats obtenus pour le DBD seul témoignent d'un comportement instable de ce dernier, avec un profil multimodal (plusieurs espèces en solution de taille et masse différentes) et des paramètres de rayon hydrodynamique largement surestimés, ne permettant pas le tracé d'un diagramme de régularisation (correspondant à la représentation du pourcentage de masse en fonction du rayon des particules en nm). Les résultats concernant les complexes DBD/21tra-TT, DBD/26tra-TT et DBD/29tra-AA attestent quant à eux d'une stabilité accrue du DBD,

puisque ces complexes présentent respectivement un rayon hydrodynamique de 3,0 nm, 2,9 nm et 3,0 nm, une masse moléculaire relative de 44 kDa, 43 kDa et 46 kDa et un pourcentage de polydispersité de 14,4%, 7,5% et 12,0%. La présence d'ADN en complexe avec le DBD semble donc permettre à ce dernier d'être fortement stabilisé.

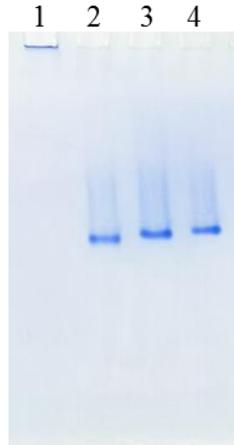
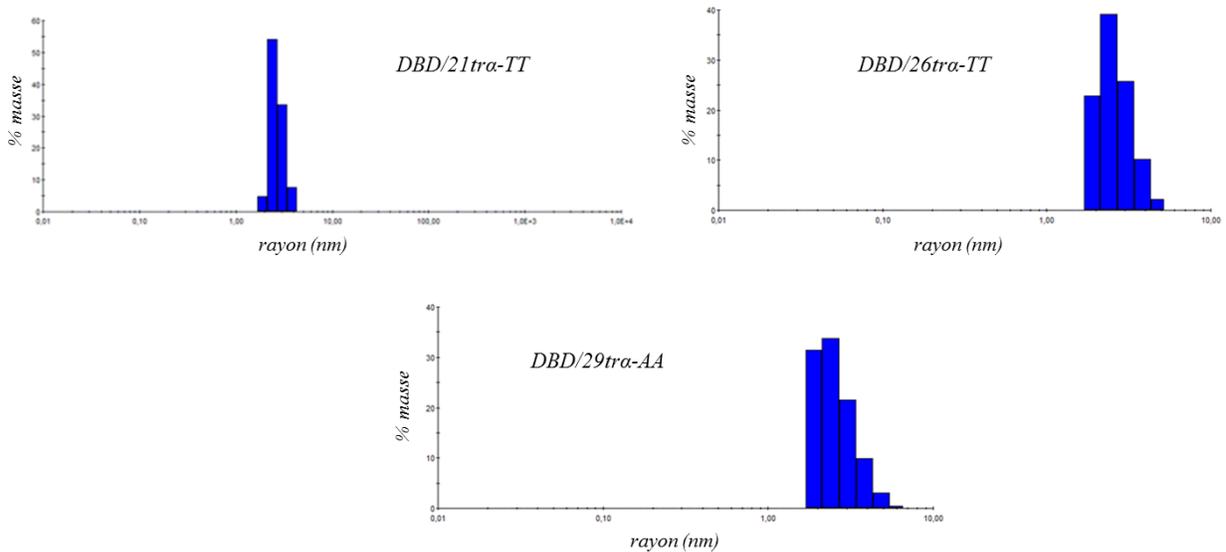


Figure 53 : Migration sur gel PAGE-8% des complexes DBD/ADN en conditions natives

1. DBD seul, 2. DBD/21tra-TT, 3. DBD/26tra-TT, 4. DBD/29tra-AA. 3µg de protéines sont déposés dans chacun des puits.



	Température (°C)	Rayon (nm)	%Pd	Mw-R (kDa)
DBD/21tra-TT	25,0	3,0	14,4%	44
DBD/26tra-TT	25,0	2,9	7,5%	43
DBD/29tra-AA	25,0	3,0	12,0%	46

Figure 54 : Mesures de DLS réalisées sur les complexes DBD/21tra-TT, DBD/26tra-TT et DBD/29tra-AA

Sur les diagrammes, le pourcentage de masse est représenté en fonction du rayon des particules en nanomètre (nm) (haut). Les paramètres caractérisant les particules sont résumés dans le tableau (bas).

2.2. Tests de cristallisation

Considérant leur faible polydispersité mesurée par DLS, les complexes DBD/ADN ont été utilisés pour mener des tests de cristallisation. Ces tests ont été réalisés sur différents complexes en utilisant les screens de cristallisation disponibles sur la plateforme de biologie et de génomique structurales de l'IGBMC. Des cristaux de complexe DBD/26trα-TT et DBD/29trα-AA sont apparus après dix jours d'incubation dans différentes conditions. Quelques exemples de cristaux sont présentés dans le tableau 12. Généralement, les cristaux s'organisaient sous forme d'amas et présentaient des formes allongées d'aiguilles avec une très fine épaisseur d'une dizaine de micromètres, rendant leur récolte difficile. Ces cristaux ont été congelés en utilisant des solutions cryoprotectantes de même composition que leurs conditions de cristallisation respectives supplémentées de 35% v/v final de PEG 3350. L'analyse de ces cristaux aux rayons-X n'a cependant pas permis d'obtenir une diffraction allant au-delà d'une dizaine d'angströms de résolution, mais a confirmé leur contenu protéique. Les meilleurs clichés de diffraction, observés avec l'oligonucléotide 29trα-AA, permettent notamment de conclure formellement qu'il s'agit de cristaux de protéine et non de sel ou d'ADN (figure 55).

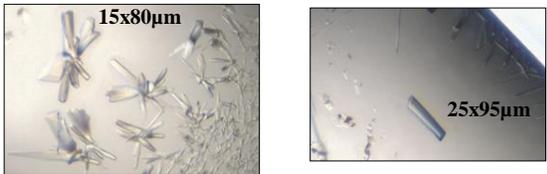
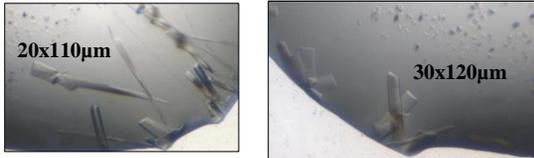
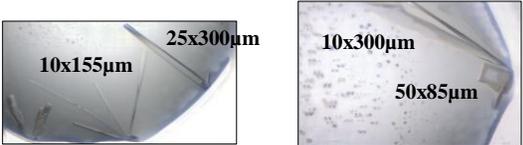
Cristaux	Conditions de cristallisation et screens	Oligonucléotide
	0,1 M MES pH 6,0 0,1 M NH ₄ Cl 0,1 M MgCl ₂ 25% PEG 3350 <i>DBD RAR/RXR, condition A10</i>	26trα-TT
	0,1 M MES pH 6,0 0,2 M NH ₄ Cl 0,1 M MgCl ₂ 25% PEG 3350 <i>DBD RAR/RXR, condition B10</i>	26trα-TT
	0,1 M MES pH 6,0 0,3 M NH ₄ Cl 0,1 M MgCl ₂ 25% PEG 3350 <i>DBD RAR/RXR, condition C10</i>	26trα-TT
	0,2 M Mg(CH ₃ CO ₂) ₂ 20% PEG 3350 <i>The PEGs, condition G1</i>	29trα-AA

Tableau 12 : Exemple de cristaux du DBD en complexe avec les oligonucléotides 26trα-TT et 29trα-AA

Les tailles des cristaux en micromètres (µm), leurs conditions de cristallisation et les oligonucléotides utilisés sont précisés.

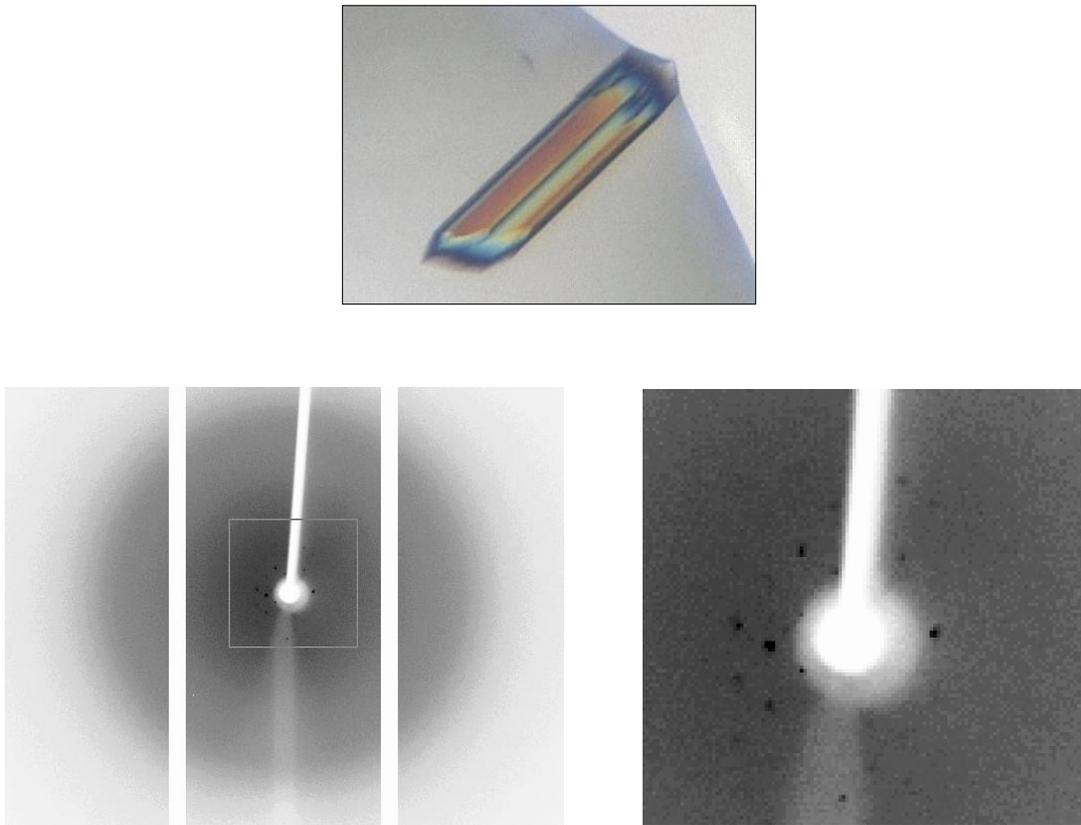


Figure 55 : Cliché de diffraction (bas) d'un cristal du supposé complexe DBD/29tra-AA (haut) à une résolution d'une dizaine d'Angströms.

La diffraction indique qu'il s'agit bien d'un cristal de protéine et non pas de sel ou d'ADN.

3. Le DBD est-il monomérique ou dimérique sur un ERRE ?

Bien qu'homodimérique, ERR se lie spécifiquement au demi-site étendu ERRE via l'un de ses DBD, mais la question majeure sans réponse à ce jour est celle du positionnement du second DBD sur les promoteurs ERRE. L'étude de ce domaine isolé devait ainsi permettre de répondre à cette question.

3.1. Migration sur gel en condition natives

La stœchiométrie du DBD sur l'élément de réponse ERRE a été suivie par migration sur gel d'électrophorèse PAGE-8% en conditions natives. Pour cela, un oligonucléotide de 21bp du gène *tra*, comportant un ERRE, en quantité molaire constante a été titré avec des ratios molaires croissants de DBD monomérique à raison de 0,5:1, 1:1, 1,5:1, 2:1, 3:1 et 4:1. Le DBD seul est utilisé comme contrôle négatif. Pour tous les ratios molaires, une unique bande migrant au même niveau est observée, permettant de conclure que le DBD est sous forme monomérique sur l'oligonucléotide 21tra. Les bandes apparaissant

pour les ratios molaires supérieurs 3 :1 et 4 :1 correspondent à des conformations de tailles plus importantes dû à l'excès de DBD ajouté (figure 56).

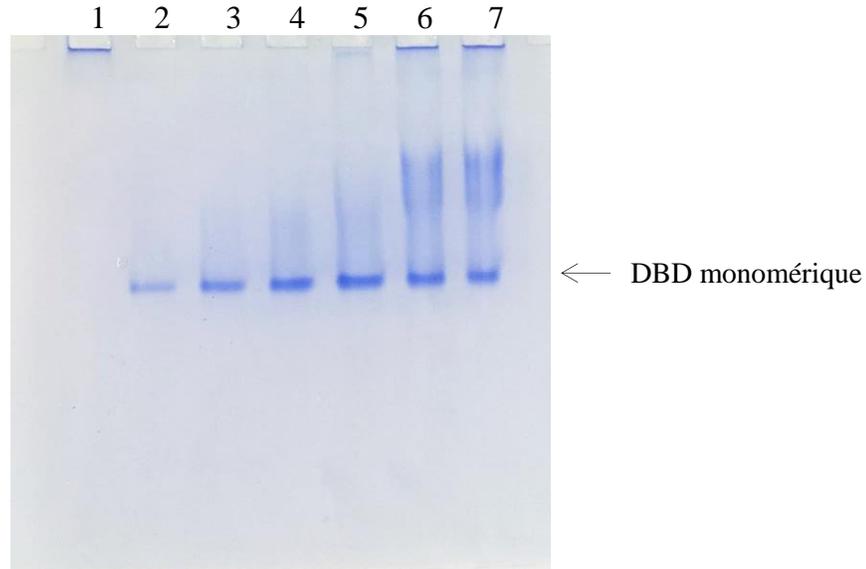


Figure 56 : Stœchiométrie de liaison du DBD sur l'oligonucléotide 21tra contenant un élément de réponse ERRE. L'élément de réponse ERRE est titré par des ratios molaires croissants de DBD. 1. DBD seul, pour des ratios molaires DBD : ERRE : 2. 0,5:1, 3. 1:1, 4. 1,5:1, 5. 2:1, 6. 3:1, 7. 4:1. 3µg de protéines sont chargés pour le ratio molaire 1 :1. Le gel est coloré au bleu de Coomassie.

De même que pour le 21tra, la stœchiométrie du DBD a été évaluée, par migration sur gel d'électrophorèse PAGE-8% en conditions natives, pour les oligonucléotides 13tra, 29tra-TT (qui contiennent l'élément de réponse ERRE) et 21rb1cc1 qui contient un IR3. Le 13tra a été utilisé comme témoin positif d'un monomère, car il ne peut accueillir qu'un seul DBD du fait de sa petite taille. Ces oligonucléotides, en quantités molaires constantes, ont été titrés avec des ratios molaires croissants de DBD monomérique, à savoir 0,5:1, 1:1, 2:1, 3:1 et 4:1. Le DBD seul et les oligonucléotides seuls ont été utilisés comme contrôles négatifs. Le même résultat que pour le 21tra a pu être observé. En effet, pour tous les ratios molaires, une bande unique migrant au même niveau est observée, correspondant à la forme monomérique du DBD sur les oligonucléotides 13tra, 29tra-TT (figure 57) et, étonnamment, 21rb1cc1 contenant un IR3 (figure 58). Des bandes de migration retardées sont également visibles pour les ratios 3:1 et 4:1, correspondent à des oligomères supérieurs en raison de l'excès de DBD. La résolution des gels pour séparer les oligonucléotides de différentes longueurs n'est cependant pas optimale.

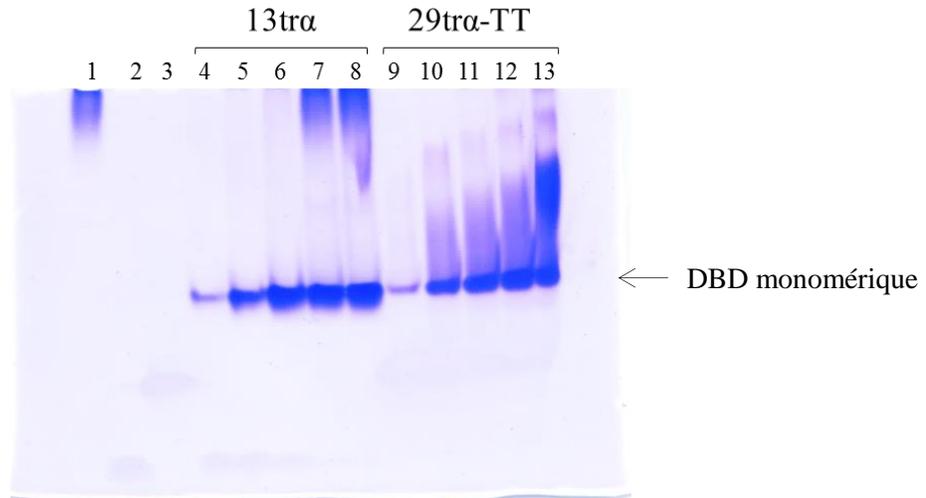


Figure 57 : Stœchiométrie de liaison du DBD sur les oligonucléotides 13tra (ERRE) et 29tra-TT (ERRE)
 Les oligonucléotides sont titrés par des ratios molaires croissants de DBD. 1. DBD seul, 2. 13tra seul, 3. 29tra-TT seul, pour des ratios molaires DBD : ADN : 4./9. : 0,5/1, 5./10. : 1:1, 6./11. : 2:1, 7./12. 3:1, 8./13. : 4:1 $3\mu\text{g}$ de protéines sont chargés pour le ratio molaire 1 :1. Le gel est coloré au bleu de Coomassie.

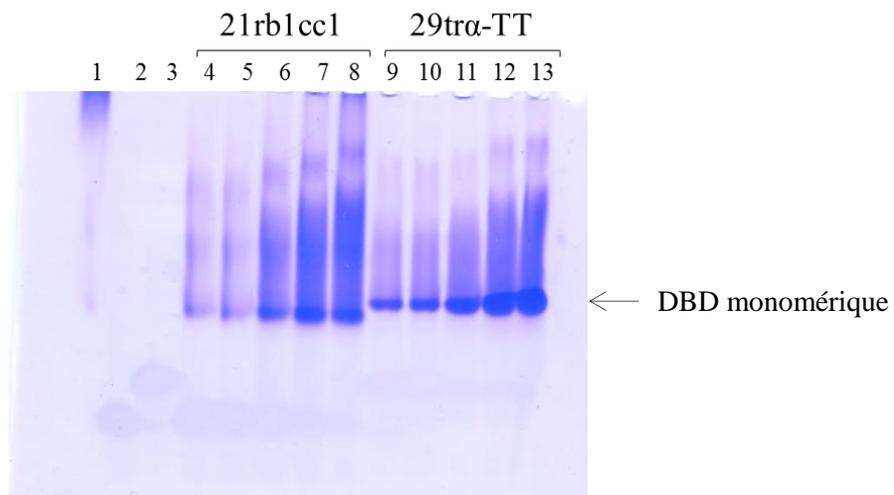


Figure 58 : Stœchiométrie de liaison du DBD sur les oligonucléotides 21rb1cc1 (IR3) et 29tra-TT (ERRE)
 Les oligonucléotides sont titrés par des ratios molaires croissants de DBD. 1. DBD seul, 2. 21rb1cc1 seul, 3. 29tra-TT seul, pour des ratios molaires DBD : ADN : 4./9. : 0,5/1, 5./10. : 1:1, 6./11. : 2:1, 7./12. 3:1, 8./13. : 4:1 $3\mu\text{g}$ de protéines sont chargés pour le ratio molaire 1 :1. Le gel est coloré au bleu de Coomassie

D'après ces résultats, le DBD serait monomérique sur un demi-site étendu ERRE et, étonnement, monomérique également sur un IR3 constitué de deux demi-sites hexamériques. Pourtant, le récepteur paralogue ER se lie sur un IR3, avec chacun de ses DBD fixé sur un demi-site.

Pourquoi le second DBD d'ERR ne se lie-t-il pas sur le second demi-site ? Une expérience supplémentaire, avec les mêmes ratios molaires que précédemment, a été réalisée en utilisant un oligonucléotide de 29 paires de bases contenant l'élément de réponse combinée ERRE/ERE, qui se caractérise par un IR3 dont le premier demi-site est précédé par une extension $5'\text{TCA}^{-3'}$. De même, une

migration sur gel d'électrophorèse PAGE-8% en conditions natives a été réalisée. Une bande unique a pu être observée pour les ratios molaires 0,5:1 et 1:1. Un retard sur gel a cependant été observé pour des ratios molaires de 2:1 et plus, témoignant clairement de la fixation d'un dimère de DBD sur ce site de liaison ERRE/ERE (figure 59).

Pour conclure, le DBD d'ERR α est monomérique sur un ERRE, quelle que soit la longueur de l'oligonucléotide utilisé (13tra, 21tra, 29tra-TT). Sur un IR3 (21rb1cc1), le DBD est également monomérique. Cependant, la présence d'une extension de trois nucléotides en 5' du premier demi-site induit une dimérisation du DBD à partir du ratio molaire 2:1. Ainsi, la dimérisation du DBD serait conditionnée à la présence de cette extension en 5' pour ancrer le premier DBD et permettre le recrutement du second DBD par coopérativité positive.

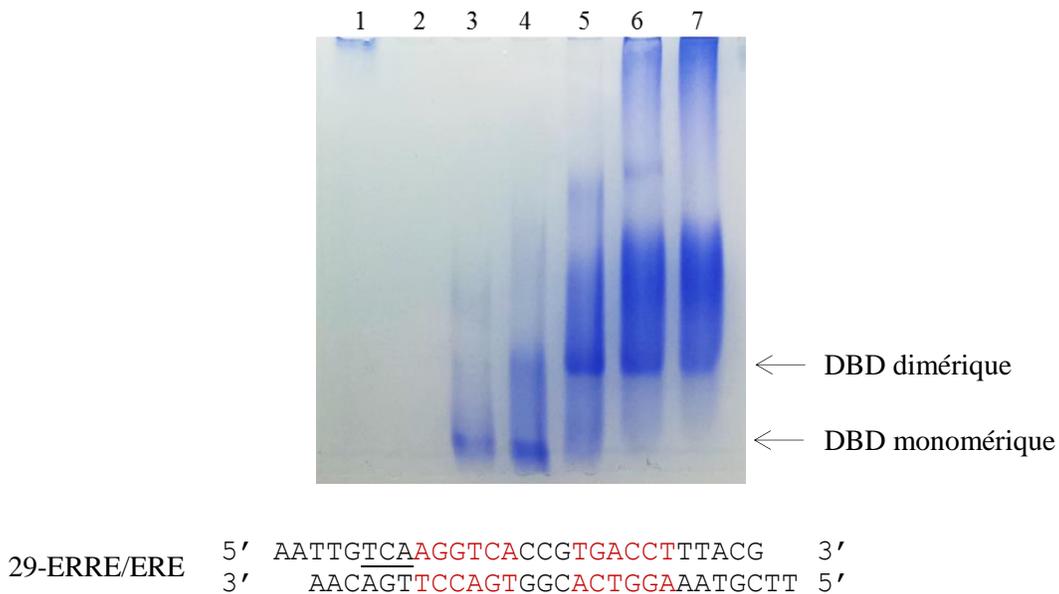


Figure 59 : Stœchiométrie de liaison du DBD sur un oligonucléotide 29-ERRE/ERE

La séquence de l'oligonucléotide 29-ERRE/ERE utilisé est précisée sous le gel. L'élément de réponse combiné ERRE/ERE est titré par des ratios molaires croissants de DBD. 1. DBD seul, pour des ratios molaires DBD : ERRE : 2. 0,5:1, 3. 1:1, 4. 1,5:1, 5. 2:1, 6. 3:1, 7. 4:1.

3 μ g de protéines sont chargés pour le ratio molaire 1 :1. Le gel est coloré au bleu de Coomassie.

3.2.Spectrométrie de masse ESI-TOF en conditions natives

Pour compléter ces premières observations de la stœchiométrie du DBD sur un ERRE, des expériences de spectrométrie de masse ESI-TOF (*Electro Spray Ionisation – Time Of Flight*) en condition natives ont été menées. Les mesures ont été réalisées sur le DBD seul en tant que contrôle et sur les complexes DBD/13tra, DBD/21rb1cc1 et DBD/29tra, où les oligonucléotides 13tra et 29tra, comprenant un ERRE, ont des longueurs respectives de 13 et 29 paires de bases et l'oligonucléotide 21rb1cc1, comprenant un IR3, est long de 21 paires de bases. L'objectif avec cette expérience était de définir la stœchiométrie du DBD sur l'oligonucléotide 29tra, suffisamment long pour potentiellement accueillir un second DBD à son extrémité 3'. L'oligonucléotide 13tra a donc été utilisé comme contrôle de l'état monomérique du DBD et le 21rb1cc1 a été utilisé pour étudier le comportement de ces DBD sur un élément de réponse IR3.

Les premières mesures ESI-TOF ont été réalisées sur le DBD seul, en conditions dénaturantes et natives. Les mesures en conditions dénaturantes ont montré que le DBD est détectable en phase gazeuse et

que sa masse moléculaire déterminée correspond à sa masse moléculaire théorique, attestant de l'absence de dégradation (figure 60a). Les mesures en condition natives, quant à elles, ont montré que les deux atomes de zinc Zn^{2+} sont présents au sein du DBD. De plus, elles renseignent sur l'état oligomérique du DBD seul en solution et indiquent que ce dernier est monomérique en solution (figure 60b).

Les mesures avec l'oligonucléotide 13 α ont montré que la totalité des DBD se fixe sur l'élément de réponse ERRE sous forme monomérique (figure 61a). De même, avec l'oligonucléotide 29 α , la totalité du DBD se lie à l'ERRE sous forme monomérique (figure 61b). Ces premières observations permettent de conclure d'emblée que le DBD, en tant que domaine isolé, est monomérique sur un élément de réponse ERRE. Quant au complexe avec l'oligonucléotide 21r1cc1, les résultats ont montré que le DBD est monomérique également sur un IR3 (figure 61c). Si cet élément de réponse est formé de deux demi-sites, la question soulevée ici est de comprendre ce qui régit ce comportement monomérique du DBD d'ERR sur un IR3.

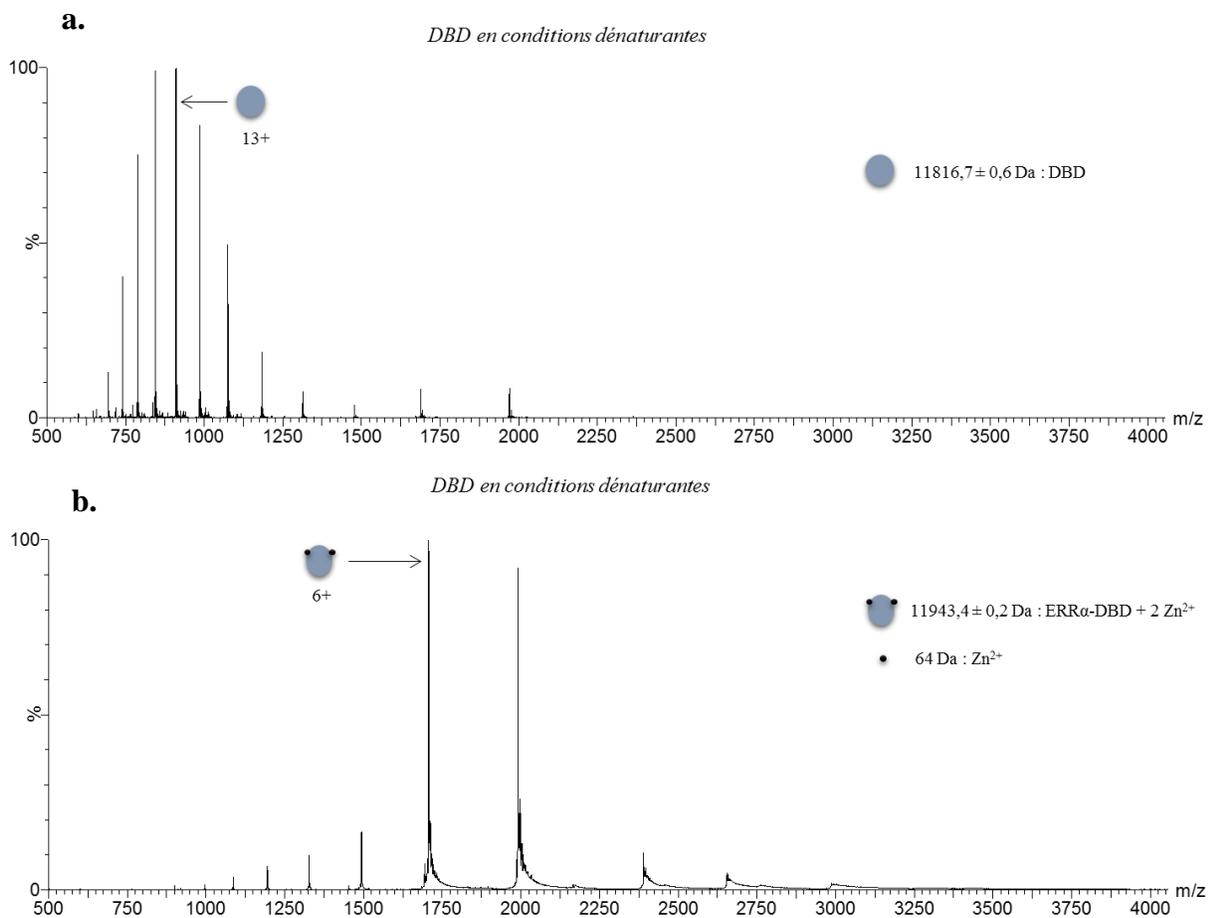


Figure 60 : Spectres de spectrométrie de masse pour le domaine DBD

a. DBD seul en conditions dénaturantes ($V_c=40V$, $P_i=2mbar$), **b.** DBD seul en conditions natives ($V_c=100V$, P_i 6mbar). Le pourcentage d'intensité est représenté en fonction du rapport m/z. Les différentes espèces présentes sont indiquées par une flèche. Un monomère de DBD est représenté par un rond bleu.

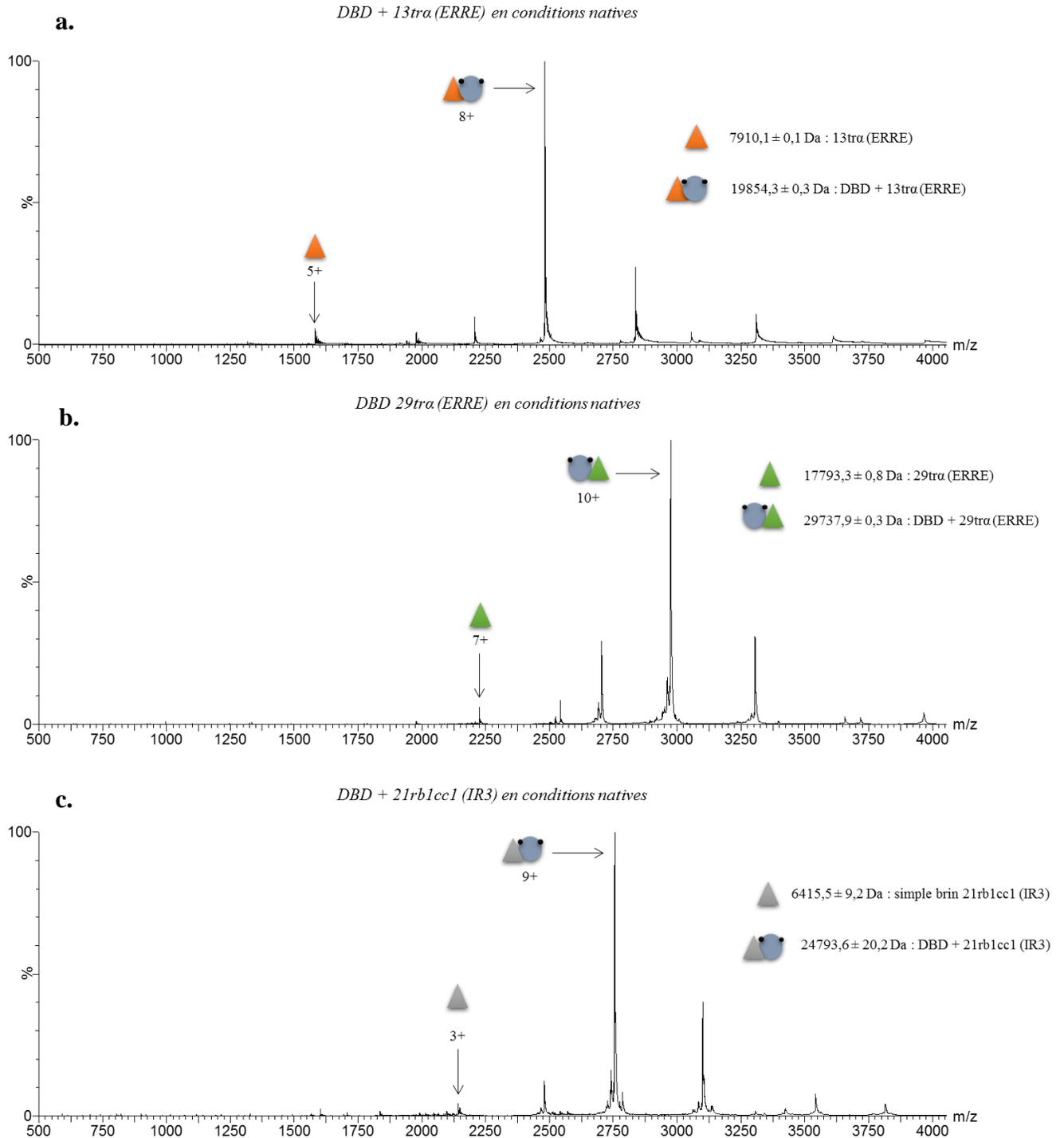


Figure 61 : Spectres de spectrométrie de masse pour les complexes DBD/13tra, DBD/29tra et DBD/21rb1cc1 en conditions natives

a. Complexe DBD/13tra (ERRE) ($V_c=100V$, $P_i=6mbar$), **b.** Complexe DBD/29tra (ERRE) ($V_c=120V$, $P_i=6mbar$). **c.** Complexe DBD/21rb1cc1 (IR3) ($V_c=120V$, $P_i=6mbar$). Le pourcentage d'intensité est représenté en fonction du rapport m/z. Les différentes espèces présentes sont indiquées par une flèche. Un monomère de DBD est représenté par un rond bleu et les oligonucléotides 13tra (ERRE), 29tra (ERRE) et 21rb1cc1 (IR3) sont respectivement représentés par des triangles orange, vert et bleu.

3.3. Étude structurale en solution : diffusion de lumière à petits angles (SAXS)

Alternativement à la cristallographie aux rayons-X, l'analyse par SAXS permet la détermination structurale d'une enveloppe moléculaire à faible résolution. Cette technique a été utilisée dans le cadre de ce projet. La courbe des intensités de diffusion obtenue a permis l'analyse de la région de Guinier linéaire. Un rayon de giration R_g de $23,8 \pm 0,3 \text{ \AA}$ a ainsi pu être déterminé (figure 62a). Puis la fonction de distribution des distances obtenue a permis de déterminer la longueur maximale du complexe. Cette courbe présente une forme non symétrique et plutôt allongée, allant jusqu'à un D_{\max} de $85 \pm 3 \text{ \AA}$. La forme de la courbe témoigne par ailleurs de la présence d'un domaine globulaire et d'une structure plutôt allongée au sein de l'objet étudié (figure 62b).

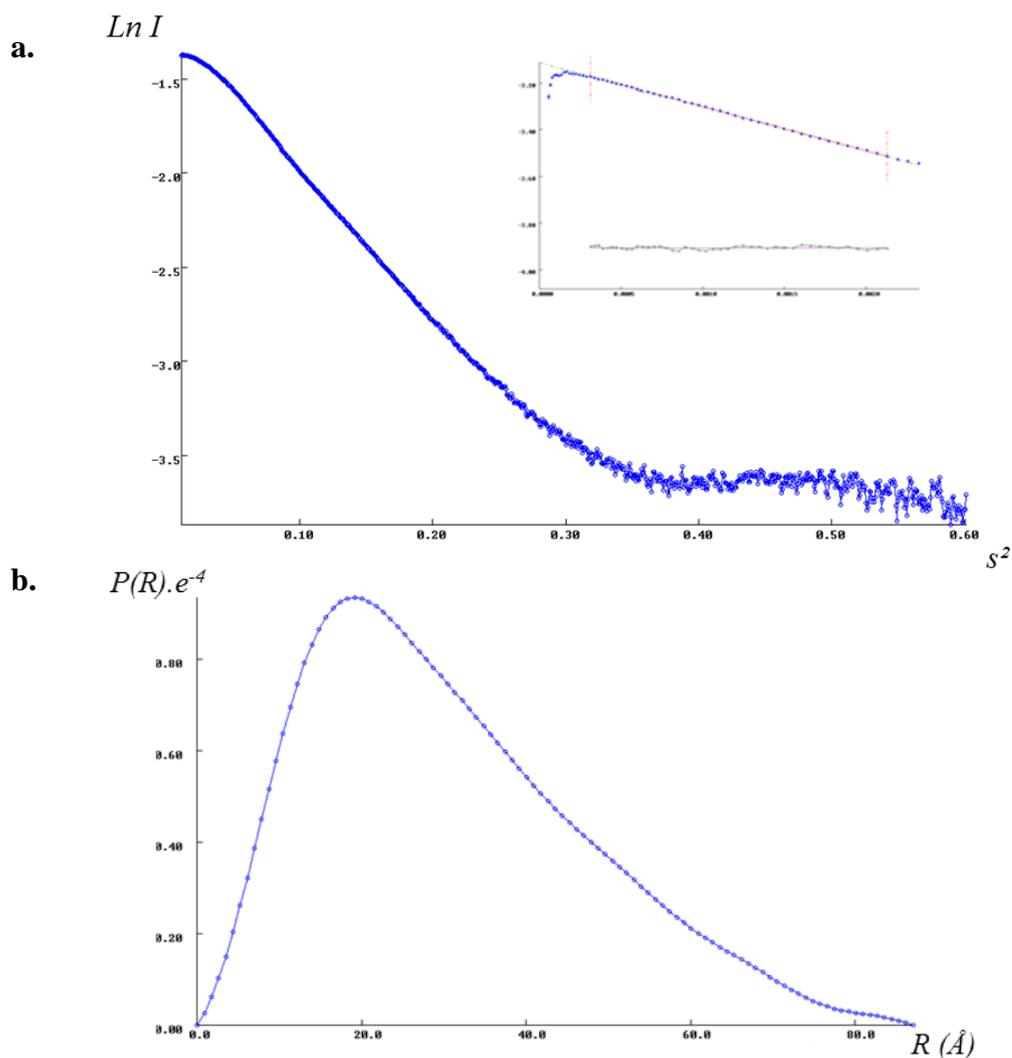


Figure 62 : Expériences de diffusion de lumière à petits angles (SAXS) réalisées sur le domaine DBD

a. Intensités de diffusion en fonction de l'angle de diffusion s^2 . La région de Guinier linéaire est également représentée.
b. fonction de distribution des distances $P(R)$.

La courbe des intensités de diffusion expérimentale obtenue a été comparé avec la courbe théorique des intensités de diffusion calculée à partir de la structure RMN *PDB 1LO1* (où un monomère de DBD d'ERR β interagit avec un ERRE) et montre une parfaite superposition à cette dernière. En contrôle, la comparaison à un modèle dimérique (construit manuellement) montre que les deux courbes d'intensités sont différentes et confirme que le complexe DBD/27tff1 se rapproche plus d'un modèle monomérique (figure 63). Pour finir, l'enveloppe *ab initio* a été calculée en utilisant le logiciel DAMMIF qui, à partir d'un modèle initiale arbitraire constitué de billes, construit un modèle correspond aux données expérimentales de diffusion. Le modèle obtenu à basse résolution pour le complexe DBD/27pb-ERRE indique que le DBD interagit avec le 27tff1 sous forme monomérique. La longueur calculée de ce complexe de 84 Å correspond à la valeur de D_{\max} déterminée par la fonction de distribution $P(R)$ (figure 64).

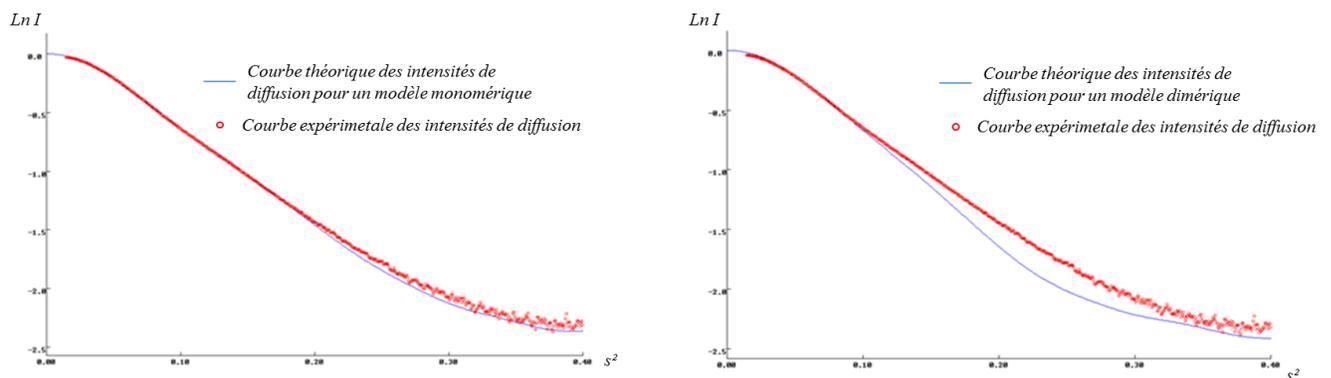


Figure 63 : Courbe expérimentale des intensités de diffusion du complexe DBD/27tff1 superposée aux courbes théoriques des intensités de diffusion pour un modèle monomérique (gauche) et un modèle dimérique (droite).

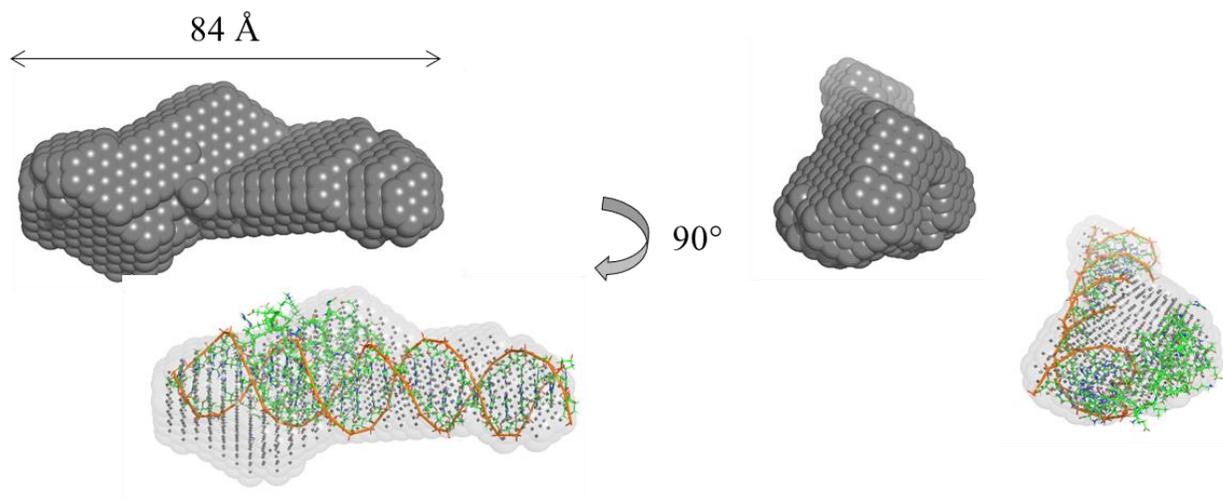


Figure 64 : Enveloppes moléculaires *ab initio* du complexe DBD/27tff1

Le complexe long de 84Å de face et de profil avec une rotation de 90°. Le complexe est modélisé sous forme d'un agglomérat de billes grises et par transparence en superposition avec la structure RMN (*PDB 1LO1*).

En conclusion, les expériences de migration sur gel d'électrophorèse en conditions natives, de spectrométrie de masse ESI-TOF et de SAXS ont permis de montrer que les DBD interagissent sous forme monomérique avec l'élément de réponse ERRE.

Partie III

Étude du récepteur ERR α entier

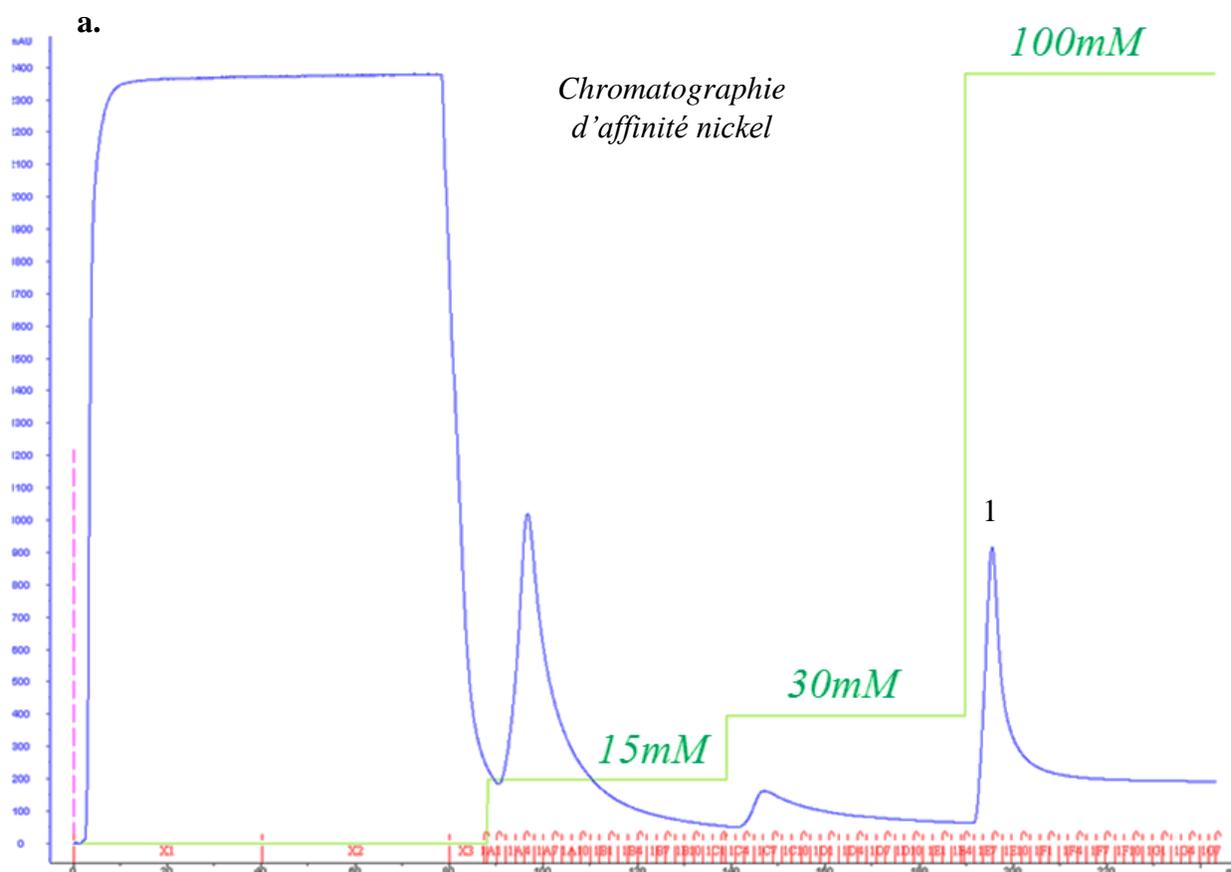
Cette dernière partie du projet présente l'objectif ambitieux de déterminer la structure du récepteur ERR α entier sur l'ADN, pour comprendre la topologie qu'il adopte sur un élément de réponse ERRE. Pour s'inscrire dans la stratégie d'inhibition de l'activité d'ERR α , la cristallisation du récepteur entier a été menée, dans sa conformation antagoniste en interaction les peptides corepresseurs issus de NCoR et en complexe avec des promoteurs naturels comportant un ERRE. En parallèle, une série d'expériences ont été menées afin de caractériser ce grand complexe.

Le récepteur ERR α entier a été purifié et utilisé pour former des complexes avec ligand, peptides et oligonucléotides comportant le demi-site étendu ERRE. Pour concevoir les tests de cristallisation, la stabilité des complexes a été évaluée par fluorimétrie différentielle, diffusion dynamique de lumière et par expériences de retard sur gel.

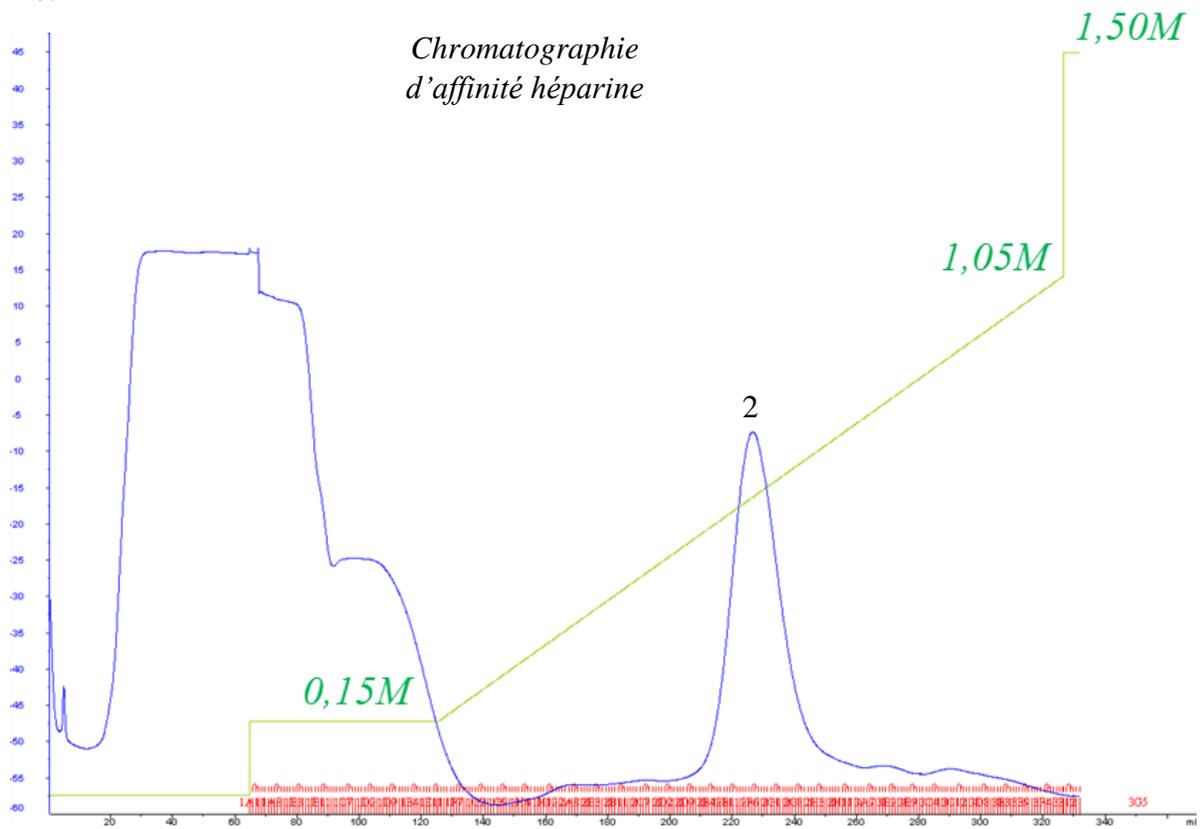
Après avoir optimisé la purification de la protéine ERR α , la caractérisation des complexes par retard sur gel a montré que la liaison de peptides de NCoR était nécessaire à l'obtention d'une conformation unique. Cette observation a été confirmée par les mesures de diffusion dynamique de lumière. Des mesures d'affinité par thermophorèse à micro-échelle ont par ailleurs démontré une meilleure affinité d'ERR pour un IR3 que pour un ERRE, sans doute au détriment de la spécificité. Les essais de cristallisation n'ont malheureusement pas permis l'obtention de cristaux du complexe. Cependant, sa caractérisation biochimique par IEF a permis de mieux comprendre le comportement d'ERR sur l'ADN dans les conditions de cristallisation considérées.

1. Le récepteur entier $ERR\alpha$ pur est utilisé pour sa caractérisation en complexe avec ses oligonucléotides

Comme pour le DBD, le récepteur entier $ERR\alpha$ a été purifié en trois étapes au cours d'un procédé de chromatographie : une première étape de chromatographie d'affinité sur une résinée chélatée au nickel a permis d'éliminer la majeure partie des contaminants protéiques. Au cours d'une deuxième étape de chromatographie d'affinité sur résine héparinée, les acides nucléiques contaminants ont notamment pu être éliminés. Enfin, une dernière étape de chromatographie d'exclusion stérique a permis d'obtenir une protéine pure et dépourvue d'agrégats. Les profils d'élution d' $ERR\alpha$ de chacune de ces étapes sont présentés sur la figure 65 et la qualité d' $ERR\alpha$ après chaque étape a été analysée par migration sur gel d'électrophorèse PAGE-10% en conditions dénaturantes (figure 66). $ERR\alpha$ est élué par compétition à environ 90 mM d'imidazole lors de la première étape d'affinité au nickel, avant d'être directement chargé sur colonne d'affinité à héparine afin d'éliminer tout ADN contaminants. $ERR\alpha$ est élué à une concentration saline de 600 mM. Après ces deux étapes de chromatographie d'affinité, $ERR\alpha$ est pur (figure 66). Enfin, après l'étape de chromatographie d'exclusion stérique, $ERR\alpha$ a été utilisé pour la formation des complexes $ERR\alpha$ /ADN. Toutes ces étapes ont été réalisées en une journée pour garantir une qualité maximale de la protéine. Sa mise en complexe avec les oligonucléotides a par ailleurs permis de conserver $ERR\alpha$ dans un état stable. Pour assurer la qualité d' $ERR\alpha$ purifié, des mesures de DLS ont été réalisées. Le rayon hydrodynamique moyen des particules, estimé à 6,78 nm, correspond à celui d'un récepteur nucléaire (environ 7 nm). Enfin, le faible pourcentage de polydispersité de 14,3% indique qu' $ERR\alpha$ purifié est homogène en solution (figure 67).



b.



c.

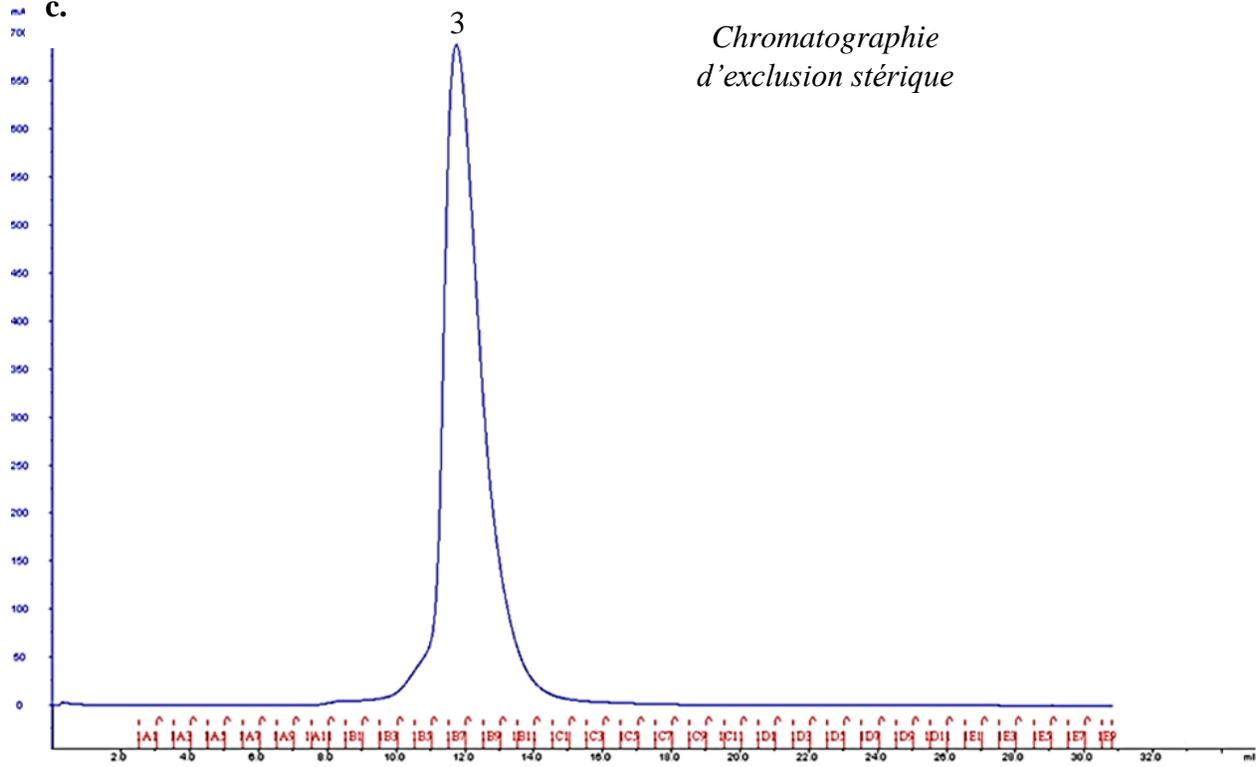


Figure 65 : Purification d'ERR α par chromatographie d'affinité nickel, chromatographie d'affinité héparine et par chromatographie d'exclusion stérique.

a. Chromatogramme d'élution de la chromatographie d'affinité nickel. Le pic d'élution d'ERR α est annoté par « 1 ». En vert sont représentées les trois concentrations croissantes d'imidazole en millimolaire (mM). (ERR α est élué à environ 90 mM.) **b.** Chromatogramme d'élution de la chromatographie d'affinité héparine. ERR α est élué à une concentration de NaCl de 600mM. Le pic d'élution d'ERR α est annoté par « 2 ». **c.** Chromatogramme d'élution de la chromatographie d'exclusion stérique. Le pic d'élution d'ERR α , annoté par « 3 » se situe à 12mL sur une colonne Superdex 200 10/300. Sur les chromatogrammes, les unités d'absorbances (en mAu) sont représentées en fonction du volume (en mL). Les fractions d'élutions sont représentées en rouge au niveau de l'axe des abscisses.

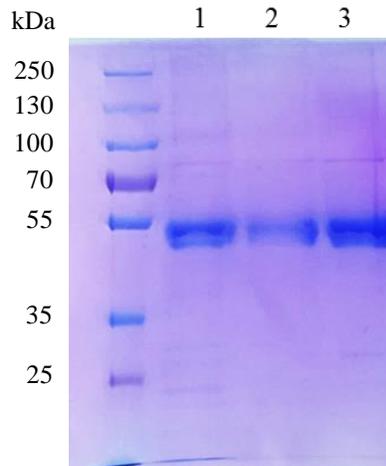
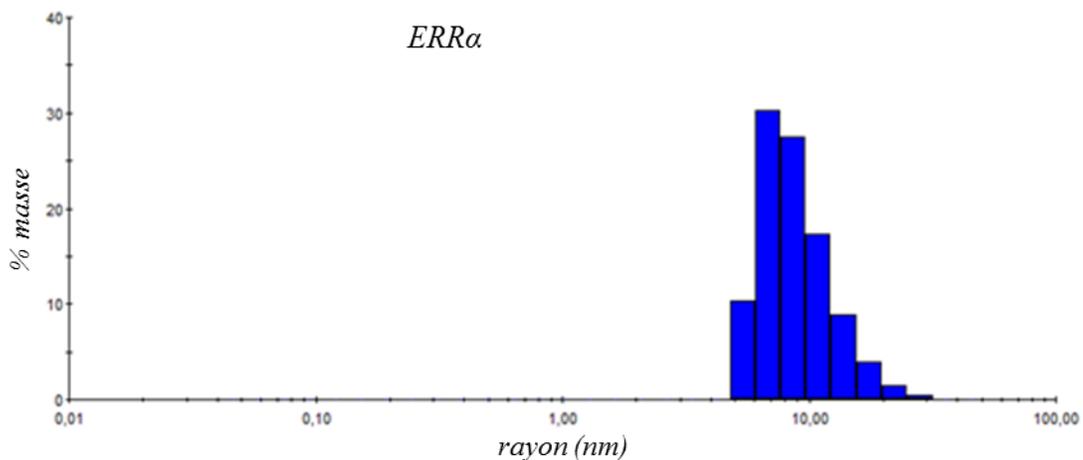


Figure 66 : Suivi de la pureté d'ERR α sur gel dénaturant PAGE-10%

1. ERR α élué par chromatographie d'affinité nickel, 2. ERR α élué par chromatographie d'affinité héparine, 3. Pic d'élution d'ERR α après chromatographie d'exclusion stérique.

5 μ g de protéines sont chargés dans chaque puit. Le gel est coloré au bleu de Coomassie.



	Temp. (°C)	Rayon (nm)	%Pd	Mw-R (kDa)
ERRα	25,0	6,78	14,3	297

Figure 67 : Mesures de DLS réalisées sur le récepteur entier ERR α

Sur les diagrammes, le pourcentage de masse est représenté en fonction du rayon des particules en nanomètre (nm) (haut). Les paramètres caractérisant les particules sont résumés dans le tableau (bas).

2. Caractérisation de complexes $ERR\alpha$ /ERRE/peptide NCoR

$ERR\alpha$ purifié a été utilisé pour former des complexes avec les peptides PF25 et PF26 issus du corépresseur NCoR, également utilisés pour les études du LBD. Afin de s'inscrire dans l'étude structurale de l'inhibition d' $ERR\alpha$, l'objectif *in fine* est de cristalliser le complexe formé par $ERR\alpha$, XCT-790, un oligonucléotide comprenant l'élément de réponse ERRE et l'un des peptides de NCoR. Pour cela, de tels complexes ont été caractérisés pour étudier leur stabilité.

2.1. $ERR\alpha$ est stabilisé en présence des peptides

La conformation d' $ERR\alpha$ lors de la formation progressive du complexe avec un élément de réponse ERRE et un peptide a été suivie par migration sur gel d'électrophorèse PAGE-8% en conditions natives. Pour cela, les oligonucléotides utilisés sont les 21tra-TT, 26tra-TT et 29tra-AA, identiques à ceux utilisés pour l'étude du domaine DBD isolé. Le peptide utilisé est le PF25 issu de NCoR. $ERR\alpha$ seul est utilisé comme contrôle négatif et présente une multitude de conformations d'après sa migration sur gel. En présence des oligonucléotides, une bande principale est révélée, attestant d'une stabilisation partielle d' $ERR\alpha$. Cependant, une seconde bande de moindre intensité est également observée, correspondant à une faible population d' $ERR\alpha$ sous une autre conformation. Enfin, l'ajout du peptide aux complexes préformés $ERR\alpha$ /ADN a conduit à la stabilisation de la totalité d'ERR sous une seule conformation (figure 68). La présence d'un peptide est donc essentielle à la stabilisation de l'ensemble du complexe ternaire dans une conformation stable, ce qui est un prérequis essentiel pour la réalisation des tests de cristallisation.

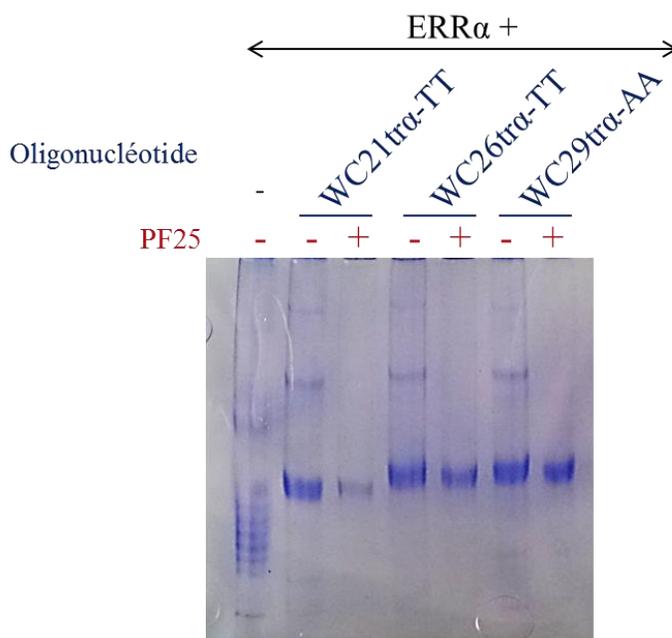
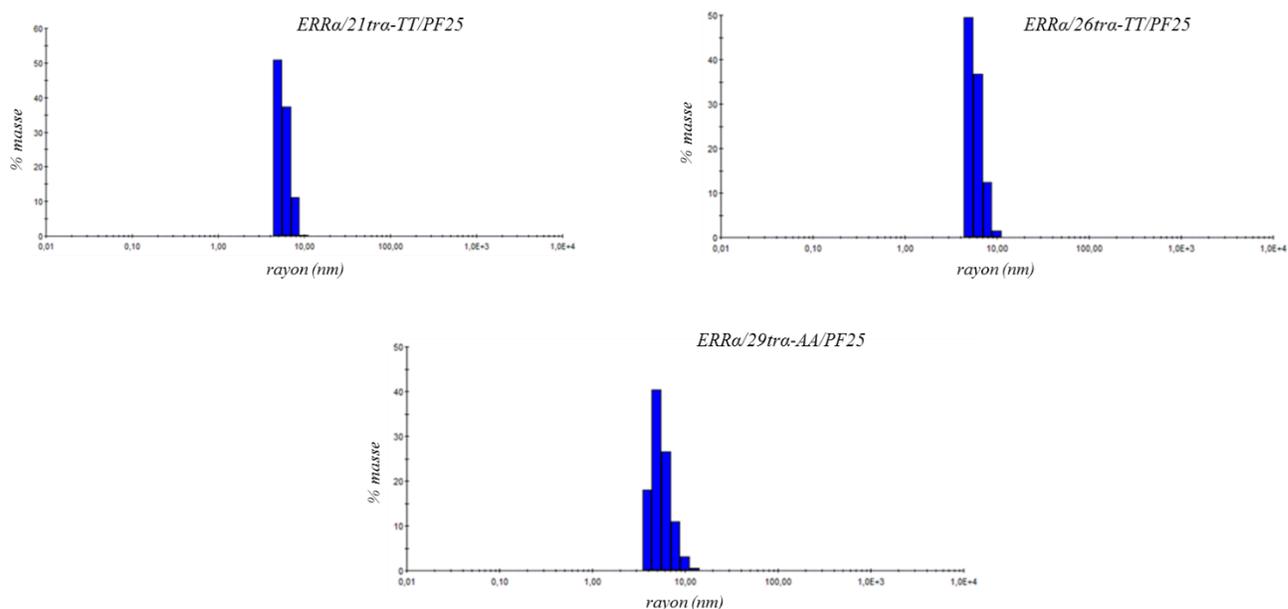


Figure 68 : Suivi de la stabilisation d' $ERR\alpha$ en fonction de la formation du complexe ternaire avec les oligonucléotides 21tra-TT, 26tra-TT et 29tra-AA et le peptide PF25 par migration sur gel PAGE-8% en conditions natives

Les complexes $ERR\alpha$ /ADN sont observés en présence et en absence du peptide PF25. $ERR\alpha$ est chargé comme contrôle. 5 μ g de protéines sont déposés dans chacun des puits. Le gel est révélé au bleu de Coomassie.

2.2. La DLS confirme la stabilité des complexes

Ces résultats ont été confirmés par des mesures de DLS réalisées avec les oligonucléotides et le peptide PF25. La moyenne des dix acquisitions réalisées sur les complexes ERR α /21tra-TT, ERR α /26tra-TT et ERR α /29tra-AA indique respectivement : 7,14 nm, 6,86 nm et 7,05 nm pour le rayon hydrodynamique des particules, 334 kDa, 305 kDa et 325 kDa pour l'estimation des masses moléculaires, et 26,6%, 19,6% et 21,4% pour les pourcentages de polydispersité. La taille des particules correspond aux valeurs attendues pour un récepteur nucléaire entier. Quant aux pourcentages de polydispersité relativement faibles, ils témoignent d'une bonne homogénéité au sein des échantillons pour les trois différents complexes (figure 69). Ces mesures de DLS ont donc permis de confirmer les résultats observés sur le gel natif de la figure 68.



	Temp. (°C)	Rayon (nm)	%Pd	Mw-R (kDa)
ERRα/21tra-TT/PF25	25,0	7,14	26,6	334
ERRα/26tra-TT/PF25	25,0	6,86	19,6	305
ERRα/29tra-AA/PF25	25,0	7,05	21,4	325

Figure 69 : Mesures de DLS réalisées sur les complexes ERR α /21tra-TT/PF25, ERR α /26tra-TT/PF25 et ERR α /29tra-AA/PF25

Sur les diagrammes, le pourcentage de masse est représenté en fonction du rayon des particules en nanomètre (nm) (haut). Les paramètres caractérisant les particules sont résumés dans le tableau (bas).

2.3. Interaction $ERR\alpha$ /ADN : exemple du promoteur du gène *tra* comparé au gène *rb1cc1*

Pour déterminer l'affinité d'interaction au sein du complexe $ERR\alpha$ /ADN, des expériences de MST ont été réalisées afin d'évaluer la constante de dissociation K_d du complexe nucléoprotéique. Le gène *tra*, comprenant un ERRE, étant celui utilisé pour les tests de cristallisation, un oligonucléotide de 33 paires de bases de ce gène (33tra) a été utilisé. En parallèle, pour comparer les forces d'interaction en lien avec la spécificité d'ERR pour un élément de réponse, des mesures ont également été réalisées avec un IR3. Pour cela, un autre oligonucléotide de 33 paires de bases dérivé du gène *rb1cc1* (33rb1cc1) a été utilisé. Ces oligonucléotides sont présentés dans le tableau 13.

Nom de l'oligonucléotide	Gène	Séquence	Elément de réponse	Expérience
33tra	<i>tra</i>	5' - CGATTTGTCAAGGTCAACACAGTGAGTTACCGGC -3' 3' - GCTAAACAGTTCAGTGTGTCACTCAATGGCCG -5'	ERRE	MST
33rb1cc1	<i>rb1cc1</i>	5' - TCCGCAAAGAAGGTCAAATTCACCTTGGGAAAG -3' 3' - AGGCGTTTCTTCCAGTTTAAGTGGAACCCCTTC -5'	IR3	MST

Tableau 13 : Oligonucléotides 33tra et 33rb1cc1 utilisés pour les expériences de MST

Les séquences nucléotidiques de 33 paires de bases sont indiquées et les éléments de réponse figurent en rouge. L'extension de trois nucléotides du ERRE est soulignée.

Pour l'oligonucléotide 33tra, le comportement thermophorétique est enregistré en fonction du temps en secondes sur huit expériences. Les courbes correspondantes ont été normalisées et montrent un comportement reproductible, malgré la présence de quelques courbes bosselées qui n'ont pas été prises en considération (figure 70a). La fluorescence normalisée a été tracée en fonction de la concentration en oligonucléotide 33tra en nM. La courbe de liaison sigmoïdale obtenue a permis de déterminer un K_d d'une valeur d'environ 107 nM entre $ERR\alpha$ et l'oligonucléotide 33tra (figure 70b).

De la même manière, les études de l'interaction entre $ERR\alpha$ et l'oligonucléotide 33rb1cc1 ont été réalisées sur trois expériences (figure 71a). La normalisation des courbes de thermophorèse obtenues a permis d'obtenir une courbe sigmoïdale de liaison où la fraction liée est représentée en fonction de la concentration d'oligonucléotide 33rb1cc1 en nM. Le K_d déterminé pour cet élément de réponse IR3 est d'environ 67 nM (figure 71b).

Pour conclure, le K_d de 107 nM caractérisant le complexe $ERR\alpha$ /33tra représente une interaction relativement forte, laissant présager un complexe suffisamment stable pour espérer le cristalliser. Étonnamment, l'affinité d' $ERR\alpha$ pour le IR3 *in vitro* (67 nM) est plus importante que pour l'ERRE. Il est à penser cependant que cette plus forte affinité se fait au détriment de la spécificité d'interaction

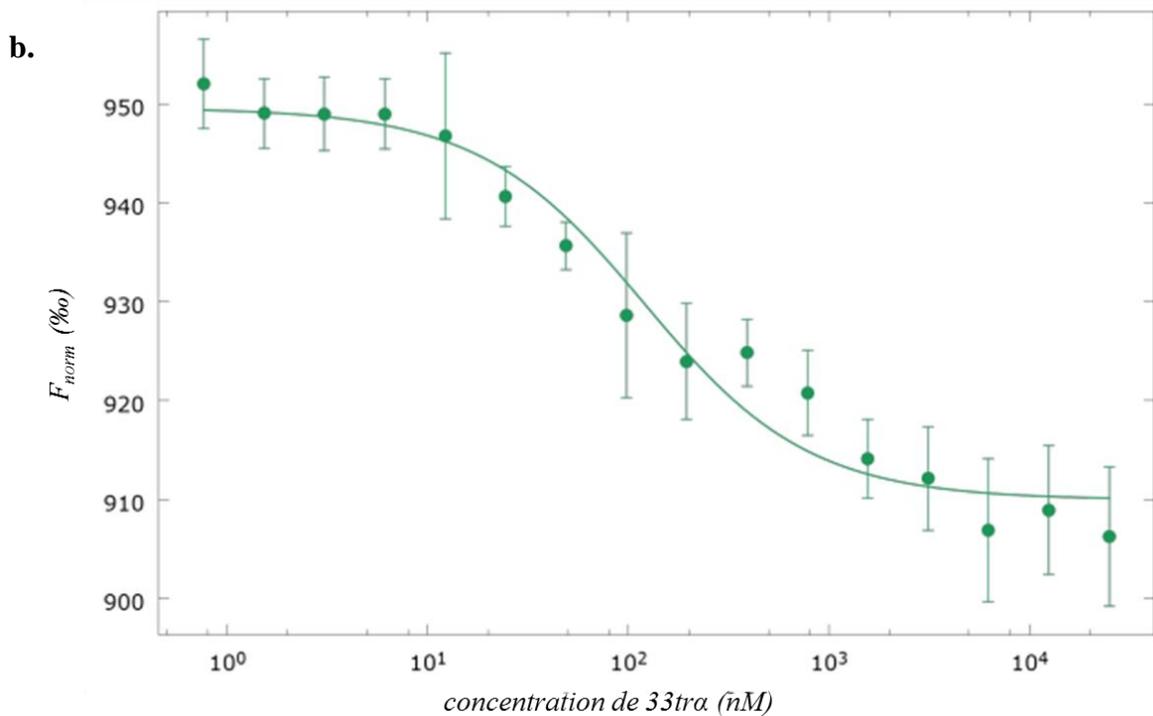
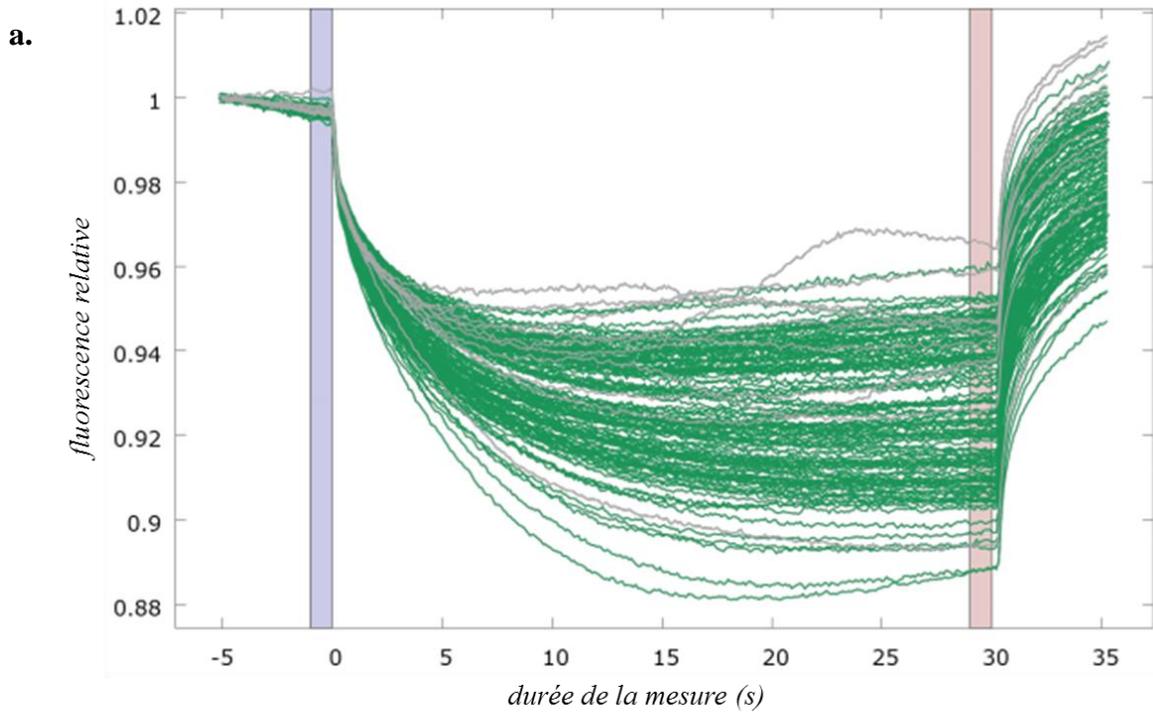


Figure 70 : Détermination de la constante de dissociation K_d caractérisant l'interaction entre ERR α et l'oligonucléotide 33tra. ERR α marqué est tenu à concentration constante et est titré en fonction de concentrations croissantes de 33tra. **a.** Courbes de thermophorèse où la fluorescence normalisée sur neuf mesures est représentée en fonction du temps de mesure en secondes. Les données sont enregistrées à 24°C pour des puissances d'excitation et de laser-IR respectives de 30% et 20%. Le moment de thermophorèse pris en compte pour le tracé de la courbe de liaison sigmoïdale est représenté par les barres bleue et rose. Les courbes grisées correspondent aux mesures non significatives qui n'ont pas été prises en compte pour l'expérience. **b.** Sigmoïde de liaison permettant la détermination du K_d . Les barres d'erreur sur les neuf mesures sont représentées pour chaque point ($\chi^2 = 0,66$; SER = 3,28). La concentration de 33tra varie de 0,76 μ M à 25 μ M pour une concentration constante d'ERR α marqué de 25 nM.

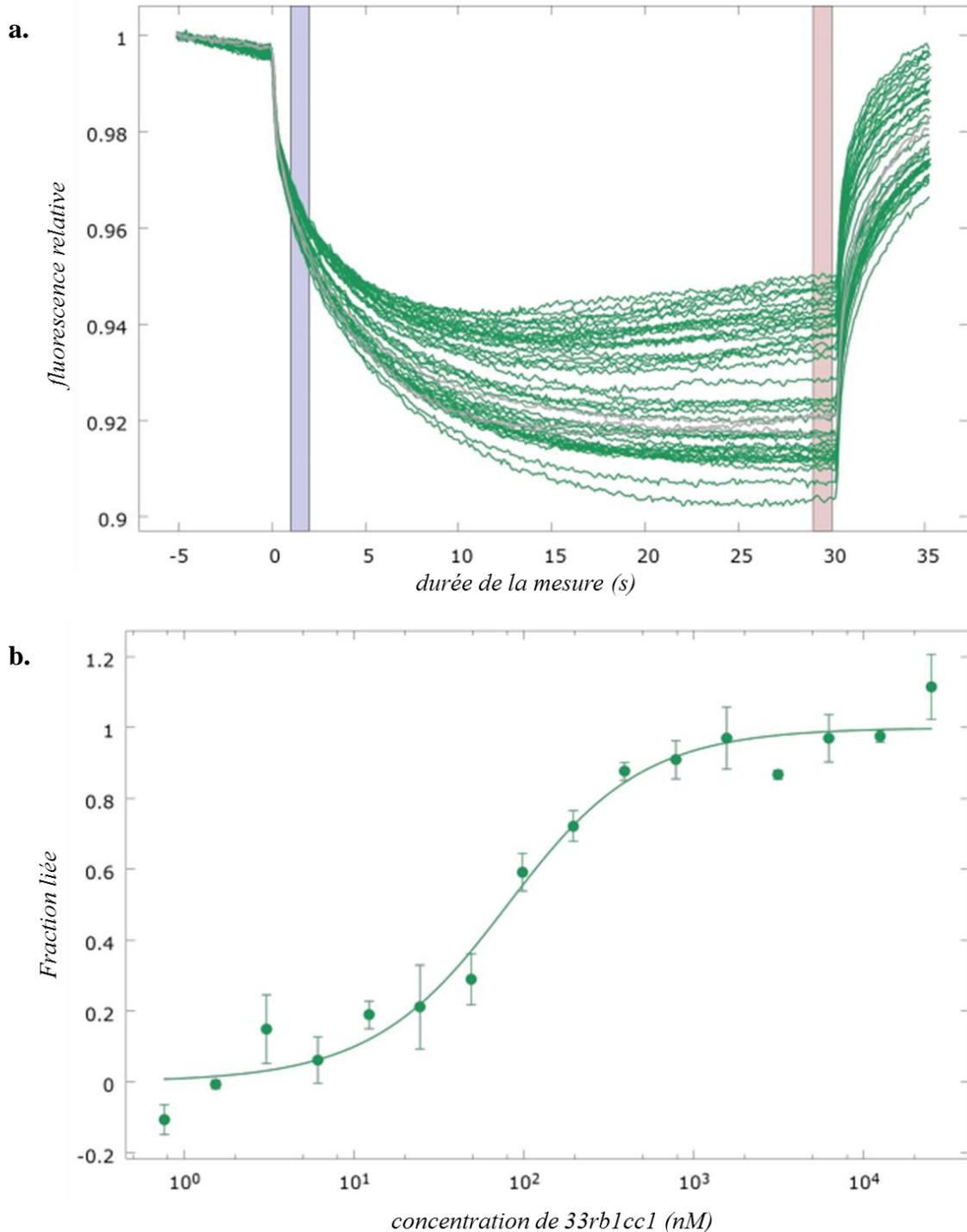


Figure 71 : Détermination de la constante de dissociation K_d caractérisant l'interaction entre $ERR\alpha$ et l'oligonucléotide 33rb1cc1. $ERR\alpha$ marqué est tenu à concentration constante et est titré en fonction de concentrations croissantes de 33rb1cc1. **a.** Courbes de thermophorèse où la fluorescence normalisée sur trois mesures est représentée en fonction du temps de mesure en secondes. Les données sont enregistrées à 25°C pour des puissances d'excitation et de laser-IR respectives de 30% et 20%. Le moment de thermophorèse pris en compte pour le tracé de la courbe de liaison sigmoïdale est représenté par les barres bleue et rose. Les courbes grisées correspondent aux mesures non significatives qui n'ont pas été prises en compte pour l'expérience. **b.** Sigmoïde de liaison permettant la détermination du K_d . Les barres d'erreur sur les trois mesures sont représentées pour chaque point ($\chi^2 = 7,27$; $SER = 2,08$). La concentration de 33rb1cc1 varie de 0,76 μM à 25 μM pour une concentration constante d' $ERR\alpha$ marqué de 25 nM.

3. Tests de cristallisation

Les premiers tests de cristallisation des complexes ERR α /ADN/peptide ont été réalisés en utilisant les screens de cristallisation disponibles sur la plateforme de biologie et de génomique structurales de l'IGBMC. Des cristaux sont apparus en moins de 24 heures avec les trois types d'oligonucléotides dans les mêmes conditions de cristallisation (tableau 14). Leurs formes étaient plutôt allongées avec l'oligonucléotide 21tr α -TT et hexagonales avec les 26tr α -TT et 29tr α -AA (tableau 14).

Afin de ne pas perturber le réseau cristallin en plongeant les cristaux dans une solution de cryoprotection, une déshydratation a été préférée, en augmentant progressivement la concentration de précipitant du réservoir (52%, 54%, 56%, 58% et 60% v/v de PEG400, avec une concentration constante de 0,1 M C₂H₃NaO₂ pH 4,5 et de 0,1 M LiSO₄). Cependant, dès le premier échange de réservoir, les cristaux se sont dissous.

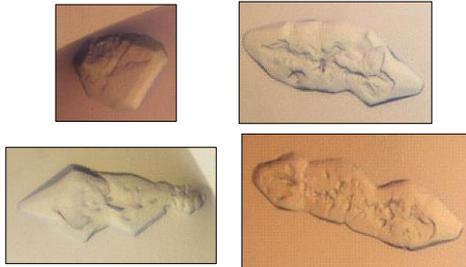
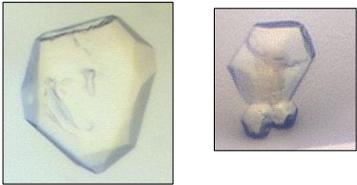
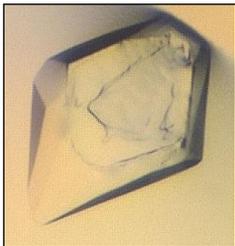
Cristaux	Conditions de cristallisation et screens	Oligonucléotide	Peptide
	0,1 M C ₂ H ₃ NaO ₂ pH 4,5 0,1 M LiSO ₄ 50% PEG400 <i>JCSG+, AI</i>	21tr α -TT	PF25
	0,1 M C ₂ H ₃ NaO ₂ pH 4,5 0,1 M LiSO ₄ 50% PEG400 <i>JCSG+, AI</i>	26tr α -TT	PF25
	0,1 M C ₂ H ₃ NaO ₂ pH 4,5 0,1 M LiSO ₄ 50% PEG400 <i>JCSG+, AI</i>	29tr α -AA	PF25

Tableau 14 : Cristaux obtenus lorsque les complexes ERR α /21tr α -TT/PF25, ERR α /26tr α -TT/PF25 et ERR α /29tr α -AA/PF25 ont été mis à cristalliser

Les conditions de cristallisation issues du screen commercial et les oligonucléotides utilisés sont précisés.

Seul un cristal de ERR, avec l'oligonucléotide 29tra-AA et le peptide PF26, a pu être reproduit par la suite (tableau 15) dans les mêmes conditions de cristallisation. Il a été directement récolté de sa goutte et congelé. Cependant, ce cristal, analysé par diffraction aux rayons-X au synchrotron, s'est avéré être un cristal de sel.

Cristaux	Conditions de cristallisation et screens	Oligonucléotide	Peptide
	0,1 M C ₂ H ₃ NaO ₂ pH 4,5 0,1 M LiSO ₄ 50% PEG400 <i>JCSG+, A1</i>	29tra-AA	PF26

Tableau 15 : Cristal obtenu pour le supposé complexe ERR α /29tra-AA/PF26

La condition de cristallisation (A1 du screen commercial JCSG+) est identique à celle observée pour les autres cristaux précédemment obtenus.

4. Contexte biochimique de cristallisation des complexes ERR α /ADN : influence du pH

Bien que les essais de cristallisation n'aient pas permis d'obtenir des cristaux d'ERR α en complexe ternaire, ceux-ci permettent de comprendre, d'un point de vue biochimique, le comportement de ces complexes en solution dans la condition de cristallisation (0,1 M C₂H₃NaO₂ pH 4,5, 01 M LiSO₄, 50% PEG400).

En effet, sur l'ADN, les groupements phosphates des liaisons phosphodiester ont un pK_a très acide et sont chargés négativement à pH physiologique. Hypothétiquement, ces charges exposées au solvant sont neutralisées par, notamment, l'interaction de protéines ou d'ions métalliques. Ainsi, au sein du complexe ERR α /ADN/peptide, le pH joue un rôle important dans la cohésion du complexe. Le tampon présent dans la condition de cristallisation est l'acétate de sodium à pH acide de 4,5, c'est-à-dire, proche du pK_a des groupements phosphates. Ces groupements, sous l'effet d'un pH acide, sont protonés, déstabilisant ainsi les interactions protéine/ADN en créant, notamment, des répulsions de charges avec les résidus basiques qui interagissent dans le grand sillon de la double hélice d'ADN.

Pour observer le complexe ternaire complet à un tel pH acide, ceux-ci ont été chargés sur un gel d'électrophorèse dans des conditions natives à un pH identique à celui de la condition de cristallisation. Au préalable, le point isoélectrique (pI) d'ERR α a été déterminé par la technique d'*IsoElectric Focusing* (IEF). Pour observer une éventuelle différence de pI entre ERR α seul et ERR en complexe, un contrôle négatif (ERR seul) a été utilisé, parallèlement aux complexes d'ERR avec l'ADN 29tra-AA en présence ou non du peptide PF26. Deux complexes supplémentaires d'ERR α avec les ADN 33tra (piste 4) et 33rb1cc1 (piste 5) ont également été étudiés. ERR α seul et l'ensemble des complexes migrent tous au même niveau,

correspondant à un pI de 5,5 (figure 72). La liaison de l'ADN et de peptides à ERR α n'aurait donc pas d'influence sur le pI de ce dernier.

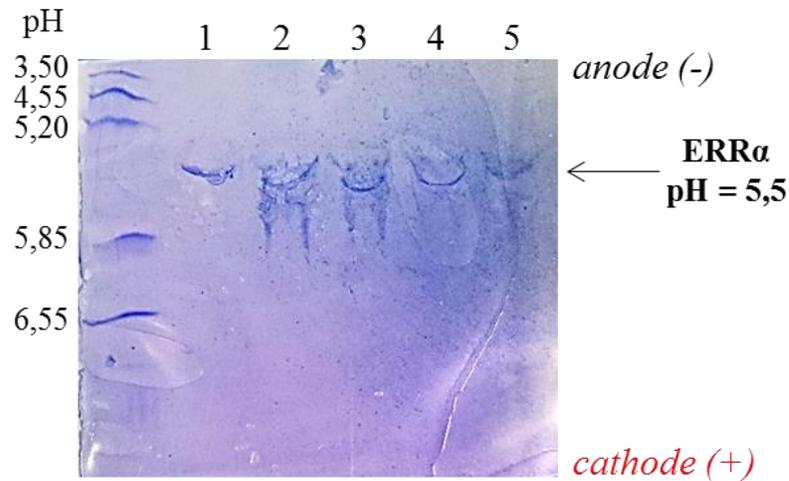


Figure 72 : IEF d'ERR α et de ses complexes : le pI est de 5,5

1. ERR α , 2. ERR α /29tra-AA, 3. ERR α /29tra-AA/PF26, 4. ERR α /33tra, 5. ERR α /33rb1cc1. Les marqueurs de pH et l'orientation des électrodes sont respectivement indiqués à gauche et à droite du gel.

1 μ g de protéine est déposé par puit. Le gel est révélé au bleu de Coomassie.

L'électrophorèse sur gel en conditions natives a ensuite été réalisée. En utilisant un gel à pH 4,4, aucune migration caractéristique d'ERR α n'a été observée, tandis qu'une migration contrôle des mêmes échantillons sur un gel à pH 10,3 a permis de voir distinctement ERR α seul ainsi que les différents complexes qu'il forme (figure 73).

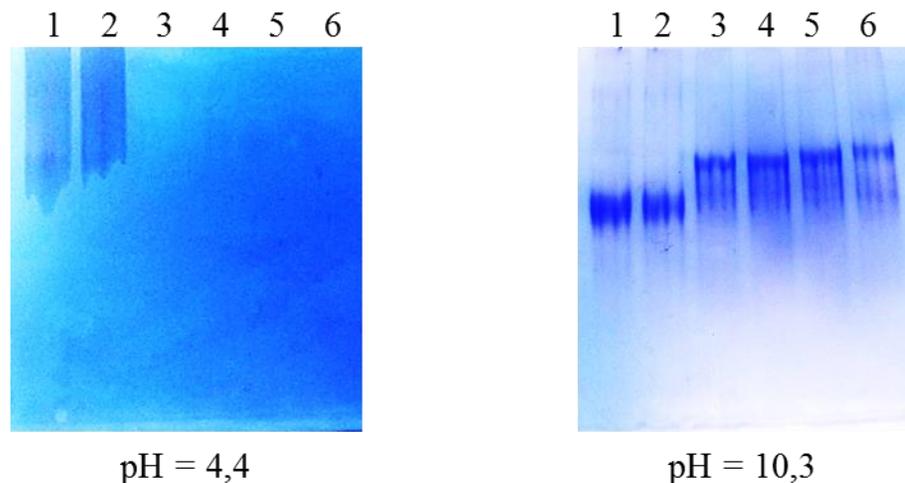


Figure 73 : Migration sur gel en conditions natives des complexes avec ERR α à pH 4,4 et pH 10,3

Pour les deux gels à pH 4,4 et pH 10,3 : 1. ERR α , 2. ERR α /PF26, 3. ERR α /29tra-AA, 4. ERR α /29tra-AA/PF26, 5. ERR α /33tra, 6. ERR α /33rb1cc1

5 μ g de protéines sont déposés par puit. Le gel est révélé au bleu de Coomassie.

Ces résultats confirment donc qu'un pH acide à 4,4, tel que celui de la solution de cristallisation, cause la dissociation du complexe.

Discussion

Au cours de ces années de doctorat, j'ai eu l'occasion de travailler sur ce projet centré sur la régulation de la transcription des gènes par le récepteur nucléaire stéroïdien ERR. Ce sujet passionnant consistait en l'étude des mécanismes structuraux qui caractérisent le fonctionnement de ce récepteur orphelin. Par une approche de biologie structurale intégrative, j'ai pu étudier le fonctionnement de la cible thérapeutique $ERR\alpha$, en complexe avec ses éléments de réponses sur l'ADN, certains de ses ligands et des fragments de corégulateurs protéiques, en me focalisant sur les domaines modulaires DBD et LBD. Ce projet était divisé en trois principales parties à l'image des différents événements qui régissent l'activité d'ERR : la modulation de l'activité d'ERR par des ligands, le mode d'interaction d'ERR avec ses séquences consensus naturelles spécifiques au niveau des promoteurs géniques et enfin une vue d'ensemble sur le récepteur entier pour comprendre l'implication des différents domaines modulaires. Pour mener à bien mon projet de thèse au Centre de Biologie Intégrative de l'IGBMC dans l'équipe du Dr. Bruno Klaholz, une multitude de techniques biophysiques disponibles sur la plateforme de biologie et génomique structurales m'ont permis de décrire les interactions entre partenaires protéiques ou protéo-nucléotidiques complétées par la cristallographie aux rayons-X. Le travail que j'ai mené au cours de ma thèse a permis de comprendre les comportements biochimiques des domaines isolés d' $ERR\alpha$ LBD et DBD, informations essentielles à la mise en place des tests de cristallisation et à la résolution de la structure atomique du récepteur.

Les ERR sont présents sous trois isotopes α , β et γ . Ces dernières ne peuvent pas être activés par les estrogènes naturels comme le 17β -estradiol, cependant ils peuvent lier des ligands synthétiques comme le 4-OHT et le DES qui jouent le rôle de pan-agonistes inverses de $ERR\beta$ and $ERR\gamma$. Le ligand agoniste inverse XCT-790, quant à lui, cible sélectivement $ERR\alpha$ pour inhiber son activité constitutive. Afin d'apporter plus de connaissances sur les mécanismes d'inhibition antagoniste d' $ERR\alpha$, l'un de mes objectifs était de découvrir les bases moléculaires régissant les interactions entre le LBD et le ligand synthétique XCT-790 par cristallographie aux rayons-X. La formation des complexes entre le LBD et le ligand agoniste inverse XCT-790 s'est faite en présence de peptides corépresseurs issus de NCoR afin de stabiliser l'hélice H12 et faciliter la cristallisation du complexe.

J'ai tout d'abord optimisé le protocole de purification du LBD d' $ERR\alpha$ pour obtenir une protéine très pure. Le LBD est complexé au XCT-790 et à l'un des peptides de NCoR (PF25 ou PF26). Les essais de cristallisation de ces complexes ont principalement été menés en criblant un panel de conditions que j'ai conçues sur la base des conditions publiées pour la structure connue du LBD complexé au peptide PI251 comportant le motif L3 LXXLL du coactivateur PGC-1 α (PDB 3D24). Ce dernier a été utilisé comme contrôle de cristallisation pour vérifier la qualité du LBD purifié et la reproductibilité de cristallisation. Peu de temps après le commencement de ce projet, des premiers cristaux du LBD en complexe avec le XCT-790 et le peptide PF25 de NCoR ont été obtenus. Ils ont diffracté à une résolution de 3,5 Å mais les données de diffraction n'ont pas pu être traitées dès même l'étape d'indexation car ces cristaux étaient maclés et présentaient plusieurs réseaux. Je n'ai pas pu reproduire ces cristaux. La stratégie alors adoptée fut celle du trempage en reproduisant les cristaux de la structure PDB 3D24 constituée du complexe LBD/PI251 en ajoutant le ligand XCT-790 à la goutte de cristallisation. Ces cristaux ont diffracté jusqu'à 2,1 Å de résolution mais, malheureusement, après avoir déterminé la structure, aucune densité pour le ligand XCT-790 n'était visible. Les contacts cristallins étant réalisés par l'intermédiaire de ce peptide, il est raisonnable de penser que le XCT-790 n'ait pas pu s'insérer dans la poche de liaison au ligand.

Si les bases moléculaires qui régissent l'antagonisme du LBD par le XCT-790 restent encore à déterminer, les caractérisations biophysiques que j'ai menées démontrent l'interaction de ce ligand avec $ERR\alpha$. La technique de thermophorèse à micro-échelle a permis la détermination d'une constante de dissociation K_d de 51,78 nM qui atteste d'une forte interaction. La formation de ce complexe a également

été suivie par spectrométrie de masse ESI-TOF en conditions natives, en collaboration avec l'équipe du Dr. Sarah CIANFERANI du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique (LSMBO). En effet, ces analyses ont permis de constater qu'une molécule de XCT-790 se liait sur chacun des monomères de LBD. Cependant, la liaison des peptides n'a pas été détectée probablement à cause de l'échange de tampon ou du voltage appliqué qui a causé la dissociation des peptides. Pour le vérifier, un contrôle positif avec le complexe LBD/PI251 serait à réaliser ultérieurement.

Pour compléter cette étude et aider à comprendre les déterminants structuraux, le XCT-790 peut être étudié avec le LBD mutant Phe328Ala, résidu localisé dans la poche de liaison aux ligands. Curieusement, le XCT-790 agit comme agoniste pour ce dernier (Willy *et al.* 2004). Il serait intéressant de déterminer la structure de ce mutant en complexe avec le XCT-790 et de la comparer avec celle du complexe sauvage LBD/XCT-790 afin de comprendre l'implication de ce résidu dans la reconnaissance du XCT-790. En se basant sur les structures connues de l'antagonisme du LBD par les composés 1a et 29, une hypothèse peut être émise quant aux mécanismes de cet agonisme observé chez le mutant LBD. La liaison du XCT-790 dans la poche du LBD mutant n'induirait pas de gêne stérique avec le résidu muté en alanine et l'hélice H12, dont la Phe510 n'est pas gênée stériquement, reste dans sa position agoniste.

Pour comprendre le mode de liaison d'ERR α sur l'élément de réponse ERRE, le domaine DBD incluant l'extension CTE a été étudié. La présence de cette partie CTE est nécessaire pour l'étude d'ERR sur un demi-site étendu puisque son interaction dans le petit sillon, constitué du tri-nucléotide ^{5'}TNA^{-3'} en 5' de l'élément de réponse, est cruciale à l'ancrage et à la stabilisation du DBD sur l'élément de réponse ERRE. L'un des objectifs de cette partie du projet était de déterminer la structure cristallographique du DBD de ERR α sur un élément de réponse ERRE et de comprendre la stœchiométrie qu'il adopte sur un ERRE.

Pour cela, j'ai tout d'abord mis en place le protocole de purification du DBD qui a permis d'obtenir une protéine hautement pure. En plus d'être pure, la protéine doit également être stable pour mener des tests de cristallisation. Le suivi de la stabilité thermique par fluorimétrie différentielle montre un T_m inchangé du DBD en présence ou non d'oligonucléotide avec un T_m de 57,5°C. De plus, l'électrophorèse en conditions natives des complexes formés avec les oligonucléotides 21 α -TT, 26 α -TT et 29 α -AA a montré la présence d'une conformation unique adoptée par chacun de ces complexes. Ceci a été confirmé par les mesures de diffusion dynamique de lumière dont les résultats confirment la bonne monodispersité et des paramètres de tailles attendus. La caractérisation de la limite de dissociation des complexes DBD/ADN en fonction de la concentration saline est un paramètre important à prendre en considération pour la cristallisation. La limite de stabilité pour ces complexes a été déterminée par électrophorèse en conditions natives et a été fixée à 400 mM. Au-delà de cette concentration, le complexe DBD/ADN tend à se dissocier. Ces caractérisations biophysiques et biochimiques ont attesté une bonne qualité du DBD purifié et une stabilité des complexes formés avec les différents oligonucléotides, points favorables pour des tests de cristallisation.

Les essais de cristallisation ont été menés en criblant un très large panel de conditions incluant divers pH, concentrations et natures de sels, précipitants et températures. Plusieurs conditions ont permis l'obtention de cristaux, principalement sous forme d'aiguilles qui se développent à partir d'un même point de nucléation, et de plaques de faibles épaisseur (de l'ordre d'une dizaine de microns). Il est important de mentionner ici que la récolte de ces cristaux est une étape relativement fastidieuse et doit être réalisée délicatement car ces derniers se cassent très facilement, quel que soit le type de boucle utilisée. Les cristaux ont été congelés en utilisant des cryoprotéctants composés de 35% de PEG 3350. Cependant, leur faible pouvoir diffractant, atteignant au mieux 7 Å de résolution, montre qu'un problème est probablement survenu

lors de la congélation qui a causé la perturbation du réseau cristallin. Si les clichés de diffraction indiquent qu'il s'agit de cristaux de protéines, il n'a été vérifié à ce jour s'ils étaient effectivement composés de complexes DBD/ADN. Pour vérifier que le DBD est bien présent au sein du cristal, quelques cristaux auraient pu être récoltés, lavés et chargés sur gel d'électrophorèse dénaturant suivie par une caractérisation par spectrométrie de masse en conditions dénaturantes.

Quelle est la stœchiométrie adoptée par les DBD sur un ERRE ? Pour répondre à cette question, des caractérisations ont été réalisées en parallèle des nombreux tests de cristallisation. En collaboration avec l'équipe du Dr. Sarah CIANFERANI du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-organique (LSMBO), des expériences de spectrométrie de masse ESI-TOF en conditions natives ont été effectuées pour étudier le comportement du DBD sur l'oligonucléotide 29bp-ERRE qui est suffisamment long pour accueillir un potentiel dimère de DBD. Les mesures sur ce complexe DBD/29bp-ERRE révèlent que le DBD est lié sous la forme d'un monomère. Ceci est supporté par l'analyse par électrophorèse en conditions natives où des ratios molaires croissants des complexes DBD/ADN indiquent que le DBD se fixe sous forme monomérique sur les ADN 21tra et 29tra qui contiennent l'élément de réponse ERRE. Curieusement, le DBD est également monomérique sur un élément de réponse IR3 alors que ce dernier est formé de deux demi-sites hexamériques, d'après les expériences d'électrophorèse en conditions natives et les mesures de spectrométrie de masse ESI-TOF. Par contre, sur un élément de réponse combiné ERRE/ERE le DBD se lie sous forme dimérique, à l'inverse de l'IR3. Des analyses par spectrométrie de masse ESI-TOF sur le DBD complexé au motif ERRE/ERE permettraient de confirmer cette observation. Le suivi de la liaison du DBD sur ce motif, en déterminant les K_d par *Micro-Scale Thermophoresis*, est prévue dans la suite de ce projet afin de visualiser une courbe sigmoïdale présentant potentiellement deux plateaux qui refléteraient la liaison séquentielle des DBD sur chacun des demi-sites. Ceci fera l'objet d'une publication d'ici peu.

En 1991, des expériences de retard sur gel pour suivre la stœchiométrie DBD/ADN, similaires à celles que j'ai menées, indiquaient que les DBD d'ER se lient sous forme dimérique à l'élément de réponse ERE. De plus, il a été démontré que le DBD d'ER est monomérique en solution sans ADN et que son homodimérisation est permise uniquement lorsqu'il se lie à l'élément de réponse ERE (Nardulli *et al.*, 1991). Deux années plus tard, la structure cristallographique des DBD du récepteur ER sur un IR3 indique que ces derniers sont liés sous forme d'homodimère, où chacun des DBD est fixé sur un demi-site (Schwabe *et al.*, 1993). Si la liaison d'ERR sur un IR3 s'opère via la liaison d'un seul DBD sur un demi-site, la présence de l'extension tri-nucléotidique en 5' du motif ERRE/ERE est suffisante à la liaison du second DBD pour former un dimère. Ainsi, la liaison du premier DBD, stabilisé par l'ancrage de la CTE dans le petit sillon, où se trouve l'extension de trois nucléotides, permettrait le recrutement coopératif du second DBD sur le second demi-site de l'IR3 et la formation de l'interface d'homodimérisation via des interactions entre les *D-box*. La présence de ce tri-nucléotide conditionnerait donc la formation d'un dimère de DBD d'ERR sur un motif contenant deux demi-sites. Les raisons pour cette différence du mode de liaison entre ERR et ER restent à être élucidées.

Enfin, la troisième partie de ce travail de thèse consiste en l'étude structurale du récepteur sur ses éléments de réponse, projet ambitieux étant donné la complexité de fonctionnement du récepteur que ce soit au niveau de son interaction avec l'ADN qu'avec sa liaison à des ligands. De plus, la présence dans ce cas du domaine amino-terminal AF1 très flexible rend cette partie du projet extrêmement complexe pour son étude biophysique et structurale. Pour s'inscrire dans la stratégie d'inhibition de l'activité d'ERR α , cette partie du projet consistait à essayer de cristalliser le récepteur entier dans sa conformation antagoniste en interaction avec le ligand XCT-790 et les peptides corépresseurs issus de NCoR en complexe avec des promoteurs naturels comportant un ERRE. Les notions acquises sur les comportements biochimiques des

domaines isolés LBD et DBD a permis d'aborder stratégiquement la mise en place d'un protocole de purification pour le récepteur entier ERR α . Le caractère instable de cette protéine imposait la réalisation de ses trois étapes de purification ainsi que la formation des complexes d'intérêts en l'espace d'une journée. Quelques caractérisations ont été réalisées pour suivre la stabilité des complexes formés en vue d'essais de cristallisation. En optimisant la formation des complexes, j'ai pu mettre en évidence l'importance de la présence de peptides de corégulateurs afin de stabiliser l'ensemble du complexe dans une conformation unique. Par ailleurs, les complexes analysés par diffusion dynamique de lumière présentent une polydispersité d'une vingtaine de pourcents pour des particules de tailles consistantes avec celle d'un récepteur nucléaire (environ 7 nm). Les essais de cristallisation ont été menés en utilisant quelques centaines de conditions de criblage. Des cristaux ont été obtenus et testés au synchrotron SLS mais il s'agissait malheureusement de cristaux de sel. Le tampon présent dans la condition de cristallisation était l'acétate de sodium à un pH acide de 4,5 (0,1 M C₂H₃NaO₂ pH 4,5, 0,1 M LiSO₄ et 50% PEG 400, le PEG 400 possédant déjà un caractère cryoprotectant à cette concentration). J'ai alors effectué une électrophorèse en conditions natives réalisée à pH 4,4 qui a démontré la dissociation des complexes. En effet, cette valeur de pH proche du pK_a des groupements phosphates conduirait à leur protonation. Les interactions protéine/ADN seraient alors déstabilisées notamment par la création de répulsions de charges entre les résidus basiques et les phosphates étant positivement chargés.

La détermination des constantes de dissociation du récepteur entier sur un ERRE et sur un IR3 révèle des K_d respectifs de 107 nM et 67 nM. Si l'affinité d'ERR α pour le IR3 *in vitro* (67nM) est supérieure à celle pour l'ERRE, cette liaison se réalise certainement au détriment d'une spécificité d'interaction car ERR se lie très spécifiquement aux ERRE. Au sein du récepteur entier, la stœchiométrie de liaison adoptée par les DBD sur l'ADN est potentiellement différente de celle pour les domaines isolés (liaison d'un monomère tant sur un ERRE que sur un IR3). L'activité de ERR est modulée par la liaison de protéines corégulatrices et de ligands sur le LBD et certainement par le domaine amino-terminal qui subit des modifications post-traductionnelles. Ainsi, le comportement du récepteur entier sur l'ADN s'avère être différent de celui du domaine DBD isolé car l'ensemble des domaines modulaires participent à la régulation de l'activité transcriptionnelle. Il existerait donc une communication inter-domaines où des réarrangements structuraux seraient transmis jusqu'aux DBD soulignant l'existence d'un mécanisme allostérique car l'effet du ligand est indirect et impacte sur l'ensemble du récepteur.

En résumé, les caractérisations du mode d'interaction d'ERR avec l'ADN en utilisant le domaine isolé DBD montre que ce dernier se lie sous forme de monomère sur un élément de réponse ERRE et, curieusement, sur un IR3 malgré la présence d'un second demi-site. Cependant, sur l'élément de réponse combiné ERRE/ERE, des premières analyses indiquent que le DBD s'y lierait sous la forme de dimère soulignant l'importance de la présence d'une extension en 5' pour la dimérisation. Dernièrement, la cristallisation du DBD sur l'élément de réponse combiné ERRE/ERE a conduit à une diffraction jusqu'à 6 Å de résolution et est en cours d'optimisation. Ainsi, l'étude de l'interface protéo-nucléotidique dans le cadre de mon projet était en partie axée sur l'étude du domaine isolé DBD. Toutefois, *in vivo*, l'ensemble du récepteur avec ses domaines modulaires entre en jeu dans la fixation aux promoteurs géniques pour réguler la transcription. En effet, il est possible qu'une communication allostérique s'initie par la fixation de ligands et/ou de corégulateurs sur le LBD ou par des modifications post-traductionnelles induisant des changements structuraux transmis jusqu'aux DBD pour dicter la topologie que doit adopter le récepteur sur l'ADN. À l'avenir, la détermination de la structure du récepteur entier dans sa conformation antagoniste sur un ERRE en présence du ligand XCT-790 par cristallographie aux rayons-X apportera plus de réponses. Ce

projet ambitieux est actuellement poursuivi sur la base des connaissances biochimiques acquises et pourra être complété par une étude en cryo-microscopie électronique.

Communications

Publication

Extended Half-Site Recognition by the Orphan Estrogen-Related Receptor Involves an Intact Dimer

**Karima Tazibt^{1*}, Maria Takacs^{1*}, Kareem Mohideen-Abdoul¹, Pierre Roblin^{2,5}, Emmanuel Compe³, Noelle Potier⁴, Sarah Cianferani⁶, Maxime Bourguet⁶, Javier Pérez², Dino Moras¹,
Bruno P. Klaholz¹ and Isabelle M.L. Billas^{1,7}**

¹Integrated Structural Biology Department, Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 7104, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U964, Université de Strasbourg (UdS), Illkirch, 67404, France, ²SOLEIL Synchrotron, Swing Beamline, 91192 Saint-Aubin, France, ³European Molecular Biology Laboratory, Hamburg Outstation, Hamburg, 22603, Germany, ³ Department of Functional Genomics and Cancer, Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 7104, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U964, Université de Strasbourg (UdS), Illkirch, 67404, France, ⁴Institut de Chimie LC3- CNRS UMR7177, 1 rue Blaise Pascal, 67008 Strasbourg, ⁵INRA-URBIA, Nantes, France, ⁶Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR7178-CNRS, Université de Strasbourg (UdS), Strasbourg, 67087, France.

*Authors contributed equally to the work

⁷Corresponding author: billas@igbmc.fr

In preparation to be submitted to Nucleic Acid Research

Poster

“Biophysical and Structural Studies of the ERR-DNA complexes”

Karima Tazibt, Stéphanie Gaudon, Maria Takacs, Bruno Klaholz, Dino Moras and Isabelle ML Billas
Recent Advances in Macromolecular Crystallization (RAMC), 8-11 septembre 2013, *Le Bischenberg*,
Bischoffsheim – France

“Biophysical and Structural Studies of the ERR-DNA complexes”

Karima Tazibt, Bruno Klaholz, Dino Moras and Isabelle ML Billas
Inauguration du Centre de Biologie Intégrative (CBI) - IGBMC, 23 janvier 2015, Illkirch – France

Présentation orale

“DNA Recognition by Estrogen-Related Receptor”

Karima Tazibt

Nuclear Receptor Day, 9 Mai 2016, Paris – France

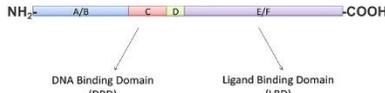
Biophysical and Structural Studies of the ERR-DNA complexes

Karima Tazibt, Stéphanie Gaudon, Maria Takacs, Bruno Klaholz, Dino Moras and Isabelle ML Billas

IGBMC (Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology), Department of Integrated Structural Biology, Illkirch, 67404, France

INTRODUCTION

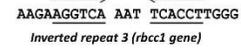
Nuclear receptors (NRs) act as transcriptional regulators through the binding to cis-acting response elements (REs) present in the gene promoters or enhancers.



General domain structure of nuclear receptors

The estrogen-related receptors are orphan nuclear receptors and exist in different isoforms : ERR α , ERR β and ERR γ .

The ERRs, just like ER, can bind with high affinity inverted repeat 3 (IR3) response elements (REs). However most of the ERR natural REs sites found in the promoter of their target genes are extended half-sites (ERRE), composed of a single 6 bp half-site extended at its 5'-end by 3 bp.

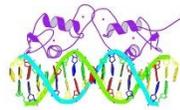


QUESTION : Is ERR a dimer or a monomer on DNA ?

ER-DBD & ERR-DBD ON RESPONSE ELEMENTS

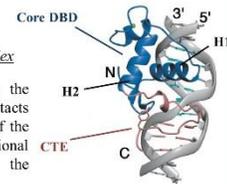
Crystal structure of the Estrogen Receptor DBD-DNA complex

ER DBD binds as a symmetrical dimer to its palindromic binding site IR3. For each monomer, two main helices are arranged in a perpendicular way via hydrophobic interactions. The N-terminal helix triggers interaction with DNA thanks to specific contacts with the major groove.



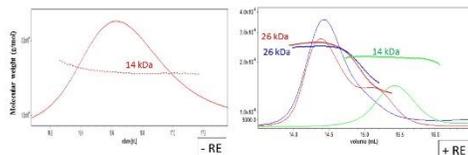
NMR solution structure of Estrogen-Related-Receptor DBD-DNA complex

The CTE extension of the DBD crosses the phosphate backbone to make base-specific contacts within the minor groove in the 5' extension of the half site response element. These additional interactions allow the stabilization of the monomeric DBD onto DNA.



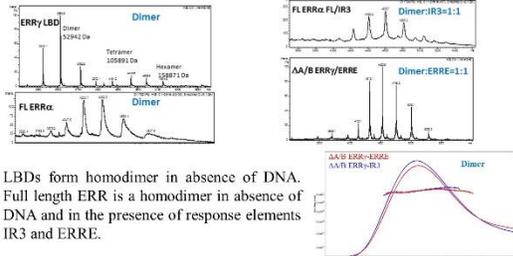
BIOPHYSICAL CHARACTERIZATION OF ERR-DBD ON DNA : MULTI-ANGLE LIGHT SCATTERING (MALS) & ESI-TOF MASS SPECTROSCOPY

ERR α -DBD is a monomer on DNA



Free ERR α -DBD is a 14kDa monomer (left panel). In complex with ERREs [ERRE (13bp, green), ERRE (21bp, blue)] and IR3 (21bp, red) the DBD α remains monomeric (right panel).

LBD and ERR α 's full length are always dimeric

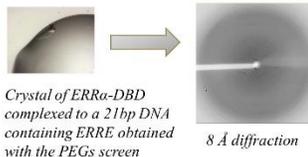


LBDs form homodimer in absence of DNA. Full length ERR is a homodimer in absence of DNA and in the presence of response elements IR3 and ERRE.

MALS and ESI-TOF data suggest that the dimerization surface between the DBDs is very weak and that the receptor dimerization is carried by the dimerization interface of LBDs.

CRYSTALLOGRAPHIC STUDIES AND SOLUTION STRUCTURE STUDIES OF ERR-DBD AND FULL LENGTH ERR IN COMPLEX WITH DNA

ERR α -DBD

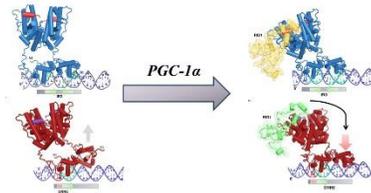


Crystal of ERR α -DBD complexed to a 21bp DNA containing ERRE obtained with the PEGs screen



SAXS studies show that full ERR bound to IR3 adopts one major asymmetric conformation. ERR bound to ERRE adopts a similar topology, but the SAXS solution structure suggests that the 3'-DBD is dynamic and not strongly bound to DNA. Remarkably, upon interaction with the coactivator PGC-1 α , ERR gets stabilized on its ERRE and adopts a conformation identical to that of PGC-1 α /ERR-IR3.

ERR α 's full length



PGC-1 α stabilizes ERR on DNA response elements

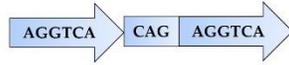
SAXS data underline the importance of cofactors for the stabilization of ERR-DNA complexes which is an important issue in the crystallization process. The choice of DNA for crystallization is an other essential parameter. The length of the oligos, the structure adopted by the 3' and 5' ends and the base-to-base interactions are important features that play a key role in crystal formation (packing, contacts between asymmetric units...).

Biophysical and Structural Studies of ERR-DNA complexes

Karima Tazibt, Bruno Klaholz, Dino Moras and Isabelle ML Billas

Centre de Biologie Intégrative, IGBMC (Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology), Illkirch, 67404, France

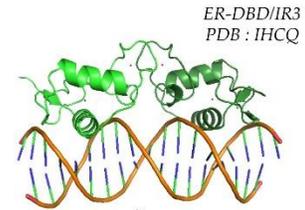
Nuclear receptors are transcription factors that control physiological events by regulating gene expression. They bind to specific DNA sequences called response elements on gene promoters organized as 6 base-pair half-sites oriented in a "head-to-head" or a "head-to-tail" fashion.



Direct repeats (DRn) "Head-to-tail"

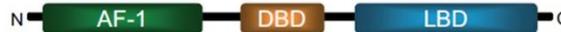


Inverted Repeats (IRn) "Head-to-head"

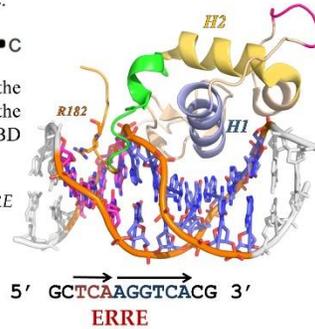
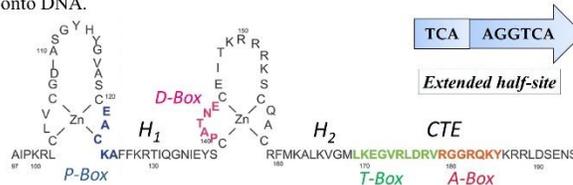


ER DBD binds as a symmetrical dimer to its palindromic binding site IR3. For each monomer, two main helices are arranged in a perpendicular way via hydrophobic interactions. The N-terminal helix triggers interaction with DNA thanks to specific contacts with the major groove.

Nuclear receptors have a modular organization in different domains : the activation domain-1 very dynamic, the DNA-Binding Domain that bind gene promoter and a Ligand-Binding Domain that binds ligand molecules and protein regulators.



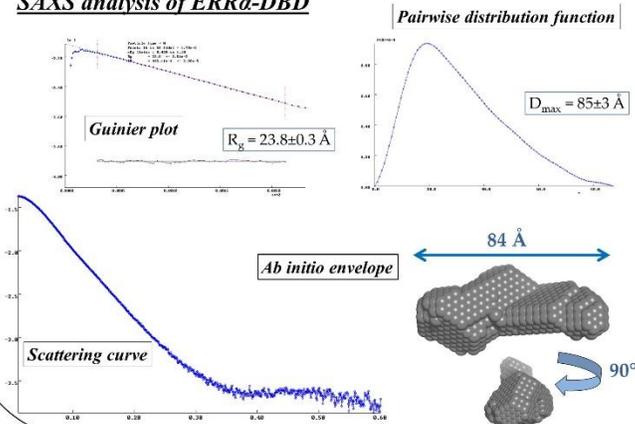
ERR most naturally binds its extended half-site ERRE. The CTE extension of the DBD crosses the phosphate backbone to make base-specific contacts within the minor groove in the 5' extension of the half-site response element. These additional interactions allow the stabilization of the monomeric DBD onto DNA.



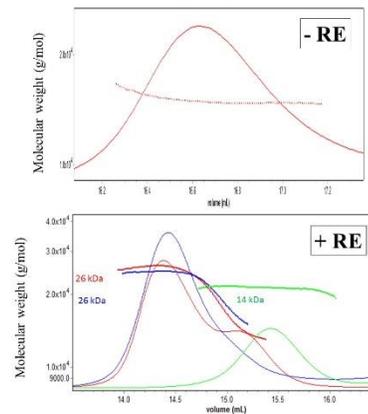
Crystallization of ERRα-DBD



SAXS analysis of ERRα-DBD



MALLS analysis of ERRα-DBD



Free ERRα-DBD is a 14kDa monomer (upper panel). In complex with ERREs [ERRE (13bp, green), ERRE (21bp, blue) and IR3 (21bp, red)] the DBDα remains monomeric (lower panel).

The SAXS pairwise distribution function suggests a globular domain with an elongated structure.

Annexes

Protéines	
hLBD dimérique avec étiquette hexa-histidine	54,5 kDa
hLBD dimérique sans étiquette hexa-histidine	51,3 kDa
mDBD monomérique avec étiquette hexa-histidine	14,0 kDa
mDBD monomérique sans étiquette hexa-histidine	11,7 kDa
mERR α entier dimérique	92,7 kDa
Peptides	
PI251	2,661 kDa
PF25	1,845 kDa
PF26	1,788 kDa
Ligand	
XCT-790	0,596 kDa
ADN double-brin	
13tr α	7,910 kDa
21tr α	12,851 kDa
21tr α -TT	12,858 kDa
21rb1cc1	12,856 kDa
26tr α -TT	15,939 kDa
27tff1	16,567 kDa
29tr α -AA	17,801 kDa
29-ERRE/ERE	17,794 kDa
33tr α	20,275 kDa
33rb1cc1	20,273 kDa

Tableau 16 : Masses moléculaires des molécules utilisées



Figure 74 : Aligement des séquences protéiques des ERR

a. Aligement des séquences de la protéine ERR α (ERR1) humaine et murine. **b.** Aligement des isotopes humaines, α (ERR1), β (ERR2) et γ (ERR3), d'ERR. Les identifiants UniProt sont précisés pour chacune des protéines. Les séquences ont été alignées avec Clustal Omega. * = résidu conservé ; : = propriété physico-chimique fortement conservée ; • = propriété physico-chimique faiblement conservée

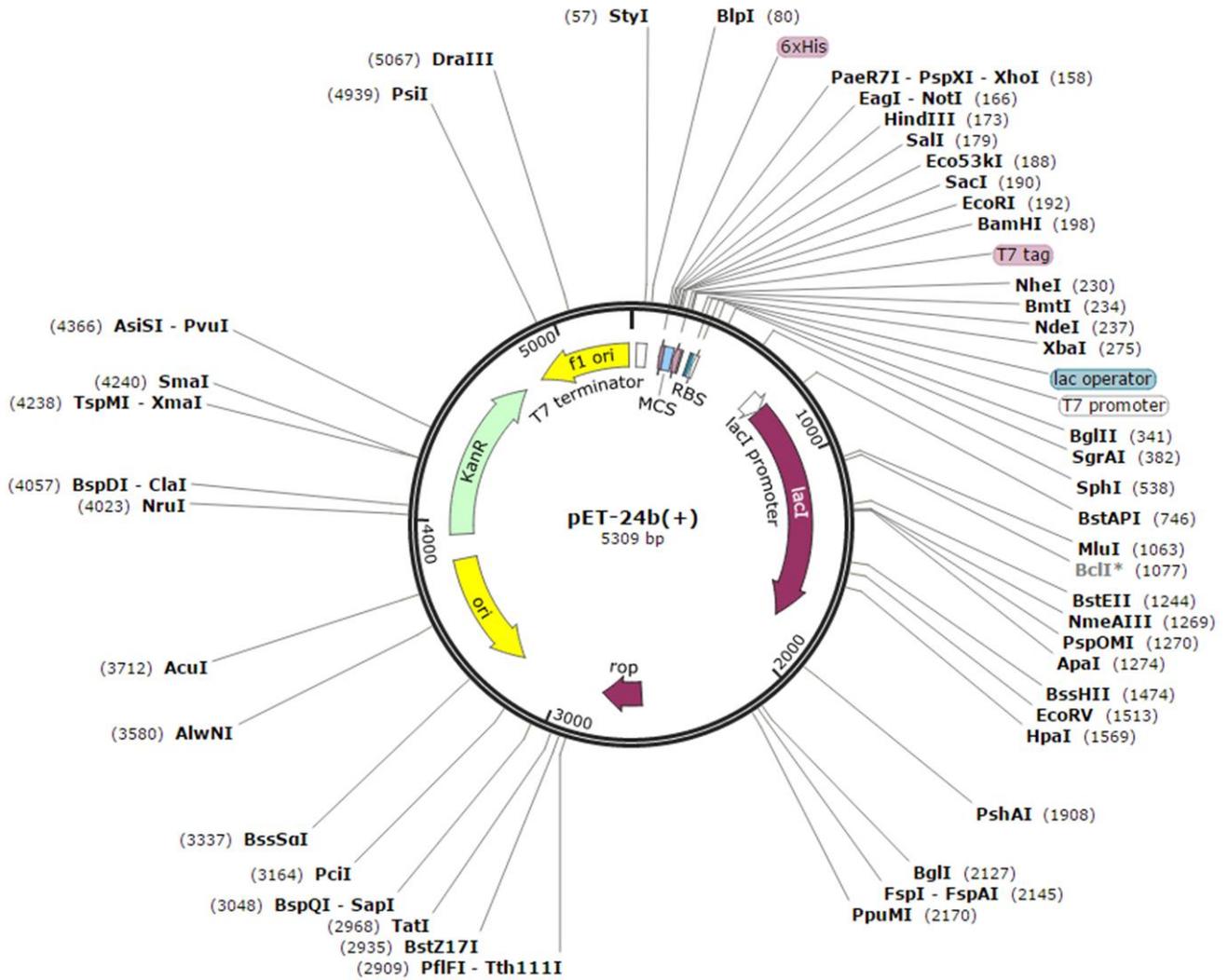


Figure 75 : Plasmide pET24 utilisé pour le clonage du domaine LBD

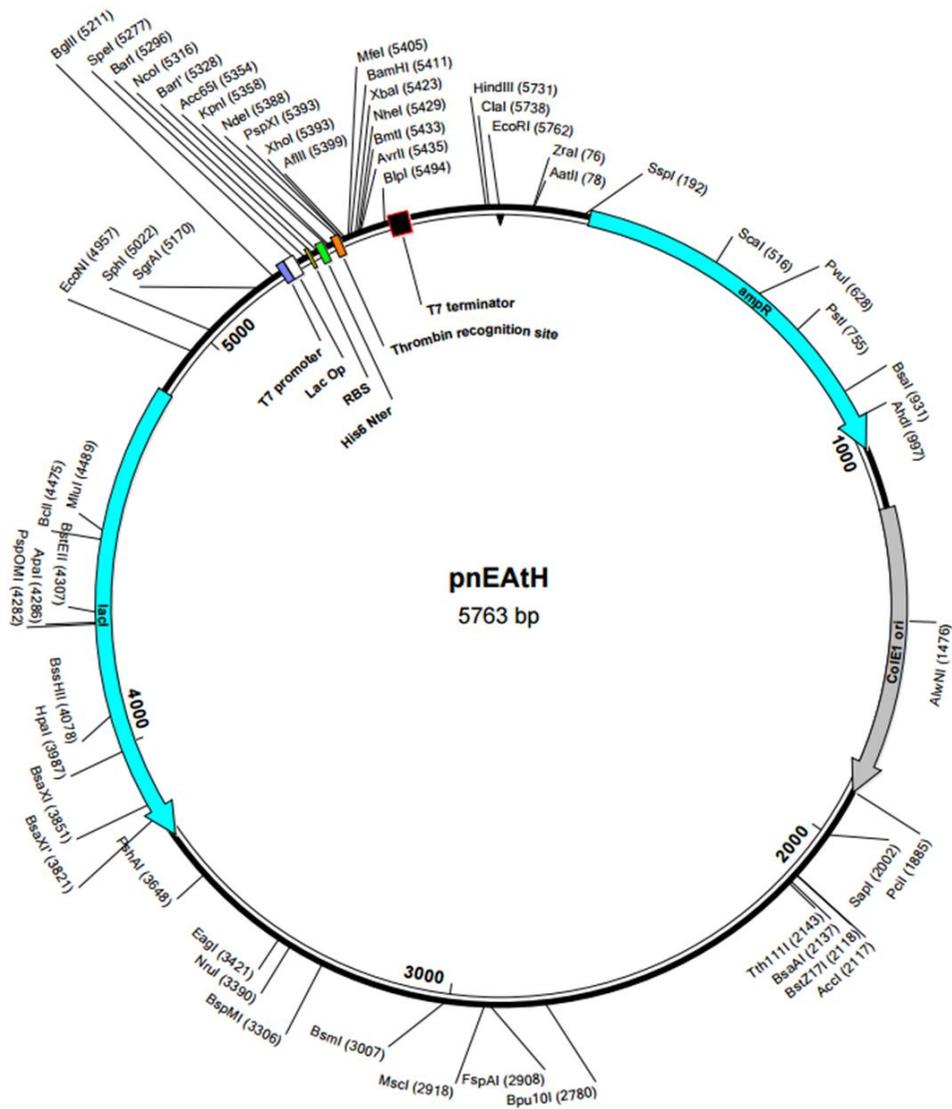


Figure 76 : Plasmide pNEAtH utilisé pour le clonage du DBD

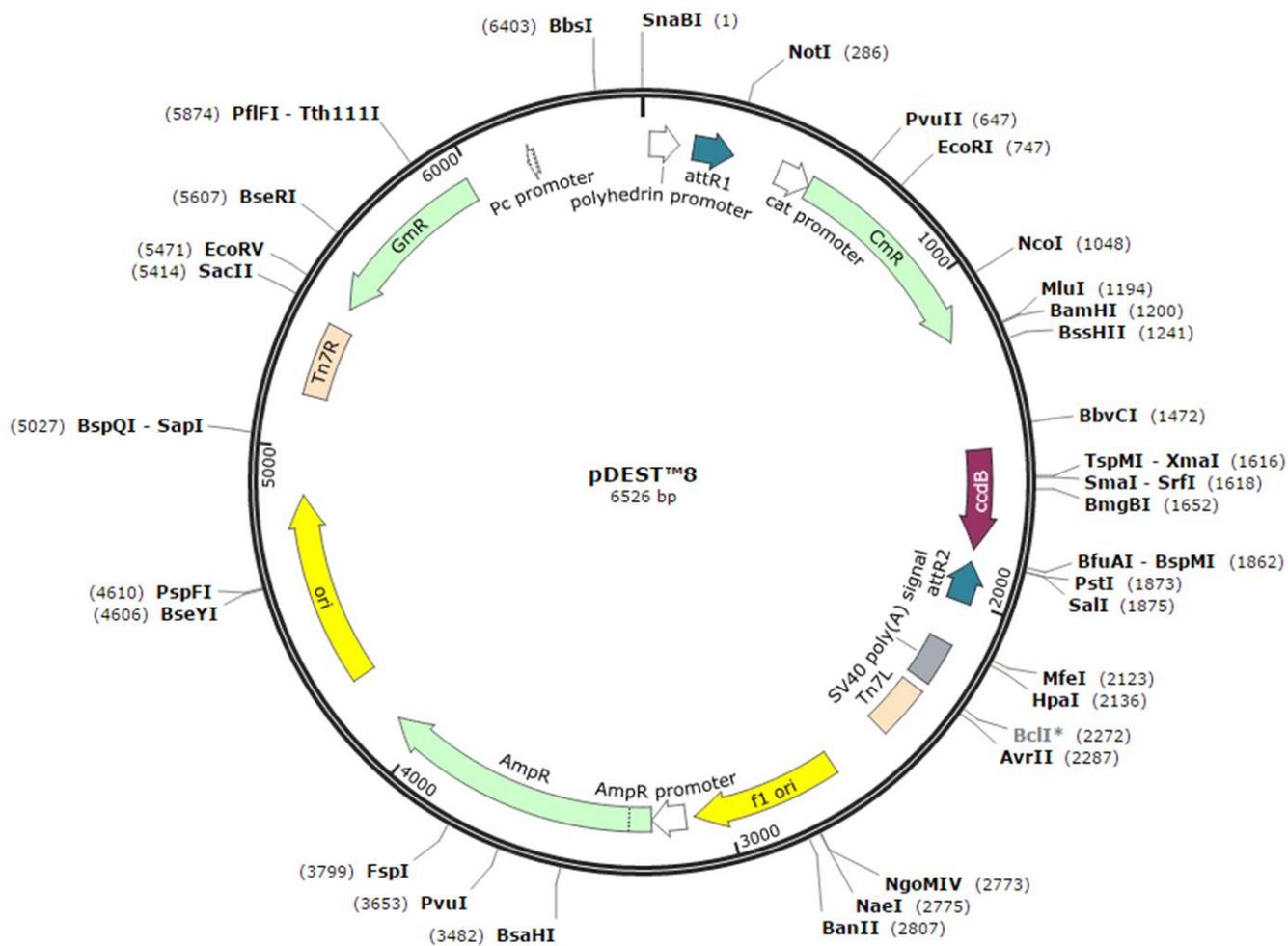


Figure 77 : Plasmide pDEST8 utilisé pour le clonage d'ERR α entier

Bibliographie

- Araki *et al.* (2006). Identification of ERR α as a specific partner of PGC-1 α for the activation of PDK4 gene expression in muscle. *FEBS*, 273, pp. 1669-1680.
- Ariazi *et al.* (2002). Estrogen-Related Receptor α and Estrogen-Related Receptor γ associate with unfavorable and favorable biomarkers, respectively, in human breast cancer. *Cancer research*, 62, pp. 6510-6518.
- Bianco *et al.* (2009). Modulating Estrogen Receptor-related receptor- α activity inhibits cell proliferation. *JBC*, 284, pp. 23286-23292.
- Blair *et al.* (2000). The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicological Sciences*, 54, pp. 138-153.
- Bookout *et al.* (2006). Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell*, 126, pp. 789-799.
- Bridgham *et al.* (2010). Protein evolution by molecular tinkering : diversification of the nuclear receptor superfamily from a ligand-dependant ancestor. *PLOS biology*, 8, pp. 1-13.
- Busch *et al.* (2004). Identification of a selective inverse agonist for the orphan nuclear receptor Estrogen-Related Receptor α . *Journal of Medicinal Chemistry*, 47, pp. 5593-5596.
- Cai *et al.* (2012). Regulation of glycolysis and the Warburg effect by estrogen-related receptors. *Oncogene*, pp. 1-8.
- Cartoni *et al.* (2005). Mitofusins 1/2 and ERR α expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *The Journal of Physiology*, 567, pp. 349-358.
- Cavallini *et al.* (2005). Oestrogen receptor-related receptor alpha (ERR α) and oestrogen receptors (ER α and ER β) exhibit different gene expression in human colorectal tumour progression. *European Journal of Cancer*, 41, pp. 1487-1494.
- Chen *et al.* (2001). Molecular basis for the constitutive activity of estrogen-related receptor α . *JBC*, 276, pp. 28465-28470.
- Chisamore *et al.* (2008). Identification of small molecule estrogen-related receptor α -specific antagonists and homology modeling to predict the molecular determinants as the basis for selectivity over ERR β and ERR γ . *Drug Development Research*, 69, pp. 203-218.
- Chisamore *et al.* (2009). Characterization of a novel small molecule subtype specific Estrogen-Related Receptor α Antagonist in MCF-7 Breast Cancer Cells. *PLOS one*, 4, pp. 1-13.
- Coward *et al.* (2001). 4-Hydroxytamoxifen binds to and deactivates the estrogen-related receptor γ . *PNAS*, 98, pp. 8880-8884.
- Deblois *et al.* (2009). Genome-wide identification of direct target genes implicates Estrogen-Related Receptor α as a determinant of breast cancer heterogeneity. *Endocrinology*, 69, pp. 6149-6157.
- Duellman *et al.* (2010). A novel steroidal inhibitor of estrogen-related receptor α (ERR α). *Biochemical pharmacology*, 80, pp. 819-826.
- Egea *et al.* (2000). Crystal structure of the human RXR α ligand-binding domain bound to its ligand : 9-cis retinoic acid. *The EMBO Journal*, 19, pp. 2592-2601.

- Escriva *et al.* (2000). Ligand binding and nuclear receptor evolution. *BioEssays*, 22, pp. 717-727.
- Evans. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240, pp. 889-895.
- Evans *et al.* (2014). Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell*, 157, pp. 255-266.
- Freedman *et al.* (1988). The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Nature*, 334, pp. 543-546.
- Fujimoto *et al.* (2009). Clinical implication of estrogen-related receptor (ERR) expression in uterine endometrial cancers. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 116, pp. 71-75.
- Fujimura *et al.* (2007). Increased expression of estrogen-related receptor α (ERR α) is a negative prognostic predictor in human prostate cancer. *Int. J. Cancer*, 120, pp. 2325-2330.
- Gearhart *et al.* (2003). Monomeric complex of human orphan Estrogen Related Receptor-2 with DNA: a pseudo-dimer interface mediates extended Half-site recognition. *JMB*, 327, pp. 819-832.
- Giguère *et al.* (1988). Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature*, 331, pp. 91-94.
- Giguère *et al.* (2008). Transcriptional control of energy homeostasis by the Estrogen-Related Receptors. *Endocrine Reviews*, 29, pp. 677-696.
- Greschik *et al.* (2004). Structural Basis for the deactivation of the Estrogen-related Receptor γ by Diethylstilbestrol or 4-Hydroxytamoxifen and Determinants of Selectivity. *JBC*, 279, pp. 33639-33646.
- Greschik *et al.* (2008). Communication between the ERR α homodimer interface and the PGC-1 α binding surface via the helix 8-9 loop *Journal of Biological Chemistry*, 283, pp. 20220-20230.
- Heard *et al.* (2000). Human ERR γ , a third member of the estrogen-related receptor (ERR) subfamily of orphan nuclear receptors : tissue-specific isoforms are expressed during development and in the adult. *Molecular Endocrinology*, 14, pp. 382-392.
- Heldring *et al.* (2007). Estrogen receptors : how do they signal and what are their targets. *Physiol. Rev.*, 87, pp. 905-931.
- Helsen *et al.* (2012). Evidence for DNA-binding domain-ligand-binding domain communications in the androgen receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 32, pp. 3033-3043.
- Herzog *et al.* (2006). Estrogen-Related Receptor α is a repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription. *JBC*, 281, pp. 99-106.
- Hörlein *et al.* (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, 377, pp. 397-403.
- Huang *et al.* (2010). Structural overview of the nuclear receptor superfamily : insight into physiology and therapeutics. *Annu. Rev. Physiol.*, 72, pp. 247-272.
- Hudson *et al.* (2014). Crystal structure of the mineralocorticoid receptor DNA binding domain in complex with DNA. *Plos one*, 9, pp. 1-9.

- Huss *et al.* (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha. *JBC*, 277, pp. 40265-40274.
- Jiang *et al.* (2003). Expression of Peroxisome-Proliferator Activated Receptor-gamma (PPAR γ) and the PPAR γ co-activator, PGC-1 α , in human breast cancer correlates with clinical outcomes. *Int. J. Cancer*, 106, pp. 752-757.
- Kallen *et al.* (2004). Evidence for ligand-independent transcriptional activation of the human estrogen-related receptor. *JBC*, 279, pp. 49330-49337.
- Kallen *et al.* (2007). Crystal structure of human Estrogen-related Receptor α in complex with a synthetic inverse agonist reveals its novel molecular mechanism 282, pp. 23231-23239.
- Khorasanizadeh *et al.* (2001). Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 26, pp. 384-390.
- Kuiper *et al.* (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *PNAS*, 93, pp. 5925-5930.
- Kuiper. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, 138, pp. 863-870.
- Laganière *et al.* (2004). A polymorphic autoregulatory hormone response element in the human Estrogen-Related Receptor α (ERR α) promoter dictates Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Coactivator-1 α control of ERR α expression. *JBC*, 279, pp. 18504-18510.
- Lanvin *et al.* (2007). Potentiation of ICI182,780 (Fulvestrant)-induced Estrogen-Receptor α degradation by the Estrogen Receptor-related Receptor- α inverse agonist XCT-790. *JBC*, 282, pp. 28328-28334.
- Laudet & Gronemeyer (2002). The Nuclear Receptor FactsBook. *Academic Press*
- Lehman *et al.* (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 106, pp. 847-856.
- Le Maire *et al.* (2010). A unique secondary-structure switch controls constitutive gene repression by retinoic acid receptor. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17, pp. 801-808.
- Li *et al.* (2000). Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *The EMBO Journal*, 19, pp. 4342-4350.
- Lou *et al.* (2014). Structure of the retinoid X receptor α -liver X receptor β (RXR α -LXR β) heterodimer on DNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21, pp. 277-281.
- Lowell *et al.* (2005). Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*, 307, pp. 384-387.
- Lu *et al.* (2001). Transcriptional regulation of the estrogen-inducible pS2 breast cancer marker gene by the ERR family of orphan nuclear receptors. *Cancer research*, 61, pp. 6755-6761.
- Matsushima *et al.* (2007). Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR γ . *JBC*, 142, pp. 517-524.

- May. (2014). Novel drugs that target the estrogen-related receptor alpha: their therapeutic potential in breast cancer. *6*, pp. 225-252.
- Meinke *et al.* (1999). DNA-binding mechanism of the monomeric orphan nuclear receptor NGFI-B. *Nature*, *6*, pp. 471-477.
- Michael *et al.* (2001). Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *PNAS*, *98*, pp. 3820-3825.
- Monsalve *et al.* (2000). Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Molecular Cell*, *6*, pp. 307-316.
- Moos *et al.* (2009). Review of the effects of 17 α -Estradiol in humans: a less feminizing estrogen with neuroprotective potential. *Drug Development Research*, *70*, pp. 1-21.
- Mootha *et al.* (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature genetics*, *34*, pp. 267-273.
- Nagy *et al.* (2011). Introduction into molecular medicine. *University of Debrecen*
- Nardulli *et al.* (1991). Purified estrogen receptor DNA binding domain expressed in Escherichia coli activates transcription of an estrogen-responsive promoter in cultured cells. *JBC*, *266*, pp. 24070-24076.
- Okada *et al.* (2008). Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human Estrogen-Related Receptor- γ . *Environmental Health Perspectives*, *116*, pp. 32-38.
- O'Malley. (1971). Mechanisms of action of steroid hormones. *The new England journal of medicine*, *284*, pp. 370-377.
- O'Malley *et al.* (2013). Elwood V. Jensen (1920–2012) : Father of the nuclear receptors. *PNAS*, *110*, pp. 3707–3708
- Orlov *et al.* (2012). Structure of the full human RXR/VDR nuclear receptor heterodimer complex with its DR3 target DNA. *The EMBO Journal*, *31*, pp. 291-300.
- Patch *et al.* (2011). Identification of diaryl ether-based ligands for Estrogen-Related Receptor α as potential antidiabetic agents. *JMC*, *54*, pp. 788-808.
- Pérez-Schindler *et al.* (2012). The corepressor NCoR1 antagonizes PGC-1 α and Estrogen-Related Receptor α in the regulation of skeletal muscle function and oxidative metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, *32*, pp. 4913-4924.
- Puigserver *et al.* (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, *92*, pp. 829-839.
- Puigserver *et al.* (1999). Activation of PPAR γ Coactivator-1 through transcription factor docking. *Science*, *286*, pp. 1368-1371.
- Puigserver *et al.* (2001). Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPAR γ Coactivator-1 *Molecular Cell*, *8*, pp. 971-982.

- Puigserver *et al.* (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews*, 24, pp. 78-90.
- Rastinejad *et al.* (1995). Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature*, 375, pp. 203-211.
- Rastinejad *et al.* (2000). Structure of the RXR-RAR DNA binding complex on the retinoic acid response element DR1. *The EMBO Journal*, 19, pp. 1045-1054.
- Renaud *et al.* (2000). Structural studies on nuclear receptors. *Cell. Mol. Life Sci.*, 57, pp. 1748-1769.
- Roemer *et al.* (2006). Structure of the progesterone receptor-deoxyribonucleic acid complex: novel interactions required for binding to half-site response elements. *Molecular endocrinology*, 12, pp. 3042-3052.
- Schreiber *et al.* (2003). The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor Estrogen-Related Receptor α (ERR α). *JBC*, 278, pp. 9013-9018.
- Schwabe *et al.* (1993). The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell*, 75, pp. 567-578.
- Sierra *et al.* (2007). Substituted 2-[(4-aminomethyl)phenoxy]-2-methylpropionic acid PPAR α agonists. 1. Discovery of a novel series of potent HDLc raising agents. *JMC*, 50, pp. 685-695.
- Skafar *et al.* (2008). The multifunctional estrogen receptor- α F domain. *Endocr.*, 33, pp. 1-8.
- Sladek *et al.* (1997). The orphan nuclear receptor Estrogen-Related Receptor α is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene. *Molecular and Cellular Biology*, 17, pp. 5400-5409.
- Stein *et al.* (2008). Estrogen-Related Receptor α is critical for the growth of Estrogen-Receptor-Negative breast cancer. *Cancer research*, 68, pp. 8805-8812.
- Sun *et al.* (2005). Expression of estrogen receptor-related receptors, a subfamily of orphan nuclear receptors, as new tumor biomarkers in ovarian cancer cells. *J. Mol. Med.*, 83, pp. 457-467.
- Suzuki *et al.* (2004). Estrogen-Related Receptor α in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer research*, 64, pp. 4670-4676.
- Takacs *et al.* (2013). The asymmetric binding of PGC-1 α to the ERR α and ERR γ nuclear receptor homodimers involves a similar recognition mechanism. *Plos one*, 8, pp. 1-11.
- Thornton *et al.* (2000). A new method to localize and test the significance of incongruence : detecting domain shuffling in the nuclear receptor superfamily. *Syst. Bio.*, 49, pp. 183-201.
- Tiefenbach *et al.* (2006). SUMOylation of the corepressor N-CoR modulates its capacity to repress transcription. *Molecular Biology of the Cell*, 17, pp. 1643-1651.
- Tohmé *et al.* (2014). Estrogen-related receptor γ is an in vivo receptor of bisphenol A. *FASEB Journal*, pp. 1-6.
- Tremblay *et al.* (2008). Phosphorylation-dependant sumoylation regulates Estrogen-Related Receptor α and γ transcriptional activity through a synergy control motif. *Molecular Endocrinology*, 22, pp. 570-584.

- Vanacker *et al.* (1998). Activation of the thyroid hormone receptor α gene promoter by the orphan nuclear receptor ERR α . *Oncogene*, *17*, p. 2429-2435.
- Vanacker *et al.* (1999). Transcriptional activities of the Orphan Nuclear Receptor ERR α (Estrogen Receptor-Related Receptor- α). *Molecular Endocrinology*, *13*, pp. 764-773.
- Vu *et al.* (2007). Phosphorylation-Dependent Sumoylation of Estrogen-Related Receptor α . *Biochemistry*, *46*, pp. 9795-9804.
- Wang *et al.* (2010). Oestrogen-related receptor alpha inverse agonist XCT-790 arrests A549 lung cancer cell population growth by inducing mitochondrial reactive oxygen species production. *Cell proliferation*, *43*, pp. 103-113.
- Wärnmark *et al.* (2003). Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors : molecular strategies for transcriptional activation. *Molecular Endocrinology*, *17*, pp. 1901-1909.
- Wei *et al.* (2016) Ligand activation of ERR α by cholesterol mediates statin and bisphosphonate effects. *Cell*, *23*, pp. 479–491.
- Willy *et al.* (2004). Regulation of PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α) signaling by an estrogen-related receptor (ERR α) ligand. *PNAS*, *101*, pp. 8912-8917.
- Wilson *et al.* (2010). An acetylation switch modulates the transcriptional activity of Estrogen-Related Receptor α . *Molecular endocrinology*, *24*, pp. 1349-1358.
- Wu *et al.* (2009). Estrogen-related receptor (ERR) inverse agonist XCT-790 induces cell death in chemotherapeutic resistant cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, *181*, pp. 236-242.
- Xu *et al.* (2002). Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPAR α . *Nature*, *415*, pp. 813-817.
- Xu *et al.* (2013). 1-Phenyl-4-benzoyl-1H-1,2,3-triazoles as orally bioavailable transcriptional function suppressors of Estrogen-Related Receptor α . *JMC*, pp. 1-40.
- Yamamoto *et al.* (1975). The interaction of estradiol-receptor protein with the genome : an argument for the existence of undetected specific sites. *Cell*, *4*, pp. 301-310.
- Yang *et al.* (1996). Estrogen-related receptor, hERR1, modulates estrogen receptor-mediated response of human lactoferrin gene promoter. *JBC*, *271*, pp. 5795-5804.
- Yang *et al.* (1998). Modulation of aromatase expression in the breast tissue by ERR α orphan receptor. *Cancer research*, *58*, pp. 5695-5700).
- Yang *et al.* (2006). Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell*, *126*, pp. 801-810.
- Yoon *et al.* (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*, *413*, pp. 131-138.
- Zhang *et al.* (2002). The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2. *Molecular Cell*, *9*, pp. 611-623.
- Zhao *et al.* (1998). Structural elements of an orphan nuclear receptor-DNA complex. *Molecular cell*, *1*, pp. 849-861.

Zhao *et al.* (2012). MiR-137 targets Estrogen-Related Receptor alpha and impairs the proliferative and migratory capacity of breast cancer cells. *Plos one*, 7, pp. 1-13.

Zhao *et al.* (2015). Families of nuclear receptors in vertebrate models : characteristic and comparative toxicological perspective. *Scientific reports*, 5, pp. 1-9.

Étude du récepteur nucléaire stéroïdien ERR en complexe avec ADN et ligands par une approche de biologie structurale intégrative

Résumé en français

Les récepteurs nucléaires régulent l'expression des gènes importants pour le développement et l'homéostasie des cellules eucaryotes. Si certains d'entre eux sont activés par la liaison d'un ligand naturel, d'autres, comme le récepteur ERR, sont orphelins et ne possèdent pas de ligand naturel connu à ce jour. ERR se lie via son domaine DBD sur un élément de réponse ERRE au niveau des régions promotrices des gènes et son activité peut être modulée par la liaison de ligands synthétiques antagonistes. Par une approche de biologie structurale intégrative combinant biochimie, biophysique et cristallographie aux rayons-X, mon travail de thèse consistait en l'étude de l'organisation structurale d'ERR pour comprendre les mécanismes d'antagonisme induits par le ligand agoniste inverse XCT-790, et la topologie qu'il adopte en interagissant avec l'ADN. Mon projet était axé sur l'étude des domaines modulaires DBD et LBD en complexe avec ADN et ligand transposée à l'étude fonctionnelle du récepteur entier. Par un important travail biochimique, j'ai mis en place les protocoles de purification de ces protéines et caractérisé biophysiquement la stabilité et la stœchiométrie des complexes avec ADN et ligand. J'ai mis en évidence que le ligand XCT-790 se lie sur chacun des monomères de LBD avec une forte affinité et que le DBD interagit avec un ERRE sous la forme d'un monomère. De multiples essais de cristallisation ont abouti à l'obtention de cristaux pour les complexes avec le LBD et le DBD ayant diffracté respectivement jusqu'à 3,5 Å et 7 Å de résolution sans néanmoins pouvoir en déterminer les structures. L'ensemble de ces résultats permettent de conclure que le DBD est monomérique sur les ERRE et IR3 et semble être dimérique sur l'élément de réponse combiné ERRE/ERE. La topologie qu'adopte ERR sur l'ADN est dictée par la liaison de ligand et serait la conséquence d'une communication allostérique entre les domaines modulaires. Ces connaissances acquises faciliteront la détermination structurale d'ERR entier par cristallographie aux rayons-X ou par cryo-microscopie électronique.

Mots-clés : ERR, orphelin, régulation transcriptionnelle, biochimie, cristallographie

Résumé en anglais

Nuclear receptors regulate expression of important genes involved in development and homeostasis in eukaryotic cells. While some of them are regulated by the binding of a natural ligand, others, like ERR, are orphan and don't have any natural ligand identified up to now. ERR binds to ERRE response elements through its DBD on promoter regions of genes and its activity can be modulated by the binding of synthetic antagonist ligands. By an integrative structural biology approach, my thesis work consisted in the study of the structural organization of ERR to understand the antagonism mechanisms induced by the inverse agonist XCT-790, and the adopted topology upon binding to DNA. My project focused on the study of the modular domains DBD and LBD complexes with DNA and ligand and extended to the functional study of the whole receptor. Thanks to significant biochemical work, I set up the purification protocols for these proteins and characterized by biophysics the stability and stoichiometry of the DNA and ligand complexes. This work revealed that XCT-790 binds on each LBD monomer with high affinity and that the DBD interacts to an ERRE as a monomer. Many crystallization trials led to crystals for the LBD and DBD complexes that diffracted respectively up to 3.5 Å and 7 Å of resolution but no structure could be determined. These results allow to conclude that the DBD is monomeric on the ERRE and IR3 and appears to be dimeric on the combined response element ERRE/ERE. The topology adopted by ERR on DNA is guided by the ligand binding and might be the consequence for an allosteric communication between the modular domains. These results provide the basis for a future structure determination of the full ERR by X-ray crystallography and cryo electron microscopy.

Keywords: ERR, orphan, transcriptional regulation, biochemistry, crystallography