

THESE

présentée à la Faculté des Sciences de la Vie
de l'Université Louis Pasteur - STRASBOURG I

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG

Mention Biologie Structurale

Par

Monique GANGLOFF

**Étude de l'agonisme et de l'antagonisme
dans le récepteur alpha des hormones œstrogènes
par mutagenèse dirigée et cristallographie**

Soutenue le 13 Décembre 2000 devant la Commission d'Examen :

Pr Marcel Hibert	Rapporteur interne
Pr Markus Grütter	Rapporteur externe
Dr Maria-Grazia Catelli	Rapporteur externe
Dr Hinrich Gronemeyer	Examineur
Dr Marc Ruff	Membre invité
Dr Dino Moras	Directeur de thèse

à Christophe

J'adresse de vifs remerciements à M. Markus Grütter, Professeur à l'Université de Zurich, à M. Marcel Hibert, Professeur à l'Université Louis Pasteur, M^{me} Maria-Grazia Catelli et M. Hinrich Gronemeyer, Directeurs de Recherche à l'INSERM, pour l'honneur qu'ils me font de juger ce travail

Je remercie M. Dino Moras de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir permis de découvrir la biologie structurale. Ce fut une expérience très enrichissante de bénéficier des nombreuses compétences que l'on trouve dans ce laboratoire, ainsi que dans l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire dirigé par M. Pierre Chambon.

Le travail que je présente dans ce manuscrit est avant tout un travail d'équipe. Je tiens donc à remercier tout particulièrement mon superviseur Marc Ruff, qui m'a initié aux techniques de purification de protéines et de cristallographie des rayons X. Un grand merci à Sylvia Eiler pour la mise au point de l'expression, de la purification et de la cristallisation de la protéine sauvage. Je remercie Sylvie Duclaud, pour la cristallisation de la protéine triple mutante et le criblage des ligands de synthèse. Merci à Jean-Marie Wurtz, pour son aide dans l'analyse de la liaison des ligands. Ce travail a été initié en collaboration avec le soutien du laboratoire pharmaceutique Schering AG (Berlin). Merci à André Mitschler, Alain Litt, Raymond Ripp et Serge Uge, pour leur aide technique.

Ce document ne serait pas ce qu'il est sans l'aide d'une équipe de relecture, je tiens donc à remercier Marc Ruff, Sylvia Eiler, Vincent Cura, Bruno Klaholz, Luc Moulinier, Catherine Stehlin, Natacha Rochel et Jean-Paul Renaud, pour leurs conseils.

Un grand merci à mes compagnons de rédaction : Anne-Laure Gall et Nicolas Calimet, ainsi qu'à mes camarades de paillasse et de bureau, que ce soit au premier étage ou au rez-de-chaussée. Merci à Anass Jawhari pour sa constante bonne humeur, Gilbert Bey pour ses marques de tendresse, Jérôme Fagart pour son aide précieuse dans les Scatchard, Valérie Lamour, Pascal Egea, William Bourguet, Natacha Rochel, Giuseppe Tocchini-Valentini, Muriel Uhring, Denis Zeyer, Florence Zink, Sebastiaan Werten, Christophe Romier, Bénédicte Delagoutte, Didier Busso, Sébastien Fribourg, Eduardo Howard, Fabrice Klein, Alfredo Torres-Larios, Odile Lecompte, Olivier Poch, Sankaranarayanan Rajan, Jean Cavarelli, Arnaud Poterszman, Anne-Catherine Dock-Bregeon, Christiane Rether et tous les autres qui ont contribué à l'ambiance si chaleureuse du laboratoire.

Merci au personnel des services communs de l'IGBMC: le service de séquençage (Serge Vicaire, Danièle Sommer), le service de synthèse d'oligonucléotides (Edouard Troesch, Franck Ruffenach, Ingrid Colas), le service de synthèse de peptides et microséquençage (Pascal Eberling et Adrien Staub).

Ce travail a été soutenu par le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement ainsi que l'Association de la Recherche contre le Cancer.

Table des matières

Première partie

I. INTRODUCTION	1
A. LES RECEPTEURS NUCLEAIRES	3
1. Fonctions biologiques et importance thérapeutique.....	3
2. Organisation modulaire	5
3. Évolution des récepteurs nucléaires.....	6
3.1 Définition de sous-familles.....	6
3.2 Diversification par deux vagues successives	6
3.3 Position phylogénétique, liaison de l'ADN et dimérisation.....	8
4. Structure des domaines fonctionnels	8
4.1 Le domaine N-terminal A/B	8
4.2 Le domaine C	9
4.2.1 Architecture générale	10
4.2.2 Les éléments de réponse hormonale.....	11
4.2.3 Liaison coopérative à l'ADN.....	11
4.2.4 Éléments structuraux impliqués dans la liaison à l'ADN et la dimérisation	13
4.3 Le domaine charnière D	15
4.4 Le domaine de liaison du ligand E.....	16
4.4.1 Repliement canonique	16
4.4.2 Interface de dimérisation	20
4.4.3 La poche de fixation du ligand.....	21
4.4.4 Les changements conformationnels induit par le ligand.....	21
(a) Le mécanisme de la souricière	21
(b) Les bases moléculaires de l'agonisme et de l'antagonisme	23
4.5 Le domaine C-terminal F.....	25
5. Localisation cellulaire des récepteurs nucléaires et mécanisme d'action.....	25
5.1 Localisation cytoplasmique	26
5.1.1 Le complexe récepteur-chaperons et mécanisme d'assemblage	26
5.1.2 Rôles potentiels du « chaperonage »	28
5.2 Localisation nucléaire et contrôle de l'expression génique	28
6. Régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires.....	28
6.1 Facteurs de transcription généraux	29
6.2 Coactivateurs	30
6.2.1 Identification des coactivateurs	30
6.2.2 Caractérisation structurale de la famille SRC/p160.....	31
6.2.3 Le rôle des coactivateurs dans la fonction AF-1	33
6.2.4 Coactivation ligand-indépendante	34
6.2.5 Mode d'action des coactivateurs	34
(a) Modification de la structure chromatinienne	34
(b) Recrutement de l'ARN-polymérase II	35
6.3 Cointégrateurs	36
6.4 Corépresseurs	37

6.4.1 Identification des corépresseurs.....	37
6.4.2 Recrutement des corépresseurs.....	38
6.4.3 Mode d'action des corépresseurs.....	39
6.5 Structure de la chromatine	40
6.5.1 Le remodelage ATP-dépendant de la chromatine.....	41
6.5.2 Les modifications covalentes des histones	41
B. RECEPTEURS DES HORMONES ŒSTROGENES	43
1. Importance thérapeutique.....	43
2. Le concept de « modulateurs sélectifs »	45
3. Les effecteurs.....	46
3.1 Caractéristiques des récepteurs des œstrogènes.....	46
3.1.1 Les isotypes ER α et ER β	46
3.1.2 Répartition tissulaire	47
3.1.3 Organisation modulaire	47
3.2 AF-1, AF-2 et recrutement des corégulateurs	48
3.3 Les éléments de réponse ADN	49
4. Les bases moléculaires des différentes activités SERM.....	50
4.1 Les SERM induisent différentes conformations de récepteur.....	50
4.2 Les SERM influencent le recrutement des corégulateurs	51
4.3 L'effet des SERM dépend de l'isotype ER	52
4.4 L'effet des SERM dépend de la nature du promoteur.....	53
4.5 Influence des autres voies de signalisation	53
5. Mode d'action des antagonistes purs	54
6. Objectif du projet de recherche	55

Deuxième partie: Sous-clonage et mutagenèse dirigée

II. LES CONSTRUCTIONS POUR L'ETUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE.....	56
A. ASPECTS METHODOLOGIQUES	59
1. Définition des domaines	59
2. Sous-clonages et mutagenèse ponctuelle.....	59
2.1 Sous-clonage dans pET-15b	60
2.2 Sous-clonage dans pET-32b	61
2.3 Modifications des vecteurs pET	62
2.3.1 Modification de pET-32b	62
2.3.2 Modification de pET-15b	62
2.4 Mutagenèse dirigée.....	63
2.4.1 Les mutations C→S.....	63
2.4.2 Les mutations EEK→A.....	65
2.4.3 Le mutant constitutif	65
B. RESULTATS	66

1. Mise au point des constructions pour l'étude structurale	66
2. Les constructions en vue de l'étude fonctionnelle	68

Troisième partie: Etude structurale

III. EXPRESSION ET PURIFICATION.....	70
A. ASPECTS METHODOLOGIQUES	72
1. Expression	72
1.1 Préculture	73
1.2 Culture.....	74
1.3 Préparation de l'extrait brut	74
2. Purification.....	75
2.1 Chromatographie d'affinité par chélation de cations métalliques	75
2.2 Chromatographie échangeuse d'ions	75
2.3 Échange de tampon.....	76
2.4 Filtration sur gel	76
3. Protéolyse ménagée.....	76
4. Élimination de la fusion.....	77
B. PURIFICATION DES CONSTRUCTIONS PORTANT UN PEPTIDE POLYHISTIDINE.....	78
1. Expression et purification de la protéine sauvage en présence d'œstradiol	79
1.1 Expression et lyse cellulaire	79
1.2 Étapes chromatographiques	79
1.2.1 Chromatographie d'affinité aux cations métalliques	79
1.2.2 Chromatographie sur échangeur d'anions	80
1.2.3 Etape de gel-filtration.....	81
1.3 Pureté et homogénéité des préparations.....	82
1.4 Bilan : Optimisation de l'expression et de la purification.....	84
1.4.1 Optimisation de la production de protéine soluble	84
1.4.2 Optimisation de la purification.....	86
2. Expression et purification du triple mutant C→S en présence d'œstradiol	87
2.1 Expression et lyse cellulaire	87
2.2 Étapes chromatographiques	87
2.2.1 Chromatographie d'affinité en absence de sulfobétaïne	87
2.2.2 Chromatographie sur échangeur d'anions	87
2.2.3 Etape de gel-filtration.....	89
2.3 Pureté et homogénéité des préparations.....	89
2.4 Bilan	89
3. Expression et purification du double mutant C→S en présence d'œstradiol	91
3.1 Expression et lyse cellulaire	91
3.2 Étapes chromatographiques	91
3.2.1 Chromatographie d'affinité aux cations métalliques	91

3.2.2 Clivage du peptide polyhistidine	92
3.2.3 Etape de gel-filtration	92
3.3 Pureté et homogénéité des préparations	92
3.4 Bilan	93
C. PURIFICATION DES FUSIONS A LA THIOREDOXINE	94
1. Purification du triple mutant C→S en présence d'un antagoniste de synthèse	96
1.1 Criblage de ligands	96
1.1.1 En présence de la fusion à la thiorédoxine	97
1.1.2 Clivage de la thiorédoxine	98
1.2 Purification du triple mutant C→S lié au ZK	99
1.2.1 Production et purification de l'apo-protéine	99
1.2.2 Formation du complexe et élimination de la thiorédoxine	99
1.2.3 Rendement de purification	100
1.3 Bilan	101
2. Purification du mutant constitutif	102
2.1 Purification en trois étapes	102
2.2 Chromatographie d'affinité au zinc	102
2.3 Clivage de la thiorédoxine	103
2.4 Élimination de la fusion par affinité au Zn ²⁺	103
2.5 Gel-filtration	103
3. Bilan de purification	104
IV. CRISTALLISATION	105
A. ASPECTS METHODOLOGIQUES	106
1. Les trois étapes de la cristallisation	107
1.1 Sursaturation	107
1.2 Nucléation	108
1.3 Croissance cristalline	108
2. L'ensemencement	109
3. Les méthodes de cristallisation	109
4. Recherche des conditions de cristallisation	110
5. Cryocristallographie	111
6. Caractérisation des cristaux	112
B. RESULTATS	113
1. Cristallisation du domaine E sauvage en complexe avec l'œstradiol	113
1.1 Caractérisation biochimique des cristaux	114
1.2 Cryocristallographie	115
1.3 Analyse cristallographique préliminaire	116
2. Cristallisation du domaine E triple mutant C→S lié à l'œstradiol	118
2.1 Caractérisation biochimique des cristaux	119
2.1.1 Western blot	119
2.1.2 Spectrométrie de masse	119
2.1.3 Séquençage N-terminal d'Edman	120

2.2 Cryocristallographie	121
2.3 Analyse cristallographique préliminaire	121
3. Cristallisation du double mutant C→S en complexe avec l'œstradiol	123
3.1 Caractérisation biochimique des cristaux	124
3.2 Recherche des conditions cryoprotectantes	125
3.3 Analyse cristallographique préliminaire	125
4. Cristallisation du triple mutant C→S en complexe avec le ZK	128
4.1 Cristallisation par ensemencements successifs	128
4.2 Analyse cristallographique préliminaire	128
5. Cristallisation du mutant constitutif	130
C. BILAN	131
V. ÉTUDE CRISTALLOGRAPHIQUE	132
A. ASPECTS METHODOLOGIQUES	133
1. Collecte des données de diffraction	133
1.1 Sources de rayons X	134
1.2 Détecteurs	135
1.3 Distance cristal-détecteur	136
1.3.1 Atteindre la plus haute résolution	136
1.3.2 Éviter la superposition des taches de diffraction (<i>overlaps</i>)	137
1.4 Angle d'oscillation	137
1.5 Temps d'exposition	138
1.6 Le nombre de clichés à enregistrer pour un espace complet	139
2. Traitement des données	139
2.1 Visualisation et analyse préliminaire d'un premier cliché de diffraction	139
2.2 Indexation et intégration du jeu de données complet	140
2.3 La mise à l'échelle du jeu de données	140
2.4 Nombre de molécules et pourcentage de solvant dans l'unité asymétrique	140
3. Résolution du problème de la phase	141
3.1 Remplacement isomorphe multiple	141
3.2 Remplacement moléculaire	142
4. Affinement du modèle	143
B. RESULTATS	145
1. Acquisition et traitement des données	145
2. Résolution des structures cristallographiques	147
2.1 Phasage du récepteur sauvage lié à l'œstradiol	147
2.2 Résolution de la structure du triple mutant C→S lié à l'œstradiol	149
2.3 Résolution de la structure du complexe lié au ZK	150
3. Qualité des structures	151
3.1 Statistiques finales d'affinement	151
3.2 Diagrammes de Ramachandran	152

VI. DESCRIPTION ET ANALYSE DES STRUCTURES.....	158
A. ARCHITECTURE DU DOMAINE E SAUVAGE	160
1. Repliement canonique.....	160
2. Empilement cristallin trigonal.....	162
3. Interface de dimérisation.....	164
4. Mode de fixation du ligand.....	166
5. Conformation agoniste de l'hélice de transactivation H12.....	168
Comparaison des structures sauvage et carboxyméthylée	171
7. Bilan	172
B. STRUCTURE DU TRIPLE MUTANT C→S	173
1. Position alternative de l'hélice H12	173
2. Empilement cristallin hexagonal	174
3. Interface de dimérisation.....	176
4. La poche de fixation du ligand	176
4.1 Mode de fixation de l'œstradiol.....	176
4.2 La poche est ouverte	177
5. L'interface H12-protéine.....	180
5.1.1 La surface de reconnaissance des coactivateurs (ou sillon antagoniste).....	180
5.1.2 Le sillon agoniste	181
5.2 Les hélices H3 et H11.....	182
6. Bilan	183
C. MODE DE FIXATION D'UN LIGAND ANTAGONISTE ZK	184
1. Description du ligand ZK	185
2. Le mode liaison du ligand	185
3. Comparaison des modes de fixation de l'œstradiol et du ZK	188
4. Comparaison avec le tamoxifène et le raloxifène	191
5. Bilan	193

Quatrième partie

VII. ÉTUDE FONCTIONNELLE.....	195
A. ASPECTS METHODOLOGIQUES	197
1. Constructions utilisées pour l'étude fonctionnelle	197
2. Étude de la capacité de liaison du ligand.....	197
2.1 Étape préliminaire : Quantification du nombre de sites	199
2.2 Mesure du K_D	199
3. Étude de l'activité transcriptionnelle	200
4. Dosage de la β -galactosidase.....	201
5. Dosage de la CAT.....	201

B. RESULTATS	202
1. Capacité de liaison du ligand par les mutants	202
1.1 Quantification du nombre de sites récepteurs	202
1.2 Les mutants lient l'œstradiol avec une forte affinité.....	203
2. Activité transcriptionnelle des mutants.....	204
2.1 Effet des mutations C→S sur l'activité transcriptionnelle du récepteur	204
2.1.1 Effet additif des mutations	204
2.1.2 Influence de la fonction AF1	206
2.1.3 Test de compétition	207
2.1.4 Influence du domaine F.....	209
2.2 Effet des mutations E339A, E419A et K531A	210
3. Bilan des essais fonctionnels	211
 <i>Cinquième partie: Relations structure-fonction</i> 	
VIII. DISCUSSION.....	212
A. MECANISME DE POSITIONNEMENT DE L'HELICE H12.....	213
1. Effet des mutations C→S : relation structure-fonction	215
1.1 Un effet entropique.....	217
1.2 Rôle des hélices H3 et H11.....	218
1.3 Les bases structurales de l'agonisme partiel	220
2. Etude structurale d'un complexe lié à un antagoniste stéroïdien.....	225
2.1 Mode de liaison du ligand	226
2.2 Gêne stérique sur la position agoniste et stabilisation de la position antagoniste de l'hélice H12	226
2.3 La question de l'ancrage et de l'antagonisme pur.....	227
B. APPORT DES DONNEES CRISTALLOGRAPHIQUES DANS LA CONCEPTION DE MEDICAMENTS	229
1. La connaissance de la poche de fixation du ligand	229
2. L'effet du ligand sur la position de l'hélice H12.....	231
3. Des ligands spécifiques des isotypes	231
C. ACTIVITE TRANSCRIPTIONNELLE ET SIGNALISATION REDOX : LE ROLE DES CYSTEINES	232
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	235
ANNEXES TECHNIQUES.....	239
A. ALIGNEMENT DE SEQUENCES SUR LE GROUPE DES RECEPTEURS ŒSTROGENES.....	240
B. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE	245
1. Souches d' <i>Escherichia coli</i>	245
2. Préparation et transformation de bactéries compétentes.....	245

2.1 Méthode chimique	245
2.1.1 Préparation de bactéries chimiocompétentes	246
2.1.2 Transformation chimique	246
2.2 Electroporation	246
2.2.1 Préparation de bactéries électrocompétentes	246
2.2.2 Transformation par électroporation	247
3. Préparation d'ADN plasmidique	247
3.1 Minipréparation d'ADN plasmidique	247
3.2 Maxipréparation d'ADN plasmidique	247
3.3 Préparation de plasmide par double gradient de chlorure de césium	248
4. Amplification d'ADN par PCR	249
4.1 Amplification d'ADN avec introduction de nouveaux sites de restriction en 5' et en 3'	249
4.2 Mutagenèse dirigée	250
4.3 Oligonucléotides de sous-clonage et de mutagenèse	250
5. Sous-clonage	252
5.1 Clonage d'un produit PCR	252
5.1.1 Déprotéinisation et précipitation de l'ADN	252
5.1.2 Digestion d'ADN par les enzymes de restriction	253
5.1.3 Déphosphorylation du vecteur plasmidique	253
5.1.4 Ligation	253
5.1.5 Transformation à partir du mélange de ligation	254
5.1.6 Obtention du vecteur de clonage et vérification de la séquence.	254
5.2 Clonage d'oligonucléotides	254
C. TECHNIQUES DE CARACTERISATION FONCTIONNELLE	256
1. Etude de la capacité de liaison du ligand	256
1.1 Préparation de l'échantillon à analyser	256
1.2 Préparation du charbon-dextran	256
1.3 Quantification du nombre de sites récepteurs	257
1.4 Détermination de la constante de dissociation	258
2. Test de transactivation	259
2.1 Culture de cellules mammifères	259
2.2 Transfection cellulaire	259
2.3 Induction de la transactivation et lyse cellulaire	260
2.4 Dosage de la β -galactosidase	260
2.5 Dosage de la CAT	261
3. Estimation du taux d'expression des récepteurs dans les cellules transfectées	261
D. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES	263
1. Dosage des protéines	263
2. Transfert des protéines sur membranes	263
3. Microséquençage	264
4. Western blotting par chimioluminescence	265
5. Spectrométrie de masse	265
6. Techniques de purification des protéines	266

6.1 Sonication et ultracentrifugation.....	266
6.2 Chromatographies sur colonnes.....	266
6.3 Chromatographie d'affinité sur résine de chélation de cations métalliques.....	266
6.3.1 Colonnes HiTrap Chelating (Pharmacia) de 1 ou 5ml :.....	266
6.3.2 Colonne POROS MC (Perseptive Biosystems) de 20ml :	267
6.3.3 Mode opératoire	267
6.4 Chromatographie d'échange d'ions	268
6.5 Filtration sur gel	268
6.6 Protéolyse ménagée.....	269
6.6.1 Thrombine.....	269
6.6.2 Entérokinase.....	269
6.6.3 Trypsine	269
E. CRISTALLISATION.....	270
1. Préparation de la solution protéique.....	270
2. Matrices d'échantillonnage statistique.....	270
3. Congélation des cristaux	273
BIBLIOGRAPHIE	274
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	293

Liste des Figures

Chapitre I : Introduction

Figure 1 : Les deux voies majeures de transduction du signal.....	2
Figure 2 : Organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs nucléaires	5
Figure 3 : Arbre phylogénétique des récepteurs nucléaires.....	7
Figure 4 : Mode de liaison à l'ADN de ER α	12
Figure 5 : Mode de liaison à l'ADN d'un hétérodimère RXR-TR.	14
Figure 6: Structure canonique des récepteurs nucléaires	18
Figure 7 : Alignement des séquences de domaine E des récepteurs nucléaires	19
Figure 8 : Dimérisation du domaine de fixation du ligand.....	20
Figure 9 : Effets de la fixation du ligand sur la conformation du domaine E de hRXR α	22
Figure 10 : Liaison des coactivateurs et mécanisme de l'antagonisme	24
Figure 11: Les différentes étapes de « chaperonage » des récepteurs stéroïdiens.....	27
Figure 12 : Organisation structurale des coactivateurs de la famille p160.....	32
Figure 13 : Activation de la transcription par les holo-récepteurs.	35
Figure 14 : Les surfaces de reconnaissance des corépresseurs et des coactivateurs.....	39
Figure 15 : Répression transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires.....	40
Figure 16 : Les trois catégories de ligands ER.....	44
Figure 17 : Organisation modulaire et homologie de séquence des isotypes ER α et ER β humains.....	48
Figure 18 : La pharmacologie complexe de la signalisation œstrogène.....	51

Chapitre II: Sous-clonage et mutagenèse dirigée

Figure 19 : Vecteur pET-15b et sites de clonage utilisés : NdeI - BamHI.	60
Figure 20 : Vecteur pET-32b et sites de clonage utilisés : NspV – KpnI.....	61
Figure 21: Modification du plasmide pET-32b.	62
Figure 22 : Introduction des mutations C→S dans pSG5-ER.	64
Figure 23 : Constructions et mutants testés au cours de l'étude structurale du récepteur.	67
Figure 24 : Constructions pour l'étude fonctionnelle.....	69

Chapitre III: Expression et Purification

Figure 25 : Système d'expression pET/BL21(DE3)	72
Figure 26: Etape de chromatographie d'affinité au zinc suivie par SDS-PAGE.....	80
Figure 27 : Chromatogramme d'échange d'anions.	81
Figure 28 : Chromatogramme de gel-filtration.	82
Figure 29 : Purification du complexe His ₆ -ER sauvage lié à l'œstradiol.	83
Figure 30 : Optimisation de la production de protéines solubles.	85
Figure 31 : Purification du complexe His ₆ -ER triple mutant lié à l'œstradiol.	88
Figure 32 : Chromatogramme d'affinité au zinc.	91

Figure 33 : Analyse de la pureté et de l'homogénéité du double mutant C→S.	92
Figure 34 : Apport de la thiorédoxine : solubilité et stabilité en absence de ligand.....	94
Figure 35 : Criblage de ligands en présence de la thiorédoxine.....	97
Figure 36 : Analyse des complexes après thrombinolyse.	98
Figure 37 : Elimination de la fusion par chromatographie d'affinité au zinc.....	100
Figure 38 : Chromatogramme d'affinité au zinc.	102
Figure 39 : Élimination de la fusion à la thiorédoxine.	103
Figure 40 : Analyse de la pureté et de l'homogénéité.	104

Chapitre IV: Cristallisation

Figure 41 : Diagramme des phases.	108
Figure 42 : Cristal et conditions de cristallisation de domaine E sauvage lié à l'œstradiol.	114
Figure 43 : Caractérisation des cristaux par Western blot.....	115
Figure 44 : Cliché de diffraction du complexe ER sauvage lié à l'œstradiol.	117
Figure 45: Photographies de microcristaux à problèmes de croissance cristalline.....	118
Figure 46 : Photographie et conditions de cristallisation du domaine E triple mutant C→S lié à l'œstradiol.	119
Figure 47 : Cliché de diffraction du complexe ER triple mutant C→S lié à l'œstradiol.....	122
Figure 48 : Photographies des cristaux de double mutant lié à l'œstradiol.	124
Figure 49 : Cliché de diffraction du double mutant C→S, cristallisé dans le PEG 400.	127
Figure 50 : Stratégie d'obtention de cristaux de complexe avec le ZK.....	129
Figure 51 : Cristaux et conditions de cristallisation du mutant constitutif.	130

Chapitre V: Etude cristallographique

Figure 52 : Schéma d'une expérience de diffraction.....	133
Figure 53 : Illustration schématique de la loi de Bragg.....	136
Figure 54 : Paramètres affectant la séparation des taches de diffraction.....	138
Figure 55 : Diagramme de Ramachandran pour le domaine E sauvage lié à l'œstradiol (molécule 1).....	153
Figure 56 : Diagramme de Ramachandran pour le domaine E sauvage lié à l'œstradiol (molécule 2).....	154
Figure 57 : Diagramme de Ramachandran pour le domaine E sauvage lié à l'œstradiol (molécule 3).....	155
Figure 58 : Diagramme de Ramachandran pour le domaine E triple mutant C→S complexé à l'œstradiol.	156
Figure 59 : Diagramme de Ramachandran pour le domaine E triple mutant C→S lié au ZK	157

Chapitre VI: Description et analyse des structures

Figure 60 : Diagramme topologique du domaine E sauvage de ERα	160
Figure 61 : Alignement des domaines E basé sur la superposition des structures tridimensionnelles.	161
Figure 62 : Empilement cristallin trigonal.	162
Figure 63 : Contact cristallographique dans le site de reconnaissance des coactivateurs	163

Figure 64 : Détail de l'interface de dimérisation du domaine E sauvage lié à l'œstradiol.	164
Figure 65 : Comparaison des modes de dimérisation des domaines E de ER et de PR.	166
Figure 66 : Détail des interactions entre la protéine sauvage et l'œstradiol.	167
Figure 67 : L'œstradiol dans la poche de fixation du ligand.	167
Figure 68: Position agoniste de l'hélice H12.	169
Figure 69 : H12 est une hélice amphipatique.	170
Figure 70 : Arrangement tétramérique de ER dans la structure oxydée de Tanenbaum.	171
Figure 71 : Localisation des mutations et superposition des complexes liés à l'œstradiol et au tamoxifène.	173
Figure 72 : Empilement cristallin hexagonal du triple mutant C→S.	175
Figure 73: Interfaces de dimérisation des récepteurs sauvage (a) et triple mutant C→S (b).	176
Figure 74 : L'œstradiol dans la poche de fixation du ligand du récepteur triple mutant C→S.	177
Figure 75 : Comparaison des poches de fixation du ligand dans les domaines E sauvage et mutant.	178
Figure 76 : La poche de fixation du ligand est ouverte dans le triple mutant.	179
Figure 77: Positionnement de H12 dans une crevasse hydrophobe.	180
Figure 78: Positionnement de H12 dans le sillon de reconnaissance des coactivateurs.	181
Figure 79: La mutation C381S favorise la solvation du sillon agoniste de l'hélice H12.	182
Figure 80 : Effets des mutations C417S et C530S sur les hélices H3 et H11.	183
Figure 81 : Représentation de l'agitation thermique du complexe mutant-ZK.	184
Figure 82 : Formule chimique du ZK.	185
Figure 83 : Orientation du ligand dans le récepteur.	186
Figure 84: Ligand en densité électronique dans la poche de fixation du ligand.	187
Figure 85 : Détail des interactions protéine-ligand.	188
Figure 86 : Comparaison de l'orientation de l'œstradiol et du ZK dans la poche.	189
Figure 87 : Plasticité de la poche de fixation du ligand.	190
Figure 88 : Ancrage des ligands SERM.	191
Figure 89 : Importance du résidu Asp351 dans le positionnement de H12 et l'ancrage des ligands SERM.	193

Chapitre VII: Etude fonctionnelle

Figure 90 : Courbes de saturation d'un radioligand au niveau d'une population de récepteur.	198
Figure 91 : Représentation schématique des tests de transactivation.	200
Figure 92 : Quantification du nombre de sites récepteurs pour le triple mutant C→S.	202
Figure 93 : Représentation de Scatchard.	203
Figure 94 : Effet additif des mutations C→S.	205
Figure 95 : Effet des mutations C→S sur l'activité transcriptionnelle de GAL-ER (DEF).	207
Figure 96 : Test de compétition en présence d'œstradiol 10nM.	208
Figure 97 : Influence de la région F sur l'activité de GAL-ER sauvage et triple mutant C→S.	209
Figure 98 : Activité transcriptionnelle du triple mutant EEK→A.	210

Chapitre VIII: Discussion

Figure 99 : Conformations du domaine de fixation du ligand.....	214
Figure 100 : Effet additif des mutations C→S sur l'activité transcriptionnelle du récepteur.....	216
Figure 101 : Effet entropique de la mutation C381S.....	217
Figure 102 : De la liaison du ligand à la stabilisation de la conformation agoniste.	219
Figure 103 : Changements conformationnels induits par les ligands purs et les agonistes partiels.	222
Figure 104 : La génistéine et le raloxifène dans la poche de fixation du ligand de ERβ.	223
Figure 105 : Formules chimiques des ligands stéroïdiens et non stéroïdiens.....	225
Figure 106 : Mode de fixation et effets des ligands SERM.	227
Figure 107 : Volumes inoccupés dans la poche de fixation du ligand.	230
Figure 108 : La poche de fixation du ligand peut accommoder des ligands chimiquement très différents.....	230
Figure 109 : Localisation des quatre cystéines au niveau du domaine E de hERα.	232

Annexes

Figure 110: Quantification du nombre de sites récepteurs dans la préparation.....	258
Figure 111 : Congélation des cristaux.....	273

Liste des Tableaux

Chapitre I : Introduction

Tableau 1 : Formules chimiques de ligands activateurs de récepteurs nucléaires.....	5
Tableau 2 : Liste des structures cristallographiques de domaines de liaison à l'ADN.....	5
Tableau 3 : Liste des structures cristallographiques de domaines E de différents récepteurs nucléaires.	5

Chapitre III: Expression et Purification

Tableau 4 : Protocoles de purification des domaines E sauvage et mutant.	5
Tableau 5 : Rendement de purification du complexe His ₆ -ER sauvage lié à l'œstradiol.....	5
Tableau 6 : Rendement de purification du complexe His ₆ -ER triple mutant C→S lié à l'œstradiol.....	5
Tableau 7 : Rendement de purification du complexe double mutant C→S lié à l'œstradiol.	5
Tableau 8: Protocoles de purification des domaines E mutants en fusion à la thiorédoxine.....	5
Tableau 9 : Rendement de purification du complexe.....	5
Tableau 10 : Rendement de purification du mutant constitutif.	5
Tableau 11 : Conditions cryoprotectantes des cristaux du domaine E sauvage lié à l'œstradiol.	5

Chapitre IV: Cristallisation

Tableau 12 : Caractéristiques des cristaux de complexe ER sauvage lié à l'œstradiol.	5
Tableau 13 : Caractérisation des fragments constituant les cristaux de triple mutant C→S lié à l'œstradiol.	5
Tableau 14 : Caractéristiques des cristaux de complexe ER sauvage lié à l'œstradiol.....	5
Tableau 15 : Caractéristiques des cristaux de complexe ER double mutant C417S+C530S lié à l'œstradiol.	5
Tableau 16 : Caractéristiques des cristaux de complexe ER triple mutant C→S lié au ZK.	5

Chapitre V: Etude cristallographique

Tableau 17 : Acquisition et traitement des données cristallographiques.....	5
Tableau 18 : Statistiques d'enregistrement et de phasage du triple mutant C→S lié à l'œstradiol.	5
Tableau 19 : Statistiques cristallographiques.	5
Tableau 20: Détail de l'interface de dimérisation du domaine E sauvage lié à l'œstradiol.....	5

Chapitre VII: Etude fonctionnelle

Tableau 21 : Résultats typiques d'analyse de Scatchard sur le domaine E sauvage et mutants.	5
Tableau 22 : Récapitulatif des taux de transactivation des récepteurs portant des mutations C→S.	5
Tableau 23 : Taux de transactivation et CE ₅₀ de GAL-ER sauvage et triple mutant C→S.....	5
Tableau 24 : Concentrations efficaces et inhibitrices de l'activité de GAL-ER sauvage et triple mutant C→S.....	5

Chapitre VIII: Discussion

Tableau 25 : Comparaison des structures cristallographiques ERα et ERβ.....	5
---	---

Annexes

Tableau 26 : Liste des oligonucléotides de sous-clonage.....	551
Tableau 27 : Oligonucléotides de mutagenèse.	552

Abréviations

A	adénine
Å	Angström
Abs _n	absorbance à la longueur d'onde de n nm
ADA	alteration/deficiency in activation
ADN	acide désoxyribonucléique
AIB-1	amplified in breast cancer-1
amp	ampicilline
AR	récepteur aux hormones androgènes
ARN	acide ribonucléique
atm	atmosphère
ATP	adénosine 5'-triphosphate
Bis-Tris	Bis (2-hydroxyéthyl) amino-tris (hydroxyméthyl) méthane
bHLH	basic helix-loop-helix
BRG-1	brahma-related gene-1
C	cytosine
CAF	CBP-associated factor
CARM	coactivator-associated-arginine methyltransferase
CBP	cAMP response element binding protein
CHAPS	3-(3-Cholamido-propyl) diméthyl-ammonio-1-propanesulfonate
chl	chloramphénicol
CHRAC	chromosome accessibility complex
Da	Dalton
DES	Diéthylstilbestrol
DIFP	di-isopropyl-fluorophosphate
dpm	désintégrations par minute
E2	œstradiol
ER	récepteur aux hormones œstrogènes
ERAP	estrogen receptor-associated protein
ERE	élément de réponse œstrogènes
G	guanine
GCN5	general control non-repressed protein 5
GR	récepteurs aux glucocorticoïdes
GRIP1	GR-interacting protein-1
GST	glutathion-S-transférase
HAT	histone acetyl transferase
HDAC	histone deacetylase
HET/SAF-B	Hsp27-ERE-TATA-binding protein / scaffold attachment factor-B
HMG	high mobility group
ISWI	imitation of switch
MAPK	mitogen activated protein kinase

mM	millimolaire
MPD	méthyl 2,5-pentane diol
MR	récepteurs aux minéralocorticoïdes
NURF	nucleosome remodelling factor
PAS	Per-Arnt Sim homology
PEG	polyéthylène glycol
PKA	protein kinase A
PMSF	phényl-méthyl-sulfonyl fluorure
PPAR	récepteurs des activateurs de prolifération des peroxysomes
PR	récepteurs à la progestérone
RAC3	receptor-associated coactivator 3
RAL	raloxifène
RAR	récepteur aux acides 9- <i>cis</i> et tout- <i>trans</i> rétinoïque
REA	repressor of estrogen receptor activity
RIP140	receptor-interacting protein 140
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RSF	remodelling and spacing factor
RXR	récepteur à l'acide 9- <i>cis</i> rétinoïque
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SERM	selective estrogen receptor modulator
SNF	sucrose non fermenting
SRA	steroid receptor RNA activator
SRC	steroid receptor coactivator
SUG1	suppressor of gal4D lesions 1
SUN-CoR	small unique nuclear receptor corepressor
SWI	switching mating type
T	thymine
T ₃	3,3',5 triodo-L-thyronine
TAF	TBP-associated factor
TAM	4-hydroxytamoxifène
TBP	TATA-binding protein
TBS	co-activateur du RZR et du RXR
TEMED	N,N,N',N'-tétra-méthyl-éthylène-diamine
TIF	transcription intermediary factor
TR	récepteur aux hormones thyroïdiennes
TRAP	thyroid receptor-associated protein
Tris	tris-(hydroxyméthyl)-aminoéthane
U	uracile
VDR	récepteur à la vitamine D ₃

I. Introduction

Les hormones constituent un système de communication élaboré permettant aux cellules de notre corps d'être en permanence renseignées sur leur environnement et d'y adapter leur fonctionnement. Les cellules cibles reconnaissent la présence d'une hormone grâce à des récepteurs spécifiques. Il existe deux grands systèmes de réponse aux hormones : les récepteurs présents sur la membrane plasmique des cellules et les récepteurs nucléaires (Figure 1). Les premiers reconnaissent l'hormone dans le milieu extérieur et déclenchent une série d'événements intracellulaires de façon à modifier l'expression des gènes. Les récepteurs nucléaires sont, quant à eux, des récepteurs intracellulaires, dont le mode d'action se situe au niveau du noyau des cellules : ils agissent comme des régulateurs transcriptionnels ligand-dépendants (Gronemeyer et Laudet, 1995) et forment une superfamille, incluant notamment les récepteurs des hormones stéroïdes, thyroïdiennes, de la vitamine D₃ et de l'acide rétinoïque (forme active de la vitamine A).

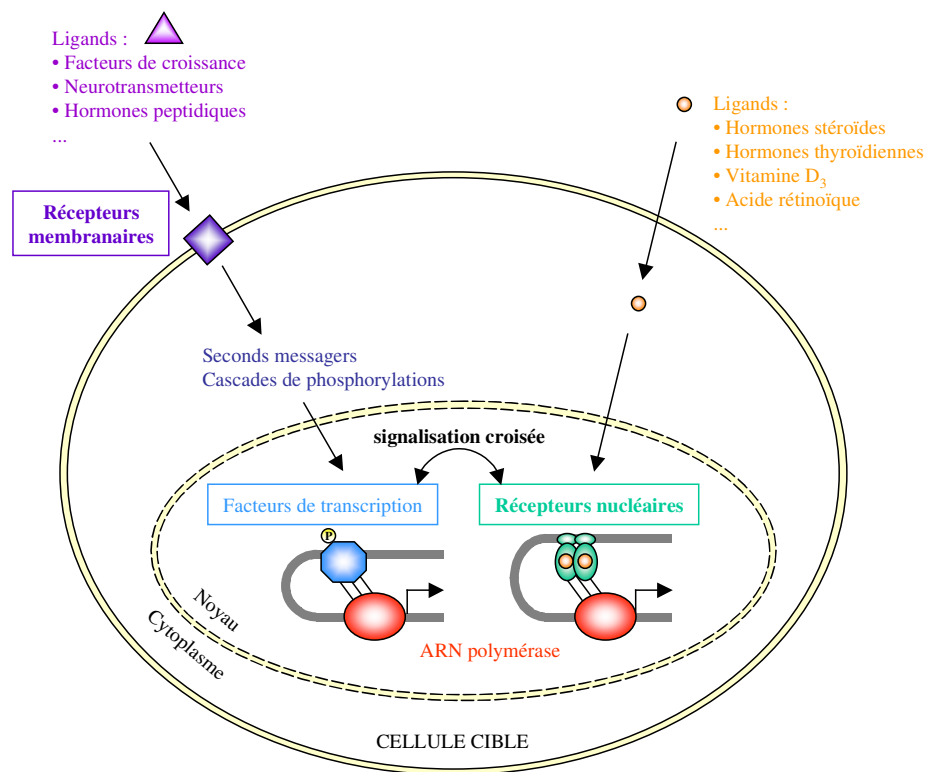


Figure 1 : Les deux voies majeures de transduction du signal impliquent les récepteurs membranaires et les récepteurs nucléaires.

Les deux voies de signalisation peuvent interférer au niveau de la régulation transcriptionnelle de gènes cibles (signalisation croisée), ce qui permet d'établir un réseau fonctionnel d'intégration de l'information.

A. Les récepteurs nucléaires

1. Fonctions biologiques et importance thérapeutique

Les récepteurs nucléaires sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques : la reproduction, la différenciation, le développement, le métabolisme, la métamorphose et l'homéostasie. Sous le contrôle des ligands, ils déclenchent des programmes génétiques spécifiques, établissant ainsi un lien entre la molécule signal et son effet physiologique. Les récepteurs nucléaires constituent d'importantes cibles pharmacologiques, associées à des pathologies majeures (cancer, diabète, syndrome de résistance hormonale, ...). Le développement de ligands synthétiques pour les récepteurs des hormones œstrogènes (ER), de l'acide rétinoïque (RAR), et des activateurs de prolifération des peroxysomes (PPAR γ), présente d'ores et déjà des applications pharmacologiques dans le cancer du sein (ER) (Tonetti et Jordan, 1999), de la peau (RAR) (Lotan, 1996) et le diabète de type 2 (PPAR γ) (Lehmann et al., 1995). Du fait de ces importantes retombées thérapeutiques, un grand intérêt est porté au mode d'action des récepteurs et à leurs ligands.

En dépit de la diversité de leurs ligands (Tableau 1), tous les récepteurs nucléaires présentent la même organisation structurale et fonctionnelle, avec des domaines de liaison à l'ADN et de fixation du ligand présentant de fortes homologues de séquences. La conservation de ces domaines a permis l'identification de nouveaux récepteurs, dont la plupart sont dits orphelins, du fait que leurs ligands, s'ils existent, n'ont pas encore été identifiés (Enmark et Gustafsson, 1996). Récemment, des ligands ont été attribués pour certains récepteurs orphelins (*Liver X Receptor* LXR, *Farnesoid X Receptor* FXR, *Pregnane X Receptor* PXR), permettant ainsi la découverte de nouvelles voies de signalisation (dans le métabolisme du cholestérol pour LXR, des acides biliaires pour FXR, dans le catabolisme des stéroïdes pour PXR). Les récepteurs orphelins constituent donc des cibles pharmacologiques et thérapeutiques potentielles. De vrais orphelins, qui n'ont pas besoin de ligand pour fonctionner, peuvent également exister, mais leur mode d'action reste à être élucidé (*Chicken Ovalbumin Upstream Protein Transcription Factor* COUP-TF, *Nerve Growth Factor Induced* NGFI-B, RevErb) (Mangelsdorf et Evans, 1995; Renaud et al., 2000).

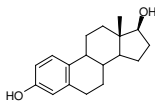
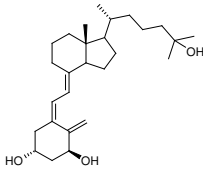
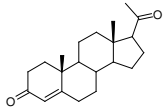
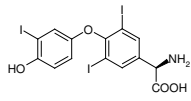
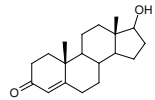
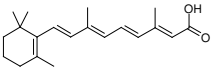
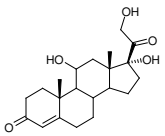
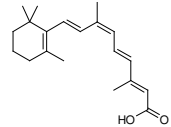
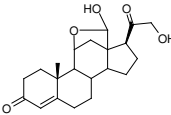
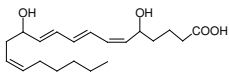
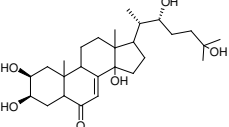
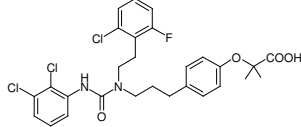
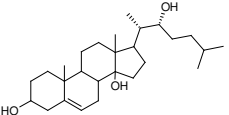
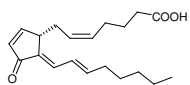
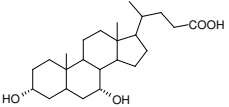
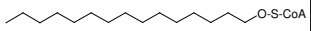
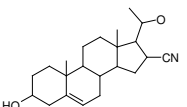
Récepteur	Ligand activateur	Formule chimique	Récepteur	Ligand activateur	Formule chimique
ER	Oestradiol-17 β		VDR	1 α ,25-dihydroxy vitamine D ₃	
PR	Progestérone		TR	3,5,3'-L-triiodo thyronine	
AR	Testostérone		RAR	acide rétinoïque tout-trans	
GR	Cortisol		RXR	acide rétinoïque 9-cis	
MR	Aldostérone		PPAR α	Leucotriène B4	
EcR	Ecdysone		PPAR β	GW 2433	
LXR	22R-hydroxy cholestérol		PPAR γ	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2	
FXR	Acide biliaire		HNF4	Palmitoyl-CoA	
PXR	Pregnelolone -16-carbonitrile				

Tableau 1 : Formules chimiques de ligands activateurs de récepteurs nucléaires.

Les hormones stéroïdes, et les autres dérivés du cholestérol, sont indiqués en bleu.

2. Organisation modulaire

Les récepteurs nucléaires présentent une organisation modulaire commune, avec une région N-terminale A/B, un domaine de liaison à l'ADN constitué par deux doigts de zinc (région C), une région charnière D et le domaine de fixation du ligand (région E). Certains récepteurs nucléaires, tels que les récepteurs des œstrogènes, possèdent une région C-terminale F, dont la fonction reste encore mal connue. La régulation de la transcription s'effectue par l'intermédiaire de deux fonctions de transactivation, AF-1 et AF-2 (Gronemeyer et Laudet, 1995), localisées respectivement au niveau des régions A/B et E. Il a été suggéré que la fonction AF-1 dépendait du contexte cellulaire et du promoteur et que seule AF-2 était hormono-dépendante. Cependant, une interaction fonctionnelle a été décrite entre AF-1 et AF-2 : dans certains cas, les deux fonctions synergisent (Tetel et al., 1999), ce qui rendrait AF-1 également ligand-dépendante. L'organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs nucléaires, représentée dans la Figure 2, sera détaillée ultérieurement.

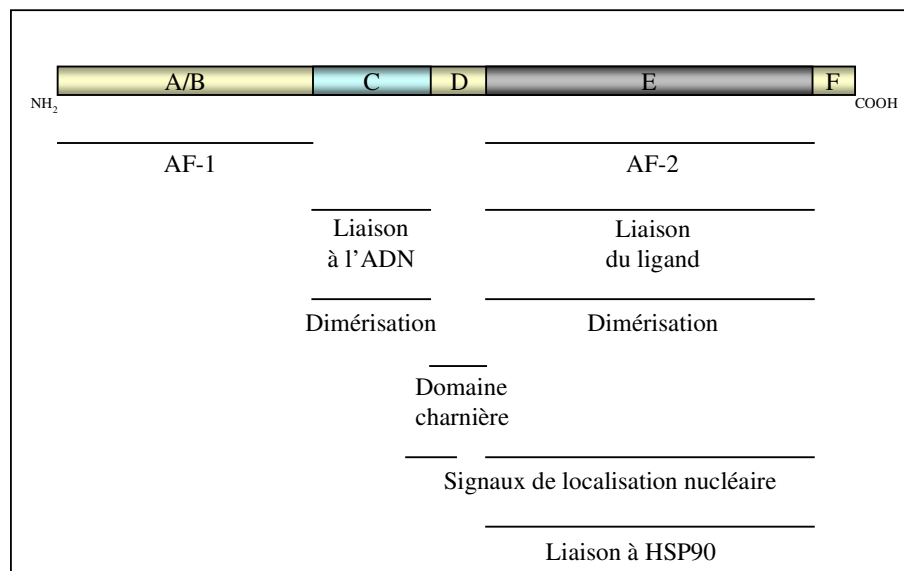


Figure 2 : Organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs nucléaires (Gronemeyer et Laudet, 1995).

Les régions C et E, impliquées dans la liaison de l'ADN et celle du ligand, sont conservées dans la superfamille. Les régions A/B, D et F, représentées en jaune, sont variables en séquence et en taille. La plupart des récepteurs possèdent deux fonctions de transactivation, AF-1 dans la région N-terminale, qui est ligand-indépendante et ne dépend que du contexte cellulaire et du promoteur ; AF-2, dans le domaine E, est régulée par le ligand et dépend de l'intégrité d'une région hélicale en C-terminal du domaine (AF-2 AD ou hélice H12). La liaison à HSP90 ne concerne que les récepteurs des hormones stéroïdes en absence de ligand.

3. Évolution des récepteurs nucléaires

3.1 Définition de sous-familles

L'alignement des séquences des domaines C et E, bien conservés dans la superfamille des récepteur nucléaires, et l'analyse phylogénétique ont permis de définir six à sept sous-familles de taille inégale (Laudet, 1997; Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999) (Figure 3).

- La sous-famille **1** contient les récepteurs des hormones thyroïdes (TR), des rétinoïdes (RAR), de la vitamine D (VDR), de l'ecdysone (EcR), les récepteurs des activateurs de prolifération des peroxyosomes (PPAR) et certains récepteurs orphelins.
- La sous-famille **2** contient les récepteurs des rétinoïdes X (RXR), ainsi que certains récepteurs orphelins.
- La sous-famille **3** est celle des récepteurs des hormones stéroïdes et des récepteurs orphelins ERR (*Estrogen receptor-Related Receptor*).
- Les sous-familles **4, 5 et 6** sont essentiellement composées de récepteurs orphelins.
- La sous-famille **0** regroupe des récepteurs ne contenant qu'un des deux domaines conservés (D ou E).

Il a été montré que les récepteurs nucléaires apparaissaient très tôt dans l'évolution des métazoaires et qu'ils sont présents dans tous les embranchements, mais n'existent pas chez les plantes, les champignons et les eucaryotes unicellulaires, comme les levures, suggérant d'autres mécanismes de régulation transcriptionnelle dans ces organismes. Les récepteurs nucléaires sont spécifiques des métazoaires.

3.2 Diversification par deux vagues successives

La diversification de la superfamille aurait suivi un modèle de duplication de gènes par deux vagues successives (Laudet et al., 1992; Laudet, 1997; Escriva et al., 1998). Une première vague aurait eu lieu très tôt dans l'évolution et aurait conduit aux sous-familles actuelles. Une deuxième vague spécifique des vertébrés aurait produit les groupes paralogues à l'intérieur de chaque sous-famille (générant les isotypes TR α et β , RAR α , β et γ , etc...).

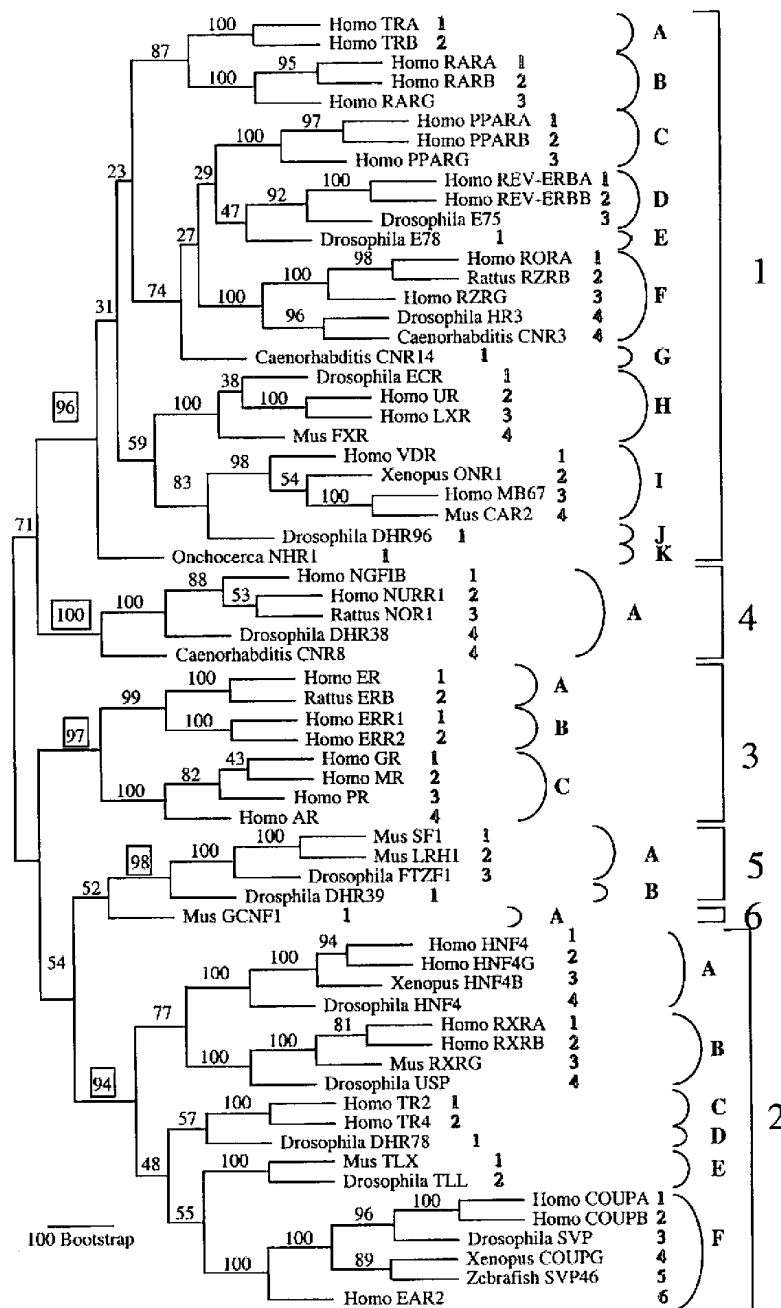


Figure 3 : Arbre phylogénétique des récepteurs nucléaires.

Les récepteurs nucléaires sont divisés en six sous-familles (Nuclear Receptors Nomenclature Committee, 1999). La septième sous-famille 0, regroupant des récepteurs ne contenant qu'un des deux domaines conservés (C ou E), n'est pas représentée. La longueur des branches de l'arbre est proportionnelle à leur valeur de *bootstrap* (Laudet, 1997). La nouvelle nomenclature, pour ER α par exemple, est : NR3A1, c'est-à-dire la sous-famille 3 des récepteurs nucléaires (NR), le sous-groupe A et l'isoforme 1.

La plupart des sous-famille des récepteurs nucléaires sont anciennes, puisqu'elles contiennent des récepteurs existant chez des eucaryotes primitifs. Chez l'Arthropode *Drosophila melanogaster* et l'Annélide *Caenorhabditis elegans*, il n'y a pas d'homologue pour la sous-famille 3 des récepteurs stéroïdiens, ce qui suggère que cette famille s'est formée après la séparation des Arthropodes et des Vertébrés.

3.3 Position phylogénétique, liaison de l'ADN et dimérisation

La position phylogénétique d'un récepteur nucléaire donné est bien corrélée avec son mode de liaison à l'ADN et de dimérisation. Par exemple, les récepteurs stéroïdiens, tels ER et le récepteur des glucocorticoïdes (GR), se lient sous forme d'homodimères à l'ADN au niveau de séquences palindromiques (décrites plus loin), les récepteurs orphelins, proches de RevErb dans l'arbre phylogénétique, se lient sous forme de monomères ou de dimères aux mêmes séquences. Enfin, pratiquement tous les récepteurs interagissant avec RXR appartiennent aux sous-familles 1 et 4.

Il est curieux que cette corrélation ne se retrouve pas au niveau des ligands. La position phylogénétique d'un récepteur n'est, en général, pas corrélée à la nature chimique de son ligand. Il a été suggéré que la capacité de fixer un ligand soit apparue au cours de l'évolution (Escriva et al., 1997; Escriva et al., 1998; Escriva et al., 2000). Des arguments phylogénétiques, fonctionnels et structuraux confortent l'hypothèse d'un récepteur ancestral orphelin.

4. Structure des domaines fonctionnels

4.1 Le domaine N-terminal A/B

On ne dispose que de peu d'information structurale et fonctionnelle sur le domaine A/B. La taille et la séquence de ce domaine sont extrêmement variables (et la distinction entre les régions A et B n'est en général pas possible). Les récepteurs des hormones stéroïdes possèdent généralement des domaines A/B plus longs que les autres récepteurs. Le récepteur aux hormones minéralocorticoïdes humain (MR) possède un domaine de 602 résidus, alors que celui du récepteur de la vitamine D (VDR) n'en compte que 23. Les récepteurs des

hormones œstrogènes possèdent des domaines de 184 résidus pour l'isotype α , et de 148 résidus pour l'isotype β . La plupart des isoformes d'un récepteur nucléaire donné se distingue dans cette région, subissant l'épissage alternatif ou une utilisation différentielle de promoteurs (Giguere et al., 1994).

Des études visant à établir la structure secondaire de ce domaine n'ont pas abouti (Dahlman-Wright et al., 1995), et il a été proposé que ce domaine adopterait un repliement sous certaines conditions, peut-être par le biais de l'interaction avec d'autres protéines (Tjian et Maniatis, 1994). Le domaine N-terminal possède une ou plusieurs fonctions d'activation de la transcription AF-1, lorsqu'il est isolé du reste de la protéine (Tora et al., 1988). Cette région a été cartographiée dans ER α et a révélé l'existence de deux domaines d'activation (Metzger et al., 1995). La fonction AF-1 présente des spécificités cellulaires et de promoteur, dont l'origine est mal comprise (Bocquel et al., 1989). Les fonctions AF-1 du domaine A/B et AF-2 dans le domaine E. contribuent à l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires de façon synergique, étant donné que les domaines isolés sont moins actifs que lorsqu'ils sont réunis (Danielian et al., 1992). Cette synergie est ligand-dépendante et implique soit une interaction directe entre les deux domaines (He et al., 2000), soit une interaction indirecte, par l'intermédiaire de coactivateurs (Bastien et al., 2000; Benecke A et al., 2000; Berrevoets et al., 1998; Bevan et al., 1999; Hittelman et al., 1999; Kobayashi et al., ; McInerney et al., 1996; Webb et al., 1998), ce qui impliquerait un rôle du ligand dans AF-1.

Le domaine A/B subit des modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, stimulant, dans la plupart des cas, son activité transcriptionnelle (Bastien et al., 2000; Chen et al., 2000; Hammer et al., 1999). Alors que la phosphorylation de ER α par TFIIF est ligand-dépendante (et donc AF-2 dépendante) (Chen et al., 2000), celle de ER β par la protéine-kinase MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) est ligand-indépendante, et permet le recrutement du coactivateur SRC-1 (Tremblay et al., 1999a). Ce dernier cas illustre bien la communication (*crosstalk*) entre la voie des récepteurs nucléaires et celle des récepteurs membranaires (par le biais de MAPK).

4.2 Le domaine C

Le domaine C (≈ 66 résidus, de masse moléculaire ≈ 10 kDa) est responsable de la liaison à l'ADN. C'est le domaine le plus conservé dans la superfamille des récepteurs nucléaires. Il est bien caractérisé au niveau structural, par cristallographie des rayons X et par RMN pour différents récepteurs nucléaires (Tableau 2).

Récepteurs	Remarques	n° PDB	Réf.
En absence d'ADN			
hERα	Monomère	-	(Schwabe et al., 1990) (Schwabe et al., 1993a)
hERR2	Monomère	-	(Sem et al., 1997)
hRARβ	Monomère	-	(Katahira et al., 1992)
rGR	Monomère	1gdc	(Hard et al., 1990)
		2gda	(Baumann et al., 1993)
En complexe avec l'ADN			
hRXR-hTR	Hétérodimère sur <i>DR4</i>	2nll	(Rastinejad et al., 1995)
RXR-RAR	Hétérodimère sur <i>DR1</i>	1dsz	(Rastinejad et al.,)
hNGFI-B	Monomère	1cit	(Meinke et Sigler, 1999)
hERα	Homodimère sur <i>IR3</i>	1hcq	(Schwabe et al., 1993b) (Schwabe et al., 1995)
rGR	Homodimère sur <i>IR4</i>	1glu	(Luisi et al., 1991)
hRevErbAα	Homodimère sur <i>DR1</i>	1a6y	(Zhao et al., 1998)
RXR	Homodimère sur <i>DR1</i>	1by4	(Zhao et al., 2000)

Tableau 2 : Liste des structures cristallographiques de domaines de liaison à l'ADN.

Les structures ont été résolues par RMN et cristallographie en présence et en absence d'ADN. *DR* pour *Direct Repeat*, *IR* pour *Inverted Repeat* (palindrome), suivi d'un chiffre qui correspond à l'espacement entre les deux demi-sites. Un monomère de hNGFI-B se fixe sur un demi-site avec une région riche en A/T en 5'.

Les n° PDB représentent les codes d'accèsion à la *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb>).

4.2.1 Architecture générale

Ce domaine est constitué de deux motifs de liaison au zinc de type C₂-C₂ (classe II). Il adopte une structure tertiaire en hélices qui interagissent spécifiquement avec les séquences d'ADN des éléments de réponse hormonale (Freedman et al., 1988a; Freedman et al., 1988b; Luisi et al., 1991). Cette structure ressemble aux doigts de zinc classiques du facteur de transcription TFIIIA de *Xenopus* (Brown et al., 1985; Miller et al., 1985), ainsi que d'un grand nombre de protéines liant les acides nucléiques (Klug et Rhodes, 1987). Par contre, dans TFIIIA, les doigts de zinc lient chacun l'ADN de façon indépendante. Dans les récepteurs nucléaires, un seul motif de liaison au zinc est impliqué dans la liaison à l'ADN, l'autre permettant la dimérisation au contact de l'ADN.

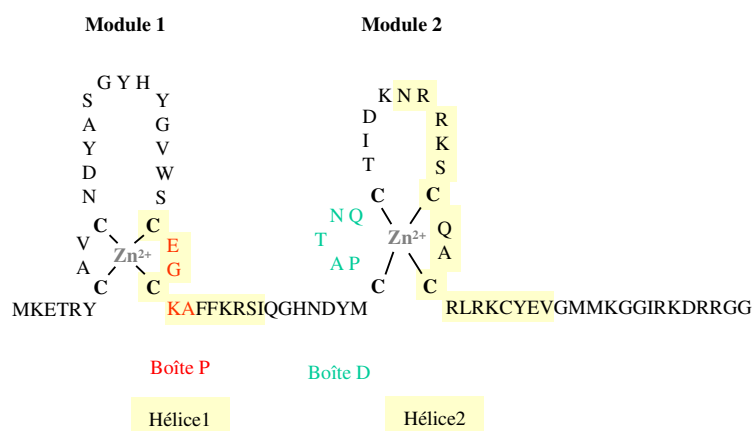
4.2.2 Les éléments de réponse hormonale

Les éléments de réponse hormonale sont, en général, constitués de deux demi-sites hexanucléotidiques permettant chacun la liaison d'un récepteur nucléaire. La séquence canonique d'un demi-site est de type 5'-PuGGTCA-3' (Gronemeyer, 1993; Gronemeyer et Moras, 1995). Ce sont des répétitions palindromiques pour les récepteurs de la sous-famille **3** (les récepteurs stéroïdiens), des répétitions directes (ou *DR*, *direct repeats*) pour les récepteurs des sous-familles **1** et **4**, tels les homodimères non stéroïdiens et les hétérodimères avec RXR, ou des séquences simples pour les récepteurs orphelins monomériques. La spécificité de liaison à l'ADN dépend de la séquence des demi-sites, de l'orientation des répétitions de ces demi-sites et de l'espacement entre les séquences. Par exemple, une répétition directe séparée par 5 nucléotides (*DR5*) sera le plus souvent reconnue par un hétérodimère RXR-RAR, tandis qu'un *DR4* sera lié par RXR-TR. Dans le cas des récepteurs orphelins monomériques, une région en 5' de l'élément de réponse, riche en A/T, gouverne la spécificité de liaison.

4.2.3 Liaison coopérative à l'ADN

En absence d'ADN, le domaine C des récepteurs nucléaires est monomérique. De plus, il présente une faible affinité pour la liaison à l'ADN sous cette forme. Des analyses structurales et des expériences de liaison ont montré que le domaine C se structurait au contact de l'ADN (Hard et al., 1990a; Kumar et Chambon, 1988; Lee et al., 1993; Lundback et al., 1994; Hard et al., 1990b; Schwabe et al., 1990).

a



b

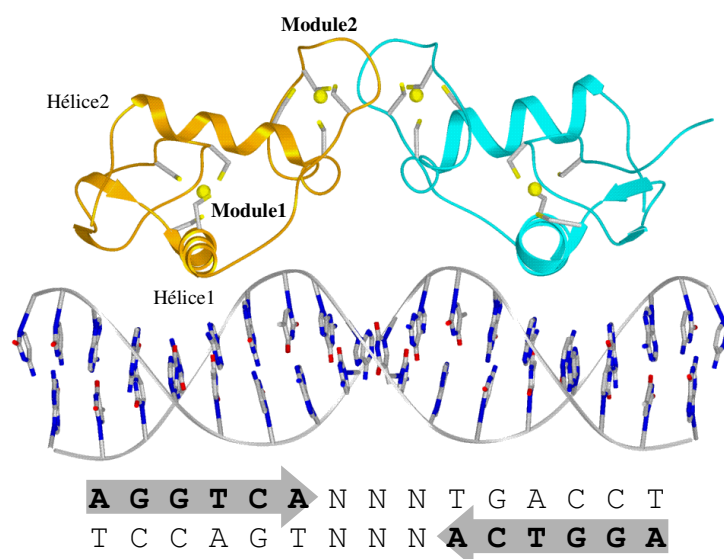


Figure 4 : Mode de liaison à l'ADN de ER α .

Structure de l'homodimère du domaine C lié à un élément de réponse de type palindromique (Schwabe et al., 1993b). En **a**, la séquence en acides aminés, sur laquelle est représentée la coordination Zn-Cys. Les résidus en rouge sont ceux de la boîte P, et ceux en vert appartiennent à la boîte D. Les régions surlignées en jaune forment les hélices 1 (ou hélice de reconnaissance) et 2. En **b**, l'architecture de l'homodimère lié à l'ADN. Les monomères en 5' (en orange) et en 3' (en cyan) sont symétriques, reflétant la structure palindromique de l'élément de réponse ERE canonique, séparé par 3 paires de bases, notées N. Le module 1 de liaison au zinc intervient dans la reconnaissance du sillon majeur de l'ADN, alors que le module 2 est impliqué dans l'interface dimérique.

Lorsque le récepteur se fixe à l'ADN sous forme dimérique, le deuxième monomère se fixe de manière coopérative et sa liaison présente une affinité plus forte que celle du premier. Alors que les contacts protéine-protéine imposent l'espacement entre les demi-sites, cette coopérativité permet des interactions plus flexibles dans la reconnaissance du deuxième demi-site et donc la reconnaissance d'éléments de réponse non consensus (Schwabe et al., 1995).

Les récepteurs stéroïdiens, tels que ER et GR, forment le plus souvent des homodimères (des hétérodimères entre MR et GR ont été décrits (Trapp et Holsboer, 1996)), alors que des récepteurs tels que TR, RAR ou VDR forment préférentiellement des hétérodimères avec RXR (Gronemeyer et Laudet, 1995). Les structures des complexes entre le domaine C et l'ADN ont permis de définir les déterminants de la spécificité de reconnaissance des récepteurs envers leur ADN.

4.2.4 Éléments structuraux impliqués dans la liaison à l'ADN et la dimérisation

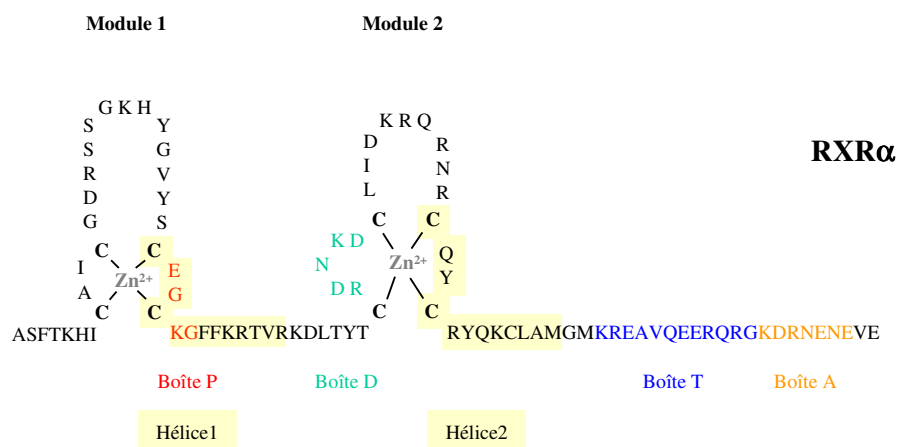
On distingue quatre séquences, appelées boîtes P, D, T et A :

- la boîte P se situe au niveau l'hélice 1 du premier module de liaison au zinc. Elle fait partie de l'hélice de reconnaissance, interagissant avec le grand sillon de l'ADN. Des expériences de mutagenèse ont montré que la spécificité de reconnaissance des demi-sites était garantie par les résidus de la boîte P. En substitution deux résidus de la boîte P de GR par les résidus correspondants de ER, le récepteur chimérique acquiert la capacité de liaison à un élément de réponse œstrogène (Danielsen et al., 1989).

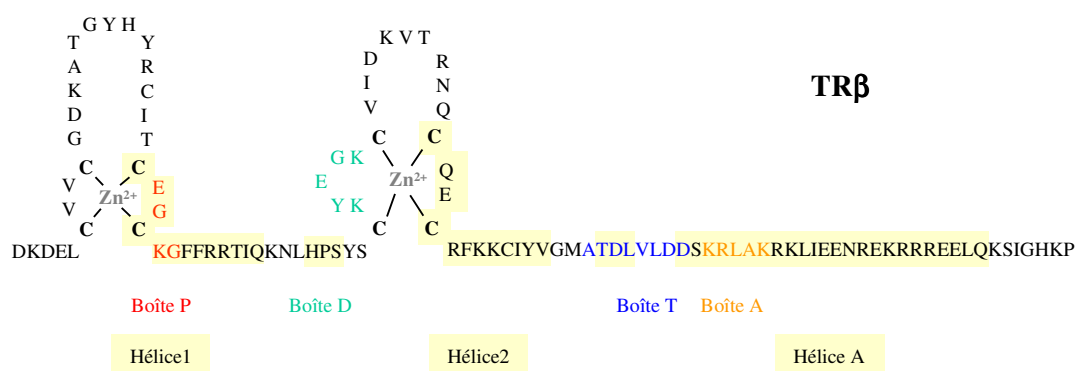
- la boîte D est impliquée dans l'interface de dimérisation (notamment dans le cas des récepteurs aux stéroïdes) et dans la discrimination de l'espacement entre les demi-sites.

- les boîtes T et A interviennent respectivement dans la dimérisation et la reconnaissance de l'ADN au niveau du petit sillon (notamment dans le cas des récepteurs RXR et TR). Elles se situent dans la partie C-terminale du domaine C et N-terminale de la région D. La boîte A est également appelée CTE (*C-terminal extension*).

a



b



c

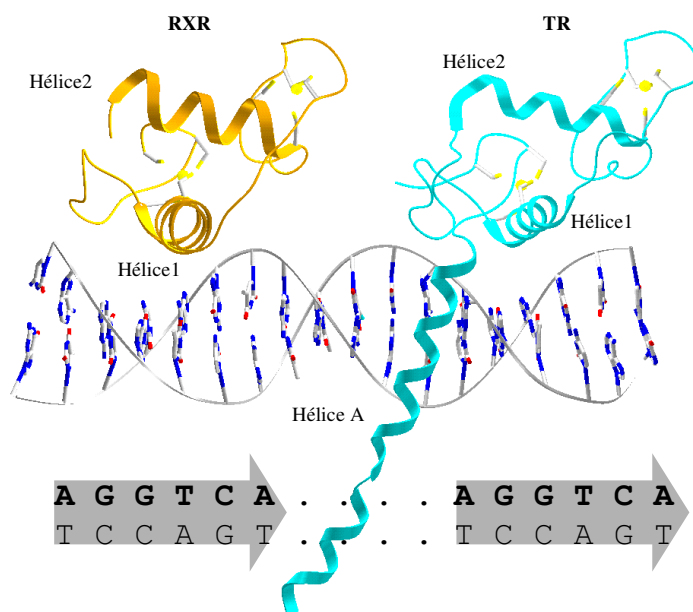


Figure 5 : Mode de liaison à l'ADN d'un hétérodimère RXR-TR.

◀ Structure de l'hétérodimère de domaines C de RXR α et de TR β liés à un élément de réponse de type *DR4* (Rastinejad et al., 1995). Les séquences en acides aminés de RXR α en **a** et TR β en **b** sont présentées. Les résidus en rouge sont ceux de la boîte P, en vert ceux de la boîte D. Deux boîtes supplémentaires T (en bleu) et A (en orange) sont décrites. Les régions surlignées en jaune forment les hélices 1, 2 et A. En **c**, l'architecture de l'hétérodimère lié à l'ADN. Les monomères de RXR en 5' (en orange) et TR en 3' (en cyan) sont arrangés en tête-à-queue, reflétant la structure de l'élément de réponse TRE, séparé par 4 paires de bases (symbolisées par des points).

Contrairement au cas symétrique de la séquence palindromique reconnue par l'homodimère ER (Figure 4), l'asymétrie de l'élément de réponse *DR* se traduit par l'asymétrie dans la disposition de l'hétérodimère RXR-TR (Figure 5). La structure du complexe RXR-TR-*DR4* est représentative de l'organisation sur les *DR* (Rastinejad et al., 1995). L'arrangement des domaines C en tête-à-queue met en contact différentes régions au niveau de l'interface dimérique. Les résidus du deuxième module de liaison au zinc de RXR interagissent avec les résidus du premier module et de la région T de TR. Il y a une interaction supplémentaire par rapport à la structure précédente. L'extension C-terminale du domaine C (et la partie N-terminale du domaine D) forme une hélice qui interagit avec le petit sillon de l'ADN (hélice A). Les contacts supplémentaires ainsi établis avec le petit sillon et le squelette de l'ADN ne peuvent être établis que sur un motif *DR4*. Les motifs *DR1*, *DR2* et *DR3* ne permettent pas cette association, il en résulterait une gêne stérique entre les deux domaines.

4.3 Le domaine charnière D

Les récepteurs nucléaires possèdent une région charnière D entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de fixation du ligand, dont la structure n'est pas connue. Une des caractéristiques principales de cette région est sa flexibilité, capable d'accommoder les différents mode de dimérisation au niveau des domaines C et E : l'homo- et l'hétéro-dimérisation n'impliquant pas les mêmes interfaces de dimérisation au niveau du domaine C, contrairement au domaine E (Bourguet et al., 2000 ; Gampe et al., 2000).

Cette région est très faiblement conservée à l'intérieur de la superfamille, mais affiche par contre un haut degré de conservation à l'intérieur de la même sous-classe de récepteur. Elle possède un signal de translocation nucléaire constitutif. Elle est également impliquée dans le recrutement d'HSP90 dans le cas de ER et de certains coactivateurs. Une protéine de

27 kDa, interagissant avec les régions D et E de PR, ER et GR a été identifiée par la technique du double hybride (Jackson et al., 1997). *In vitro*, cette protéine L7/SPA est capable d'augmenter l'activité agoniste partielle de certains antagonistes de ER (tamoxifène), de PR ou de GR (RU486), sans influencer l'activité de ligands agonistes ou antagonistes purs. Cette coactivation pourrait expliquer l'effet ambigu de ces ligands en fonction des types cellulaires. Le coactivateur PGC-1 se lie également préférentiellement à la région charnière de PPAR γ (Puigserver et al., 1998) et de ER α (Tcherepanova et al., 2000). Le mode d'interaction entre ces coactivateurs et la région D n'est pas connu.

4.4 Le domaine de liaison du ligand E

Le domaine E est multifonctionnel : il assure la fixation du ligand, procure une surface de dimérisation, porte la fonction de transactivation de la transcription ligand-dépendante AF-2, interagit avec la protéine HSP90 (*Heat Shock Protein 90 kDa*) et porte des signaux de translocation nucléaire ligands-dépendants. C'est un domaine globulaire d'environ 250 résidus ($\approx$ 30 kDa). Les alignements de séquences montrent que le domaine E est moins conservé que le domaine de liaison à l'ADN. Le domaine E de ER, par exemple, présente uniquement 31% d'identité de séquence avec RXR α , 23% avec PR et 18% avec TR β . Malgré cette divergence, les structures tridimensionnelles de ces domaines sont très similaires.

4.4.1 Repliement canonique

De nombreuses structures cristallographiques de ce domaine (répertoriées dans le Tableau 3) ont été résolues pour différents récepteurs nucléaires. Le domaine E adopte un repliement canonique chez les récepteurs nucléaires (Figure 6). Cette structure canonique comprend 12 hélices- α disposées en trois couches, formant un motif dit en «sandwich à hélices- α antiparallèles» (Wurtz et al, 1996 ; Moras et Gronemeyer, 1998). Un feuillet- β à 2 brins antiparallèles (avec un coude β) est généralement présent du côté de l'hélice H3. Il existe des variations autour de cette organisation canonique, notamment au niveau de la zone de connexion entre les hélices H1 et H3, avec la disparition de l'hélice H2 ; la présence d'hélices supplémentaires ; la disparition ou à l'amplification du feuillet.

Récepteurs	Ligands	Remarques	n° PDB	Réf.
APO				
RXRα	-	Dimère	1lbd	(Bourguet et al., 1995)
PPARβ	-	Monomère	2gwx	(Xu et al., 1999)
PPARγ	-	Dimère	1prg	(Nolte et al., 1998)
		Monomère	3prg	(Uppenberg et al., 1998)
AGONISTES				
RXRα	AR-9C	Monomère	1fby	(Egea et al., 2000a)
RARγ	AR-T	Monomère	2lbd	(Renaud et al., 1995)
	AR-9C, BMS961	Monomère	3lbd, 4lbd	(Klaholz et al., 1998)
	BMS394, BMS395	Monomère	1exa, 1exx	(Klaholz et al., 2000a)
	BMS184394	Monomère	1fcx	(Klaholz et al., 2000b)
	CD564	Monomère	1fcy	
	BMS181156	Monomère	1fcz	
TRα	T3, Dimit	Monomère	-	(Wagner et al., 1995)
TRβ	T3	Monomère, GRIP1	1bsx	(Darimont et al., 1998)
PPARβ	GW2433	Monomère	1gwx	(Xu et al., 1999)
	EPA	Monomère	3gwx	
PPARγ	Rosiglitazone	Homodimère, SRC1	2prg	(Nolte et al., 1998)
VDR	Vitamine D3	Monomère	1db1	(Rochel et al., 2000)
PR	Progestérone	Monomère*	1a28	(Williams et Sigler, 1998)
ERα	Œstradiol	Tétramère	1a52	(Tanenbaum et al., 1998)
		Dimère	1ere	(Brzozowski et al., 1997)
		Dimère, GRIP1	3erd	(Shiau et al., 1998)
PPARγ/RXRα	Rosiglitazone/AR-9C	hétérodimère, SRC1	-	(Gampe et al., 2000)
	GI262570/ AR-9C	hétérodimère, SRC1	-	
AGONISTES/ANTAGONISTES PARTIELS				
RXRα	acide oléique	Hétérodimère RAR/RXR	1dkf	(Bourguet et al., 2000)
ERβ	Génistéine	Homodimère	1qkm	(Pike et al., 1999)
PPARγ	GW0072	Homodimère	4prg	(Oberfield et al., 1999)

Récepteurs	Ligands	Remarques	n° PDB	Réf.
ANTAGONISTES PURS SUR AF-2				
RAR α	BMS614	Hétérodimère RAR/RXR	1dkf	(Bourguet et al., 2000)
ER α	RAL	Homodimère	1err	(Brzozowski et al., 1997)
	TAM	Homodimère	3ert	(Shiau et al., 1998)
ER β	RAL	Homodimère	1qkn	(Pike et al., 1999)

Tableau 3 : Liste des structures cristallographiques de domaines E de différents récepteurs nucléaires.

Les structures sont classées en fonction de la présence et de la nature biologique du ligand.

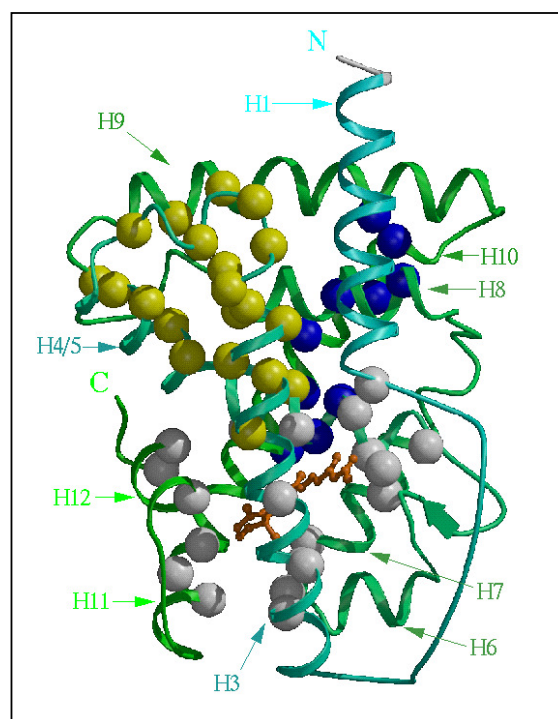


Figure 6: Structure canonique des récepteurs nucléaires (Wurtz et al, 1996).

Les résidus très conservés dans tous les récepteurs nucléaires, appartiennent au cœur du domaine, sont représentés par des sphères jaune (au niveau de H3, H4, H5, H8, H9, L3-4 et L8-9). Les résidus impliqués dans les contacts entre H1, d'une part, et H5, H8, H9 et H10, de l'autre, sont représentés par des sphères bleues. Les sphères grises représentent les C α des résidus de la poche du ligand de hRAR (< 4.5 Å de l'acide rétinoïque).

La comparaison des structures et l'analyse de séquences a permis de mettre en évidence un motif signature du domaine (Wurtz et al, 1996), qui comporte des résidus conservés, essentiels à la stabilisation du cœur hydrophobe (Figure 8).



Figure 7 : Alignement des séquences de domaine E des récepteurs nucléaires (Wurtz et al., 1996).

Les structures secondaires encadrées sont celles de hRAR γ et d'apo-hRXR α . Les boîtes rose +++ symbolisent de longues insertions dans VDR et USP. Les acides aminés conservés sont indiqués par un code à une lettre : h = hydrophobe ; F = aromatique. **Les résidus très conservés du cœur hydrophobe sont surlignés en jaune.** Les résidus impliqués dans les contacts entre H1 et H5, H8, H9 sont surlignés en bleu. Les ronds blancs indiquent les résidus de la poche du ligand de hRAR γ , les ronds verts : les contacts entre H1 et le cœur. Le domaine d'activation *AF-2a* de ER (Pierrat et al., 1994), *AF-2 AD* et la séquence signature sont indiqués en rose.

4.4.2 Interface de dimérisation

La surface de dimérisation semble être conservée dans la superfamille des récepteurs nucléaires. Plusieurs structures cristallographiques d'homo- (RAR, ER, PPAR) ou d'hétérodimères (RXR-PPAR et RXR-RAR), ainsi que des études de mutagenèse montrent que l'interface se situe au niveau de l'hélice H10 (Figure 8). L'interface générée par les hélices H10 de chaque monomère ressemble au motif de fermeture-éclair à leucines. Les hélices H7 et H9, et des boucles L7-8 et L8-9 (L pour *loop*) contribuent également à l'interface. Les interactions impliquent des contacts van der Waals et polaires. La surface de dimérisation totale représente environ 1700 Å² (ER), 1600 Å² (PPAR) et 1300 Å² (RXR), soit de 11 à 15% de la surface totale accessible par monomère. Dans les homodimères ligandés, l'hélice H7 d'un monomère se retrouve à proximité de l'hélice H12 de l'autre monomère, suggérant la possibilité d'une communication allostérique entre monomères.

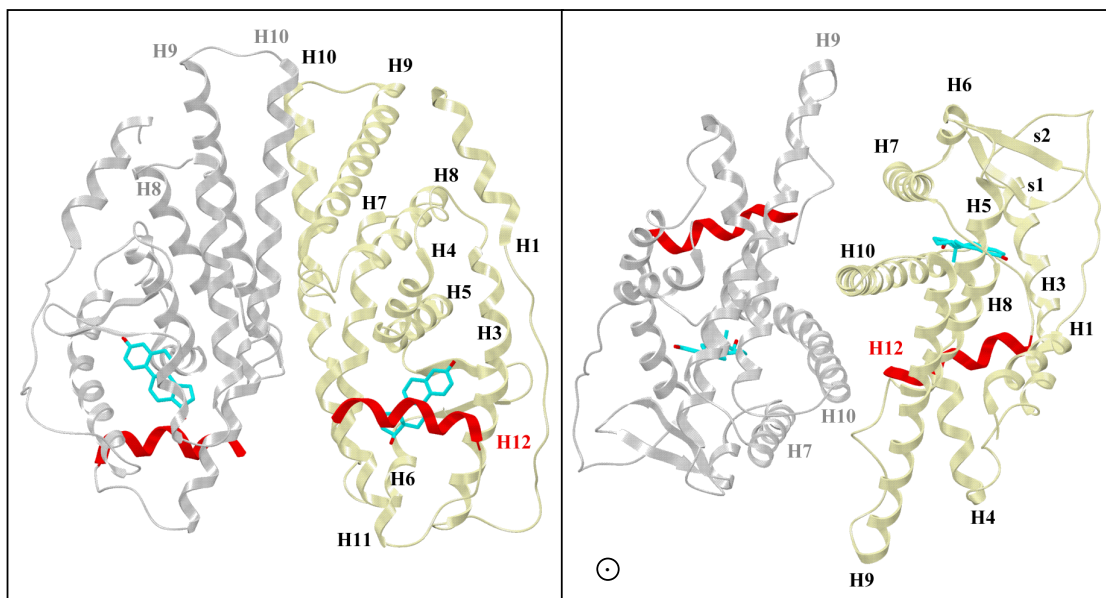


Figure 8 : Dimérisation du domaine de fixation du ligand.

Cas du hER α lié à l'œstradiol, vues de face et de haut. Les monomères sont représentés en gris et en jaune, l'hélice C-terminale H12 est colorée en rouge, le ligand en bleu.

4.4.3 La poche de fixation du ligand

Dans toutes les structures cristallographiques résolues jusqu'à présent, le ligand est toujours enfoui au cœur de la protéine, dans une poche majoritairement hydrophobe et scellée (sauf pour PPAR γ). La cavité est délimitée par les hélices H3, H5, H6, H7, H11 et H12, ainsi que par le feuillet- β . Une telle organisation soulève le problème du mécanisme d'entrée ou de sortie du ligand. Le mécanisme mis en avant est celui du changement conformationnel, impliquant principalement l'hélice H12 (Renaud et al., 1995; Blondel et al., 1999; Egea et al., 2000).

Les récepteurs nucléaires présentent généralement une affinité de l'ordre du nanomolaire pour leur ligand. Affinité et sélectivité de reconnaissance du ligand sont assurées par les nombreux contacts hydrophobes et les points d'ancrage hydrophile dans la poche. Dans le cas de l'acide rétinoïque 9-cis, le ligand est capable de s'adapter à la forme des poches des récepteurs RAR et RXR, et d'optimiser les contacts hydrophobes. Par contre, pour les récepteurs stéroïdiens, les ligands sont plus rigides. La sélectivité ne seraient pas uniquement due aux contacts van der Waals, qui ne suffiraient pas à distinguer les petites différences structurales des ligands (Tableau 1). Dans ce cas, les liaisons hydrogène contribuent de manière significative à la sélectivité (Egea et al., 2000b). Les récepteurs aux rétinoïdes et les récepteurs aux stéroïdes possèdent une arginine conservée (sur l'hélice H5), qui interagit respectivement avec la fonction carboxylate de l'acide rétinoïque et les groupements alcool ou cétone des stéroïdes. Ceci suggère une conservation du positionnement des ligands à l'intérieur de ces familles.

4.4.4 Les changements conformationnels induit par le ligand

a) Le mécanisme de la souricière

Le mécanisme de la souricière, déjà proposé d'après la comparaison des structures cristallographiques des domaine de fixation de l'hormone de RXR α non ligandé (Bourguet et al., 1995) et de l'holo-RAR γ lié à l'acide rétinoïque tout-trans (Renaud et al., 1995), a récemment été confirmé par la structure de RXR α complexé à son ligand naturel, l'acide rétinoïque 9-cis (Egea et al., 2000a).

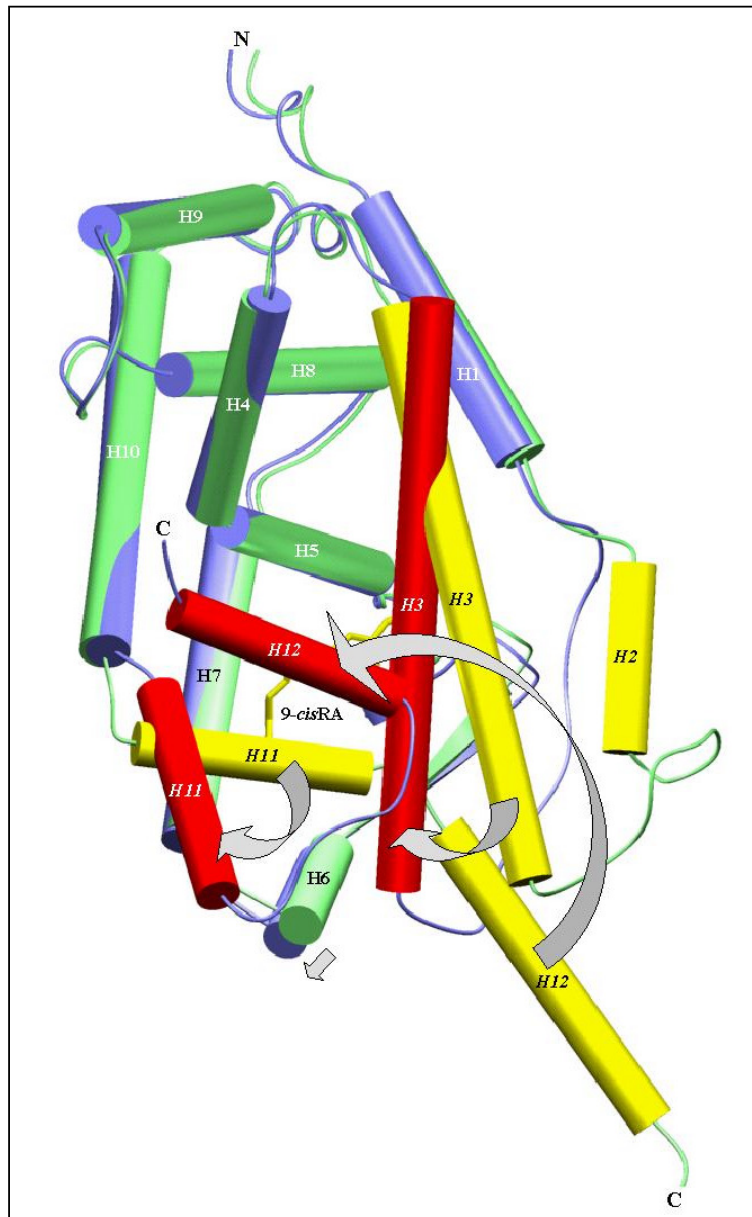


Figure 9 : Effets de la fixation du ligand sur la conformation du domaine E de hRXR α (Egea et al., 2000a). Superposition des structures *apo* et *holo*-RXR α : la forme *apo* est représentée en vert, la forme en bleu. Les éléments de structure secondaire subissant les réarrangements conformationnels les plus importants (H2, H3, H11 et H12), sont dessinés en jaune pour la forme *apo* et en rouge pour la forme *holo*. Les flèches mettent l'accent sur les principaux mouvements des éléments de structure secondaire lors de la transition *apo* vers *holo*.

La comparaison des volumes des monomères apo- et holo-RXR montre que le domaine se compacte, sous l'effet de la fixation du ligand (de 39110 à 35870 Å³). Des changements conformationnels majeurs accompagnent cette compaction et affectent l'extrémité N-terminale de H3 ainsi que les hélices H11 et H12. L'hélice H6 et le feuillet-β subissent de légères adaptations structurales, tandis que les autres hélices ne sont pas affectées. La forme apo-RXR possède une hélice supplémentaire H2 par rapport à la forme holo. Dans la forme holo-RXR, cette même région forme une boucle L1-3. Ce changement conformationnel illustre probablement la flexibilité structurale et la dynamique de la région, qui accompagne le mouvement de H3 lors de la fixation du ligand. En effet, la partie N-terminale de H3 subit une rotation d'environ 90° autour de son axe hélical, et une inflexion qui rapproche l'hélice de la poche de fixation du ligand. Des résidus de H3 peuvent ainsi interagir avec le ligand. La partie N-terminale de H3 se déplace d'une dizaine d'Angström, grâce au mouvement combiné de l'hélice H11. La poche de fixation du ligand est constituée au contact du ligand et les deux partenaires s'adaptent en formant de nombreux contacts hydrophobes impliquant des résidus de H3, H6, H7 et H11. En absence de ligand, l'hélice H11 stabilise la poche de fixation du ligand, cavité hydrophobe béante, en la remplissant de ces résidus apolaires. Dans la forme ligandée, cette hélice est déplacée par H3 et subit une rotation d'environ 180° autour de son axe hélical. Ce demi-tour de l'hélice permet de générer la surface d'interaction du ligand (en exposant l'autre face au solvant) et contribue au repositionnement de H12. L'hélice H12, qui était complètement exposée au solvant dans la forme apo-RXR, se retourne et se positionne sur le core du domaine. Sous l'effet du ligand, cette interaction est stabilisée par des contacts avec des résidus de H3 et de H11. Le ligand joue donc un rôle indirect dans la stabilisation de l'hélice H12, en positionnant H3 et H11. Pour certains récepteurs tels RAR, PR, PPARγ et TR, le ligand interagit directement avec l'hélice H12.

b) Les bases moléculaires de l'agonisme et de l'antagonisme

La fixation d'un ligand agoniste engendre une conformation du domaine E reconnue par les coactivateurs portant une séquence LXXLL (L pour leucine et X, un résidu quelconque), appelée *NR-box* (Le Douarin et al., 1996; Heery et al., 1997). Différentes structures cristallographiques de complexes, dans lesquels les domaines E ligandés sont liés à des peptides coactivateurs GRIP1 ou SRC1, ont été résolues (Darimont et al., 1998; Nolte et al., 1998; Shiau et al., 1998; Gampe et al., 2000). Le site de reconnaissance des coactivateurs

est constitué par des résidus de l'hélice H3, de la boucle L3-4, et des hélices H4 et H12, et présente une surface majoritairement hydrophobe. Le peptide portant le motif LXXLL, adopte une structure en hélice- α amphipathique, complémentaire à cette surface hydrophobe. De plus, il est maintenu par des interactions électrostatiques. Une « pince électrostatique » est constituée par deux résidus chargés strictement conservés dans la superfamille des récepteurs nucléaires. Le premier est localisé sur l'hélice H3 (K362 de ER α), le deuxième, sur l'hélice H12 (E542 de ER α). Dans la Figure 10, il apparaît clairement que seule la conformation induite par un agoniste permet le recrutement d'un coactivateur, en générant la surface AF-2 reconnu par les coactivateurs. Par contre, la liaison d'un antagoniste abolit cette surface en déplaçant l'hélice H12.

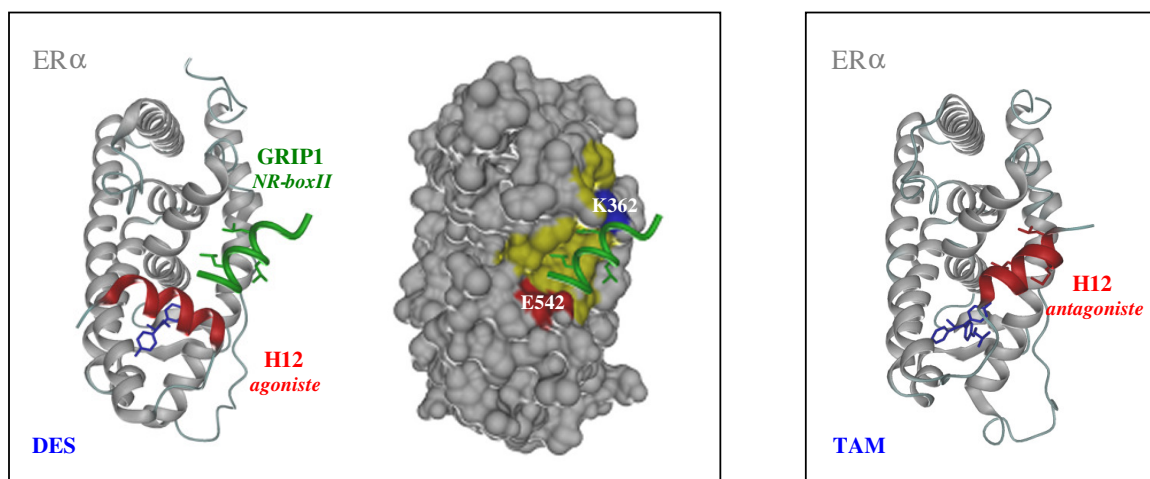


Figure 10 : Liaison des coactivateurs et mécanisme de l'antagonisme (Shiau et al., 1998).

A gauche, deux représentations de la structure du complexe ternaire ER α -DES-peptide GRIP1, la première en mode ruban, la deuxième en surface accessible, telle qu'elle est calculée par MSMS et représentée par le programme DINO. ER α est représenté en gris, sauf H12 qui est en rouge, DES en bleu et le peptide GRIP1 en vert. Sur la surface, seul le sillon d'interaction du coactivateur est colorée : en jaune la région hydrophobe, en rouge E542 et en bleu K362, la pince électrostatique, maintenant le peptide GRIP1. Les trois leucines du motif LXXLL de *NR-box II* sont représentées. **A droite**, une représentation en ruban du complexe ER α -TAM, dans lequel l'antagoniste (en bleu) déplace H12 (en rouge) et empêche ainsi la liaison du coactivateur (Shiau et al., 1998).

La liaison de ligands antagonistes, tels que le tamoxifène (TAM) ou le raloxifène (RAL) pour ER (Brzozowski et al., 1997; Pike et al., 1999; Shiau et al., 1998) et BMS614 pour RAR α (Bourguet et al., 2000), empêche l'hélice H12 d'adopter la conformation agoniste, en générant une contrainte stérique directe. En effet, ces ligands portent des chaînes latérales encombrantes, qui débordent de la poche de fixation du ligand, et pointent vers l'hélice H12. La position agoniste de H12 est ainsi rendue impossible. Le mécanisme de l'antagonisme est basé sur la destruction de l'interface des coactivateurs par un changement conformationnel impliquant l'hélice H12 (Figure 10).

4.5 Le domaine C-terminal F

La région F n'existe que chez certains récepteurs, mais sa fonction n'est pas entièrement élucidée. Il a été montré que le domaine F diminuait l'activité transcriptionnelle du récepteur ligandé dans les cellules transfectées (Montano et al., 1995). Cette région posséderait également une fonction modulatrice de l'efficacité des antiœstrogènes, affectant leur activité agoniste/antagoniste partielle dans certains types cellulaires. Le mécanisme par lequel F est capable d'affecter l'activité du récepteur a été étudié, par la technique du double hybride dans la levure. La présence de la région F diminue l'activité transcriptionnelle du récepteur ER α d'un facteur 10, en altérant la capacité de dimérisation du domaine E (Peters et Khan, 1999). De plus, cette région inhiberait la capacité inhérente du récepteur à interagir avec le coactivateur RIP140 (Peters et Khan, 1999). Seule la structure cristallographique des domaines E-F de PR a été résolue (Williams et Sigler, 1998). Le repliement de F sur le domaine engendre une gêne stérique, qui empêche la dimérisation par l'hélice H10, tel qu'il est observé dans RXR (ne possédant pas de région F) et ER (possédant une région F, absente dans la structure cristallographique). Il est aisément concevable que la position de F influence également le recrutement de coactivateur et la synergie entre les fonctions AF-1 et AF-2.

5. Localisation cellulaire des récepteurs nucléaires et mécanisme d'action

La localisation cellulaire du récepteur en absence de ligand est un point important à souligner dans le mode de fonctionnement de ces régulateurs transcriptionnels activés par la fixation d'un ligand. Deux cas de figure sont rencontrés.

5.1 Localisation cytoplasmique

En absence de ligands, certains récepteurs stéroïdiens, tels GR, sont séquestrés dans le cytoplasme dans un complexe multiprotéique (Pratt et Toft, 1997; Ylikomi et al., 1998), comprenant des protéines de choc thermique HSP (*heat shock protein*) et des immunophilines. Cette interaction stabilise le récepteur en absence de ligand, en le maintenant sous une forme monomérique latente stable. La fixation du ligand au récepteur permet la translocation nucléaire et la dissociation du complexe. L'*holo*-récepteur dimérique active la transcription des gènes cibles, après s'être fixé sur les séquences d'ADN spécifiques situées dans le promoteur.

5.1.1 Le complexe récepteur-chaperons et mécanisme d'assemblage

Le complexe multimérique renfermant le récepteur non transformé a été caractérisé *in vitro*. Il contient au moins une dizaine de chaperons, dont cinq sont obligatoires pour la maturation de GR (Dittmar et Pratt, 1997) et de PR (Kosano et al., 1998). Trois facteurs obligatoires sont exprimés de manière constitutive. Il s'agit des protéines HSP70, DnaJ/HSP40 et HSP90. Deux cochaperons sont également nécessaires : p23, qui se lie à HSP90 et la protéine Hop (*HSP70/HSP90 organizing protein*), facteur pontant entre HSP70 et HSP90. Deux cochaperons additionnels ont été identifiés Hip (*Hsp70-interacting protein*) et BAG-1. Ces protéines ne sont toutefois pas nécessaires pour maintenir la capacité de liaison de l'hormone *in vitro*. Quatre autres protéines, non essentielles *in vitro*, appartiennent au complexe natif de récepteur non transformé et se lient à HSP90 : ces protéines appartiennent à la famille des immunophilines, liant les immunosuppresseurs tels que le FK506, la rapamycine et la cyclosporine A. Ce sont également des molécules ubiquitaires. Les immunophilines FKBP51, FKBP52, CyP-40 et la phosphatase PP5, possèdent des motifs TPR (*tetratricopeptide*). Ces protéines présentent une activité peptidyl-prolyl-isomérase intervenant dans le repliement des protéines (Schmid et al., 1993), mais n'ont pas été impliquées dans le repliement de GR (Owens-Grillo et al., 1995). Elles possèdent également un domaine de liaison de la calmoduline dans leur partie C-terminale. Un rôle dans l'import nucléaire de GR a été suggéré pour FKBP52 (Czar et al., 1995). Les immunophilines entrent en compétition avec Hop pour la liaison à HSP90 durant la maturation du complexe (Owens-Grillo et al., 1996). La Figure 11 illustre le mécanisme d'assemblage proposé pour GR (Dittmar et Pratt, 1997) et PR (Kosano et al., 1998).

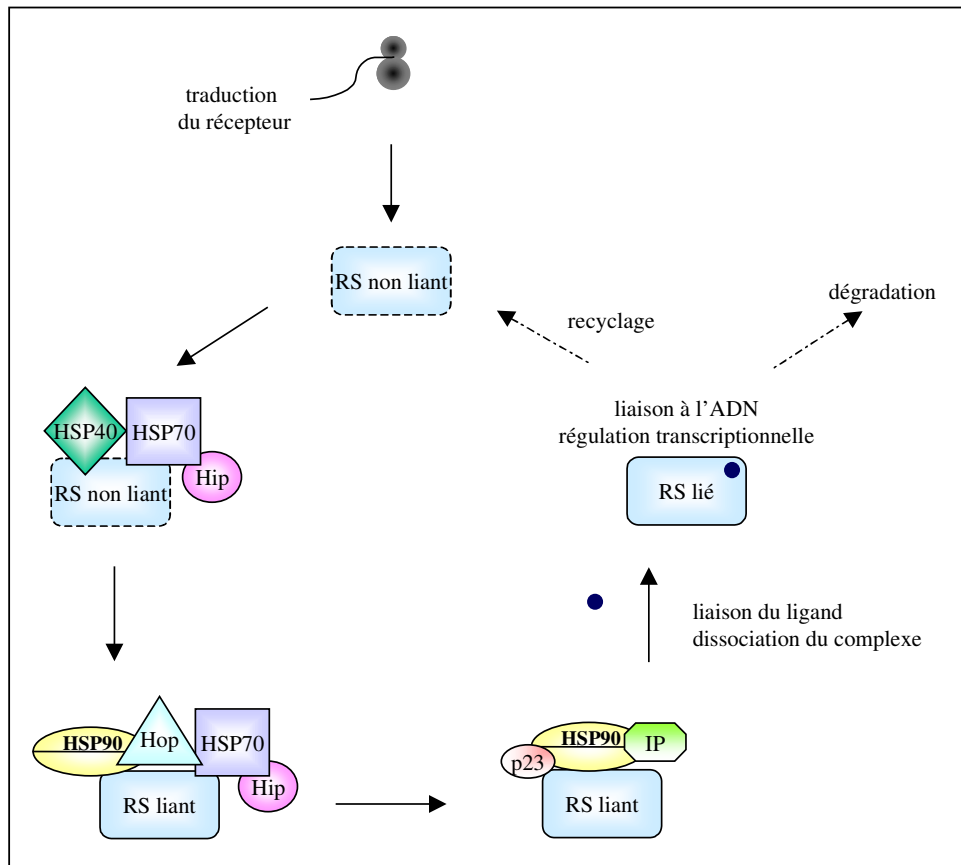


Figure 11: Les différentes étapes de « chaperonage » des récepteurs stéroïdiens.

Un mécanisme d'assemblage de complexes chaperons a été proposé pour GR (Dittmar et Pratt, 1997) et PR (Kosano et al., 1998). Dans le lysat de réticulocyte, le récepteur stéroïdien libre s'associe d'abord avec HSP70 et HSP40. Ces deux chaperons synergisent pour faciliter le repliement coordonné de la protéine-substrat (Fink, 1999). Cette étape précoce dépend de l'activité ATPasique d'HSP70 et conduit au recrutement ADP-dépendant de Hip et de Hop au niveau d'HSP70. Hop lie HSP90 de façon indépendante et fonctionne en quelque sorte comme un adaptateur pour amener HSP90 au récepteur stéroïdien. En présence d'ATP, p23 stabilise HSP90 au niveau du domaine de fixation de l'hormone du récepteur, maintenant ainsi une conformation de haute affinité pour le ligand. Dans ce complexe mature de récepteur non transformé, Hop est déplacé et remplacé par une autre protéine à motif TPR (FKBP52, FKBP51 ou CyP-40 selon le type cellulaire). Dans un système reconstitué *in vitro*, le complexe HSP70-Hop-HSP90 est suffisant pour maintenir le récepteur stéroïdien dans un état activable par le ligand, ce qui n'exclut pas un rôle potentiel pour les autres protéines dans un environnement cellulaire plus approprié. Outre le rôle de chaperonage, ces protéines pourraient être impliquées dans la translocation nucléaire, le recyclage et la dégradation des récepteurs stéroïdiens.

5.1.2 Rôles potentiels du « chaperonage »

Différents rôles pour l'interaction entre HSP90 et les récepteurs stéroïdiens ont été suggérés, mais restent néanmoins à confirmer *in vivo* :

- le repliement du récepteur (Nathan et Lindquist, 1995; Pratt et Toft, 1997),
- la capacité de fixation du ligand (Picard et al., 1990; Pratt et Toft, 1997),
- la régulation de la liaison à l'ADN : HSP90 est capable de dissocier les récepteurs ER (Sabbah et al., 1996) et GR (Kang et al., 1999) liés à l'ADN.
- la translocation nucléaire : les chaperons influencent le transport entre le cytoplasme et le noyau des récepteurs stéroïdiens (DeFranco, 1999).
- la dégradation ou le recyclage : le traitement à la geldanamycine, un inhibiteur de l'activité ATP-asiqque d'HSP90, provoque la perte de la capacité de liaison de GR et de PR, qui pourrait être attribuée à un mécanisme de dégradation impliquant le protéasome 20S (Smith et al., 1995; Whitesell et Cook, 1996).

5.2 Localisation nucléaire et contrôle de l'expression génique

Dans le cas des récepteurs non stéroïdiens, tels que les récepteurs des rétinoïdes (RXR et RAR) ou de l'hormone thyroïde (TR), la localisation est nucléaire en l'absence de ligand. Ils sont déjà fixés sur les séquences cibles d'ADN, aussi bien sous forme d'homodimères que d'hétérodimères. En absence de ligand, ils répriment la transcription des gènes cibles. La fixation du ligand modifie la structure des récepteurs et active alors la transcription des gènes cibles.

6. Régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires régulent l'expression des gènes cibles en réponse à la liaison de l'hormone, de modifications post-traductionnelles et par interférence avec d'autres facteurs de transcription. De récents progrès ont permis de mieux comprendre cette voie de signalisation, ainsi que les bases moléculaires de la signalisation croisée.

De nombreuses protéines corégulatrices (coactivateurs et corépresseurs) sont impliquées dans la répression et l'activation des gènes cibles. Ces cofacteurs ne peuvent pas lier l'ADN directement. Par contre, ils se fixent aux récepteurs nucléaires, qui sont liés au

niveau des régions promotrices des gènes cibles et affectent ainsi leur taux de transcription (Horwitz et al., 1996; Jenster, 1998; Koenig, 1998; Xu et al., 1999; Bevan et Parker, 1999; Glass et al., 1997; Leo et Chen, ; McKenna et al., 1999a; Glass et Rosenfeld, ; McKenna et al., 1999b; Robyr et al., 2000).

La régulation transcriptionnelle est également médiée par la modification de la structure chromatinienne. La chromatine ouverte (euchromatine) facilite l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle basale et stimule le taux de transcription. Par contre, la structure hautement ordonnée de la chromatine (hétérochromatine) empêche la fixation de la TBP (*TATA-binding protein*) et réprime la transcription. La structure de la chromatine peut être altérée par la modification covalente des histones du nucléosome. L'acétylation des histones diminue les interactions entre l'ADN et le nucléosome, en diminuant la charge nette positive des histones. Ce phénomène est réversible et implique une activité enzymatique de déacétylation. Les deux activités d'histone acétyl-transférase HAT et d'histone déacétylase HDAC sont respectivement associées aux coactivateurs et aux corépresseurs, procurant un lien enzymatique aux mécanismes d'activation et de répression transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires.

La régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires fait intervenir de nombreux acteurs, portant souvent des fonctions redondantes, et dont le rôle n'a pas encore été clairement établi *in vivo*.

6.1 Facteurs de transcription généraux

Les récepteurs nucléaires régulent la transcription en se fixant sur les éléments de réponse hormonale, pouvant se trouver à plusieurs kilobases du site d'initiation de la transcription. Les récepteurs, associés à leurs corégulateurs, influencent l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription. Des contacts directs entre les récepteurs et certains facteurs généraux de la transcription ont été mis en évidence, mais leur fonctionnalité reste à déterminer. Des facteurs tels que TBP (Fondell et al., 1993), et des facteurs associés TAF_{II}110, TAF_{II}28 (May et al., 1996), TAF_{II}30 (Jacq et al., 1994), TAF_{II}55 (Lavigne et al., 1999), TAF_{II}135 (Mengus et al., 1997), TFIIF, TFIIB (McKenna et al., 1999) et TFIIF (Rochette-Egly et al., 1997) ont été impliqués dans des interactions directes avec différents récepteurs nucléaires.

6.2 Coactivateurs

Les premiers coactivateurs découverts répondaient aux critères suivants :

- interaction avec les récepteurs nucléaires au niveau du domaine d'activation de la transcription AF-2, de manière ligand-dépendante,
- augmentation de l'activité du gène rapporteur de façon AF-2-dépendante, mais non en absence de récepteur. Bien qu'il contienne également une fonction d'activation autonome, un coactivateur ne peut être recruté au niveau du promoteur, en absence de récepteur,
- interaction avec les composés de la machinerie transcriptionnelle basale.

Le mécanisme d'action de ces coactivateurs classiques se base sur l'interaction d'une hélice avec une surface du domaine E (voir paragraphes 0 et I.A.6.2.2). Les bases moléculaires de l'agonisme et de l'antagonisme décrites dans ce travail se réfèrent uniquement à ce type de coactivateurs. Depuis, d'autres coactivateurs ont été découverts. Certains d'entre eux peuvent interagir avec différentes régions des récepteurs, par exemple, le domaine A/B (AF-1) (voir paragraphes I.A.6.2.3 et I.A.6.2.4 ; Jackson et al., 1997 ; Lanz et al., 1999), le domaine E (AF-2) ou encore la région charnière. Leurs interactions peuvent être modulées par des ligands agonistes/antagonistes partiels ou encore être entièrement ligand-indépendante.

6.2.1 Identification des coactivateurs

L'existence des coactivateurs a d'abord été suggéré par des expériences d'interférence (*squelching*). Dans ces expériences (par transfection transitoire de cellules de mammifères), la présence d'un récepteur actif inhibait le fonctionnement d'un second récepteur de manière dose-dépendante. Ces données ont été interprétées comme le résultat de la séquestration des coactivateurs (ou facteurs de transcription intermédiaires TIF), par un excès de récepteurs nucléaires (Meyer et al., 1989).

La première preuve de l'existence des coactivateurs provient d'une approche biochimique, utilisant le domaine E ligandé du ER, en fusion à la glutathion-S-transférase, comme appât dans une expérience de *GST pull-down*, qui a permis d'identifier les protéines ERAP (*estrogen receptor-associated proteins*) : ERAP-140 et ERAP-160 (Halachmi et al.,

1994). L'interaction nécessite la présence d'un ligand et d'un domaine E fonctionnel. Des ligands antagonistes empêchent l'interaction.

Le développement de techniques comme celle du double hybride dans la levure et le criblage de banque d'expression a permis d'identifier un grand nombre de coactivateurs (et également de corépresseurs), qui transmettent le signal des récepteurs nucléaires à leurs cibles moléculaires. Une famille de coactivateurs a été identifiée : la famille SRC/p160, qui se subdivise en trois groupes :

- SRC-1/NcoA-1 (Onate et al., 1995),
- SRC-2/NcoA-2/GRIP1 (Hong et al., 1996)/TIF2 (Voegel et al., 1996),
- SRC-3/pCIP(Torchia et al., 1997)/RAC3 (Li et al., 1997)/ACTR (Chen et al., 1997)/AIB-1 (Anzick et al., 1997)/TRAM-1 (Takeshita et al., 1997).

Il y a environ 40% de similarité de séquence parmi les membres de cette famille, ce qui suggère une certaine redondance fonctionnelle. Mais on note également dans certains cas une forte spécificité : par exemple, SRC-3 augmenterait sélectivement l'activité transcriptionnelle de ER α , mais non celle de ER β (Suen et al., 1998).

6.2.2 Caractérisation structurale de la famille SRC/p160

Le clonage des coactivateurs SRC/p160 a été suivi par leur caractérisation structurale. Ils présentent tous des caractéristiques communes, à savoir la présence d'un domaine PAS (*Per-Arnt Sim homology*) / bHLH (*basic helix loop helix*) à l'extrémité N-terminale. Ce domaine intervient dans la formation de complexes multimériques *in vivo* (McKenna et al., 1998). Ils possèdent également tous de courtes séquences signature LXXLL (L pour leucine et X, un acide aminé quelconque) adoptant une structure en hélice- α amphipatique (cf. paragraphe 0). Des peptides, contenant ce motif, se lient aux récepteurs nucléaires en complexe avec des ligands agonistes et sont appelées *NR-boxes* (Heery et al., 1997; Torchia et al., 1997; Le Douarin et al., 1996). Le rôle de ces motifs dans l'interaction ligand-dépendante avec les récepteurs nucléaires a d'abord été suggérée par leur conservation dans les régions centrales de tous les membres de la famille SRC/p160 (Li et al., 1997; Onate et al., 1995; Torchia et al., 1997; Voegel et al., 1998). Des mutations dans ces motifs abolissent l'interaction avec les récepteurs nucléaires (Heery et al., 1997). Par conséquent, ces motifs

sont nécessaires et suffisants pour l'interaction directe avec les récepteurs nucléaires *in vivo*. Les *NR-boxes* sont également présents dans d'autres coactivateurs des récepteurs nucléaires, tels TRAP (*TR-associated proteins*) (Fondell et al., 1996) ou p300/CBP (Heery et al., 1997).

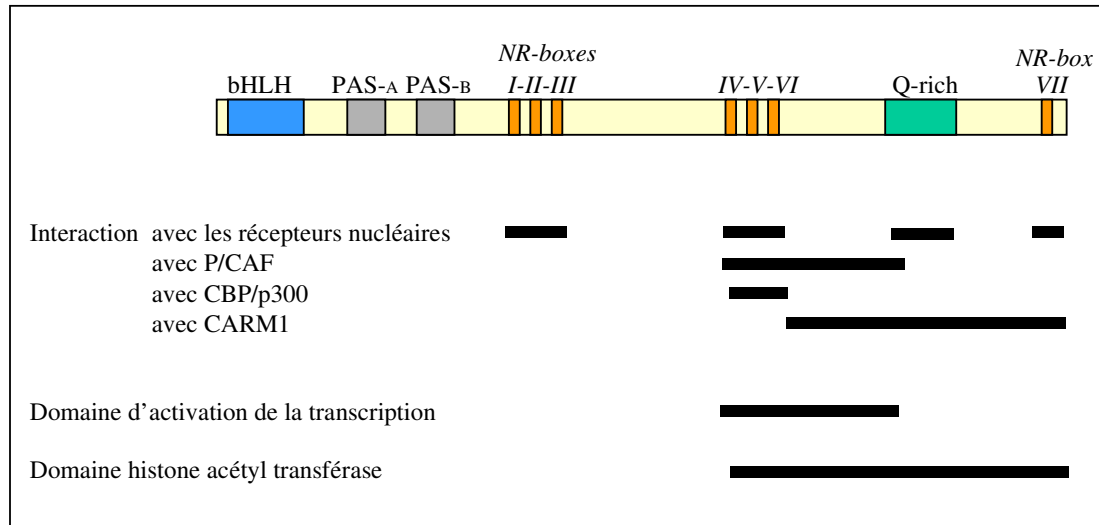


Figure 12 : Organisation structurale des coactivateurs de la famille p160.

La région N-terminale contient des domaines hautement conservés bHLH et PAS A/B (ces domaines sont présents dans de nombreux facteurs de transcription et joue un rôle dans la dimérisation, et l'interaction avec l'ADN en ce qui concerne bHLH). Dans la région centrale se trouve des domaines d'interaction avec les récepteurs nucléaires et d'activation de la transcription, contenant chacun trois motifs LXXLL ou *NR-box*. SRC-1 possède un motif additionnel à l'extrémité C-terminale. La région C-terminale contient un domaine riche en glutamines (Q-rich) impliqué dans diverses interactions protéine-protéine (en particulier avec la région A/B de certains récepteurs). Les domaines permettant l'interaction avec P/CAF (*CBP-associated factor*), CBP/p300 (*cAMP response element binding protein*) et CARM1 (*coactivator-associated-arginine methyltransferase 1*). Ce dernier est impliqué dans la méthylation de l'ADN, une des nombreuses fonctions enzymatiques présentes dans les complexes de coactivation.

Il est remarquable que certains coactivateurs possèdent plusieurs motifs LXXLL (il y en a 7 dans SRC-1), dont la plupart semble être fonctionnels *in vitro*, en terme de capacité de liaison aux récepteurs nucléaires. Cette multiplicité reflète soit la redondance du système, soit la spécificité de l'interaction (Ding et al., 1998). Il existe des arguments en faveur de la spécificité de l'interaction. En effet, des expériences de mutagenèse ont montré l'importance des résidus jouxtant le motif LXXLL, du côté N- ou C-terminal. Par conséquent, mêmes les coactivateurs homologues tels que SRC-1/TIF2/RAC3 ont des préférences pour certains

récepteurs nucléaires. Ainsi, les récepteurs TR et ER se lient préférentiellement au motif *NR-box II*, GR et AR au motif *III* de p160 (Darimont et al., 1998; Kalkhoven et al., 1998; Ding et al., 1998; Voegel et al., 1998). En utilisant des motifs chimères pour l'étude de l'interaction avec ER, il a été montré que les résidus basiques du côté N-terminal du motif *II* étaient nécessaires pour la liaison préférentielle de ce motif (Mak et al., 1999). Mais ces résidus ne semblent pas contacter la surface AF-2, d'après la structure cristallographique.

De plus, la structure cristallographique de PPAR γ lié à un fragment de SRC-1 portant deux motifs LXXLL (Nolte et al., 1998) montre que le fragment englobe le dimère. Dans ce complexe, chacun des motifs est positionné sur la surface AF-2 d'un monomère. La présence de plusieurs motifs de liaison sur un seul coactivateur pourrait donc être déterminant dans la sélectivité de complexes de récepteurs homo- ou hétérodimériques.

6.2.3 Le rôle des coactivateurs dans la fonction AF-1

Ajoutant à la complexité du système, l'interaction entre le motif LXXLL des coactivateurs et le domaine E des récepteurs nucléaires n'est pas la seule façon de recruter les coactivateurs. En effet, il a été montré que la fonction AF-1 de ER était capable d'interagir avec les coactivateurs p160 (Webb et al., 1998). Ce type d'interaction, quoique beaucoup plus faible que celle de la fonction AF-2, pourrait être suffisante pour recruter des coactivateurs en présence d'antagonistes partiels tels que le tamoxifène. De telles interactions ont également été décrites pour d'autres récepteurs stéroïdiens. Les coactivateurs de la famille de p160, tels SRC-1, seraient recrutés par AF-1, étant donné que des mutations dans les motifs LXXLL n'empêchent pas l'activité transcriptionnelle de ces récepteurs. Cette interaction a été caractérisée ; elle implique une région riche en glutamines de SRC-1 (Bevan et al., 1999; Webb et al., 1998).

La fonction AF-1 exerce une activité prédominante dans AR et GR, contrairement à ER, ceci en se basant sur des expériences dans des cellules transfectées. Il est envisageable que la fonction AF-1 soit prédominante dans certains récepteurs nucléaires, de par une capacité d'interaction accrue avec les coactivateurs p160, par rapport aux récepteurs dont l'activité dépendrait uniquement de la fonction AF-2. Par contre, *in vivo*, les rôles respectifs des fonctions AF-1 et AF-2 dans les réponses biologiques ne sont pas connus. Enfin, il a été

montré que les deux fonctions interagissaient de façon synergique et que ce mode de fonctionnement impliquait le recrutement coopératif de coactivateurs dans le cas de ER α (Benecke A et al., 2000). Les fonctions AF-1 et AF-2 ne seraient donc pas indépendantes l'une de l'autre dans le contexte du récepteur entier (Scheller et al., 1998). Elles constitueraient les deux parties d'une seule et même interface de recrutement de coactivateurs, dont l'intégrité dépendrait alors de la fixation du ligand.

6.2.4 Coactivation ligand-indépendante

Deux mécanismes de coactivation ligand-indépendante ont été découverts chez ER. Le premier est stimulé par la phosphorylation de résidus sérines dans le domaine A/B par les kinases Ras-Raf-MAPK activés par les récepteurs membranaires (Bunone et al., 1996; Kato et al., 1995). La phosphorylation de ces résidus permet le recrutement du coactivateur SRC-1 en absence de ligand, dans le cas de ER β (Tremblay et al., 1999a). Le deuxième implique la cycline D1, facteur pontant entre SRC-1 et l'apo-récepteur ER (Neuman et al., 1997; Zwijsen et al., 1997; Zwijsen et al., 1998). La cycline D1 est également capable de recruter un coactivateur à activité histone-acétyltransférase, P/CAF (McMahon et al., 1999).

L'activité des récepteurs peut donc être modulée de différentes façons, et répondre non seulement à la signalisation hormonale, mais également à d'autres voies, telles que celles des facteurs de croissance et du cycle cellulaire.

6.2.5 Mode d'action des coactivateurs

a) Modification de la structure chromatinienne

Les coactivateurs recrutent ou appartiennent à des complexes multimériques à activité d'histone acétyl-transférase. Ils acétylent certaines lysines localisées à l'extrémité N-terminale des histones. La diminution des charges positives affaiblit l'interaction avec l'ADN chargé négativement, et déstabilise ainsi la structure chromatinienne, ce qui crée un environnement plus accessible pour la machinerie transcriptionnelle de base (Figure 13).

Les coactivateurs de la famille SRC/p160 recruteraient des cofacteurs additionnels, tels que P/CAF et CBP/p300, qui sont également capables d'interagir avec les récepteurs nucléaires, et les uns avec les autres (Chakravarti et al., 1996; Hanstein et al., 1996; Yao et al., 1996). P/CAF et CBP/p300 stimulent la transcription par le biais de leur activité HAT (Bannister et Kouzarides, 1996; Ogryzko et al., 1996; Yang et al., 1996). De plus, P/CAF et CBP/p300 serait également capable d'acétyler les facteurs de transcription TFIIEb et TFIIF (Imhof et al., 1997).

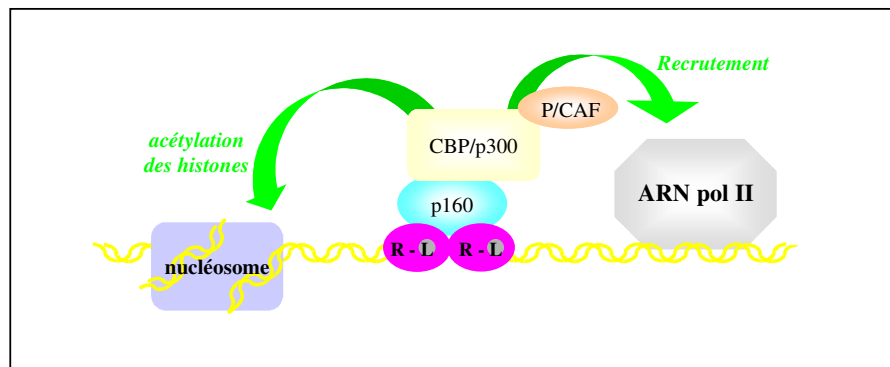


Figure 13 : Activation de la transcription par les holo-récepteurs.

Après fixation du ligand, les récepteurs nucléaires subissent un changement conformationnel qui leur permet de recruter des cofacteurs impliqués dans l'activation transcriptionnelle. Les coactivateurs interviennent à deux niveaux : le remodelage de la chromatine (la déstabilisation des contacts histone-ADN) et le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de l'ARN polymérase II pour effectuer la transcription des gènes-cibles.

b) Recrutement de l'ARN-polymérase II

Un complexe de coactivation se liant à VDR, à TR et probablement à d'autres récepteurs nucléaires, a été identifié récemment (Fondell et al., 1996; Rachez et al., 1998). Ce complexe, appelé DRIP (*VDR interacting proteins*) ou TRAP (*thyroid hormone receptor-associated proteins*), est recruté par la fonction AF-2 en réponse à la liaison du ligand agoniste, par le biais d'une seule sous-unité (DRIP205/TRAP220) possédant un motif LXXLL. Cette sous-unité permet l'ancrage ligand-dépendant des 14 à 16 autres protéines de DRIP/TRAP (qui semble être un complexe préformé). Différentes sous-unités de ce complexe sont homologues aux protéines de Médiateur (Gu et al., 1999; Rachez et al., 1998), un complexe qui s'associe, en compagnie de protéines SRB (*suppressor of carboxy-terminal*

repeat domain B), à l'ARN polymérase II, au niveau de la région C-terminale CTD (*carboxy-terminal repeat domain*). Il semblerait donc que le complexe DRIP/TRAP soit capable de recruter l'ARN-polymérase II, cette interaction pouvant impliquer des sous-unités du complexe Médiateur/SRB.

Le complexe DRIP/TRAP pourrait fonctionner indépendamment ou en séquence avec le système p160, CBP et P/CAF. Après le remodelage de la chromatine par les coactivateurs à activité HAT, le complexe DRIP/TRAP permettrait le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. Dans ce modèle, le mécanisme de la dissociation du premier complexe et la liaison du second n'est pas connu.

6.3 Cointégrateurs

De plus en plus, les actions indirectes des récepteurs nucléaires sont identifiées dans la régulation de l'expression génétique. Différentes cascades de signalisation communiquent pour réajuster leur réponse à d'autres signaux, ce qui permet d'établir un réseau fonctionnel d'intégration de l'information.

Des exemples de signalisation croisée sont cités ci-dessous :

- la transrépression entre les récepteurs nucléaires et AP1 (Nagpal et al., 1995),
- l'interférence entre les récepteurs nucléaires et NF- κ B (Sheppard et al., 1998),
- les modifications post-traductionnelles par phosphorylation des récepteurs nucléaires (dans les régions A/B, E et F) par des kinases telles PKA (Okamoto et al., 1999), ou MAPK (*mitogen activated protein kinase*) activés par la voie des récepteurs membranaires des facteurs de croissance (Elbrecht et al., 1999).

Un lien a pu être établi entre les voies de signalisation suivantes :

- p53 intervenant dans l'apoptose (Chen et al., 1997),
- NF- κ B impliqué dans les réponses anti-inflammatoires (Perkins et al., 1997),
- AP1 dans la prolifération cellulaire (Fronsdal et al., 1998),
- et enfin les récepteurs nucléaires impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques (Chakravarti et al., 1996).

En effet, CBP (*CREB-binding protein*)/p300, d'abord caractérisée pour CREB (*cAMP-response element binding protein*) sur les promoteurs régulés par l'AMPc, peut interagir directement avec ces différentes protéines. La liaison avec les récepteurs nucléaires peut être directe, grâce à ses *NR-boxes* (Heery et al., 1997), ou indirecte, via les coactivateurs de la famille SRC/p160 (Smith et al., 1996) (Figure 12). Il a été, par exemple, montré que la transrépression entre les récepteurs nucléaires et AP1 pouvait être surmontée en surexprimant CBP, dans les cellules transfectées (Fronsdal et al., 1998). CBP est donc considérée comme un cointégrateur de ces différentes voies de signalisation.

6.4 Corépresseurs

Un corépresseur, au vrai sens du terme, doit remplir les critères suivants. D'abord, il doit interagir directement avec le récepteur en absence de ligand, ce qui doit stimuler la répression de l'activité basale d'un gène rapporteur. Un corépresseur doit également interagir avec la machinerie transcriptionnelle basale et posséder un domaine de répression autonome.

6.4.1 Identification des corépresseurs

La répression transcriptionnelle active ou *silencing* du niveau basal de l'expression génique a été mise en évidence pour les récepteurs non stéroïdiens, capables de diminuer l'activité basale d'un promoteur en absence de ligand. Des approches similaires à la caractérisation des coactivateurs ont été appliquées aux corépresseurs, des protéines qui se dissocient, lors de la fixation d'un ligand agoniste (Burris et al., 1995). À ce jour, cinq différents corépresseurs ont été identifiés : SMRT (*Silencing mediator for retinoid et thyroid hormone receptor*)/TRAC-2, N-CoR (*Nuclear receptor repressor*)/RIP13, Sun-CoR, SSn6/Tup1, TRUP (pour revue Robyr et al., 2000).

En absence de ligand, les récepteurs stéroïdiens sont piégés dans des complexes avec certaines protéines chaperons, dont la protéine de choc thermique HSP90, et certaines immunophilines (Pratt et Toft, 1997). La fixation d'antagonistes de PR et de ER, respectivement RU486 et 4-hydroxytamoxifène, provoquent la dissociation des complexes avec les chaperons, la liaison à l'ADN et la dimérisation de ces récepteurs, sans toutefois stimuler la transactivation. Ces ligands agissent comme des agonistes ou des antagonistes

selon le contexte cellulaire et le promoteur. Tandis que l'effet antagoniste de la fonction ligand-dépendante AF-2 a été attribué à la dissociation des coactivateurs (Cavailles et al., 1994; Halachmi et al., 1994; Onate et al., 1995; Shiau et al., 1998), il a été suggéré que ces ligands pourraient également induire une répression active de la transcription des gènes cibles. L'association avec des corépresseurs leur permettrait de bloquer, non seulement AF-2, mais également la fonction ligand-indépendante AF-1. Par conséquent, l'observation d'une activité variable des ligands agonistes/antagonistes mixtes en fonction des types cellulaires (Berry et al., 1990; McDonnell et al., 1995) pourrait être due à des interactions différentielles avec les coactivateurs et les corépresseurs (Zhang et al., 1998).

6.4.2 Recrutement des corépresseurs

Les corépresseurs tels que SMRT et N-CoR (Smith et al., 1997b), interagiraient avec les apo-récepteurs au niveau du domaine E, par le biais de motifs conservés *CoRNR-box* LXX[I/H]IXXX[I/L]. Ces motifs ressemblent aux motifs LXXLL des coactivateurs, et formeraient également des hélices- α (Hu et Lazar, 1999; Nagy et al., 1999; Perissi et al., 1999). De même que pour les coactivateurs, l'espacement critique des résidus hydrophobes pourrait constituer un déterminant structural de la spécificité d'interaction entre les aporécepteurs et les corépresseurs. Nous ne disposons pas de données structurales quand au mode de liaison de ce motif au niveau du domaine E des récepteurs nucléaires. Toutefois, la similarité des motifs des coactivateurs et des corépresseurs, et la capacité de l'hélice H12 à inhiber fortement l'interaction des corépresseurs, après fixation du ligand, suggèrent que les coactivateurs et les corépresseurs utilisent une interface chevauchante à la surface du domaine E des récepteurs nucléaires. Des expériences de mutagenèse suivies de tests de liaison et de double hybride dans les cellules de mammifère, ont suggéré que les hélices H3, H4-5 et H11 du domaine E étaient impliquées dans la liaison des corépresseurs (Horlein et al., 1995; Burke et al., 1998; Renaud et al., 2000; Zamir et al., 1997).

Il a été proposé que l'hélice portant le motif *NCoRNR-box* était incapable de se positionner dans le sillon des coactivateurs, en présence de ligand, parce qu'elle était trop longue pour être maintenue par la « pince électrostatique », constituée par des résidus chargés des hélices H3 et H12 (Perissi et al., 1999). De plus, la liaison des coactivateurs nécessite une conformation particulière de cette hélice, alors que les corépresseurs peuvent se fixer en son

absence (liaison à des mutants de délétion de H12). Par contre, l'hélice H12 est requise pour induire la dissociation des corépresseurs après la liaison du ligand. Le rôle joué par l'hélice H12, flexible, est donc fondamental dans la discrimination entre coactivateurs et corépresseurs (Glass et Rosenfeld, ; Renaud et al., 2000). Le mécanisme proposé est celui de l'exclusion mutuelle de ces deux types de cofacteurs : lors de la fixation du ligand, l'hélice H12 agirait comme un « levier » pour enlever le corépresseur.

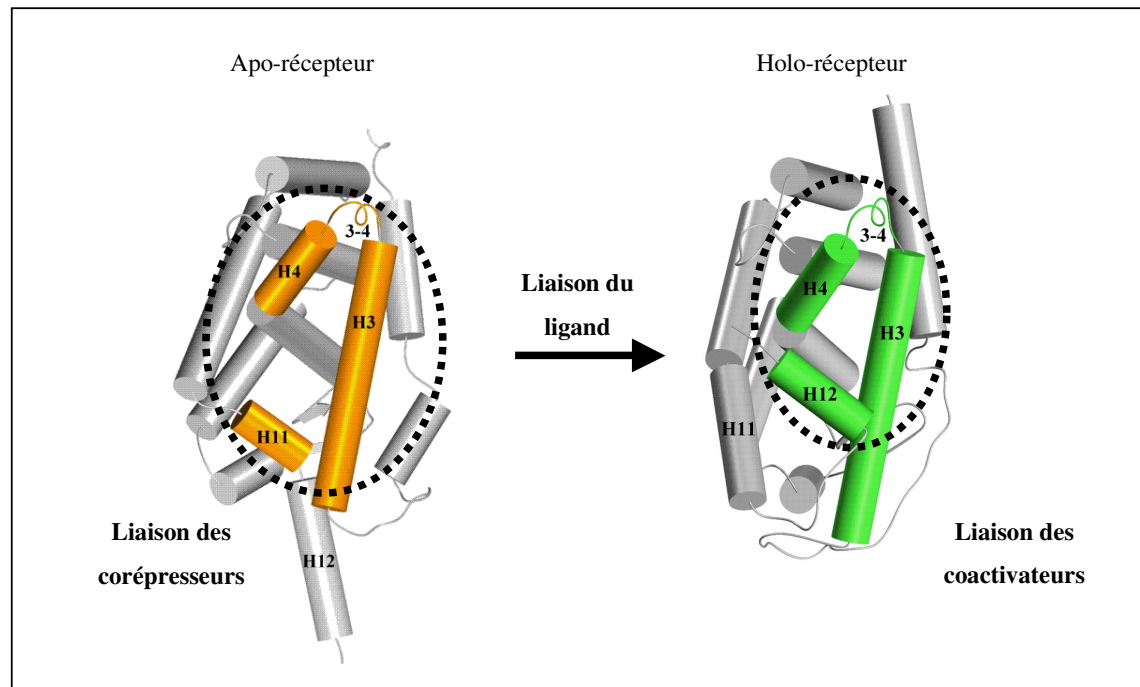


Figure 14 : Les surfaces de reconnaissance des corépresseurs et des coactivateurs (Renaud et al., 2000).

En absence de ligand, le corépresseur serait lié au domaine E des récepteurs nucléaires au niveau de H3, L3-4, H4 et H11. Qu'importe la position de H12, elle n'intervient pas dans l'interface. La structure cristallographique de l'apo-RXR est représentée (Bourguet et al., 1995) pour illustrer la structure d'un apo-récepteur. La liaison du ligand provoque un changement conformationnel, qui positionne H12 sur le cœur de la protéine. Ceci est illustré par la structure de RAR lié à l'acide rétinoïque tout-trans (Renaud et al., 1995). Le positionnement de H12 chasse le corépresseur et permet le recrutement du coactivateur.

6.4.3 Mode d'action des corépresseurs

Les corépresseurs contiennent ou recrutent, par le biais de facteurs auxiliaires (notamment le cointégrateur Sin3 (*switching independent*)), un complexe HDAC de

déacétylation des histones. Ce complexe favorise l'état compact, et donc réprimé, de la chromatine (Figure 15). Tandis que les coactivateurs acétylent les histones et affaiblissent ainsi les interactions des queues N-terminales des histones avec l'ADN nucléosomal, les corépresseurs inversent ce processus (Alland et al., 1997; Laherty et al., 1997; Lavinsky et al., 1998).

Une interaction directe entre corépresseurs et certains composés de la machinerie transcriptionnelle a également été mise en évidence. Des expériences *in vivo* et *in vitro* ont montré l'interaction entre N-CoR et TFIIB, TAF_{II}32 et TAF_{II}70 (Muscat et al., 1998; Wong et Privalsky, 1998). Or la présence de N-CoR empêche l'interaction physique entre TFIIB et TAF_{II}32 qui est requise pour l'initiation de la transcription.

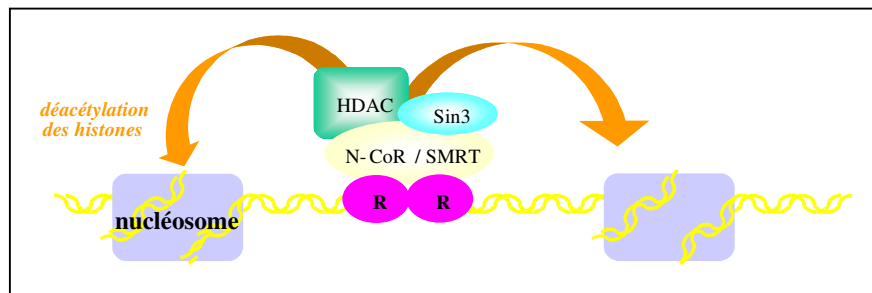


Figure 15 : Répression transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires.

Le recrutement de corépresseurs et l'induction de l'état compact de la chromatine a lieu en absence de ligand (ou en présence d'antagoniste).

6.5 Structure de la chromatine

L'arrangement compact des nucléosomes en chromatine constitue une barrière pour la pré-initiation de la transcription, probablement en gênant l'accès de l'ARN-polymérase II et des facteurs de transcription de base (Kadonaga, 1998). En effet, le mécanisme de régulation transcriptionnelle est étroitement lié à l'état de l'ADN. Contrairement au complexe de préinitiation, les récepteurs nucléaires sont capables de se fixer à l'ADN de la chromatine, et de le maintenir sous forme condensée, grâce au recrutement de corépresseurs et de protéines associées. Par contre, au contact d'un ligand agoniste, les récepteurs activent la transcription en recrutant des coactivateurs, qui favorisent le remodelage de la chromatine. Ceci nécessite

un échange de corégulateurs, qui est contrôlé par le changement conformationnel induit lors la liaison du ligand (Glass et Rosenfeld, ; Renaud et al., 2000).

La fluidité de la chromatine implique des complexes multiprotéiques qui nécessitent soit l'hydrolyse de l'ATP, soit certaines modifications covalentes des extrémités des histones pour modifier la structure hautement ordonné des nucléosomes.

6.5.1 Le remodelage ATP-dépendant de la chromatine

Les études génétiques sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont permis d'identifier les composants du complexe SWI (*switching mating type*) / SNF (*sucrose non fermenting*) (Yoshinaga et al., 1992) qui altèrent la structure nucléosomale de façon ATP-dépendante. Des mutations dans les gènes *swi/snf* ont de nombreux effets sur la transcription et empêchent le fonctionnement des récepteurs nucléaires introduits dans ce système, la levure étant dépourvue de cette famille de protéines (Yoshinaga et al., 1992). Les supprimeurs de ces mutations sont localisés sur les gènes des histones et des protéines HMG (*high mobility group*), impliqués dans la structure chromatinienne. Les homologues de ces complexes de levure ont été identifiés chez les eucaryotes supérieurs, tels que les complexes Brahma chez la drosophile et BRG-1 (*Brahma-related gene*) chez l'homme. Ces complexes possèdent de nombreuses sous-unités communes, incluant une protéine à domaine de type hélicase. Les complexes de type SWI/SNF utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour altérer les interactions entre les histones et l'ADN, et permettent ainsi le déplacement ou la dislocation du nucléosome. D'autres complexes hydrolysant l'ATP ont été identifiés chez les eucaryotes, comme NURF (*nucleosome remodelling factor*), CHRAC (*chromosome accessibility complex*) ou RSF (*remodelling et spacing factor*). Ces quatre complexes partagent la même sous-unité ISWI (*imitation of switch*) qui porte une fonction d'ATP-ase.

6.5.2 Les modifications covalentes des histones

Contrairement aux complexes de remodelage ATP-dépendant, les enzymes que nous allons décrire dans cette partie provoquent la modification covalente du nucléosome. Les extrémités N-terminales des histones du cœur des nucléosomes sont modifiées de façon covalente par phosphorylation, acétylation, méthylation, ubiquitination et ADP-ribosylation

(Strahl et Allis, 2000). L'association entre l'acétylation des histones et l'activation génique a beaucoup été étudié, mais il n'était pas clair comment ce phénomène était associé à l'expression ciblée de certains gènes. L'implication des complexes ADA (*alteration/deficiency in activation*)-GCN5 (*general control nonrepressed protein 5*) dans l'activité transcriptionnelle de GR a d'abord été démontrée en utilisant la génétique de levure. La délétion des gènes *ada2*, *ada3* ou *gcn5*, provoque une diminution de l'activité de GR. Les produits de ces gènes, et d'autres, participent à un complexe multimérique à activité d'histone acétyl-transférase HAT, le complexe SAGA (Wallberg et al., 1999).

D'autres protéines possédant une activité HAT, interagissent avec les récepteurs nucléaires, et ont déjà été décrites en tant que coactivateurs. Il s'agit des protéines p160, CBP/p300, P/CAF (*p300/CBP-associated factor*) (Collingwood et al., 1999; Glass et Rosenfeld, 2000). D'autres activités, que nous n'allons pas développer ici, ont été identifiées dans les complexes de coactivation :

- activité méthyl-transférase avec CARM1 (Elbrecht et al., 1999),
- activité protéine-kinase avec TIF1 α (Fraser et al., 1998),
- activité hélicase avec SUG1/TIF1 (Fraser et al., 1997),
- activité ubiquitine-protéine-ligase avec E6-AP (Nawaz et al., 1999).

Les récepteurs nucléaires sont donc entourés d'un grand nombre d'activités enzymatiques, capables de changer leur environnement chromatinien au niveau du promoteur (Felsenfeld, 1996), modifiant ainsi l'activité de la machinerie basale. L'existence d'un grand nombre de cofacteurs, regroupés en différents complexes, semble indiquer que ces protéines n'interviennent pas uniquement dans la signalisation des récepteurs nucléaires (voir paragraphe I.A.6.3 sur les cointégrateurs). La communication entre les récepteurs nucléaires et les différents facteurs de transcription pourraient être due à l'utilisation commune d'un nombre limitant de cofacteurs, ainsi qu'à leurs effets sur la structure chromatinienne.

B. Récepteurs des hormones œstrogènes

Nous avons vu le rôle important que jouent les récepteurs nucléaires dans la régulation de l'expression génique. Ce chapitre est consacré aux récepteurs des œstrogènes en particulier, avec l'accent sur les potentiels et les limites thérapeutiques de leurs ligands naturels ou synthétiques.

1. Importance thérapeutique

Les œstrogènes interviennent dans la croissance cellulaire, la différenciation et l'homéostasie de nombreux tissus cibles (Ciocca et Roig, 1995). La plupart des effets de ces hormones sont médiées par leurs récepteurs nucléaires (ER). Les ligands capables de moduler cette activité sont utilisés dans la contraception, le traitement de cancers gynécologiques, de l'ostéoporose, de la ménopause et de certaines maladies cardiovasculaires. Un nombre considérable, et sans cesse croissant, de ligands synthétiques a été généré, au vu de l'importance médicale de cette voie de signalisation (Anstead et al., 1997). Quelques ligands sont décrits dans la Figure 16. Contrairement aux autres récepteurs nucléaires, ER reconnaît un large spectre de ligand structuralement très différents (MacGregor et Jordan, 1998), tels que les dérivés stéroïdiens, les composés possédant un squelette hydroxystilbène, comme le diéthylstilbestrol DES et le tamoxifène, et les composés possédant un squelette aryl-benzothiophènes, comme le raloxifène. Le criblage d'un grand nombre de ligands synthétiques a permis de découvrir des molécules antagonistes à haute affinité, dont certaines présentent une grande valeur médicale (Rosen et al., 1995).

En plus de leurs effets dans la reproduction, les œstrogènes sont des hormones bénéfiques dans différents tissus et sont utilisés dans la thérapie de remplacement hormonal chez les femmes postménopausées (Bryant et Dere, 1998). Les œstrogènes inhibent la résorption osseuse et préviennent l'ostéoporose. De plus, de nombreuses études ont suggéré un rôle bénéfique des œstrogènes sur le système cardiovasculaire en diminuant les accidents cardiovasculaires, du fait de leur rôle dans le métabolisme lipidique hépatique. L'exposition aux œstrogènes a été associée à une amélioration des fonctions cognitives et une certaine protection contre la maladie d'Alzheimer. Par contre, une exposition à ces hormones est également associée avec un risque accru de cancer du sein et de l'utérus.

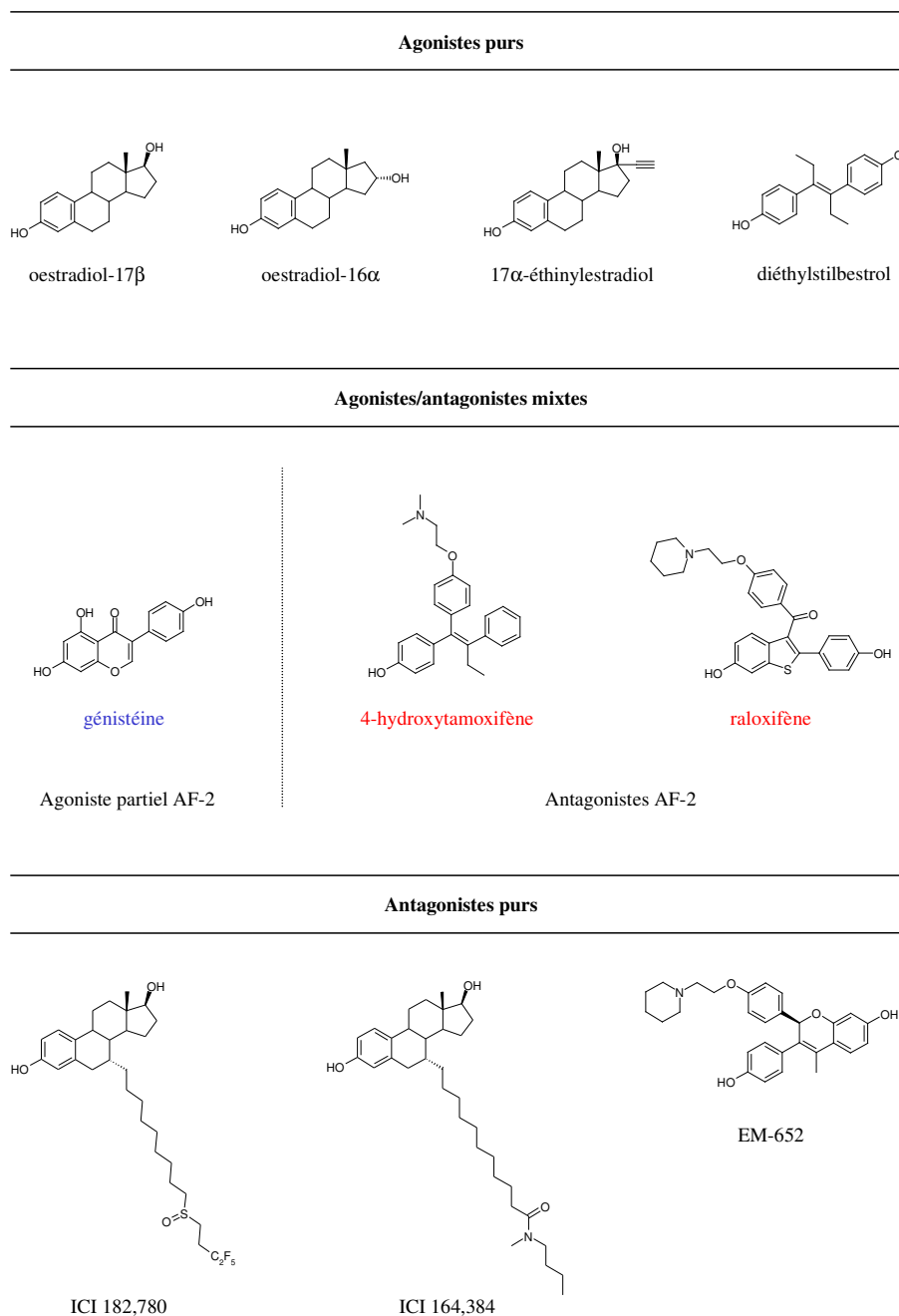


Figure 16 : Les trois catégories de ligands ER.

Parmi les agonistes/antagonistes partiels, se distingue la g niste ne, une phyto-œstrogène, qui est un agoniste partiel de la fonction AF-2, alors que le 4-hydroxytamoxifène et le raloxifène sont des ligands *SERM* qui inhibent la fonction AF-2, mais pas la fonction constitutive AF-1. Les antagonistes purs, quant à eux, ne présente pas d'activité agoniste *in vivo*. Leur mode d'action est mal connu.

Le tamoxifène a été l'une des premières molécules de synthèse décrites. Il constitue, de nos jours, le traitement le plus utilisé contre le cancer du sein. Il présente également des effets bénéfiques sur le tissu osseux après la ménopause. Par contre, un traitement prolongé augmente les risques de cancer de l'utérus. Le tamoxifène se comporte comme un agoniste dans l'utérus et le tissu osseux et comme un antagoniste dans le tissu mammaire. Il faut aussi noter que l'utilisation du tamoxifène dans le traitement du cancer du sein, même bénéfique au début, peut aboutir à la stimulation de la croissance de la tumeur.

Plus récemment, le raloxifène a vu ses débuts dans la prévention de l'ostéoporose. De même que le tamoxifène, le raloxifène a également des effets agonistes sur le métabolisme lipidique du foie. Quoique de tels ligands soient utiles dans la prévention et le traitement de l'ostéoporose et du cancer du sein, ils présentent également des effets secondaires. Ces médicaments ne luttent pas contre les symptômes vasomoteurs de la ménopause. Par conséquent, les recherches se poursuivent de manière intensive dans le but de trouver des molécules qui présenteraient des effets antagonistes plus marqués pour lutter contre le cancer du sein et de l'utérus, et une action agoniste ciblée sur le squelette et les systèmes cardiovasculaire et nerveux.

2. Le concept de « modulateurs sélectifs »

Les termes d'agoniste ou d'antagoniste ne sont pas toujours appropriés pour la description des ligands des récepteurs des œstrogènes. Ainsi est apparu le terme de « modulateurs sélectifs », SERM (*selective estrogen receptor modulators*), pour décrire des ligands ER-spécifiques, qui agissent dans certains tissus comme les hormones œstrogènes, mais antagonisent leurs effets, dans d'autres. En effet, les SERM présentent un biocaractère agoniste ou antagoniste en fonction du type cellulaire. Le tamoxifène et le raloxifène appartiennent à la famille des SERM (Figure 16). De nombreuses études ont portées sur les bases moléculaires de l'effet des SERM. On considère en général que les ligands SERM sont des antagonistes purs de la fonction AF-2 ligand-dépendante. Par contre, ces ligands sont incapables d'inhiber la fonction AF-1 contenue dans le domaine A/B des récepteurs, d'où leur effet agoniste dans certaines conditions. Les antagonistes purs seraient, quant à eux, capables d'inhiber toute activité transcritionnelle du récepteur. En effet, ils ne présentent pas d'activité agoniste tissu-spécifique. Mais leur mécanisme d'action n'est pas entièrement élucidé.

3. Les effecteurs

Nous verrons dans cette partie que les effets variables des ligands SERM sont le reflet de la diversité de la voie de signalisation des œstrogènes, dans laquelle il faut tenir compte de la diversité des récepteurs, des corégulateurs, de leur taux d'expression respectif en fonction du type cellulaire, et enfin de la variété des gènes cibles.

3.1 *Caractéristiques des récepteurs des œstrogènes*

Les effets des œstrogènes sont étudiés depuis plus de 60 ans. Alors que la plupart de leur effets sont médiés par leurs récepteurs nucléaires, ces hormones exercent également des effets très rapides (en moins de 5 min) et non génomiques (Wehling, 1997). Les mécanismes moléculaires de cette régulation non transcriptionnelle ne sont pas bien compris. L'existence de récepteurs membranaires œstrogéno-dépendants a été suggérée, bien que quelques uns de ces effets impliquent leurs récepteurs nucléaires (Collins et Webb, 1999). Nous allons uniquement aborder les récepteurs nucléaires.

3.1.1 Les isotypes ER α et ER β

Pendant longtemps, les effets des œstrogènes ont été attribués à un seul récepteur cloné en 1985 (Walter et al., 1985). Sur les bases de l'homologie de séquence avec ce premier récepteur (appelée maintenant ER α), de nombreuses tentatives d'identifier d'autres isotypes ont été menées. Elles ont d'abord permis le clonage des récepteurs orphelins ERR (*estrogen receptor-related receptor*) (Giguere et al., 1988). Mais ces récepteurs ne lient pas les œstrogènes et des ligands spécifiques, s'ils existent, n'ont pas encore été identifiés. Dix ans après l'identification de ER α , Kuiper a cloné un deuxième isotype, ER β , à partir d'une banque d'ADNc de rat (Kuiper et al., 1996). Cet isotype a été caractérisé chez d'autres espèces, et en particulier chez l'homme (Enmark et al., 1997; Mosselman et al., 1996; Tremblay et al., 1997; Ogawa et al., 1998).

L'importance respective des deux isoformes dans la transmission du message hormonal fait l'objet de recherches intensives. Il est crucial de comprendre les différences fonctionnelles et leurs rôles éventuels dans les différents organes, durant le développement et la vie adulte.

D'autre part, différentes isoformes issues d'épissages alternatifs de ER β ont été mis en évidence, telles ER β_2 (Petersen et al., 1998) et ER β_{cx} , un dominant négatif de l'activité de ER α mais non de ER β (Ogawa et al., 1998a). L'existence de ces isoformes doit être prise en compte dans le mécanisme d'action des récepteurs aux œstrogènes *in vivo*.

3.1.2 Répartition tissulaire

Les deux isotypes ont une répartition tissulaire différente. Tandis que ER α est exprimé dans les organes femelles majeurs (ovaires, utérus, vagin, glandes mammaires et certaines régions du système nerveux central, telles que l'hypothalamus), ER β n'est pas toujours abondant dans ces tissus, hormis dans les ovaires, et il est plus exprimé dans les organes mâles et dans différentes régions du système nerveux central, incluant l'hypothalamus et le cortex cérébral (Couse et Korach, 1999). Cette répartition suggère des rôles tissus-spécifiques pour les deux isotypes. Ces rôles sont étudiés *in vivo* à l'aide de souris transgéniques privés des gènes codant pour ces récepteurs (*knock-out*) (Lubahn et al., 1993) (Eddy et al., 1996) ; (Couse et Korach, 1999).

3.1.3 Organisation modulaire

ER α et ER β présentent la même organisation modulaire (Figure 17) avec une forte identité de séquence au niveau du domaine de liaison à l'ADN (96% d'identité) et une identité un peu plus faible au niveau du domaine de fixation du ligand (53% d'identité). Les domaines N-terminal et charnière présentent une plus grande variabilité (30% d'identité). Avec une telle identité de séquence au niveau des domaines de liaison de l'ADN et du ligand, il est attendu que les deux isotypes reconnaissent les éléments de réponse œstrogène (ERE) et les ligands avec la même affinité. C'est en effet le cas, lorsqu'il s'agit de séquences ERE consensus et de l'œstradiol (Pace et al., 1997; Tremblay et al., 1997; Pettersson et al., 1997). Mais dans le cas de la régulation du gène de l'ostéopontine sous le contrôle d'éléments ERE non consensus, la reconnaissance (suivie de l'activation transcriptionnelle) n'est réalisée que par ER α , et non par ER β (Vanacker et al., 1998). De même, des ligands se fixant préférentiellement à un isotype donné sont connues (Sun et al., 1999). Ainsi la génistéine, une phyto-œstrogène contenue dans le soja (Figure 16), se lie préférentiellement au ER β et présente une activité agoniste partielle.

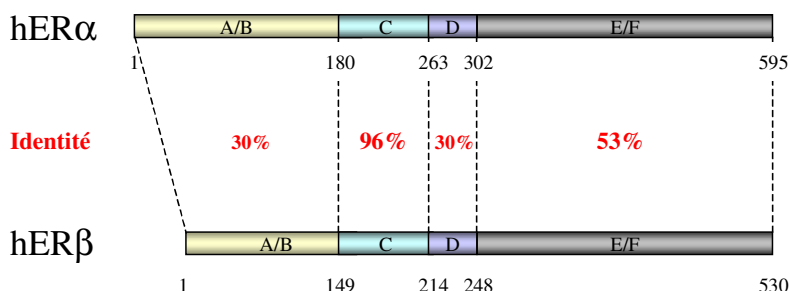


Figure 17 : Organisation modulaire et homologie de séquence des isotypes ERα et ERβ humains.

Les domaines fonctionnels et les positions des acides aminés qui les délimitent sont représentés. Le pourcentage d'identité entre les deux isotypes est indiqué en rouge pour chaque région. Un alignement de séquence de ces récepteurs est présenté en annexe X.A.

3.2 AF-1, AF-2 et recrutement des corégulateurs

Les récepteurs ligandés interagissent avec les ERE en tant qu'homo- ou hétérodimère de ERα et ERβ (Hall et McDonnell, 1999; Tsai et O'Malley, 1994). Après la liaison à l'ADN, l'activité transcriptionnelle est régulée par deux fonctions de transactivation. La fonction AF-2 est localisée dans le domaine E relativement bien conservé (Figure 17). Par contre, AF-1 est localisée dans le domaine A/B faiblement conservé entre les deux isotypes, aussi bien au niveau de la séquence que de la fonction (Hall et McDonnell, 1999).

Les deux fonctions de transactivation agissent en recrutant des coactivateurs, capables de stimuler la transcription des gènes cibles (Glass et Rosenfeld, 2000; McKenna et al., 1999). Les coactivateurs les mieux caractérisés de ER appartiennent aux familles p160/SRC et p300/CBP. Bien que la plupart des études se soient focalisées sur la fonction AF-2 activée par l'œstradiol et inhibé par les SERM (Hanstein et al., 1996; Kalkhoven et al., 1998; Voegel et al., 1996), différentes études ont montré que la fonction AF-1 pouvait interagir physiquement et de manière fonctionnelle avec les coactivateurs. Cette interaction pourrait être ligand-indépendante (Endoh et al., 1999; Lavinsky et al., 1998; Webb et al., 1998). Elle est régulée par la phosphorylation de certains résidus Ser des domaines A/B de ERα et de ERβ par les kinases activés par la voie des récepteurs membranaires (Kato et al., 1995; Tremblay et al., 1999a; Endoh et al., 1999). Ce mode de régulation confère potentiellement la spécificité de tissu de l'action des ER.

3.3 Les éléments de réponse ADN

Dans la voie de signalisation la mieux comprise, l'œstradiol se lie au domaine E du récepteur, ce qui stabilise son interaction avec l'ADN, au niveau des éléments de réponse œstrogènes ERE (Figure 4). Très peu de gènes cibles sont connus. Les gènes de la vitellogénine, de PR, de la prolactine, de pS2, de c-fos, de l'oxytocine et de la cathepsine sont sous le contrôle direct de promoteur ERE-dépendant. Il apparaît que de nombreux gènes sont régulés par les œstrogènes en absence de séquences ERE consensus (*epidermal growth receptor* EGF, son récepteur EGFR, la cycline D1, *breast cancer-1* BRCA1, ...) (pour revue : Muramatsu et Inoue, 2000).

Il y a en fait trois types de promoteurs cibles contrôlés par ER :

- les cibles directes, contenant uniquement des ERE, sur lesquelles ER constitue l'élément clé de la régulation transcriptionnelle. Ces séquences existent en différentes positions et en différents nombres au niveau de la région promotrice d'un gène cible (Tsai et O'Malley, 1994),
- les cibles complexes, contenant différents éléments de réponses (par exemple Sp1-ERE), sur lesquelles le signal œstrogène est intégré en même temps que celui d'autres voies de signalisation (Webb et al., 1995),
- les cibles indirectes, sans ERE, sur lesquelles le récepteur sert de corégulateur. En effet, il a été montré que l'œstradiol régulait également la transcription de certains gènes qui ne contiennent pas de ERE (McDonnell, 1999). Cette régulation se fait par le biais d'interactions fonctionnelles avec d'autres facteurs de transcription, qui se lient à leurs séquences cibles. Le mécanisme de cette corégulation n'est pas élucidé. Étant donné que certains coactivateurs interagissent à la fois avec les récepteurs nucléaires et d'autres facteurs de transcription (ces coactivateurs sont alors qualifiés de cointégrateurs), il se peut que l'effet de ER soit dû à une compétition pour le recrutement de corégulateurs partagés avec d'autres voies de signalisation.

4. Les bases moléculaires des différentes activités SERM

Le premier modèle qui a été proposé pour la régulation de l'activité de ER par les œstrogènes et les SERM reposaient sur deux hypothèses (Katzenellenbogen et Katzenellenbogen, 1996). La première consistait à ne considérer que deux états de ER, actif ou inactif, et ceci quelque soit le type cellulaire : inactif en absence de ligand, ou en présence d'antagoniste, actif en présence d'agoniste. La deuxième hypothèse portait sur le caractère biologique du ligand : son effet était entièrement déterminé par sa structure chimique, déterminant son affinité pour le récepteur et sa capacité à induire un état actif ou inactif, toujours indépendamment du type cellulaire. Dans cette optique, n'importe quel ligand présente le même comportement dans chaque type cellulaire.

Pour expliquer l'effet agoniste des SERM dans certains types cellulaires et antagoniste dans d'autres, il faut bien admettre que l'effet du ligand ne dépend pas que de sa structure chimique, mais également d'autres paramètres, comme l'isotype, la composition cellulaire en corégulateurs et le promoteur du gène cible (Katzenellenbogen et Katzenellenbogen, 1996). Les modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation ou l'acétylation de ER et de ces corégulateurs, modulent les interactions, et donc la régulation transcriptionnelle (Chen et al., 1999; Smith, 1998; Glass et Rosenfeld, 2000; McKenna et al., 1999). De nombreux travaux de recherche tentent d'attribuer des rôles individuels à chaque acteur qui pourrait influencer l'effet des SERM (Figure 18). Ces études utilisent en général des systèmes cellulaires, dans lesquels sont introduits un isotype ER particulier, un promoteur cible donné, dans un type cellulaire connu. Par exemple, les SERM tamoxifène, raloxifène et GW5638 présentent différentes activités biologiques sur le promoteur du complément 3 dans les cellules hépatiques transfectées avec ER α (Willson et al., 1997).

4.1 Les SERM induisent différentes conformations de récepteur

Diverses approches ont été utilisées pour montrer que les SERM induisaient différentes conformations au niveau du domaine de fixation du ligand, à la fois dans ER α et ER β : la protéolyse ménagée (McDonnell et al., 1995), des techniques immunologiques (Martin et al., 1988) et de liaison sélective de peptides à la surface du domaine (Paige et al., 1999) et enfin, la cristallographie (Brzozowski et al., 1997; Pike et al., 1999; Shiau et al., 1998). Le tamoxifène et le raloxifène induisent des structures différentes de celle du récepteur

non ligandé. De plus, les structures des complexes liés à ER α et à ER β ne sont pas identiques. Toutes ces observations vont à l'encontre de l'hypothèse, où seulement deux états de récepteurs (actifs ou inactifs) étaient considérés, et suggèrent que plusieurs conformations sont possibles pour un complexe récepteur-ligand donné.

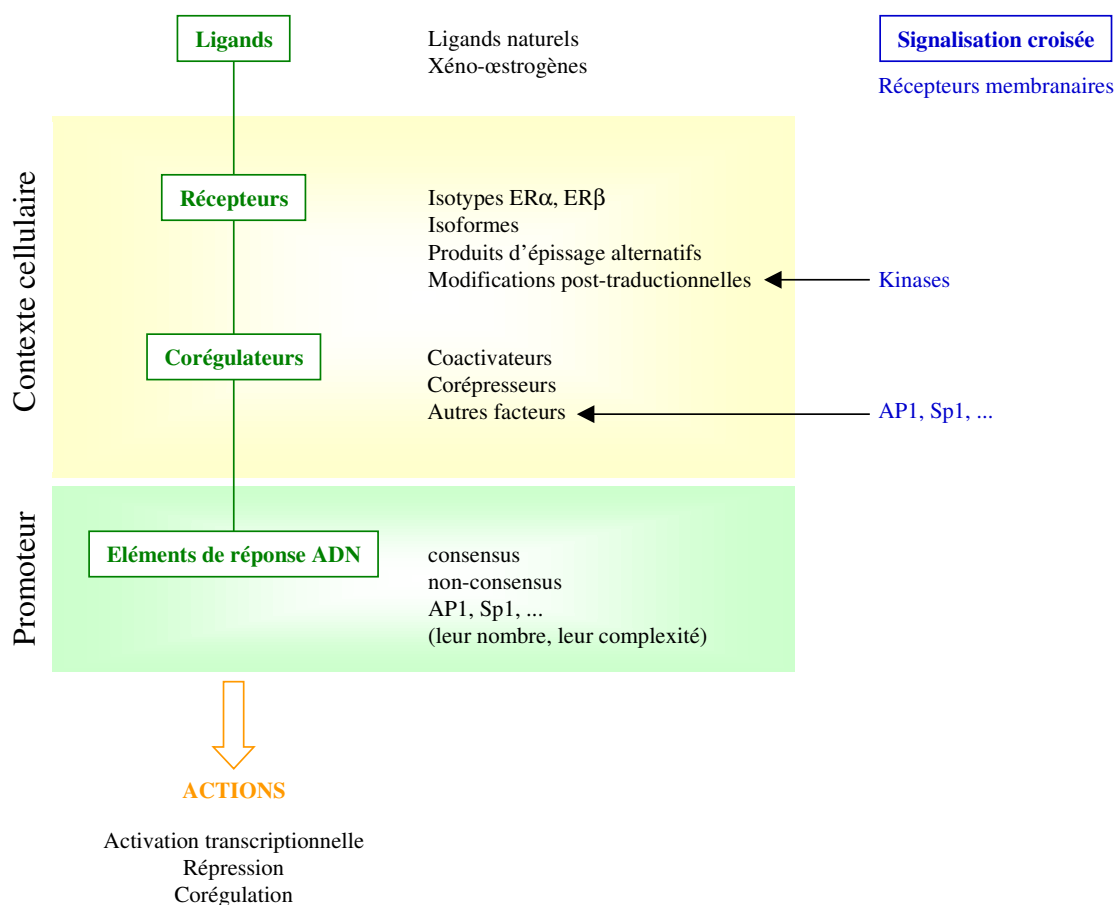


Figure 18 : La pharmacologie complexe de la signalisation œstrogène.

Le diagramme souligne les différents acteurs dans la voie de signalisation des œstrogènes : les ligands et les effecteurs qui déterminent ensemble l'intensité et le caractère de la réponse en fonction du contexte cellulaire et du promoteur. La voie des récepteurs membranaires est parfois capable de réguler ER en absence de ligands.

4.2 Les SERM influencent le recrutement des corégulateurs

Nous avons vu que l'œstradiol stimulait l'activité de ER en permettant des contacts directs ER-coactivateurs, par le biais essentiellement de la fonction AF-2 et, dans certains cas,

en synergie avec AF-1 (Benecke et al., 2000). Contrairement à ce mécanisme classique, certains coactivateurs peuvent également interagir avec le complexe lié au tamoxifène. En particulier, les coactivateurs p160/SRC (Smith et al., 1997; Webb et al., 1998), p300/CBP (Lavinsky et al., 1998), l'ARN-hélicase p68 (Endoh et al., 1999) augmentent l'activité agoniste partielle du tamoxifène par le biais de AF-1. En effet, les SERM sont incapables d'inhiber AF-1, contrairement aux antagonistes purs (Berry et al., 1990; McDonnell et al., 1995; Tzukerman et al., 1994; Willson et al., 1997). Les interactions directes entre le domaine E et les coactivateurs ne sont pas stimulées par le tamoxifène, dans des expériences *in vitro* (Hanstein et al., 1996; Kalkhoven et al., 1998; Voegel et al., 1996). Et les études cristallographiques montrent que la conformation induite par le tamoxifène et le raloxifène empêche l'interaction avec les coactivateurs au niveau du domaine E (Shiau et al., 1998).

D'un autre côté, les corépresseurs réduisent l'activité agoniste partielle des SERM. En effet, les corépresseurs N-CoR et SMRT, inhibent l'activité du tamoxifène, mais non celle de l'œstradiol (Jackson et al., 1997; Smith et al., 1997; Lavinsky et al., 1998). De plus, le fait de bloquer les fonctions de N-CoR et de SMRT, stimule l'activité agoniste du tamoxifène (Lavinsky et al., 1998). Récemment deux autres protéines, REA (*repressor of estrogen receptor activity*) (Montano et al., 1999) et une protéine de la matrice nucléaire, HET/SAF-B (*Hsp27-ERE-TATA-binding protein / scaffold attachment factor-B*) (Oesterreich et al., 2000) ont été impliquées dans la répression de l'activité de ER lié à l'œstradiol ou au tamoxifène. L'importance de ce mécanisme de modulation de l'activité de ER médié par des corégulateurs n'est pas connu *in vivo*.

4.3 L'effet des SERM dépend de l'isotype ER

Les SERM, comme le tamoxifène et le raloxifène, peuvent partiellement activer ER α , mais ils inhibent complètement ER β (Hall et McDonnell, 1999; McInerney et al., 1998; Tremblay et al., 1997). Le tamoxifène et le raloxifène présentent des différences d'activité en fonction de l'isotype sur des séquences ERE et AP1 (Jones et al., 1999; Paech et al., 1997). En utilisant des récepteurs chimères ER α /ER β , dans lesquels les domaines A/B ont été intervertis, il a été montré que l'activité agoniste du tamoxifène était dépendante de la fonction AF-1 de ER α (McInerney et al., 1998). Quand les deux isotypes sont coexprimés dans la même cellule, leur réponse combiné au ligand se distingue de leur réponse isolé,

quand un seul isotype est présent (Hall et McDonnell, 1999; Jones et al., 1989). L'expression de ER α et ER β varie en fonction du type cellulaire, ce qui constitue un critère important dans l'effet des SERM (Gustafsson, 1999).

4.4 L'effet des SERM dépend de la nature du promoteur

Dans une lignée de cellules utérines transfectées par ER α , le tamoxifène augmente l'activité du promoteur AP1-dépendant, aussi bien que l'œstradiol, alors que c'est un antagoniste sur les promoteurs ERE-dépendants et un agoniste faible sur le promoteur de TGF α dans lequel se trouvent à la fois des ERE et des sites Sp1 (Jones et al., 1999; Webb et al., 1995). En considérant maintenant ER β , toujours au niveau d'un élément AP-1, l'œstradiol inhibe la transcription du gène rapporteur, alors que le tamoxifène, le raloxifène et ICI 164, 384 (pourtant défini comme un antagoniste pur) constituent de puissants activateurs dans les différents types cellulaires utilisés (Paech et al., 1997). Quoique le mécanisme de régulation des gènes sous le contrôle d'élément AP1 ne soit pas bien compris, il apparaît clairement que les isotypes ER exercent des rôles opposés dans cette régulation.

4.5 Influence des autres voies de signalisation

Nous avons vu que le caractère des SERM pouvait être influencé par d'autres voies de signalisation (kinases stimulées par les récepteurs membranaires), par le biais de la fonction AF-1. Mais le tamoxifène présente également des effets agonistes dans certains contextes, où l'activité AF-1 est négligeable (notamment dans les cellules de l'endomètre et les cellules cervicales). Cette activité dans l'utérus peut même être plus puissante que celle induite par l'œstradiol (Albert et al., 1990 ; Jamil et al., 1991). Un mécanisme a été proposé pour expliquer l'agonisme du tamoxifène dans l'utérus (Webb et al., 1995) : la synergie avec la voie de signalisation Jun/Fos (AP1). Alors que le tamoxifène active l'expression du gène de la collagénase régulé par AP1 dans les cellules utérines, il l'inhibe totalement dans les lignées de cellules de cancer du sein (MDA453, MCF-7 et ZR-75). Cet effet implique ER α et en particulier, son domaine de liaison à l'ADN (Webb et al., 1995). L'œstradiol, quant à lui, active ce gène quel que soit le contexte cellulaire et cet effet est médié par ER α , indépendamment de son domaine de liaison à l'ADN.

Les effets de l'œstradiol (carcinogène dans le tissu mammaire) et ceux du tamoxifène (carcinogène dans le tissu utérin) *in vivo* semblent être parfaitement corrélés dans ce cas avec la corégulation des gènes AP1-dépendants souvent impliqués dans la prolifération cellulaire, voire la cancérisation (par exemple le gène de l'*insulin growth factor* IGF-I).

5. Mode d'action des antagonistes purs

Le mode d'action des antagonistes purs n'est pas clairement établi. Il a été suggéré que des ligands tels ICI 164,384, ICI 182,780, et RU 58 668 empêchaient le trafic nucléocytoplasmique de ER, en bloquant son import nucléaire (Dauvois et al., 1993; Devin-Leclerc et al., 1998; Mahfoudi et al., 1995; van de Velde et al., 1994). En effet, le récepteur des œstrogènes serait constamment transféré d'un compartiment à l'autre, bien qu'il soit détecté de manière prédominante dans le noyau, et ceci en présence et en absence de ligand. D'autres mécanismes ont été suggérées pour expliquer l'effet radical de ces molécules, telles que l'inhibition de la dimérisation et de la liaison à l'ADN (Arbuckle et al., 1992; Fawell et al., 1990), et la dégradation du récepteur ligandé (Dauvois et al., 1992; Gibson et al., 1991).

6. Objectif du projet de recherche

Le but de ce projet est l'étude des relations structure-fonction dans le récepteur hER α . Cette étude a débuté il y a cinq ans, alors qu'il n'y avait aucune donnée cristallographique sur les récepteurs stéroïdiens. Le mécanisme de la régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires n'était pas connu (l'existence de corégulateurs n'était alors qu'une hypothèse) et on ignorait tout sur le mécanisme de l'antagonisme. Au laboratoire, les structures de l'apo-RXR (Bourguet et al., 1995) et l'holo-RAR (Renaud et al., 1995) venaient d'être résolues. C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés au domaine de fixation de l'hormone (domaine E) de ce récepteur, en vue de l'étude cristallographique de complexes liés à différents ligands : l'œstradiol-17 β , hormone naturelle, et des ligands de synthèse agonistes, SERM et antagonistes purs. Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de recherche pharmaceutique Schering AG (Berlin).

ER α constitue un système de choix, de par son importance clinique. La compréhension à l'échelle atomique du mode de fixation du ligand et des relations structure-fonction dans le récepteur constitue une approche complémentaire au criblage à haut débit de ligands et permet de rationaliser la conception de nouvelles molécules-médicaments.

II. Les constructions pour l'étude structurale et fonctionnelle

Pour entreprendre l'étude cristallographique d'une protéine, il faut disposer d'une grande quantité de protéine active, soluble et stable : de préférence, de l'ordre de quelques milligrammes de protéine pure et homogène. Au niveau des constructions utilisées pour l'étude structurale, plusieurs stratégies ont été poursuivies dans ce but :

- le criblage de fragments de différentes longueurs, pour lesquels la solubilité et la stabilité ont été testées,

- l'utilisation de la fusion à la thiorédoxine. La thiorédoxine trxA est une oxydo-réductase bactérienne de petite taille (≈ 12 kDa), capable de s'accumuler jusqu'à atteindre 40% de la quantité totale de protéines dans *E. coli*. Le fait de fusionner une protéine d'intérêt à cette protéine hypersoluble dans la bactérie peut s'avérer être d'un grand secours dans certains cas. L'utilité de la fusion à la thiorédoxine a été illustrée par la production sous forme soluble d'un grand nombre de cytokines et de facteurs de croissance (LaVallie et al., 1993).

- la mutagenèse dirigée : la modification génétique de certains résidus peut également améliorer la solubilité et la stabilité de la protéine.

Dans cette partie, je vais présenter les expériences de mutagenèse dirigée utilisées dans l'étude des relations structure-fonction du domaine de fixation de l'hormone du récepteur :

- Pour rendre la protéine plus stable au cours du temps et faciliter sa cristallisation, nous avons muté les cystéines réactives et sensibles au stress oxydatif. La sensibilité à l'oxydation de cette protéine est illustrée par la structure cristallographique de ER α oxydé, formant un tétramère lié par des ponts disulfures intermoléculaires entre les cystéines en position 530 (Tanenbaum et al., 1998). Une alternative à la mutagenèse des cystéines consiste à modifier chimiquement ces résidus en surface par carboxyméthylation (Hegy et al., 1996; Brzozowski et al., 1997; Shiao et al., 1998). Cette technique a permis de déterminer la présence de trois cystéines réactives (en position 381, 417 et 530), sur les quatre que compte le domaine E (la cystéine en position 447 étant inaccessible). Toutes les structures de ER décrites dans la littérature, hormis celle du tétramère, ont été résolues en utilisant la protéine carboxyméthylée. Du fait de leur exposition au solvant, nous avons muté les résidus C381, C417 et C530 en

sérines (mutations C→S), résidus polaires ne différant des cystéines que par la substitution de l'atome de soufre par celui de l'oxygène.

- Un mutant constitutif Y537S décrit dans la littérature (Carlson et al., 1997) a été étudié au niveau structural, pour comprendre le mécanisme d'activation de la fonction AF2 en absence de ligand, impliqué dans la prolifération cellulaire de certains cancers du sein (Zhang et al., 1997).

- Pour confirmer l'importance biologique des résidus potentiellement impliqués dans le mécanisme de changement conformationnel induit par le ligand, trois résidus participant à un réseau de liaisons hydrogène ont été changées en alanine (E339A, E419A et K531A).

A. Aspects méthodologiques

1. Définition des domaines

L'organisation modulaire et fonctionnelle du récepteur hER α a été déterminée par différentes méthodes. L'analyse des séquences primaires, en comparant les récepteurs des hormones œstrogènes de différentes espèces (Krust et al., 1986), avec d'autres récepteurs nucléaires (Green et Chambon, 1986) a permis de repérer les régions conservées. Des études de mutagenèse dirigée (Kumar et al., 1986) ont permis de délimiter les domaines impliqués dans la liaison de l'ADN, du ligand et les régions portant les fonctions de transactivation du récepteur. La protéolyse ménagée constitue un autre outil très puissant pour localiser les domaines globulaires d'une protéine. Cette technique a permis de délimiter avec précision le côté N-terminal du domaine de fixation de l'hormone, mais non en C-terminal, où plusieurs sites de clivage ont été identifiés à l'intérieur des domaines E et E/F (Seielstad et al., 1995). La résolution des structures cristallographiques des récepteurs de l'acide rétinoïque RAR et RXR (Bourguet et al., 1995; Renaud et al., 1995) a permis de générer un alignement de séquences des récepteurs nucléaires au niveau du domaine E, en tenant compte des informations structurales (Wurtz et al., 1996). En nous basant sur ces résultats, nous avons généré des constructions de différentes tailles, testé leur taux d'expression dans *E. coli* et démarré l'étude structurale sur le fragment le plus soluble.

2. Sous-clonages et mutagenèse ponctuelle

Les sous-clonages dans les vecteurs d'expression ont été réalisés en générant l'ADN à insérer par PCR. La technique de sous-clonage par PCR est réalisée en présence de l'ADN matriciel, de l'ADN polymérase Deep-Vent polymerase (*Biolabs*), des oligonucléotides amorces appropriés et des désoxynucléotides dNTP (avec N = A, T, C, G). Les oligonucléotides amorces portent les sites de restriction requis pour le sous-clonage. Le fragment amplifié peut ainsi être digéré et inséré dans le vecteur digéré par les mêmes enzymes. Les mutations ponctuelles ont été introduites dans le gène cible par la technique de mutagenèse assistée par PCR (Ho et al., 1989). Les protocoles de sous-clonage et de mutagenèse, incluant PCR, digestion, déphosphorylation du vecteur, précipitation de l'ADN, ligation et transformation bactérienne sont détaillés en annexe. Les produits des sous-clonages

et les mutations sont vérifiés par séquençage automatique d'ADN, par le service de séquençage de l'IGBMC.

2.1 Sous-clonage dans pET-15b

Les sous-clonages réalisés dans pET-15b ont été effectués dans les sites NdeI–BamHI (Figure 19). Le site NdeI permet de cloner l'insert en phase dans le cadre de lecture. Ce site NdeI se trouve juste en 3' d'une séquence codant pour le polypeptide de fusion à 6 histidines et un site de clivage spécifique de la thrombine, une protéase à sérine. L'emploi de deux sites de restrictions permet de procéder à un clonage orienté. La traduction du gène ainsi cloné donne naissance à un polypeptide contenant 20 acides aminés supplémentaires en N-terminal. Après clivage à la thrombine, il ne subsiste que 3 acides aminés (GlySerHis) étrangers à la séquence insérée dans le vecteur.

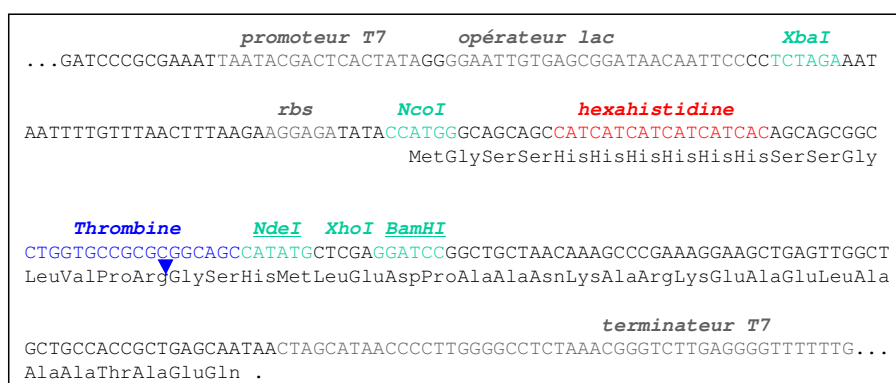


Figure 19 : Vecteur pET-15b et sites de clonage utilisés : NdeI - BamHI.

Les limites des différents fragments de ER α introduits dans pET-15b sont :

- Résidus 302 à 595, recouvrant les domaines E et F.
- Résidus 302 à 567, recouvrant le domaine E et une partie de F.
- Résidus 302 à 552, le domaine E en entier.
- Résidus 302 à 531, représentant le fragment minimum de protéolyse, dans lequel le domaine E est privé de la région C-terminale codant pour l'hélice de transactivation H12 et la boucle qui la précède.

Les domaines suivants ont été sous-clonés par PCR dans ce vecteur :

- le récepteur entier (résidus 1 à 595),
- le fragment Δ AB (résidus 180 à 595),
- le domaine E (résidus 302 à 552, 301 à 553, ou 302 à 553).

2.3 Modifications des vecteurs pET

2.3.1 Modification de pET-32b

Nous avons modifié le plasmide pET-32b pour remplacer le site de clivage de l'entérokinase par un site supplémentaire pour la thrombine. L'insertion d'oligonucléotides synthétiques double brin dans les sites KpnI et NcoI a permis cette substitution. Cette technique présentée sommairement dans la Figure 21, est décrite en annexe.

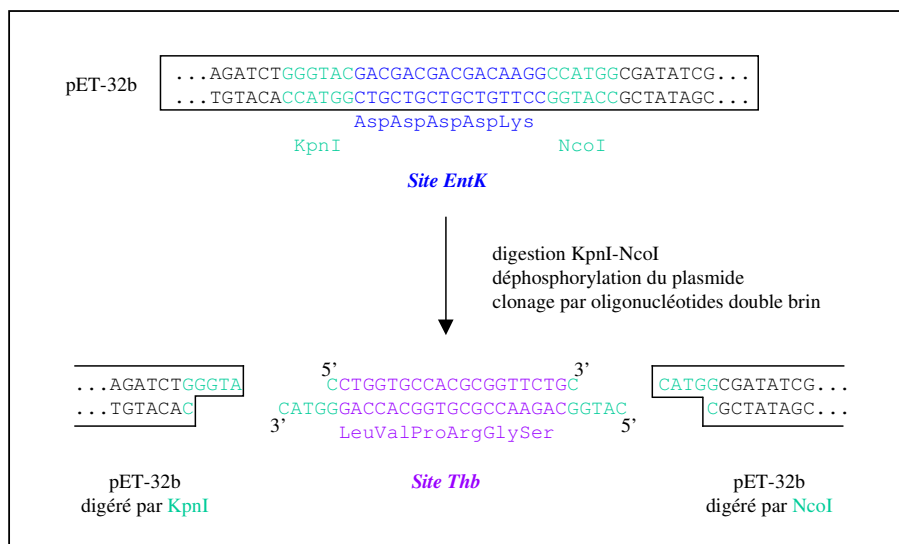


Figure 21: Modification du plasmide pET-32b.

2.3.2 Modification de pET-15b

Dans pET-32b, après clivage à la thrombine, il subsiste 13 acides aminés étrangers à la protéine d'intérêt à l'extrémité N-terminale (GlySerGlyMetLysGluThrAlaAlaAlaLysPheGlu). La présence d'une telle séquence pouvant gêner la cristallisation de la protéine d'intérêt,

nous avons généré une construction dans laquelle cette séquence se limite à 3 acides aminés (GlySerHis) en utilisant le plasmide pET-15b. Ce plasmide a été modifié par insertion dans les sites XbaI et NcoI de la séquence codant pour la thiorédoxine trxA, en aval du site de fixation des ribosomes (rbs). L'insert a été généré par PCR, le plasmide pET-32b servant de matrice, en utilisant les oligonucléotides amorces suivants : YO134 : 5' TTCCCCTCTAGAA ATAATTTTGT 3' (XbaI) et YO135 : 5' GCTGCCCATGGCAGAACCGGCCA G 3' (NcoI). Comme pour le vecteur pET-15b, le clonage du domaine E a été réalisé dans les sites NdeI et BamHI. Cette construction reste à être testée.

2.4 Mutagenèse dirigée

Les mutations ont été introduites par PCR dans différentes constructions permettant l'étude structurale et fonctionnelle.

2.4.1 Les mutations C→S

Les mutations C→S en positions 381, 417 et 530 ont d'abord été introduites dans le domaine E sous-cloné dans pET-15b, puis dans la fusion à la thiorédoxine (pET-32b), le récepteur entier (pSG5), et enfin dans GAL-ER (pG4M). Elles ont été générées par PCR dans le domaine E, à l'aide d'oligonucléotides appropriés décrits en annexe. Brièvement, les mutations simples ont été obtenues en utilisant comme ADN matriciel, celui du domaine E sauvage. Les mutations doubles et triple résultent de l'emploi d'une matrice portant respectivement une et deux mutations.

Pour introduire les mutations simples, doubles et triple dans le récepteur entier (dans le vecteur d'expression eucaryotique pSG5-ER), nous avons procédé en deux étapes. La démarche est représentée dans la Figure 22.

- Les fragments HindIII-BglII de 252 pb portant les mutations C381S et/ou C417S ont été récupérés par digestion HindIII-BglII du domaine E mutant. Le sous-clonage dans les sites HindIII-BglII de pSG5-ER provoque la perte d'un fragment de 547 pb, car il y a deux sites BglII (en position 2328, dans le récepteur et en position 2874, dans le vecteur).

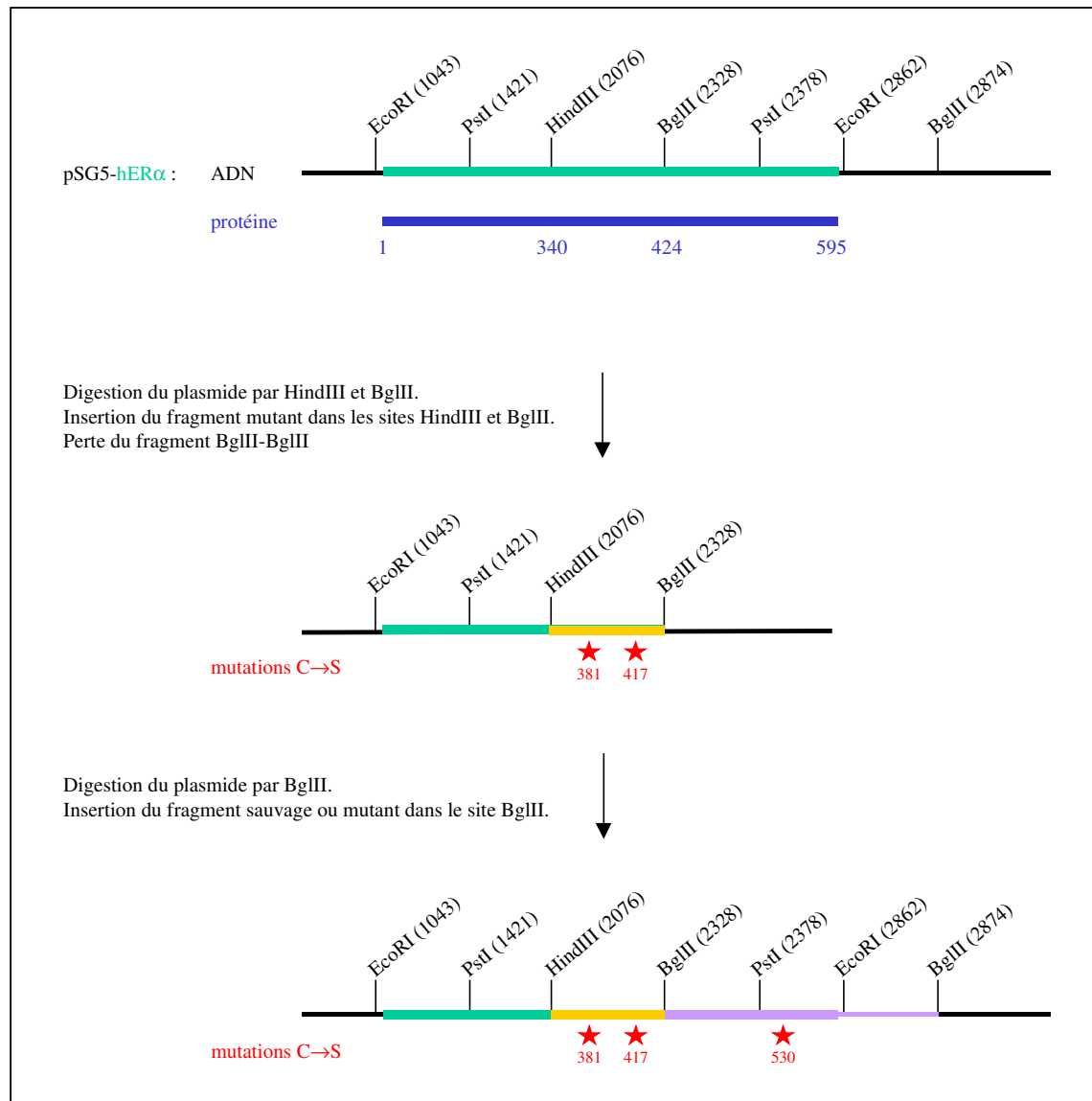


Figure 22 : Introduction des mutations C→S dans pSG5-ER.

Les mutations simples, doubles et triple ont été introduites dans le récepteur entier en deux étapes de sous-clonage : dans les sites HindIII-BglII (pour les fragments portant les mutations C381S et/ou C417S) et dans les sites BglII-BglII (pour le fragment sauvage et mutant C530S). Pour générer la mutation simple C530S, seul le fragment BglII-BglII sauvage a été excisé et remplacé par un fragment PCR portant la mutation. Les mutations sont indiquées par des étoiles rouge.

- Le sous-clonage dans le site BglII a permis de réintégrer le fragment sauvage ou mutant C530S, selon les cas. Le fragment BglII-BglII sauvage a été obtenu par digestion de pSG5-ER avec BglII, alors que celui portant la mutation C530S a été synthétisé *de novo* par PCR. Pour générer la mutation simple C530S, seul le sous-clonage dans BglII est nécessaire. L'orientation du fragment BglII-BglII est déterminée par digestion avec l'enzyme de restriction PstI, permettant l'excision d'un fragment de 958 pb dans la bonne orientation, ou de 1404 pb dans la mauvaise.

Les trois mutations ont également été introduites dans le récepteur chimérique GAL-ER, en clonant par PCR les fragments mutants DEF (résidus 282 à 595) et DE (résidus 282 à 552) dans les sites XhoI-BamHI du vecteur plasmidique pG4M. Lors de la PCR, le vecteur pSG5-ER portant la triple mutation a servi d'ADN matriciel.

2.4.2 Les mutations EEK→A

Les mutations E339A, E419A et K531A ont été générées par PCR dans le fragment codant pour les régions DEF du récepteur et sous-cloné dans les sites XhoI-BamHI du vecteur pG4M, permettant l'expression de GAL-ER(résidus 282-595). Ces mutations ont également été introduites dans le fragment codant pour le domaine E (résidus 302-552) et sous-cloné dans les sites NdeI-BamHI de pET-15b.

2.4.3 Le mutant constitutif

La mutation Y537S a uniquement été introduite dans le domaine E (résidus 302-553) sous-cloné dans les sites NspV-KpnI de pET-32b, en vue de l'expression procaryotique du mutant en fusion à la thiorédoxine.

B. Résultats

1. Mise au point des constructions pour l'étude structurale

Dans la Figure 23 sont résumées les constructions dont nous disposons et la façon dont elles ont été exploitées :

- Parmi les constructions réalisées dans pET-15b, le fragment 302 à 531 est le moins soluble. Privé de l'élément clé de la transactivation ligand-dépendante, l'hélice H12, ce fragment peu soluble ne présente pas d'intérêt et a été abandonné. L'intégrité du domaine E semble contribuer à la solubilité de la protéine.

- C'est sur le domaine E que nous avons concentré nos efforts, ce qui a abouti à sa cristallisation et à la résolution de sa structure tridimensionnelle en complexe avec l'œstradiol. Il faut cependant souligner que la présence du ligand a été indispensable pour solubiliser et stabiliser la construction en fusion au peptide polyhistidine (dans pET-15b).

- Les deux constructions comprenant une partie ou la totalité du domaine F sont solubles. La construction allant des résidus 302 à 567 a été abandonnée au profit de celle contenant la région F en entier. L'étude structurale sur les régions E-F a été initiée en collaboration avec l'équipe du Dr Hinrich Gronemeyer.

Les constructions en fusion à la thiorédoxine dans pET-32b ont amélioré la solubilité et la stabilité du domaine E, même en absence de ligand. Ce point fut capital dans la réussite de l'étude cristallographique du complexe avec un ligand de synthèse, en permettant le criblage de nombreux ligands avec la même préparation protéique, purifiée sous la forme apo-récepteur.

- Compte tenu de cet effet sur le domaine de fixation du ligand, nous avons testé la production de récepteur entier ou ΔAB , en fusion à la thiorédoxine. L'étude structurale de ces récepteurs est en cours.

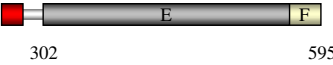
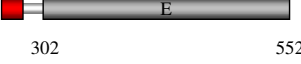
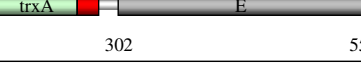
		Mutations ponctuelles	Expression Purification Cristallisation Structure
Constructions pET-15b			
		-	en cours
		-	+
en présence d'oestradiol		- C→S	+ + + + + + + +
		-	-
Constructions pET-32b			
		-	en cours
		-	en cours
		-	+ + -
		C→S	+ + -
en absence de ligand*		- C→S Y537S	+ + + + + + + + -

Figure 23 : Constructions et mutants testés au cours de l'étude structurale du récepteur.

Les constructions dans pET-15b et dans pET-32b sont présentées. Elles possèdent toutes les deux des peptides polyhistidines (en rouge). Les sites de clivage à la thrombine sont représentés par les petits tubes en gris clair et ceux de l'entérokinase, par des tubes violet. Les constructions ayant abouti à la cristallisation du domaine E sauvage et mutants feront l'objet des prochains chapitres.

* Dans pET-32b, la fusion N-terminale à la thiorédoxine trxA d'*E. coli* permet d'exprimer le domaine E en absence de ligand, contrairement à la construction équivalente dans pET-15b.

Les premières constructions dans pET-32b possédaient une fusion C-terminale avec un site de clivage spécifique de l'entérokinase et un second peptide polyhistidine. La présence de deux peptides polyhistidines a été jugé nécessaire dans un premier temps. Le premier peptide est situé entre la fusion et la protéine d'intérêt, alors que le deuxième se trouve à l'extrémité C-terminale. Il se peut donc que seul le deuxième peptide soit accessible à la résine d'affinité par chélation de cations métalliques. Mais toutes les tentatives de cristallisation en présence des fusions N- et C-terminales ont échoué. Il a donc fallu s'en débarrasser. Deux sites de clivage, l'un du côté N-terminal, spécifique de la thrombine, l'autre du côté C-terminal pour l'entérokinase, ont été prévus à cet effet. L'entérokinase demeurait inefficace et ne permit pas le clivage de la fusion C-terminale. La seule élimination de la fusion N-terminale par la thrombine ne suffisait pas pour permettre la cristallisation.

Nous avons modifié le plasmide pET-32b pour remplacer le site de clivage de l'entérokinase par un site spécifique de la thrombine. La thrombine présentait un faible rendement de clivage de la fusion C-terminale, limitant la quantité de protéines pour les essais de cristallisation. Nous avons donc cherché une autre solution.

En introduisant par PCR un codon de terminaison de la traduction en 3' de l'insert, nous avons testé la construction dépourvue de la fusion C-terminale. Le peptide polyhistidine localisé entre la thiorédoxine et la protéine d'intérêt fut accessible à la résine d'affinité. Après élimination de la fusion N-terminale, nous avons finalement abouti à la cristallisation de la protéine.

2. Les constructions en vue de l'étude fonctionnelle

Les différentes constructions réalisées pour l'étude fonctionnelle sont illustrées dans la Figure 24. L'étude fonctionnelle réalisée sur les récepteurs mutants (hormis Y537S) sera détaillée ultérieurement.

La fusion du domaine E au peptide polyhistidine est utilisée dans l'étude structurale et l'étude de la capacité de liaison du ligand, ce qui permet de tester à la fois l'effet des mutations (en comparant la constante de dissociation des protéines sauvage et mutantes) et la production bactérienne du domaine de fixation de l'hormone.

L'activité transcriptionnelle des récepteurs mutants est analysée *ex vivo*, après cotransfection des récepteurs et des gènes rapporteurs, dans les cellules eucaryotiques COS1. Cette étude a été réalisée sur le récepteur entier et sur le récepteur chimérique GAL-ER, dans lequel le récepteur privé des régions A/B et C, est fusionné au domaine de liaison de l'ADN de GAL4, un régulateur transcriptionnel de levure.

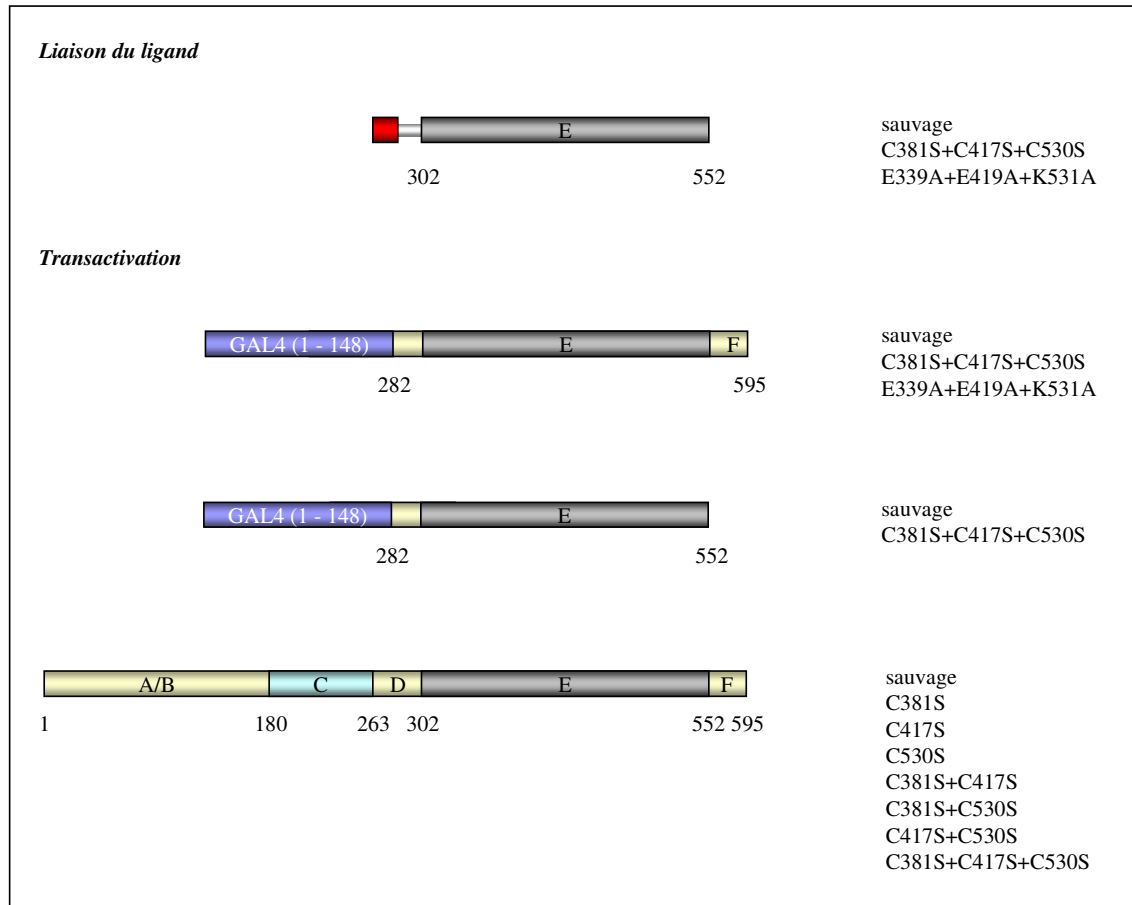


Figure 24 : Constructions pour l'étude fonctionnelle.

III. Expression et purification

Le succès de l'étape de cristallisation est déterminée par la qualité du matériel produit et purifié. La démarche qui a été utilisée est celle d'un processus itératif, dans lequel les étapes d'expression et de purification sont modifiées en fonction des résultats en cristallisation.

Dans cette partie, je présenterai les protocoles de purification du domaine E des récepteurs ER sauvage et mutants (mutants C→S et mutant constitutif Y537S) ayant abouti à leur cristallisation. Les différents protocoles ont été mis au point avec Marc Ruff et Sylvia Eiler, sur la protéine sauvage ; avec Sylvie Duclaud, sur la fusion à la thiorédoxine.

Nous distinguerons les constructions portant un peptide polyhistidine (constructions pET-15b), de celles en fusion à la thiorédoxine (pET-32b). Alors que la contribution du ligand est indispensable dans le premier cas, il n'en va pas de même pour la fusion à la thiorédoxine, conférant solubilité et stabilité à l'apo-protéine. Nous avons considéré ces propriétés dans les approches biochimiques décrites dans la section qui suit.

A. Aspects méthodologiques

1. Expression

Pour l'étude structurale du récepteur $ER\alpha$, nous avons utilisé le système pET (Novagen) basé sur l'ARN polymérase du phage T7, inductible à l'IPTG, décrit dans la Figure 25. Ce système est très puissant pour exprimer les protéines recombinantes dans *E. coli*. Les vecteurs pET originaux et les souches hôtes ont été développées par Studier et collaborateurs (Rosenberg et al., 1987).

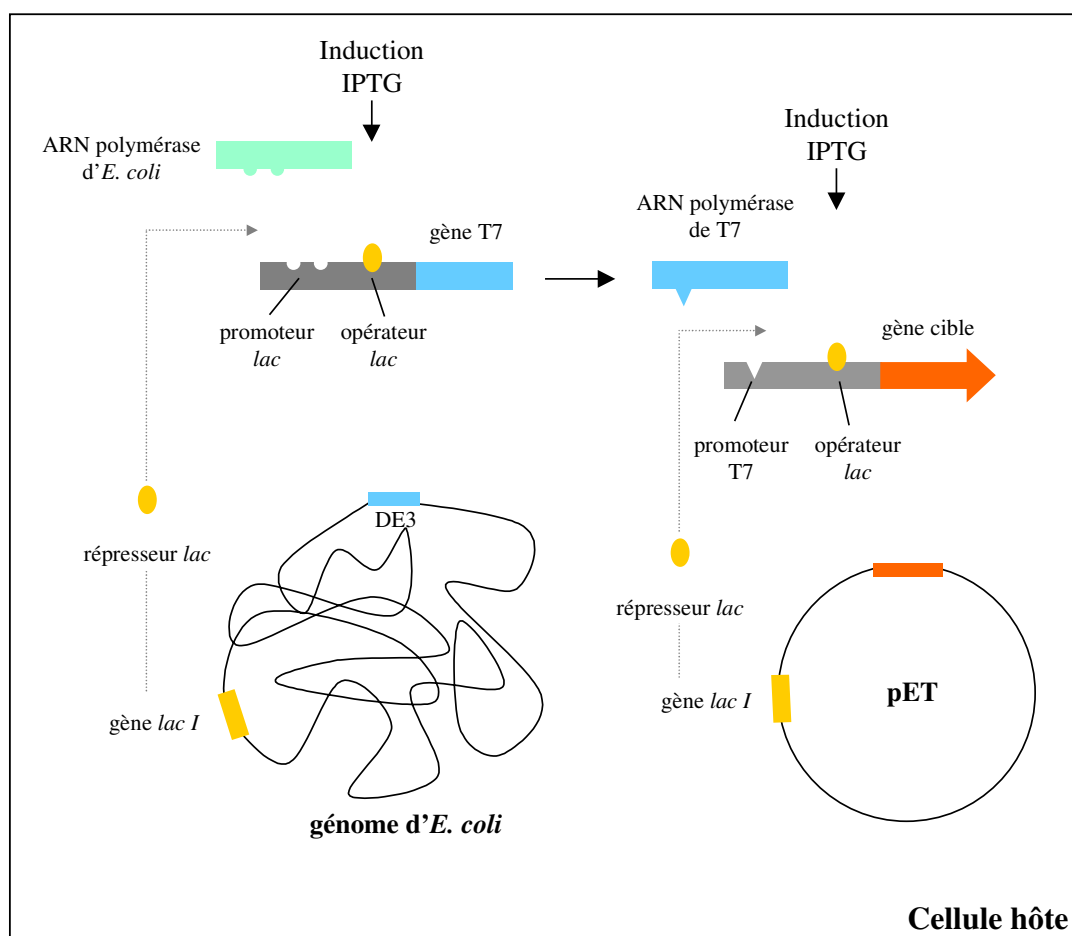


Figure 25 : Système d'expression pET/BL21(DE3)

Le gène cible est cloné dans un plasmide pET sous le contrôle des signaux forts de transcription et de traduction du bactériophage T7. Le vecteur pET porte le gène de la β -lactamase, qui lui confère la résistance à l'ampicilline. La transcription est réalisée par l'ARN polymérase de T7, dont le gène est inséré dans le génome de la bactérie hôte par l'intermédiaire d'un dérivé lysogène du phage λ , le bactériophage *DE3*, sous la dépendance du promoteur *lacUV5* inductible à l'IPTG. La T7 polymérase est très sélective, elle transcrita uniquement le gène cible. De plus, la souche *E. coli* BL21(DE3) utilisée pour l'expression est déficiente en certaines protéases qui pourrait dégrader la protéine recombinante et diminuer le rendement de purification (Studier et Moffatt, 1986; Studier et al., 1990).

1.1 Préculture

Cette étape a pour but d'amplifier les bactéries recombinantes en vue de la culture et de la production de protéine. Après électroporation avec le vecteur d'expression adéquat, les bactéries BL21(DE3) sont cultivées dans un milieu nutritif renfermant l'ampicilline (amp) à 100 μ g/ml. Il y a différentes façons de procéder à cette étape. Il s'agit d'optimiser la quantité de bactéries recombinantes capables de produire la protéine d'intérêt. Au cours des multiples générations, le plasmide peut être « perdu » par une partie de la population. Un antibiotique tel que l'ampicilline est rapidement dégradé par les β -lactamases sécrétées dans le milieu par les bactéries transformées. Sans antibiotique, il n'y a plus de sélection et cela favorise l'expansion des bactéries non recombinantes. Nous avons testé deux techniques de préculture:

- Nous avonsensemencé le mélange d'électroporation dans un milieu de culture LB-amp. Ce milieu a été incubé à 37°C, toute la nuit, sous agitation. Cette technique est basée sur l'efficacité de l'électroporation (de l'ordre de 10¹² transformants/ μ g d'ADN).

- Une deuxième façon de procéder a consisté à prélever les colonies ayant poussé sur milieu gélosé. Les bactéries ont été transformées la veille de la culture et étalées sur un milieu LB-Agar-amp. Il est important d'éviter les tapis cellulaires pour conserver le caractère sélectif de ce procédé. Après une nuit à 37°C, les colonies recombinantes ont été mises en suspension, en raclant la surface gélosée, pour ensemencer le milieu de culture liquide.

La première technique n'a été utilisée que dans le protocole d'expression de la protéine sauvage. La deuxième, bien plus efficace, a été utilisée dans les autres cas.

1.2 Culture

Nous avons testé différents milieux et conditions de culture dans le but d'augmenter la production de protéine soluble. La surproduction dans le système pET/BL21(DE3) peut être telle que les protéines se retrouvent sous forme de corps d'inclusion (agrégats insolubles), limitant le rendement de production de protéine soluble. En diminuant la vitesse de traduction des chaînes polypeptidiques naissantes, en variant la composition du cytoplasme bactérien et le taux de protéines chaperones, il est possible de limiter la formation des corps d'inclusion. Il existe différents paramètres à tester à cet effet. Il y a notamment la composition du milieu de culture (LB, milieu de culture riche ou minimum), les substances modifiant la viscosité du milieu, tels que le glycérol ou encore le saccharose, la température et la présence de ligands.

1.3 Préparation de l'extrait brut

L'extrait brut représente la fraction de protéines solubles obtenue après broyage des bactéries et ultracentrifugation de l'extrait cellulaire total. De même que pour la culture, nous avons cherché à optimiser le rendement de production de protéines solubles en testant différents tampons de broyage. Les paramètres que nous avons fait varier sont les suivants :

- la concentration et la nature du sel : NaCl, KCl.
- les agents solubilisants tels que le glycérol, saccharose, éthylène glycol, sulfobétaïne,
- les détergents (CHAPS, octyl-D-glucopyranoside, sarcosine),
- le tampon utilisé : Tris-HCl pH 8.0, tampon phosphate pH 7.4,
- le volume de broyage.

2. Purification

Les protocoles de purification ont été élaborés au fur et à mesure, en tenant compte des résultats de cristallisation. Il s'agit d'un processus itératif dans lequel des étapes de purification ont été rajoutées ou enlevées, différents tampons de colonnes et de conditionnement de la protéine ont été criblés.

Les détails techniques sur le matériel utilisé sont décrits en annexe.

2.1 Chromatographie d'affinité par chélation de cations métalliques

Le principe de cette chromatographie est basé sur l'emploi de cations métalliques divalents (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}) chélatés par des groupements de type iminodiacétate pour séparer des protéines portant des polyhistidines. Ces cations immobilisés vont interagir avec la fusion polyhistidine de la protéine et permettre de purifier rapidement et efficacement la protéine. L'élution des protéines du gel peut être réalisée par différentes méthodes : modification de pH, agent chélatant ou ligand compétiteur (Porath, 1992; Vosters et al., 1992).

Nous avons essayé les cations tels que le nickel, le cuivre et le zinc. Le zinc permet l'utilisation de fortes concentrations en agent réducteur, contrairement au nickel et au cuivre, plus sensibles à la réduction du cation métallique en métal. L'utilisation du zinc est recommandée pour la purification de protéines sensibles à l'oxydation.

Le choix du tampon dépend des propriétés de l'ion métallique chélaté et des propriétés de fixation de la protéine d'intérêt. Nous avons observé que le Tris-HCl et le Tris-maléate avaient tendance à diminuer l'efficacité de fixation de la fusion. Nous avons finalement utilisé le phosphate de sodium et de potassium qui permet une bonne rétention de la protéine d'intérêt sur la colonne. L'élution est réalisée dans un gradient d'imidazole.

2.2 Chromatographie échangeuse d'ions

Nous avons testé la chromatographie d'échange d'ions dans le but d'augmenter la pureté et l'homogénéité de la protéine. Les colonnes échangeuses d'ions permettent de séparer

les protéines en fonction de leur charge nette à un pH donné. L'élution a été réalisée par la technique du gradient de force ionique croissante.

2.3 Échange de tampon

Différentes techniques permettent l'échange de tampon : la dialyse, l'ultrafiltration, la filtration sur colonne, la précipitation, la lyophilisation. Dans la plupart des cas, nous avons préféré effectuer les échanges de tampon sur colonne.

2.4 Filtration sur gel

La filtration sur gel permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire apparente. Cette étape chromatographique fait triple emploi : elle permet de caractériser l'échantillon ; en temps qu'étape de purification, elle sert à éliminer toute trace éventuelle d'agrégats ou d'oligomères et enfin, elle est utilisée pour effectuer un échange de tampon qui permet le conditionnement de la protéine en vue des essais de cristallisation.

3. Protéolyse ménagée

La protéolyse est réalisée sur la protéine de fusion en utilisant la thrombine bovine plasmatique (*Sigma Biochemicals*). Cette protéase à sérine requiert la présence de cations divalents calcium (1 à 5 mM) et un pH aux alentours de 8.0-8.5. Elle est susceptible d'être inhibée par les agents chélatants (tels que l'EDTA) ou complexants (tels que l'imidazole) et en principe les inhibiteurs classiques de protéases à sérine (PMSF et DIFP). Il s'est avéré que cet enzyme est plus résistant qu'il n'y paraît. L'ajout de calcium n'est pas nécessaire et des concentrations en imidazole de l'ordre de 250 mM n'inhibent pas l'enzyme.

La présence de la fusion peut gêner ou faciliter la cristallisation de la protéine selon les cas. C'est donc un important paramètre à considérer lors de la préparation de l'échantillon.

4. Élimination de la fusion

Nous avons testé différentes étapes chromatographiques pour éliminer la fusion après clivage : la gel-filtration, la chromatographie d'affinité au zinc et la chromatographie d'échange d'anions.

Nous avons préféré la chromatographie d'affinité au zinc qui retient spécifiquement la séquence polyhistidine, ainsi que la fusion non clivée, alors que la protéine d'intérêt se retrouve dans l'effluent de colonne.

B. Purification des constructions portant un peptide polyhistidine

Les conditions d'expression et de purification des domaines E sauvage et mutants de ER α , résumées dans le Tableau 4, seront détaillées dans ce qui suit (en particulier la première purification, celle du domaine E sauvage, servant de référence).

Étapes	Sauvage	Triple mutant C381S+C417S+C530S	Double mutant C417S+C530S
Préculture	Milieu liquide	Milieu gélosé	Milieu gélosé
Culture	LB + saccharose 10%	LB + saccharose 10%	LB + saccharose 10%
Induction	À 25°C + α estradiol	À 25°C + α estradiol	À 15°C + α estradiol
Lyse cellulaire	2M sulfobetaine 50mM NaCl 100mM NaKHPO ₄ 10 μ M α estradiol 20mM β -Me	2M sulfobetaine 50mM NaCl 100mM NaKHPO ₄ 10 μ M α estradiol -	- 200mM KCl 100mM NaKHPO ₄ - -
Dilution de la fraction soluble	0.5M sulfobetaine 50mM NaCl 100mM NaKHPO ₄ 10 μ M α estradiol 20mM β -Me	0.5M sulfobetaine 50mM NaCl 100mM NaKHPO ₄ 10 μ M α estradiol -	-
Chromatographie d'affinité au Zn ²⁺ (gradient d'imidazole dans le tampon donné)	0.5M sulfobetaine 50mM NaCl 100mM NaKHPO ₄ 10 μ M α estradiol 20mM β -Me	- 50mM NaCl 100mM NaKHPO ₄ 10 μ M α estradiol -	- 200mM KCl 100mM NaKHPO ₄ - -
Traitement de la solution protéique	Dilution	Dilution	+ α estradiol
Chromatographie d'échange d'ions (gradient de NaCl dans le tampon donné)	10mM NaCl 10mM Tris-HCl pH 8 10 μ M α estradiol 50mM β -Me	10mM NaCl 10mM Tris-HCl pH 8 10 μ M α estradiol -	-
Clivage de la fusion	-	-	Thrombinolyse
Gel-filtration	50mM NaCl 50mM Tris-mal pH 8 10 μ M α estradiol 50mM β -Me	50mM NaCl 50mM Tris-mal pH 8 10 μ M α estradiol -	50mM NaCl 50mM Tris-mal pH 8 10 μ M α estradiol -

Tableau 4 : Protocoles de purification des domaines E sauvage et mutant.

Protéines en fusion au peptide polyhistidine et en complexe avec l' α estradiol

1. Expression et purification de la protéine sauvage en présence d'œstradiol

1.1 Expression et lyse cellulaire

La préculture a été réalisée en milieu liquide. Après ensemencement, le milieu de culture (500ml LB, 125ml sacchararose à 50%, 625µl amp à 0.1mg/ml) a été incubé à 37°C, jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0.6. La synthèse de la protéine hétérologue a été induite par adjonction d'IPTG à 0.5mM, en présence d'œstradiol 10µM, pendant 4 heures à 25°C. Les bactéries ont été récoltées par centrifugation et lavées dans une solution renfermant 10% glycérol en vue de la congélation. Le culot a été conservé à -80°C. Les rendements étaient de l'ordre de 4 g de cellules / litre de culture.

Les bactéries provenant de 2 litres de culture ont été mises en suspension dans 100ml de tampon de lyse (sulfobétaïne SB201 2M, NaCl 50mM, NaKHPO₄ 100mM pH 7.4, œstradiol 10µM, β-mercaptoéthanol 20mM) et broyées par sonication. Une sonde de température maintenait le lysat à une température inférieure à 10°C. Des inhibiteurs de protéases ont été ajoutés avant, pendant et après la lyse (DIFP 0.1mM, PMSF 0.1mM et un cocktail de leupeptine, pepstatine, aprotinine, antipain et de chymostatine, à 1.25µg/ml). L'extrait total de lyse a été clarifié par ultracentrifugation (1 heure à 45000 g et à 4°C). Le surnageant contenant la fraction soluble a été immédiatement utilisé.

1.2 Étapes chromatographiques

1.2.1 Chromatographie d'affinité aux cations métalliques

L'extrait brut est dilué avec trois volumes de tampon dépourvu de sulfobétaïne (50mM NaCl, 100mM NaKHPO₄ pH 7.4, 10µM œstradiol, 20mM β-mercaptoéthanol) pour atteindre une concentration finale de 0.5M SB201 avant d'être injecté sur la colonne d'affinité au zinc. Le débit de charge et d'élution est de 30ml/min sur une colonne Poros MC de 20ml (*Applied Biosystems*). Après un lavage de 10 volumes de colonnes (CV) dans le tampon de colonne (0.5M SB201, 50mM NaCl, 100mM NaKHPO₄ pH 7.4, 10µM œstradiol, 20mM β-mercaptoéthanol), un gradient linéaire de 0 à 0.5M d'imidazole de 15 CV est appliqué.

La protéine est éluée à ≈ 120 mM d'imidazole. Les fractions de colonne sont analysées sur gel SDS-PAGE 12% (Figure 26).

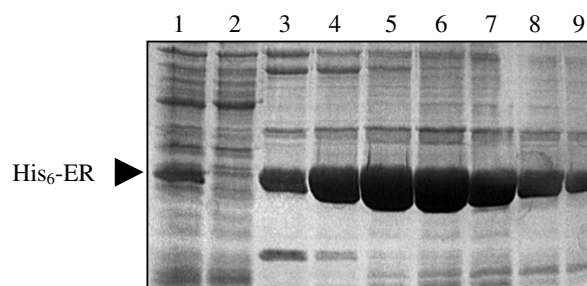


Figure 26: Etape de chromatographie d'affinité au zinc suivie par SDS-PAGE.

En présence de la sulfobétaïne SB201 absorbant à 280nm, le chromatogramme de la colonne d'affinité ne permet pas la détection des protéines, ce qui nécessite l'analyse des fractions d'élution sur gel SDS-PAGE 12%, coloré au bleu de Coomassie. En 1 : extrait brut dilué. En 2 : effluent de colonne. De 3 à 9 : éluat renfermant la protéine d'intérêt.

1.2.2 Chromatographie sur échangeur d'anions

La protéine purifiée par affinité au zinc se trouve dans un tampon, dont la force ionique ne permet pas la rétention de la protéine sur une colonne échangeuse d'anions. La protéine est diluée d'un facteur 10 avec de l'eau millipore avant d'être injecté sur la colonne Poros 10HQ de 1.7ml (*Applied Biosystems*) équilibrée dans 10CV de tampon de composition : 10mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 10 μ M œstradiol, 50mM β -mercaptoéthanol. La protéine est éluée dans un gradient de chlorure de sodium (l'élution se fait à environ 150mM NaCl). Un chromatogramme typique est présenté (Figure 27 A).

Deux pics sont plus ou moins bien séparés sur cette colonne et leur contenu est analysé sur gel natif 6% (Figure 27 B). La protéine du premier pic est homogène, on n'observe qu'une seule bande sur le gel, tandis que celle du deuxième pic présente une certaine hétérogénéité (deux à trois bandes selon les différentes purifications). En nous appuyant sur le comportement de la protéine sur gel natif, nous séparons les fractions du pic 1 de celle du pic 2 et nous les manipulons séparément en vue de la troisième et dernière étape de purification, la gel-filtration.

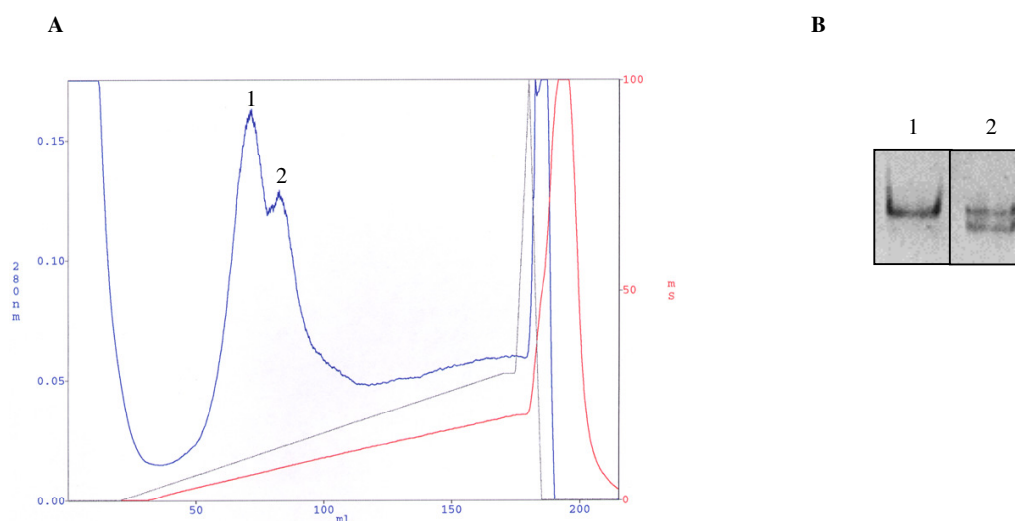


Figure 27 : Chromatogramme d'échange d'anions.

L'étape de chromatographie d'échange d'ions est réalisée sur une colonne Poros 10 HQ (*Applied Biosystems*). Un chromatogramme typique est présenté en **A**. La séparation de deux populations de protéines n'est pas optimale, même sur cette colonne hautement résolutive. Le contenu des fractions de colonne est analysé sur gel natif-PAGE 6% en **B**. La protéine du pic 1 est homogène (une seule bande sur gel), contrairement à celle du pic 2 (pic ou épaulement).

1.2.3 Etape de gel-filtration

L'étape de gel-filtration nécessite au préalable la concentration des échantillons à un volume maximal de 3ml, ce qui est réalisé par ultrafiltration sur une membrane YM-10 (*Amicon*). Le concentré est injecté sur une colonne Fractogel EMD BioSEC (S) (*Merck*) de 120ml équilibré au préalable dans le tampon D (50mM NaCl, 50mM Tris-maléate pH 8.0, 10 μ M œstradiol, 50mM β -mercaptoéthanol). Le débit est de 3ml/min et des fractions de 2ml sont collectées. Un chromatogramme est présenté en Figure 28.

Que ce soit la fraction du pic 1 de la chromatographie d'échange d'ions ou celle du pic 2 plus hétérogène, le profil est le même en gel-filtration : il s'agit de dimères (d'une masse moléculaire apparente de 60kDa) dans les deux cas. Les fractions contenant le complexe sous forme dimérique sont rassemblées et la solution protéique est concentrée à 10mg/ml pour les essais de cristallisation.

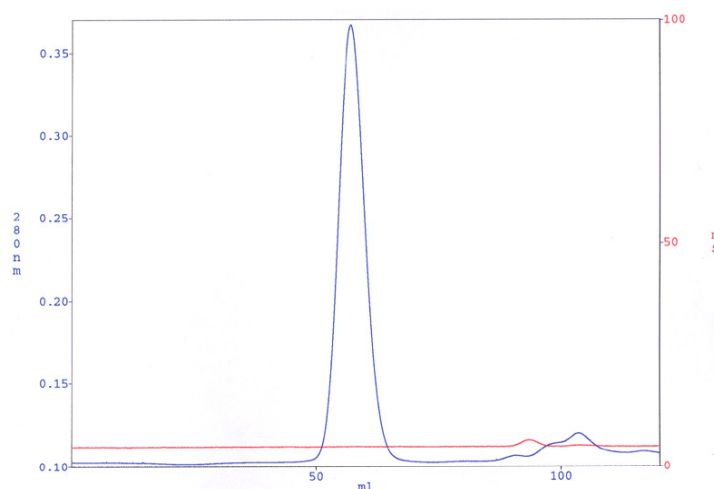


Figure 28 : Chromatogramme de gel-filtration.

Un seul pic est observé, correspondant au complexe ER α -E2 sous forme dimérique, sans trace d'agrégats ni d'autres espèces oligomériques.

1.3 Pureté et homogénéité des préparations

L'analyse de la pureté et de l'homogénéité est réalisée par électrophorèse en gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE 12%) et natives (native-PAGE 6%), colorés au bleu de Coomassie, ainsi que par filtration sur gel. Les préparations de protéines sont systématiquement scindées en deux fractions après l'étape de chromatographie d'échange d'ions : la fraction du pic 1 renfermant la protéine homogène (une seule bande sur gel natif, et dimérique, d'après le profil du chromatogramme de gel-filtration) et la fraction hétérogène du pic 2 (plusieurs bandes sur gel natif, malgré une homogénéité apparente en gel-filtration). Cette hétérogénéité du pic 2 pourrait être due à différents facteurs altérant la charge à la surface de la protéine. Il est possible que des résidus tels que les histidines du peptide de fusion aient chélaté des cations divalents. Les cystéines sont également capables d'interagir avec des ions métalliques. D'autre part, des molécules résiduelles de sulfobetaine pourraient être à l'origine de cette hétérogénéité.

Que ce soit la protéine du pic 1 ou du pic 2, ces préparations ont un degré de pureté et d'homogénéité suffisant pour permettre l'obtention de cristaux utilisables dans des expériences de diffraction des rayons X.

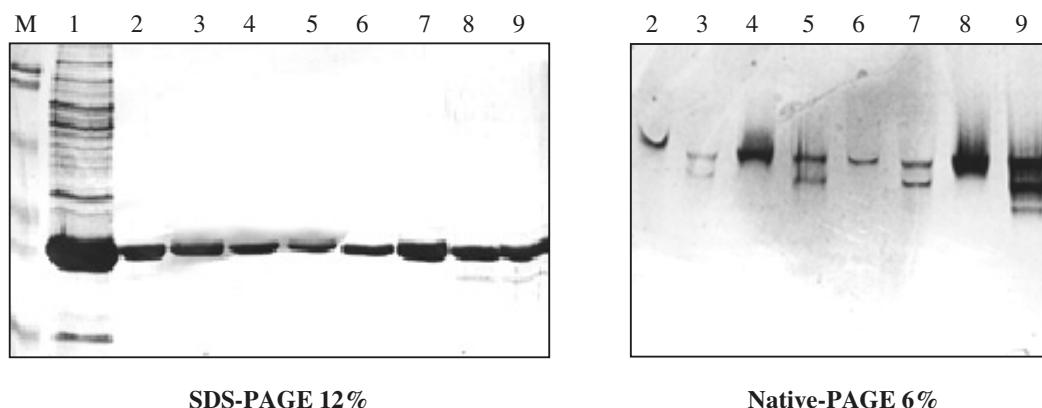


Figure 29 : Purification du complexe His₆-ER sauvage lié à l'œstradiol.

La purification est suivie par électrophorèse en gels de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE 12%) et natives (native-PAGE 6%), les gels sont colorés au bleu de Coomassie.

M : marqueurs de poids moléculaires,

1 : Fraction de la colonne d'affinité,

2 : Fraction du pic 1 de la colonne d'échange d'ions,

3 : Fraction du pic 2 de la colonne d'échange d'ions,

4 : Fraction du pic 1 après concentration,

5 : Fraction du pic 2 après concentration,

6 : Fraction du pic 1 de la gel-filtration,

7 : Fraction du pic 2 de la gel-filtration,

8 : Fraction du pic 1 de la gel-filtration après concentration,

9 : Fraction du pic 2 de la gel-filtration après concentration.

Le rendement de purification a constitué dans cette étude un très bon indicateur de la qualité d'une préparation de protéine. Sur les quelques dizaines de préparations protéiques effectuées, seules celles générant un rendement de l'ordre de 3 mg/l de culture ont abouti à la cristallisation de la protéine. La réussite d'une préparation pouvait se déduire d'après la quantité de protéine obtenue après la première étape chromatographique, peut-être en reflétant la qualité de la production de protéines solubles. Une autre étape délicate était la concentration de l'échantillon, dont le rendement était souvent inférieur à 50%. De plus, il

était indispensable d'obtenir quelques milligrammes de protéine pour les premiers essais de cristallisation, dans lesquels il fallait cribler un maximum de paramètres. La protéine était concentrée à 10 mg/ml par ultrafiltration sur un Centricon-10 (*Amicon*) en vue des essais de cristallisation.

Étapes	Quantité de protéine
Chromatographie d'affinité au Zn^{2+}	60 mg
Chromatographie échangeuse d'anions	26 mg
Concentration	13 mg
Gel-filtration	9 mg
Concentration	7 mg
Rendement final	3.5 mg/l de culture

Tableau 5 : Rendement de purification du complexe His₆-ER sauvage lié à l'œstradiol

1.4 Bilan : Optimisation de l'expression et de la purification

1.4.1 Optimisation de la production de protéine soluble

Dans les conditions de croissance standard où les bactéries sont cultivées en milieu LB à 37°C, la souche recombinante d'*E.coli* produit le domaine E majoritairement sous forme de corps d'inclusion. Nous avons amélioré le rendement de production de protéine active et soluble en jouant sur différents paramètres de croissance cellulaire, d'induction et de lyse cellulaire (Figure 30).

(a) Effet du saccharose et de la température

L'ajout de saccharose dans le milieu de culture et la diminution de la température lors de l'induction ont permis d'améliorer la production de protéines solubles. L'effet solubilisant du saccharose a déjà été montré par ailleurs (Kipriyanov et al., 1997). Ce sucre non métabolisable par les bactéries, augmente la viscosité du milieu et provoque un choc osmotique. La présence de saccharose, ainsi que la diminution de la température lors de

l'induction, ont pour effet de ralentir la croissance des bactéries. Leur métabolisme général est ralenti, ainsi que la production de protéines, ce qui facilite leur repliement. En effet, la protéine d'intérêt produite dans ces conditions a moins tendance à former des corps d'inclusion.

(b) Culture en présence du ligand

Il est connu que la fixation du ligand provoque un changement conformationnel rendant la protéine plus compacte (Fritsch et al., 1992). La présence du ligand a augmenté la production de récepteur soluble, probablement en empêchant l'enchevêtrement des apo-protéines plus flexibles et hydrophobes, et en contribuant au repliement correct de la protéine.

(c) Criblage des tampons de lyse

Différents agents solubilisants ont été testés, parmi lesquels le CHAPS (détergent zwitterionique), les sels à différentes concentrations (NaCl, KCl) et les polyols (glycérol, sucres). Nous avons obtenu de très bons résultats avec un agent solubilisant appartenant à la famille des sulfobétaïnes à courte chaîne. La sulfobétaïne SB201 (3-(1-pyridinio)-1-propanesulfonate, *Fluka*) s'apparente à la partie polaire d'un détergent zwitterionique. Il s'agit d'un produit non visqueux et surtout non dénaturant des protéines (Blisnick et al., 1998; Goldberg et al., 1995; Goldberg et al., 1996; Vuillard et al., 1995).

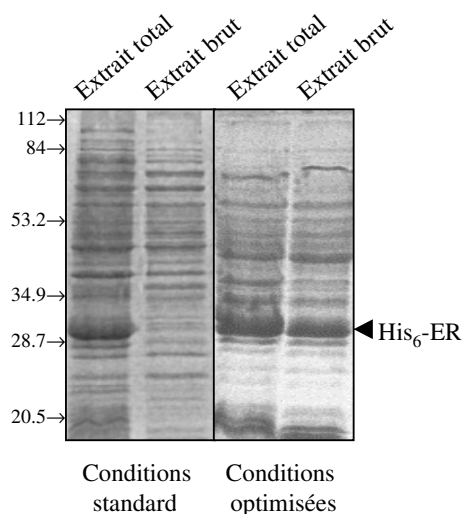


Figure 30 : Optimisation de la production de protéines solubles.

◀ Sur un gel dénaturant 12% coloré au bleu de Coomassie, sont comparés les protéines produites dans les conditions de culture et de broyage standards (avec une culture réalisée dans un milieu LB, l'induction à 37°C, et la lyse dans le tampon 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.5) et optimisées (avec une culture réalisée dans un milieu LB-saccharose 10%, l'induction à 25°C, et la lyse dans le tampon 2M sulfobétaïne, 50mM NaCl, 100mM NaKHPO₄ pH 7.4, 10μM œstradiol, 20mM β-mercaptoéthanol).

1.4.2 Optimisation de la purification

Les points essentiels qui nous ont permis d'aboutir à une préparation de protéine capable de cristalliser sont détaillés ci-dessous :

- La présence de l'agent solubilisant sulfobétaïne lors de la lyse cellulaire et de la première étape chromatographique fut indispensable pour obtenir de la protéine soluble. En effet, en absence de sulfobétaïne, nous ne disposions pas de quantité de matériel suffisante pour une étude structurale.

- L'ajout d'œstradiol tout au long de la purification a permis d'empêcher la dénaturation de la protéine en maintenant le site récepteur saturé. Des expériences de liaison du ligand sur l'apo-protéine purifiée, réalisées par l'équipe d'Hinrich Gronemeyer, ont montré que le récepteur perdait rapidement sa capacité de liaison, alors que le récepteur saturé dès sa production est stable après purification. D'autre part, l'œstradiol étant faiblement soluble en solution aqueuse, il est dissout dans l'éthanol. L'ajout du ligand à la protéine constitue une étape délicate, étant donné que l'éthanol est un agent précipitant de la protéine. Pour maintenir la protéine saturée en ligand et procéder de la manière la plus douce possible, le ligand a donc été ajouté dans les tampons de purification.

- Il a fallu utiliser de grandes quantités d'agent réducteur tout au long de la purification pour éviter l'oxydation de la protéine. La sensibilité au stress oxydatif se traduit par l'oligomérisation et l'agrégation de la protéine, un effet contrecarré par l'utilisation de fortes concentrations en β-mercaptoéthanol, dès le broyage cellulaire.

- En absence de l'étape chromatographique d'échange d'ions, le degré de pureté de la protéine était suffisant pour que des cristaux soient obtenus. Mais ces cristaux étaient petits et incapables de diffracter les rayons X. Cette étape de purification supplémentaire fut indispensable à l'obtention de cristaux adaptés à une expérience de diffraction. Bien que l'échantillon protéique du pic 2 ne soit pas aussi homogène que celui du pic 1, il a néanmoins permis l'obtention de cristaux exploitables.

2. Expression et purification du triple mutant C→S en présence d'œstradiol

2.1 Expression et lyse cellulaire

La préculture a été réalisée sur milieu gélosé. Après ensemencement, le milieu de culture, contenant 10% de saccharose, a été incubé à 37°C. La culture et l'induction ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles du récepteur sauvage (décrites dans le paragraphe III.B.1.1), c'est-à-dire en présence d'œstradiol à 10µM. Les bactéries provenant de 2 litres de culture ont été mises en suspension dans 100ml de tampon de lyse dépourvu d'agent réducteur (sulfobétaïne SB201 2M, NaCl 50mM NaKHPO₄ 100mM pH 7.4, œstradiol 10µM) et broyées par sonication.

2.2 Étapes chromatographiques

2.2.1 Chromatographie d'affinité en absence de sulfobétaïne

L'extrait brut est dilué avec trois volumes de tampon dépourvu de sulfobétaïne et d'agent réducteur (50mM NaCl, 100mM NaKHPO₄ pH 7.4, 10µM œstradiol) avant d'être injecté sur la colonne d'affinité au zinc. La chromatographie d'affinité est réalisée dans les mêmes conditions que la protéine sauvage, mais les tampons de colonne sont privés de sulfobétaïne et d'agent réducteur.

2.2.2 Chromatographie sur échangeur d'anions

La chromatographie sur échangeur d'anions a également été réalisée dans les mêmes conditions que celle de la protéine sauvage, mais en absence de β-mercaptoéthanol. De même que pour la protéine sauvage, cette étape chromatographique a permis la séparation de deux populations protéiques (Figure 31 **a** et **c**) :

- le pic1, homogène sur un gel natif,
- un épaulement ou pic2, hétérogène sur gel natif.

Les deux populations ont été séparées et concentrées en vue de l'étape de gel-filtration (Figure 31 **b**).

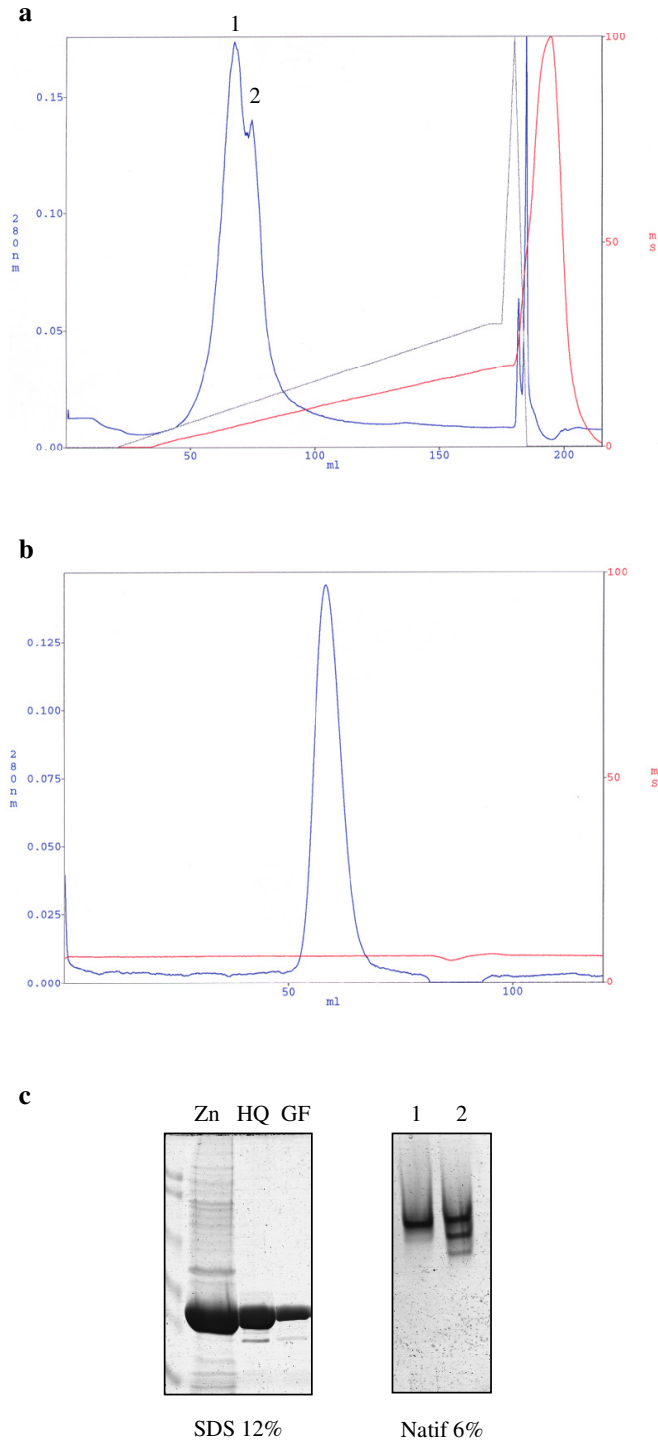


Figure 31 : Purification du complexe His₆-ER triple mutant lié à l'œstradiol.

Chromatogrammes d'échange d'ions en **a**, de gel-filtration en **b** et gels PAGE en **c** : en conditions dénaturantes SDS 12% présentant les fractions après chromatographies d'affinité (**Zn**), d'échange d'ions (**HQ**) et de gel-filtration (**GF**) et gel natif présentant les pics 1 et 2 séparés par l'échange d'ions en **c**.

2.2.3 Etape de gel-filtration

L'étape de gel-filtration (Figure 31 **b**) montre que les mutations C→S stabilisent le récepteur sous forme dimérique en absence d'agent réducteur.

2.3 Pureté et homogénéité des préparations

Malgré le gain de stabilité conféré par les mutations C→S, la protéine mutante présente la même hétérogénéité que la protéine sauvage et nécessite l'étape chromatographique sur échangeur d'ions. Ce résultat suggère que les trois cystéines, que nous avons mutées, ne sont pas impliquées dans l'hétérogénéité observée.

Le rendement de purification et le comportement de la protéine mutante sont en tout point identiques à ceux de la protéine sauvage (Tableau 6 et Figure 31). La protéine triple mutante, tout comme la protéine sauvage, est concentrée à 10mg/ml en vue des essais de cristallisation.

Étapes	Quantité de protéine
Chromatographie d'affinité au Zn^{2+}	63 mg
Chromatographie échangeuse d'anions	30 mg
Concentration	27 mg
Gel-filtration	24 mg
Concentration	10 mg
Rendement final	5 mg/l de culture

Tableau 6 : Rendement de purification du complexe His₆-ER triple mutant C→S lié à l'œstradiol.

2.4 Bilan

Le protocole de purification du triple mutant C→S est analogue à celui de la protéine sauvage. Les quelques différences résident dans la préculture, l'utilisation d'agent réducteur et de sulfobétaïne.

- La préculture a été réalisée sur milieu gélosé, ce qui tend à augmenter le rendement de production de protéine (en évitant la perte du plasmide lors de la culture).

- le triple mutant C→S est insensible au stress oxydatif et ne requiert pas l'utilisation de β -mercaptoéthanol. Cet aspect sera primordial au niveau cristallographique. En effet, le β -mercaptoéthanol interfèrerait avec la substitution des cristaux de protéine sauvage par les atomes lourds. Par contre, pour les cristaux de protéine triple mutante obtenus en absence d'agent réducteur, il sera possible de résoudre le problème de la phase par cette technique.

- la sulfobétaïne n'est pas requise dans les tampons de colonne de l'étape de chromatographie d'affinité, la solubilité de la protéine triple mutante n'étant pas altérée par son absence. De plus, nous avons constaté que cette molécule interférerait avec la colonne échangeuse d'anions. En effet, son utilisation limitait la durée de vie de la colonne. Nous avons donc progressivement limité son usage, d'abord en l'éliminant des tampons de l'étape chromatographique d'affinité, puis de celui de la lyse cellulaire.

3. Expression et purification du double mutant C→S en présence d'œstradiol

3.1 Expression et lyse cellulaire

La culture et l'induction ont été réalisées en présence d'œstradiol à 10μM, selon les conditions décrites dans le Tableau 4. La température d'induction a été abaissée à 15°C et l'induction a été réalisée pendant 15 heures (au lieu de 25°C pendant 4 heures). Les bactéries provenant de 2 litres de culture ont été mises en suspension dans 100ml de tampon de lyse dépourvu de sulfobétaïne, de ligand et d'agent réducteur (KCl 200mM, NaKHPO₄ 100mM pH 7.4) et broyées par sonication.

3.2 Étapes chromatographiques

3.2.1 Chromatographie d'affinité aux cations métalliques

L'extrait brut a été chargé directement sur la colonne d'affinité, équilibrée dans le même tampon que celui de la lyse cellulaire. La protéine a été éluée dans ≈ 250 mM d'imidazole. Le chromatogramme obtenu est présenté dans la Figure 32. Les fractions contenant la protéine d'intérêt ont été rassemblées (environ 20ml). La protéine a été saturée de ligand : on a ajouté 20μl d'œstradiol à 10mM.

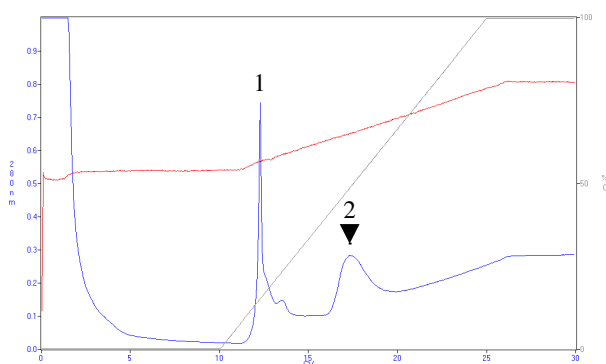


Figure 32 : Chromatogramme d'affinité au zinc.

La DO à 280 nm est représenté en bleu, le gradient d'imidazole (de 0 à 0.5M) en gris et la conductivité en rouge. Le pic 1 correspond à des contaminants, le pic 2 à la protéine d'intérêt.

3.2.2 Clivage du peptide polyhistidine

L'étape de protéolyse du peptide polyhistidine a été effectuée en ajoutant environ 1U/mg de protéines (100µl de thrombine à 0.25U/µl) et on a laissé incuber la nuit à 4°C. Dans ces conditions, la protéolyse est totale.

3.2.3 Etape de gel-filtration

Le produit de la digestion a été purifié par gel-filtration. Les fractions renfermant la protéine dimérique ont été rassemblées et concentrées en vue des essais de cristallisation.

3.3 *Pureté et homogénéité des préparations*

L'analyse de la pureté et de l'homogénéité du complexe est présentée dans la Figure 33. Le degré de pureté et d'homogénéité semble inférieur aux préparations précédentes, mais a tout de même été suffisant pour permettre la cristallisation de la protéine.

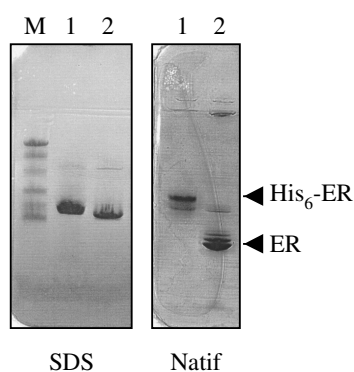


Figure 33 : Analyse de la pureté et de l'homogénéité du double mutant C→S.

Des échantillons avant (1) et après thrombinolyse (2), sont déposés sur des gels gradient 8-25%.

La migration de la protéine sur gel natif est très différente avant et après thrombinolyse, suggérant que l'élimination du peptide polyhistidine modifie profondément les caractéristiques physico-chimiques de la protéine. La masse moléculaire n'est pas très différente, elle est respectivement de 31 et de 29 kDa, avant et après coupure. Quant au point

isoélectrique théorique de la protéine, il est de 7.2 pour la fusion, et de 6.9, après élimination du peptide polyhistidine. Les diminutions de la masse moléculaire et du pH_i contribuent toutes deux à cette différence de migration.

Dans ce protocole de purification, nous n'avons pas utilisé de sulfobétaïne dans les tampons de lyse et de colonne d'affinité au Zn^{2+} . Le rendement après la première étape chromatographique est de 25mg, ce qui représente moins de la moitié par rapport au protocole précédent. L'effet solubilisant de la sulfobétaïne est ainsi quantifié. Le rendement final de 4 mg par litre de culture est satisfaisant. La protéine est concentré à environ 6 mg/ml en vue des essais de cristallisation, et non pas à 10 mg/ml, ce qui limite les pertes à cette étape.

Étapes	Quantité de protéine
Chromatographie d'affinité au Zn^{2+}	25 mg
Concentration	21 mg
Gel-filtration	14 mg
Concentration	8 mg
Rendement final	4 mg/l de culture

Tableau 7 : Rendement de purification du complexe double mutant C→S lié à l'œstradiol.

3.4 Bilan

- La modification du protocole d'expression a permis de produire une protéine plus stable, qu'il fut possible d'extraire en absence de sulfobétaïne. L'absence de l'étape chromatographique sur échangeur d'ions a permis de conserver un rendement satisfaisant en fin de purification. Le degré de pureté et d'homogénéité a été suffisant pour la cristallisation.

- Le peptide polyhistidine a été clivé, car sa présence s'est avéré gênante dans la cristallisation du double mutant C→S. En présence de cette fusion, des microcristaux inutilisables pour des expériences de diffraction des rayons X avaient été obtenus. Il en va de même pour le triple mutant, dont la cristallisation n'a abouti qu'après protéolyse « spontanée » du peptide polyhistidine et des deux premiers résidus du domaine E (voir chapitre Cristallisation).

C. Purification des fusions à la thiorédoxine

Nous avons testé la fusion à la thiorédoxine sur le récepteur et constaté qu'elle permettait de manipuler le domaine de fixation à l'hormone en absence de ligand (Figure 34). Alors que dans le cas de la fusion au peptide polyhistidine seul, la protéine s'agrège en absence de ligand, la fusion à la thiorédoxine reste soluble et stable au cours du temps, ce qui permet la purification de l'apo-protéine. Nous avons mis à profit cette propriété dans la purification du mutant constitutif et dans celle des complexes avec des ligands de synthèse, formés non pas lors de la culture, comme avec l'œstradiol, mais en cours de purification. Nous avons utilisé le triple mutant C→S insensible au stress oxydatif, en vue de la formation de ces complexes. Le Tableau 8 résume les conditions d'expression et de purification des fusions à la thiorédoxine décrites dans cette partie.

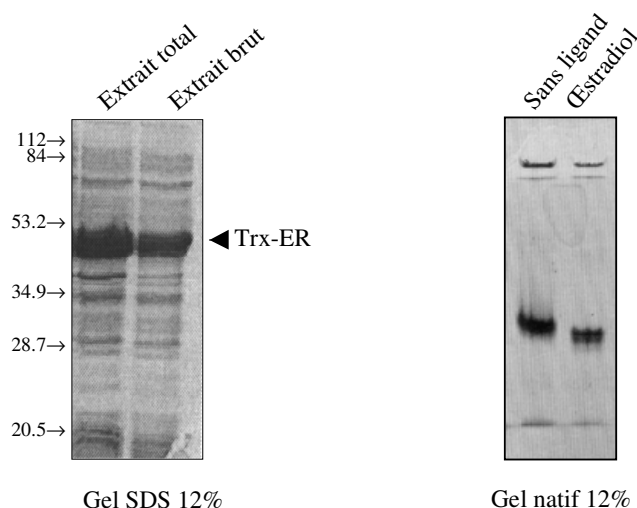


Figure 34 : Apport de la thiorédoxine : solubilité et stabilité en absence de ligand

La fusion à la thiorédoxine solubilise le domaine E : en comparant les deux dépôts sur le gel SDS-PAGE, l'extrait brut et l'extrait total, on constate que la majorité de la fusion est produite sous forme soluble. De plus, la fusion maintient le domaine E sous forme soluble et homogène en absence de ligand : on peut noter qu'il y a une légère différence de migration en absence et en présence d'œstradiol (le complexe migrant plus loin), ce qui corrobore l'hypothèse de la compaction du domaine induit par le ligand.

Étapes	Triple mutant C381S+C417S+C530S	Mutant constitutif Y537S
Préculture	Milieu gélosé	
Culture	LB + saccharose 10%	
Induction	À 15°C	
Lyse cellulaire	2M sulfobétaïne 50mM NaCl 100mM NaKHPO ₄ -	- 200mM KCl 100mM NaKHPO ₄ 20mM β-Me
Dilution de la fraction soluble	0.5M sulfobétaïne 50mM NaCl 100mM NaKHPO ₄	-
Chromatographie d'affinité au Zn ²⁺ (gradient en imidazole dans le tampon donné)	50mM NaCl 100mM NaKHPO ₄ -	200mM KCl 100mM NaKHPO ₄ 20mM β-Me-
Ajout de ligand	Ligand ZK233702	-
Clivage de la fusion	Thrombinolyse	
Chromatographie d'affinité au Zn ²⁺	50mM NaCl 100mM NaKHPO ₄ -	200mM KCl 100mM NaKHPO ₄ 20mM β-Me
Échange de tampon ou Gel-filtration	50mM NaCl 50mM Tris-mal pH 8 10μM ZK233702 -	50mM NaCl 50mM Tris-mal pH 8 - 20mM β-Me

Tableau 8: Protocoles de purification des domaines E mutants en fusion à la thiorédoxine.

Un échange de tampon sur colonne a été réalisé dans le cas du triple mutant C→S ligandé, alors qu'une chromatographie de gel-filtration a été réalisée sur le mutant constitutif (colonne sur laquelle l'apo-récepteur a fixé de l'œstradiol contaminant : voir dans la section suivante, la caractérisation des critères de mutant constitutif).

1. Purification du triple mutant C→S en présence d'un antagoniste de synthèse

La mise au point du protocole de purification d'un complexe avec un ligand antagoniste en vue des essais de cristallisation ne fut pas aisée. Tout d'abord, nous avons commencé à travailler sur des antagonistes qui diminuaient de façon considérable la solubilité du complexe, pour ne pas parler d'agrégation totale au contact du ligand. Puis il a fallu établir un procédé pour cribler les ligands. Nous nous sommes tournés vers la fusion à la thiorédoxine stabilisant le récepteur en absence de ligand. En fait, il s'agissait de différentes constructions en fusion à la thiorédoxine décrite dans le chapitre précédent, avec ou sans peptide polyhistidine C-terminal. Pendant presque deux ans, les préparations de ces différentes constructions ont été testées, jusqu'à ce que l'une d'entre elles aboutisse à la cristallisation d'un complexe.

La production d'apo-protéine présente plusieurs avantages dans l'étude systématique de complexes :

- il est possible de tester différents ligands à la fois, à la recherche de candidats appropriés à la cristallisation des complexes,
- c'est un moyen plus économique pour produire les complexes. On évite ainsi d'ajouter les ligands (dont la chimie est coûteuse, souvent difficile, et qui ne sont donc pas disponibles en grandes quantités) dans les milieux de culture et les tampons de colonne.

Dans un premier temps, nous avons sélectionné les ligands ne provoquant pas l'agrégation du récepteur. Puis, nous avons préparé des quantités de complexes adaptés à une étude cristallographique. Dans cette partie nous détaillerons le protocole de criblage de ligands, ainsi que le protocole d'expression et de purification du complexe lié à l'antagoniste ZK233702 ayant abouti à sa cristallisation.

1.1 Criblage de ligands

Nous avons entrepris le criblage d'une dizaine de ligands synthétisés par l'entreprise pharmaceutique Schering pour trouver des candidats potentiels pour une étude cristallographique. Parmi ces ligands se trouvaient des antagonistes purs et des SERM. Nous ne présenterons pas la structure chimique de ces ligands pour des raisons de confidentialité.

Des tests de solubilité des complexes ont été effectués en présence de la thiorédoxine dans un premier temps, puis après clivage de la fusion. Les complexes sont formés en présence de deux équivalents molaires de ligands. Étant donné que l'affinité des ligands pour le récepteur est de l'ordre du nanomolaire, les concentrations avec lesquelles nous avons travaillé (de l'ordre du micromolaire) ont permis la saturation totale des sites récepteurs. Le mélange a été laissé à 4°C pendant 15 heures, avant l'analyse par électrophorèse sur gel polyacrylamide en conditions natives.

1.1.1 En présence de la fusion à la thiorédoxine

Alors que toutes les bandes sur gel devrait avoir la même intensité (Figure 35), si les complexes présentaient la même solubilité, nous remarquons que ce n'est pas le cas pour deux ligands. En présence de deux antagonistes purs ZK 191 703 et de ZK 187 964 (en rouge sur la Figure 35), les complexes ne sont pas solubles et ont été éliminés par centrifugation. Ces ligands agrègent le complexe, même en présence de la thiorédoxine solubilisante, ce qui corrobore le mécanisme d'action proposé pour les antagonistes purs (voir I.B.5). En effet, il est probable que le même effet provoqué *in vivo* aboutisse à la dégradation du récepteur (Dauvois et al., 1992; Gibson et al., 1991). Les autres ligands (en noir sur la Figure 35) forment des complexes solubles, uniquement en présence de la thiorédoxine (données non présentées).

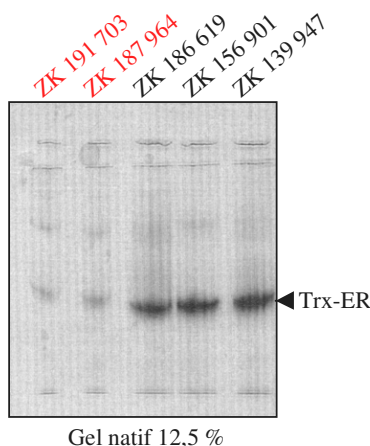


Figure 35 : Criblage de ligands en présence de la thiorédoxine.

Les complexes ont été formés en présence de deux équivalents molaires de ligands, à 4°C pendant 15 heures, avant centrifugation et analyse par électrophorèse sur gel polyacrylamide en conditions natives.

De nombreux essais de cristallisation (avec et sans Trx) ont été réalisés sur les trois complexes solubles, en vain.

1.1.2 Clivage de la thiorédoxine

L'effet solubilisant de la thiorédoxine peut dissimuler des différences plus fines dans le comportement des complexes. La fusion a été clivée par la thrombine et le produit de digestion est analysé sur gel natif. La Figure 36 montrent plusieurs complexes traités en parallèle, dans les mêmes conditions expérimentales. L'intensité des bandes, quoique très faible, est comparable entre les différents complexes, ainsi qu'avant et après la thrombinolyse. Les complexes, après coupure de la thiorédoxine, sont nettement moins solubles qu'en présence de la fusion. Tous les complexes semblent se comporter de la même manière, il n'y a pas de différence flagrante, comme dans le cas précédent. Ils ont donc tous été testés en cristallisation. Lors des premiers essais de cristallisation, un seul complexe se distinguait des autres en formant des précipités microcristallins : c'est le complexe lié au ZK 233 702 (ZK), dont la purification est détaillée dans le paragraphe suivant. Ce ligand est un SERM stéroïdien, portant des groupements en position 7 α et 11 β (cf. VI.C.1).

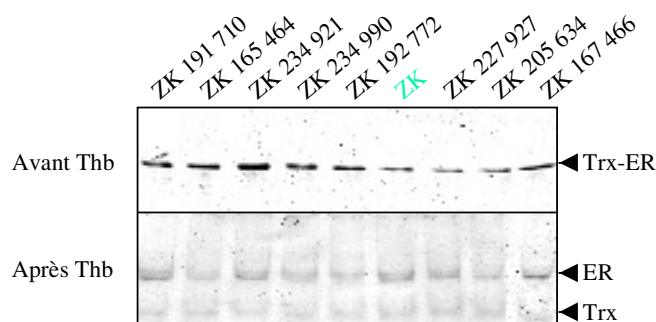


Figure 36 : Analyse des complexes après thrombinolyse.

Des échantillons de protéines liées à différents antagonistes ont été analysés sur gels natifs 6% avant et après thrombinolyse (Thb). Des essais de cristallisation ont été réalisés sur les neuf complexes en parallèle. Un seul complexe a cristallisé jusqu'à présent. Pour des raisons de confidentialité, les formules chimiques des autres ligands ne seront pas dévoilées.

1.2 Purification du triple mutant C→S lié au ZK233702

1.2.1 Production et purification de l'apo-protéine

La fusion à la thiorédoxine, portant la triple mutation C→S, a été produite en absence de ligand. La lyse cellulaire a été réalisée dans un tampon contenant la sulfobétaïne (2M SB201, 50mM NaCl, 100mM NaKHPO₄ pH 7.4). L'extrait brut a été dilué à 0.5M SB201, dans le même tampon dépourvu de sulfobétaïne, avant d'être injecté sur la colonne d'affinité au zinc. La chromatographie d'affinité au zinc a été réalisée en absence de ligand et de sulfobétaïne.

1.2.2 Formation du complexe et élimination de la thiorédoxine

Le ligand a été incubé avec la fusion pendant 24 heures (80μM ligand, la protéine de concentration 2mg/ml, soit 40μM, est ainsi saturée). Le clivage à la thrombine n'a été effectué qu'après la formation du complexe. La thrombine a été ajoutée à une concentration de 1 U/mg de protéine, et le milieu de digestion a été incubé pendant 48h à 4°C. La coupure a été vérifiée sur gel SDS-PAGE 12%. Elle fut totale et il n'y avait pas de site secondaire de protéolyse. Le produit de la digestion a été dilué 10 fois dans l'eau, avant d'être injecté sur une colonne d'affinité au zinc HiTrap 1ml (*Pharmacia*) : cette dilution de l'imidazole compétiteur a permis la fixation de la thiorédoxine portant le peptide polyhistidine sur la colonne. Le récepteur n'a pas été retenu sur la colonne et s'est retrouvé dans l'effluent de colonne. L'effluent fut concentré et un changement de tampon a été effectué sur une colonne G-25 de 70ml (*Pharmacia*). La protéine, ainsi conditionnée dans le tampon contenant 50mM NaCl, 50mM Tris-maléate pH 8.0, 10μM ZK233702, fut concentrée à 3mg/ml pour les essais de cristallisation.

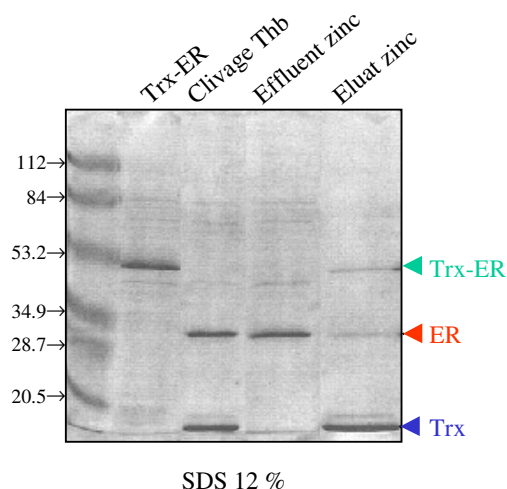


Figure 37 : Elimination de la fusion par chromatographie d'affinité au zinc.

Les dépôts avant et après clivage à la thrombine (Thb) montrent que la digestion est quasiment totale. Les produits de la digestion sont séparés par chromatographie d'affinité : la protéine d'intérêt passe à travers la résine alors que la thiorédoxine (portant le peptide polyhistidine) est retenue spécifiquement.

1.2.3 Rendement de purification

La fusion à la thiorédoxine présente un effet solubilisant indéniable et permet d'obtenir un bon rendement final de l'ordre de 8mg de complexe pur et homogène pour 1 litre de culture.

Étapes	Quantité de protéine
Chromatographie d'affinité au Zn^{2+}	105 mg
Chromatographie d'affinité au Zn^{2+}	52 mg
Concentration	34 mg
Échange de tampon	26 mg
Concentration	16 mg
Rendement final	8 mg/l de culture

Tableau 9 : Rendement de purification du complexe.

1.3 Bilan

- Nous avons travaillé sur différents sortes de ligands antagonistes : des antagonistes purs et des ligands SERM. Leur liaison au domaine E a diminué la solubilité du complexe formé et, en présence de certains antagonistes purs, provoqué une agrégation totale et irréversible.
- En utilisant la fusion à la thiorédoxine, permettant l'expression de l'apo-protéine, nous avons pu cribler de nombreux ligands, pour trouver des candidats appropriés à la cristallisation du complexe. La thiorédoxine a uniquement un effet solubilisant en *cis*. Quand la thiorédoxine est clivée, son effet stabilisant sur l'apo-récepteur est perdu. C'est pourquoi le ligand doit être ajouté avant la thrombinolyse.
- Quoique la sulfobétaïne apparaisse encore dans ce protocole de purification, il s'est avéré qu'elle était superflue, voire gênante dans la cristallisation des complexes, et a été éliminée des protocoles suivants.

2. Purification du mutant constitutif

Dans cette partie est décrite la procédure de purification du mutant constitutif Y537S. Il a été montré que cette mutation stabilisait la forme apo-récepteur (Carlson et al., 1997), qui jusqu'à présent n'a été décrite que pour des récepteurs non-stéroïdiens tels que RXR α (Bourguet et al., 1995) et PPAR γ (Nolte et al., 1998; Uppenberg et al., 1998).

2.1 Purification en trois étapes

La lyse cellulaire est réalisée dans un tampon dépourvu de ligand et de sulfobétaïne mais en présence d'agent réducteur (200mM KCl, 100mM NaKHPO₄ pH 7.4, 20mM β -mercaptoéthanol). L'extrait total est clarifié par ultracentrifugation (45000g, 1 heure, 4°C). L'extrait brut est purifié en trois étapes chromatographiques.

2.2 Chromatographie d'affinité au zinc

L'extrait brut est chargé directement sur une colonne d'affinité, équilibrée dans le même tampon que celui de la lyse cellulaire. La fusion est éluée dans $\approx$ 120mM d'imidazole jusqu'à 0.5M. Le chromatogramme obtenu est présenté à la Figure 38. Les fractions contenant le mutant sont rassemblées (environ 20ml).

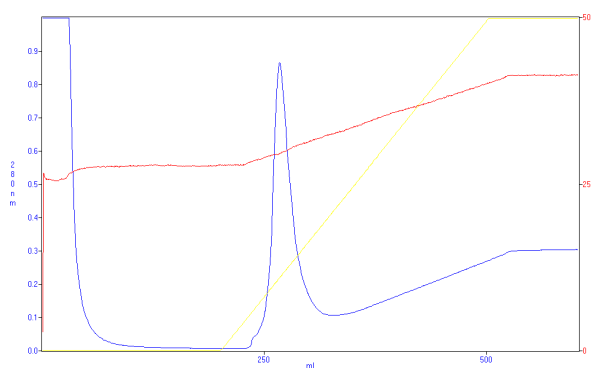


Figure 38 : Chromatogramme d'affinité au zinc.

2.3 Clivage de la thiorédoxine

L'étape de protéolyse est effectuée en ajoutant environ la thrombine à 0.5U/mg de protéines (soit 230µl à 0.25U/µl) et en laissant incuber 48 heures à 4°C.

2.4 Élimination de la fusion par affinité au Zn^{2+}

Le produit de la digestion est dilué 10 fois dans le tampon d'équilibration de colonne avant injection. La protéine d'intérêt est récupérée dans l'effluent de colonne, débarrassée de la thiorédoxine, mais aussi de la fraction de fusion non clivée.

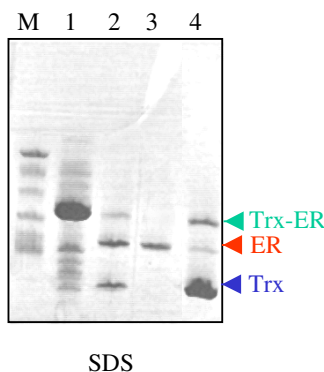


Figure 39 : Élimination de la fusion à la thiorédoxine.
(1 : pic Zn^{2+} , 2 : clivage, 3 : effluent Zn^{2+} , 4 : éluat Zn^{2+})

2.5 Gel-filtration

L'étape de gel-filtration nécessite au préalable la concentration de la protéine mutante à un volume de 3 ml, ce qui est réalisé par ultrafiltration sur une membrane YM-10 (*Amicon*). Le concentré est injecté sur la colonne, équilibrée au préalable dans le tampon renfermant 50mM NaCl, 50mM Tris-maléate pH 8.0, 50mM β -mercaptoéthanol. Les fractions de colonne correspondant au mutant dimérique (masse moléculaire apparente d'environ 50kDa) sont rassemblées et concentrées en vue des essais de cristallisation.

3. Bilan de purification

La pureté et l'homogénéité du mutant sont analysées par électrophorèse en conditions natives et dénaturantes sur gels de polyacrylamide présentés dans la Figure 40. La préparation est pure à plus de 95% et très homogène (une seule bande sur un gel natif en gradient 8-25%). Ce mutant présente une très grande stabilité au cours du temps. Nous n'avons pas constaté de phénomène d'agrégation. Ce comportement s'apparente à celui du triple mutant C→S, mais se distingue de la protéine sauvage, dont la concentration en protéine soluble diminue au cours du temps.

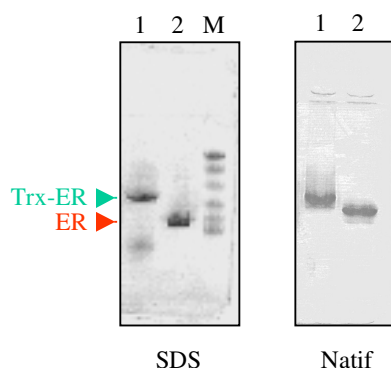


Figure 40 : Analyse de la pureté et de l'homogénéité.

Des échantillons avant la thrombinolyse (1) et après la gel-filtration (2) sont analysés sur gels gradient 8-25%.

La présence de la thiorédoxine augmente le rendement de production de protéine soluble d'un facteur 5 par rapport au rendement obtenu avec le double mutant C→S préparé dans les mêmes conditions (Tableau 10). L'élimination de la thiorédoxine n'affecte pas la solubilité du mutant constitutif, dont le rendement de purification est très élevé.

Chromatographie d'affinité au Zn^{2+}	115 mg
Chromatographie d'affinité au Zn^{2+}	47 mg
Concentration :	40 mg
Gel-filtration :	35 mg
Concentration :	22 mg
Rendement final	11 mg/L de culture

Tableau 10 : Rendement de purification du mutant constitutif.

IV. Cristallisation

Dans cette section sont décrites les conditions de cristallisation des domaines de fixation du ligand sauvage et mutants. Toutes n'ont pas abouti à l'obtention de cristaux utilisables pour des expériences de diffraction des rayons X (tels le mutant constitutif). Les conditions de cristallisation de la protéine sauvage lié à l'œstradiol ont été établies par Sylvia Eiler, et celles de la protéine portant la triple mutation C→S, par Sylvie Duclaud.

A. Aspects méthodologiques

L'obtention de monocristaux de taille suffisante et diffractant à haute résolution constitue une étape limitante au cours de la détermination d'une structure de macromolécule par cristallographie. Les cristaux sont composés d'une fraction importante de solvant (pouvant aller jusqu'à 70%), les rendant particulièrement fragile mécaniquement. La cohésion du cristal est assurée par différentes forces intermoléculaires non covalentes. Ces interactions sont de type van der Waals, électrostatiques et liaisons hydrogène. Les canaux de solvant permettent aux petites molécules (atomes lourds, agents cryoprotectants, ligands, substrats...) de diffuser à l'intérieur du cristal.

La définition des conditions de cristallisation demeure un processus empirique car le nombre de paramètres entrant en jeu est trop grand pour rationaliser ce phénomène, du moins pour les macromolécules biologiques. Aucune règle ne permet donc de prédire les conditions de cristallisation *ab initio*. Nous pouvons toutefois distinguer deux facteurs déterminants dans la réussite des essais de cristallisation : le criblage des paramètres physico-chimiques et la qualité du matériel biologique. La variation des paramètres physico-chimiques, tels que le pH, la température, la nature et la concentration en agent précipitant, permettent d'atteindre l'état de sursaturation, provoquant la cristallisation des macromolécules. La qualité du matériel biologique dépend de sa pureté et de son homogénéité. En effet, un haut degré de pureté est nécessaire, mais non suffisant, à l'obtention de cristaux. Les problèmes d'hétérogénéité peuvent se situer à différents niveaux et gêner la cristallisation :

- les modifications des macromolécules, que ce soit par protéolyse, par oxydation, par adsorption de cations ou par modifications post-traductionnelles non homogènes,

- différentes espèces en solution, espèces oligomériques ou conformationnelles. Alors que les espèces oligomériques peuvent être éliminées par une étape chromatographique de type gel-filtration, il est plus difficile de piéger une conformation unique pour les macromolécules flexibles. La flexibilité peut être due à l'organisation modulaire de la protéine ou à des régions non structurées, empêchant la cristallisation. Il est donc *a priori* plus aisé de cristalliser un domaine globulaire, avec lequel on atteindra un niveau d'homogénéité structural et fonctionnel adéquat. L'utilisation de ligands ou substrats présente également une grande efficacité dans la stabilisation d'une forme donnée, notamment dans le cas des récepteurs nucléaires.

1. Les trois étapes de la cristallisation

La cristallisation comporte trois étapes décrites ci-dessous : la sursaturation, la nucléation et la croissance cristalline.

1.1 Sursaturation

Pour qu'un cristal apparaisse dans une solution protéique, il est nécessaire, mais non suffisant, de faire passer la protéine d'un état soluble à un état de sursaturation (Figure 41). La sursaturation est un état métastable, où la concentration de la protéine est supérieure à sa solubilité. La concentration saline permet d'atteindre cet état de sursaturation par deux effets distincts sur la solubilité des protéines :

- Un effet de *salting-in* : à très faible force ionique, la solubilité des protéines croît avec la force ionique. Le phénomène physique expliquant la diminution de solubilité avec l'abaissement de la force ionique est lié à un effet essentiellement électrostatique (théorie de Debye-Hückel) dû à l'élimination d'ions essentiels à la compensation des charges de la protéine.

- Un effet de *salting-out* : à force ionique élevée, on constate que la solubilité des protéines diminue, si la force ionique augmente. Les ions présents en solution sont hydratés, tandis que la couche de solvation de la protéine est perturbée. La désolvatation des protéines

favorise leur association et/ou agrégation pour minimiser les surfaces hydrophobes exposées au solvant. Le « salting-out » est très utilisé pour la cristallisation.

Les sels employés mais également d'autres composants tels que des polymères organiques (comme les PEG et PEG-MME) ou des alcools (comme le MPD) sont utilisés pour la cristallisation des macromolécules en modifiant leur solubilité. Enfin toute une panoplie de composés chimiques (comme les détergents) permet également de modifier la solubilité, sans oublier le pH et la température.

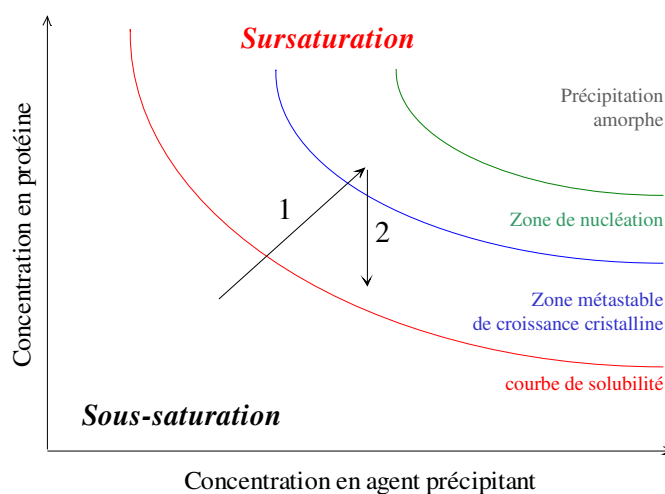


Figure 41 : Diagramme des phases.

Les trois étapes de la cristallisation : la sursaturation et la nucléation en **1**, et la croissance cristalline en **2**

1.2 Nucléation

L'état de sursaturation favorise l'apparition de germes cristallins. Lorsque la sursaturation est trop forte, la phase solide est constituée d'un précipité amorphe.

1.3 Croissance cristalline

La croissance cristalline s'effectue par fixation successives de molécules dans le réseau tridimensionnel du cristal en formation. Mais il arrive souvent que des germes apparaissent sans croître, ou qu'une croissance trop rapide forme des amas de cristaux

entrecroisés. La croissance cristalline jusqu'à l'obtention de cristaux de taille macroscopique constitue donc un facteur limitant. De plus, il ne suffit pas d'obtenir des monocristaux de taille macroscopiques, il faut encore que le réseau cristallin soit régulier, pour qu'ils soient capables de diffracter à haute résolution et que les données de diffraction soient exploitables.

2. L'ensemencement

L'ensemencement peut constituer une réponse aux problèmes de croissance cristalline. Il s'agit d'introduire un germe dans des conditions de sursaturation ne permettant pas la nucléation spontanée mais uniquement la croissance cristalline. Lorsque ce germe est microscopique, on parle de micro-ensemencement. L'ensemencement est également mis en œuvre en utilisant des petits cristaux pour améliorer leur taille, dans ce cas on parle de macro-ensemencement.

3. Les méthodes de cristallisation

Il existe plusieurs méthodes de cristallisation (Ducruix et Giegé, 1992) : la diffusion de vapeur, la microdialyse, la cristallisation en batch et en gel. La méthode de cristallisation par diffusion de vapeur est la plus utilisée au laboratoire, mais les autres méthodes ne sont pas négligées. En fait, la cristallisation est un processus multiparamétrique et la méthode utilisée peut être considérée comme un paramètre supplémentaire. Les résultats présentés n'ont été obtenus que par la méthode de diffusion de vapeur et la technique de la goutte suspendue.

Dans la méthode de diffusion de vapeur, une goutte est formée en mélangeant la solution contenant la protéine à une solution d'agent précipitant (sels, PEGs, alcools,...). Cette goutte est équilibrée contre une solution réservoir contenant la même solution en agent précipitant dans la plupart des cas. Du fait du mélange des solutions protéiques et d'agent précipitant, la concentration en agent précipitant est réduite dans la goutte. Le transfert d'eau ou de substances volatiles à travers la phase gazeuse s'opère entre la goutte et le réservoir en fonction de la concentration en sels des deux compartiments :

- de la goutte vers le réservoir, où il se produit le phénomène de *salting-out*. La concentration de l'agent précipitant et de la protéine permet d'atteindre l'état de sursaturation décrit par la flèche 1 de la Figure 41.

- du réservoir vers la goutte, phénomène assimilé au *salting-in*. La dilution d'un agent solubilisant de la protéine peut également permettre la sursaturation et la cristallisation.

4. Recherche des conditions de cristallisation

Plusieurs stratégies ont été suivies dans le but d'établir les conditions de cristallisation :

- La diffusion dynamique de lumière permet de déterminer la monodispersité du matériel biologique.

- Les tests de précipitation permettent de déterminer la concentration en agent précipitant (PEG de différentes masses moléculaires, MPD, sulfate d'ammonium) provoquant la précipitation de la protéine, et la nature réversible de ce phénomène. Un agent cristallisant ne dénature pas la protéine, même si la concentration à laquelle il est utilisé provoque sa précipitation. Ces tests permettent donc de déterminer quels agents précipitants et quelle gamme de concentration sont à tester de façon systématique.

- Les criblages systématiques consistent, par exemple, à faire varier la concentration en agent précipitant en fonction du pH. D'autres paramètres sont souvent analysés en parallèle, tels que l'effet de la température, de la concentration en protéine, ainsi que l'effet d'additifs (alcools, cations divalents, détergents).

- Le criblage factoriel, contrairement au criblage méthodique, consiste à échantillonner les conditions testées. Cette approche statistique, dite de la matrice éparse d'échantillonnage permet de couvrir une large gamme de conditions de cristallisation en un petit nombre d'essais. Un tel échantillonnage est disponible de façon commerciale (Hampton research, <http://www.hamptonresearch.com>). Il s'agit d'un ensemble de conditions de cristallisation, établies à partir de conditions de cristallisation connues, et combinant plusieurs paramètres (agents précipitant, sels de différentes natures, à différentes concentrations, à

différents pH). Les deux matrices que nous avons utilisé de manière systématique lors des premiers essais de cristallisation d'une protéine donnée, Crystal Screen I et II de *Hampton research*, sont décrites en annexe.

5. Cryocristallographie

Il est préférable de refroidir un cristal avant de le soumettre à l'irradiation par les rayons X, pour limiter les dommages causés par l'échauffement et les radicaux libres ainsi générés. Cette technique est appelée la cryocristallographie. C'est également un bon moyen de conserver les cristaux, en attendant leur enregistrement. Le cristal doit être protégé avant d'être soumis à un tel traitement (une température de l'ordre de -170°C). Il s'agit d'éviter la formation de glace cristalline qui serait fatale au cristal. La recherche d'un agent cryoprotectant n'est pas toujours triviale, car il faut préserver le pouvoir de diffraction du cristal. Il arrive que les conditions de cristallisation soient cryoprotectantes, notamment pour des conditions renfermant des concentrations élevées en PEG 400 ou en éthylène glycol (de l'ordre de 30%). Dans ce cas, le cristal peut être soumis directement au flux d'azote.

Dans la pratique, on procède de la façon suivante :

- des clichés de diffraction sont enregistrés sur un cristal monté en capillaire, maintenu à la température de croissance des cristaux. Ces clichés servent de référence.
- Un agent cryoprotectant est testé à différentes concentrations dans la liqueur-mère. Concrètement une boucle (Cryoloop de *Hampton research*) renfermant le mélange est placé dans le flux d'azote gazeux et un cliché de diffraction est enregistré. Si le cliché révèle la présence de glace cristalline, visualisée par des anneaux de diffraction à une résolution de $3.6\text{\AA}$, la concentration en agent cryoprotectant est augmentée.
- Un cristal trempé rapidement dans ce mélange est testé à froid. Cette technique est illustrée en annexe. Si la diffraction n'est pas altérée par ce traitement, les conditions cryogéniques sont établies. Le refroidissement des cristaux conduit souvent à l'augmentation de leur mosaïcité, surtout pour les cristaux de grande taille. Il est donc important de comparer les enregistrements effectués à la température de croissance des cristaux et ceux réalisés à basse température. Si l'augmentation de la mosaïcité est trop importante, il faut modifier les

conditions de refroidissement. Dans ce cas, la concentration, voire la nature, de l'agent cryoprotectant doivent être modifiée.

- Parmi les différents agents cryoprotectants, le plus communément utilisé est le glycérol. Des produits tels que l'éthylène glycol, le PEG400 et l'isopropanol, quoique ce dernier soit difficile à manipuler (problème d'évaporation) sont également cryoprotectants. Alcools de petite taille, sucres, huile peuvent être testés, voire combinés entre eux.

- Le trempage des cristaux est un autre paramètre à tester. Certains cristaux nécessitent des temps de trempage plus longs, ou une augmentation progressive en agent cryoprotectant par trempages successifs.

- Les cristaux sont très sensibles à la concentration en sel. Si la solution de trempage est trop concentré en sel, le choc osmotique peut détruire le cristal. Si la concentration en sel est trop faible, le cristal risque de se dissoudre. De plus, il est difficile de connaître la concentration précise en sel de la liqueur-mère, surtout dans les conditions où la goutte s'équilibre lentement contre le réservoir. La concentration en sel constitue un autre paramètre à tester.

- Il est important de stabiliser les cristaux dans la goutte de cristallisation, pour éviter qu'ils ne se dissolvent lors de leur manipulation. La stabilisation consiste à augmenter la concentration en agent précipitant. Les cristaux sont manipulés lorsque l'équilibre entre la goutte et le réservoir est atteint.

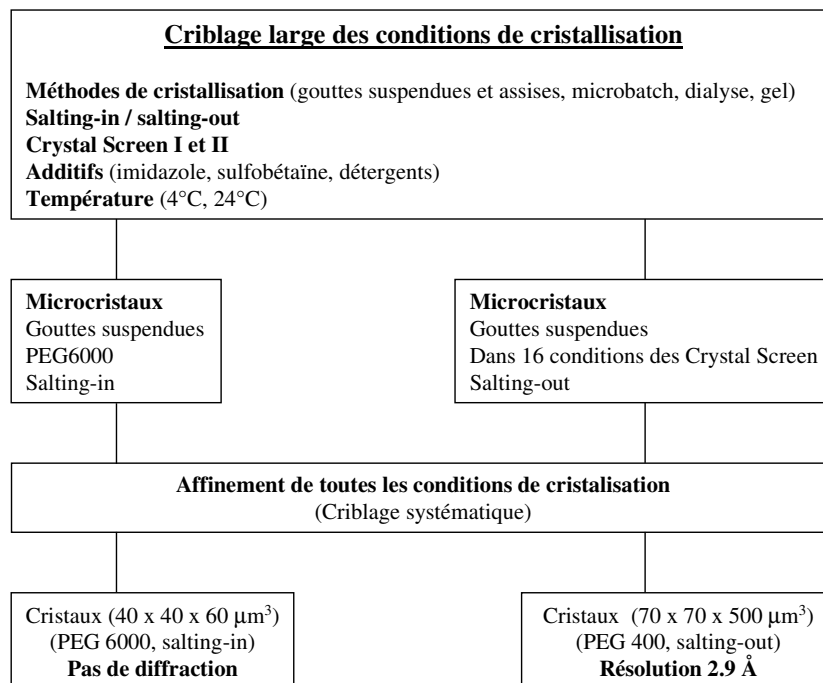
6. Caractérisation des cristaux

Les techniques de caractérisation biochimique de protéine provenant de cristaux dissous sont décrites en annexe. Une approche de l'étude cristallographique sera donnée dans la section suivante.

B. Résultats

1. Cristallisation du domaine E sauvage en complexe avec l'œstradiol

La stratégie de recherche des conditions de cristallisation de la protéine sauvage est illustrée dans le diagramme ci-dessous :



Les essais de cristallisation, ayant abouti à l'obtention de cristaux utilisables pour des expériences de diffraction des rayons X, ont été réalisés par la technique de la diffusion de vapeur, selon la méthode de la goutte suspendue, en salting-out et à 4°C. Toutes les solutions utilisées ont été filtrées sur des filtres *Millex* 0.22μ. Les gouttes ont été réalisées en ajoutant un volume de 2 à 8 μl de solution réservoir à un volume équivalent de protéine. Des cristaux utilisables pour des expériences de diffraction des rayons X ont été obtenus en présence de PEG 400. Le criblage des conditions de cristallisation a été réalisé en variant le pH, les concentrations en PEG 400 et en NaCl (Figure 42). La concentration en protéine indiquée dans la Figure 42 est celle de départ et les conditions de cristallisation sont celles du réservoir. Des cristaux d'une taille de l'ordre de $70 \times 70 \times 500 \mu\text{m}^3$ mettaient cinq semaines à apparaître.



[protéine] = 10mg/ml

4 à 20% PEG400

350 à 850mM NaCl

100mM Imidazole

pH 7.2, 7.3, 7.4

50mM β -mercaptoéthanol

4°C

Taille: $50 \times 50 \times 400 \mu\text{m}^3$

Figure 42 : Cristal et conditions de cristallisation de domaine E sauvage lié à l'œstradiol.

Dans la plupart des gouttes de cristallisation apparaissaient des amas polycristallins et les monocristaux étaient rares. Une croissance cristalline régulière n'était observée que dans une gamme étroite en PEG/NaCl et pH, qu'il fallait définir pour chaque préparation protéique.

1.1 Caractérisation biochimique des cristaux

Les cristaux sont caractérisés par Western blot en utilisant un anticorps dirigé contre le peptide polyhistidine. La détection immunologique permet de visualiser d'éventuels fragments de protéolyse. Les cristaux sont lavés par trois immersions successives dans la solution réservoir avant d'être dissous dans une solution SDS 1%. Ces lavages sont nécessaires pour éliminer la protéine provenant de la goutte et non du cristal. Les différentes solutions de lavage ainsi que la solution contenant les cristaux dissous sont déposés sur un gel SDS-PAGE 12% et le gel est transféré sur membrane de nitrocellulose pour la détection immunologique (Figure 43). Les cristaux contiennent le domaine E en fusion au peptide d'histidines. Malgré la présence de cette extrémité N-terminale, il n'a pas été possible de la visualiser en densité électronique, lors de la résolution de la structure.

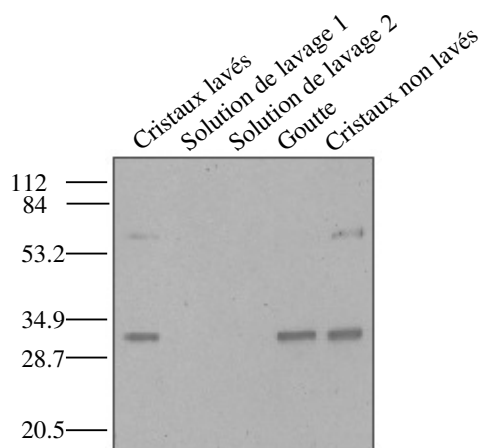


Figure 43 : Caractérisation des cristaux par Western blot.

Différents échantillons protéiques sont analysés : une solution protéique provenant de la dissolution de cristaux lavés, les solutions de lavage, une solution protéique provenant de la goutte cristallisation et enfin, une solution protéique provenant de la dissolution cristaux non lavés. La détection immunologique est réalisée à l'aide d'un anticorps primaire dirigé contre le peptide polyhistidine, et d'un anticorps secondaire couplé à une peroxydase (technique décrite en annexe).

1.2 Cryocrystallographie

La difficulté dans la recherche de solutions cryogéniques pour les cristaux de complexe sauvage résidait dans le faible pouvoir diffractant de ces cristaux, qui empêchait la mise au point au laboratoire. Il a fallu utiliser une source synchrotron (ESRF, à Grenoble et DESY, à Hambourg). Des agents cryoprotectants, tels que le PEG 400, MPD, éthylène glycol (EG), glycérol et des mélanges de ces solutions ont été testés en trempage rapide. Pour les cristaux, dont la liqueur-mère possédait une concentration élevée en PEG 400 (de 10 à 20%), la solution cryoprotectante donnant le meilleur résultat était le PEG 400 à 30% (Tableau 11). Le résultat a été jugé en terme de préservation du pouvoir diffractant et de la mosaïcité du cristal. À des concentrations en PEG plus faibles (4 ou 6%), nous avons utilisé un mélange de 6% PEG 400 et de 25% EG. La concentration en sel de la solution cryoprotectante est légèrement inférieure à celle du réservoir (de 50 mM) pour éviter que les cristaux ne subissent de choc osmotique. Le tampon imidazole est ajouté à 100 mM, au même pH que la solution de cristallisation.

Liqueur-mère	Solution cryoprotectante
<10% PEG400	6% PEG400 + 25% EG
50mM imidazole	100mM imidazole
450mM NaCl	400mM NaCl
10% à 20%PEG400	30% PEG400
50mM imidazole	100mM imidazole
500mM NaCl	450mM NaCl

Tableau 11 : Conditions cryoprotectantes des cristaux du domaine E sauvage lié à l'œstradiol.

1.3 Analyse cristallographique préliminaire

Les cristaux de forme allongée et biseautée appartiennent au système trigonal. Ils diffractent jusqu'à 2.9 Å pour les meilleurs cristaux. Leurs caractéristiques sont résumées dans le Tableau 12. Un cliché de diffraction, pris sur un cristal de $60 \times 60 \times 500 \mu\text{m}^3$, est présenté dans la Figure 44.

Système cristallin	Trigonal
Groupe d'espace	P3 ₂ 21
Multiplicité	6
Paramètres de maille	a = b = 105.50 Å ; c = 136.08 Å $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$
Volume de la maille	1 311 700 Å ³
Nombre de molécules / unité asymétrique	2 ou 3
Densité relative	3.6 ou 2.4 Å ³ .Dal ⁻¹
Pourcentage de solvant	66 ou 49 %

Tableau 12 : Caractéristiques des cristaux de complexe ER sauvage lié à l'œstradiol.

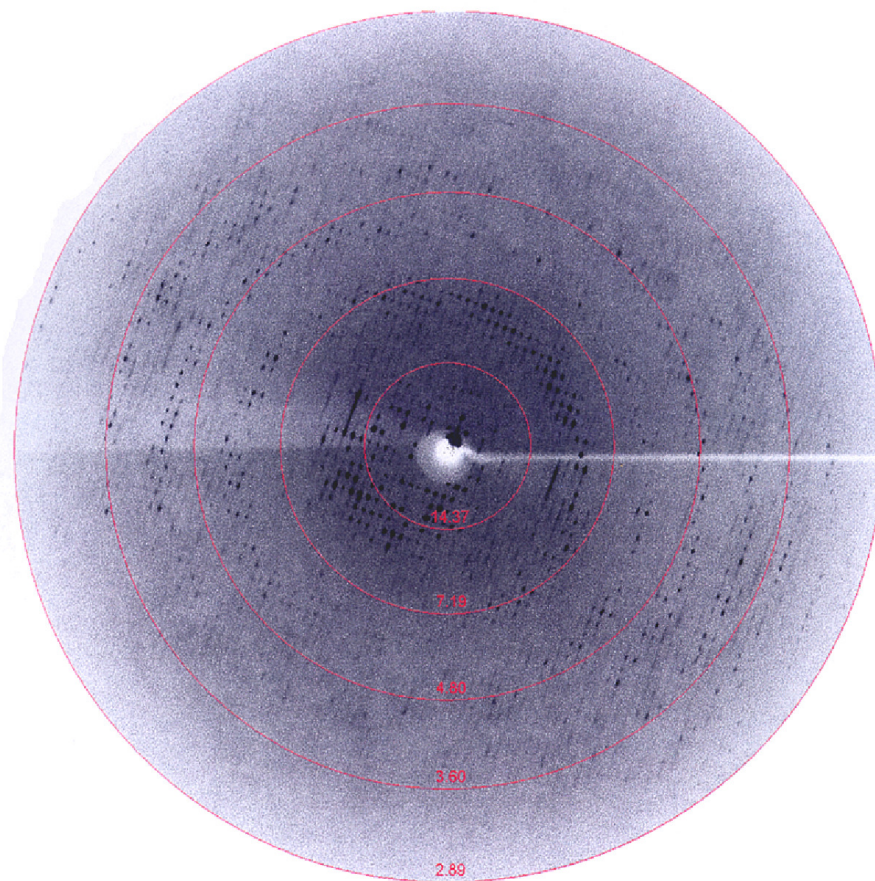


Figure 44 : Cliché de diffraction du complexe ER sauvage lié à l'œstradiol.

Ce cliché a été enregistré à -150°C à l'E.S.R.F (sur la ligne ID2). La distance entre le cristal et le détecteur est de 230 mm, le temps d'exposition de 45 secondes et l'oscillation de 0.5° .

2. Cristallisation du domaine E triple mutant C→S lié à l'œstradiol

Nous avons testé les matrices d'échantillonnage *Hampton*, Crystal screen I et II (*Hampton research*) et reproduit les conditions de cristallisation de la protéine sauvage. Seule la technique de la goutte suspendue a été utilisée. Des microcristaux ont été obtenus en présence d'un grand nombre d'agents cristallisants (l'acétate de sodium, le formate de sodium, de magnésium ou d'ammonium, le tartrate de potassium et de sodium, l'éthylène glycol, le PEG400, le PEG8000, le PEG20000) pour des pH compris entre 6.5 et 8.5. Par contre, des cristaux enregistrables n'ont pas été obtenus, même après un criblage systématique de ces agents cristallisants (Figure 45). Ces criblages ont été réalisés sur différentes préparations de protéine.

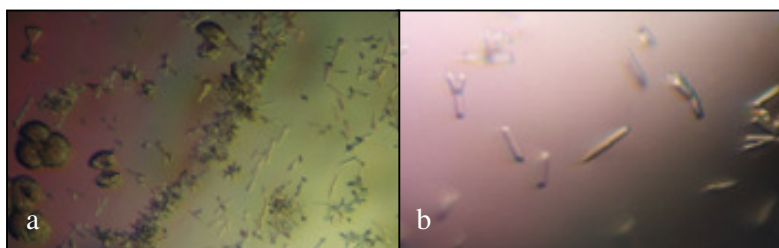


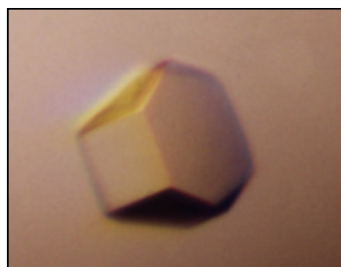
Figure 45: Photographies de microcristaux à problèmes de croissance cristalline.

En **a**, la condition Crystal screen I-25 avec une solution réservoir à 0.1M Imidazole pH 6.5, 1.0M Acétate Na. En **b**, une condition de cristallisation semblable à celle de la protéine sauvage à 4% PEG400, 100mM Imidazole pH 7.3, 300mM NaCl, 50mM β -mercaptoéthanol. L'agent réducteur constitue ici un additif de cristallisation et peut être remplacé par un autre alcool, tel que l'isopropanol.

Sur un échantillon protéique particulier, une nouvelle forme cristalline est apparue en présence des conditions de cristallisation suivantes :

- PEG8000 entre 10 – 15%,
- NaCl entre 300 et 600mM,
- pH = 6.9,
- à 4 et à 17°C,
- à une concentration en protéine de 4mg/ml.

Ces cristaux ont une forme hexagonale et atteignent des dimensions de l'ordre de $70 \times 70 \times 120 \mu\text{m}^3$ (Figure 46).



[protéine] = 4mg/ml

10 à 15% PEG8000

300 à 600mM NaCl

50mM Imidazole pH 6.9

4 et 17°C

Taille: $70 \times 120 \times 120 \mu\text{m}^3$

Figure 46 : Photographie et conditions de cristallisation du domaine E triple mutant C→S lié à l'œstradiol.

2.1 Caractérisation biochimique des cristaux

Différentes techniques de caractérisation des protéines ont été mises en œuvre sur les cristaux hexagonaux lavés et dissous : Western blot, spectrométrie de masse et séquençage N-terminal d'Edman.

2.1.1 Western blot

Alors que la liqueur mère renfermait la protéine de fusion au peptide polyhistidine, les cristaux lavés n'ont pas été détectés immunologiquement. Par conséquent, la protéine qui a cristallisé, était privée du peptide polyhistidine.

2.1.2 Spectrométrie de masse

Les cristaux ont été caractérisés par spectrométrie de masse selon la technique mise au point par Valérie Lamour et Noëlle Potier au laboratoire. Deux cristaux de taille $50 \times 50 \times 100 \mu\text{m}^3$ ont été prélevés dans les gouttes de cristallisation et lavés par trempages successifs dans la liqueur-mère, puis dans l'eau. Cette étape a permis d'éliminer les traces de PEG 8000 et de sel qui auraient empêché la détermination précise de la masse de la protéine constituant le cristal. Les cristaux ont montré une surprenante résistance mécanique au lavage dans l'eau, mais ont fini par se dissoudre dans le mélange dénaturant d'acétonitrile 50%, acide formique 1%. Ce mélange a permis l'analyse de la protéine en mode d'ionisation positive. Quatre espèces ont été caractérisées, présentant des masses moléculaires respectives de 28436 Da,

28309 Da, 28155 Da et 27909 Da, qui correspondent à différents fragments de protéolyse, dont les limites ont pu être caractérisées grâce au séquençage N-terminal (Tableau 13).

2.1.3 Séquençage N-terminal d'Edman

Le séquençage N-terminal d'autres cristaux dissous et transférés sur membrane de PVDF a permis de déterminer le début de la séquence de ces fragments. Nous avons déduit l'extrémité C-terminale des fragments en comparant les masses théoriques et les masses mesurées par spectrométrie de masse (Tableau 13). La différence entre la masse théorique et la masse expérimentale peut provenir d'adduits non éliminés lors du lavage des cristaux.

Fragments	Masse calculée	Masse mesurée
N304 – P552	28401	28436
N304 – A551	28304	28309
S305 – H550	28119	28155
S305 - R548	27 868	27909

Tableau 13 : Caractérisation des fragments constituant les cristaux de triple mutant C→S lié à l'œstradiol.

La combinaison des technique de spectrométrie de masse et de séquençage N-terminal a permis de caractériser de façon relativement précise la protéine provenant de cristaux dissous.

Contrairement à la protéine sauvage qui ne cristallisait pas après clivage de la fusion par la thrombine, la protéolyse de la protéine mutante a permis d'obtenir une nouvelle forme cristalline. La digestion du côté N-terminal a eu lieu après la lysine K303 ou l'asparagine N305. Cela ne correspond pas à une thrombinolyse, dont le site est localisé plus en amont (de 6 à 7 résidus du côté N-terminal du site de clivage). Nous avons tenté de reproduire de telles coupures avec la trypsine, qui est spécifique de sites basiques. La trypsine clivait la fusion à ces positions, mais également au niveau d'un site localisé à l'extrémité N-terminale de l'hélice H9 (Lys 467). La digestion à la trypsine n'était donc pas appropriée à la préparation de protéine en vue des essais de cristallisation du domaine de fixation du ligand.

2.2 Cryocrystallographie

La mise au point des conditions cryogéniques a pu être effectuée au laboratoire car les cristaux diffractaient bien les rayons X (une résolution de l'ordre de 3 Å). Les cristaux étaient tous refroidis dans la même solution cryogéniques (10% PEG8000, 20% glycérol, 50mM imidazole pH 6.9, 300mM NaCl). Ces cristaux étaient beaucoup plus résistants que les cristaux de protéine sauvage ou double mutant C→S (voir le paragraphe IV.B.3.2), surtout à l'égard de la concentration en sel.

2.3 Analyse cristallographique préliminaire

Les cristaux de forme hexagonale appartiennent au système cristallin hexagonal. La différence avec les cristaux de protéine sauvage ne s'arrête pas au système cristallin. En effet, et comme nous le verrons dans le chapitre sur l'analyse de la structure, la protéine triple mutante C→S adopte un repliement différent (antagoniste) de celle de la protéine sauvage (en conformation agoniste).

Ces cristaux diffractent jusqu'à 2.0 Å pour les meilleurs cristaux. Leurs caractéristiques sont résumées dans le Tableau 14. Un cliché de diffraction, pris sur un cristal de $60 \times 60 \times 500 \mu\text{m}^3$, est présenté dans la Figure 47.

Système cristallin	Hexagonal
Groupe d'espace	P6 ₅ 22
Multiplicité	12
Paramètres de maille	$a = b = 58.60 \text{ Å}$; $c = 276.02 \text{ Å}$ $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$
Volume de la maille	$820\,900 \text{ Å}^3$
Nombre de molécules / unité asymétrique.	1
Densité relative	$2.3 \text{ Å}^3 \cdot \text{Dal}^{-1}$
Pourcentage de solvant	46 %

Tableau 14 : Caractéristiques des cristaux de complexe ER sauvage lié à l'œstradiol

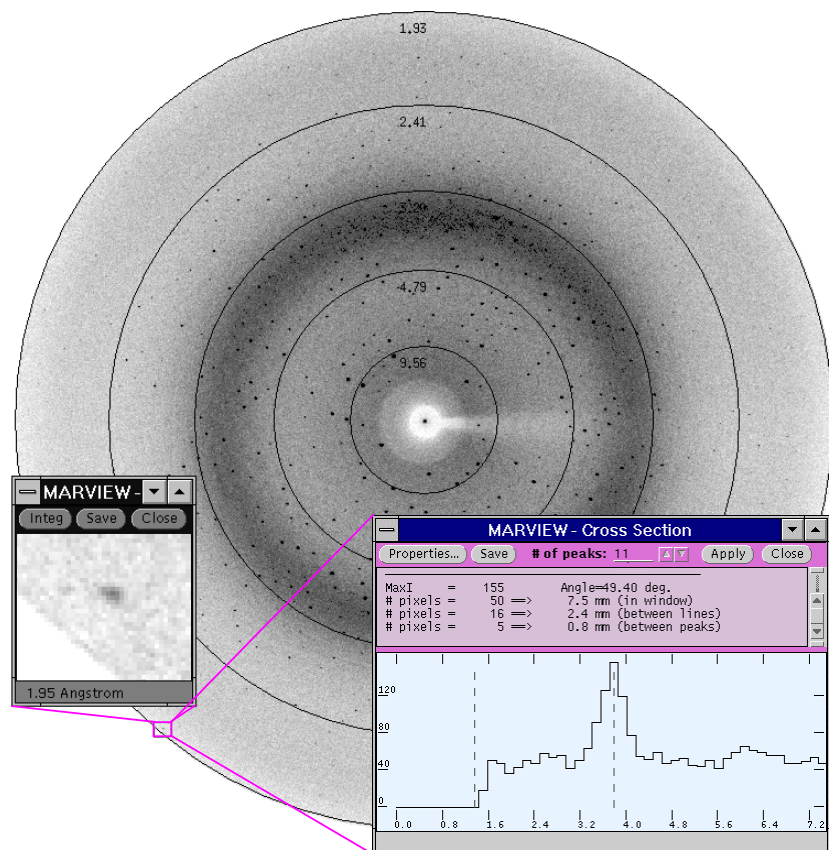


Figure 47 : Cliché de diffraction du complexe ER triple mutant C→S lié à l'œstradiol

Ce cliché a été enregistré à -150°C au LURE par André Mitschler. La distance entre le cristal et le détecteur est de 260 mm, le temps d'exposition de 5 minutes et l'oscillation de 0.5° . Un agrandissement est donné pour une tache à haute résolution, ainsi que sa section en nombre de pixels (*cross-section*).

3. Cristallisation du double mutant C→S en complexe avec l'œstradiol

Pour le complexe double mutant C417S+C530S lié à l'œstradiol, le but était de cristalliser la protéine dans la conformation agoniste (celle du récepteur sauvage), mais également dans la conformation antagoniste (celle du récepteur triple mutant C381S+C417S+C530S), en adaptant les conditions de cristallisation.

Nous avons ainsi criblé de façon systématique les paramètres suivants :

- les agents cristallisants PEG 400 (celui de la protéine sauvage), PEG 8000 (celui de la protéine triple mutante) et un PEG de masse moléculaire intermédiaire, PEG 4000,
- la concentration en NaCl (de 0 à 1M),
- le pH entre 6.5 et 7.5,
- la concentration en protéine (de 2 à 10 mg/ml),
- la température (4 et 17°C).

Les cristaux obtenus dans le PEG 400 étaient des aiguilles très fines (maximum 10µm d'épaisseur) et très longues (environ 200µm) (Figure 48 **a**). Ces cristaux ressemblaient aux cristaux de protéine sauvage obtenus dans les mêmes conditions. Mais leur croissance était limitée (surtout en épaisseur) ou se poursuivait par un enchevêtrement polycristallin.

Dans le PEG 8000, c'est-à-dire dans les conditions de cristallisation de la forme triple mutante C→S, nous n'obtenions que des microcristaux et en grand nombre (Figure 48 **b**). Pour enrayer le problème d'une trop forte nucléation, nous avons testé la technique de l'ensemencement. En tentant le microensemencement de germes dans une goutte limpide (solution réservoir : 3% PEG 8000, 400mM NaCl, 50mM Imidazole pH 6.9), des aiguilles de plus de 400µm de long croissent en deux semaines, mais ces cristaux étaient encore plus fins que ceux obtenus dans le PEG 400 (< 5µm).

Nous avons testé un PEG de masse moléculaire intermédiaire, le PEG 4000, qui est souvent efficace dans la cristallisation des protéines en général, et des récepteurs nucléaires en particulier (TR (Darimont et al., 1998), PPAR (Nolte et al., 1998) et surtout ER (Pike et al., 1999; Shiau et al., 1998)). Nous avons obtenu des cristaux de forme hexagonale dans une

gamme de concentration en PEG 4000 entre 10 et 17.5% et en NaCl entre 200 et 400mM, à pH 6.9 et à 17°C. La taille moyenne de ces cristaux était de l'ordre de $80 \times 80 \times 130 \mu\text{m}^3$ au bout de 4 semaines (Figure 48 c). La forme de ces cristaux était strictement identique à ceux du triple mutant obtenus dans le PEG 8000.

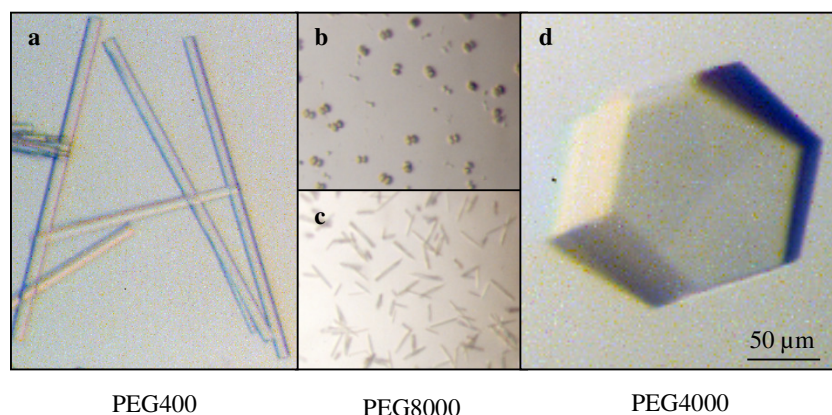


Figure 48 : Photographies des cristaux de double mutant lié à l'œstradiol.

Les 3 agents cristallisants testés sont les PEG 400, 4000 et 8000 dans les conditions décrites ci-dessous :

a :	[protéine] = 6 mg/ml	b :	[protéine] = 4 mg/ml	d :	[protéine] = 3.5 mg/ml
5% PEG 400		6% PEG 8000		12.5% PEG 4000	
50mM imidazole pH 6.6		50mM imidazole pH 6.6		50mM imidazole pH 6.9	
250mM NaCl		200mM NaCl		200mM NaCl	
50mM β -mercaptoéthanol		17°C		17°C	
4°C		c :	8% PEG 8000		
		50mM imidazole pH 6.6			
		600mM NaCl			
		17°C			

3.1 Caractérisation biochimique des cristaux

Le peptide polyhistidine a été éliminé par clivage à la thrombine lors de la préparation de la protéine. La présence des trois résidus (Gly Ser His) en aval du site de la thrombine et

l'intégrité du domaine E ont été confirmées par spectrométrie de masse et séquençage N-terminal de la protéine après dissolution de cristaux obtenus dans le PEG 4000.

3.2 Recherche des conditions cryoprotectantes

Dans le cas des aiguilles apparues dans le PEG 400, nous avons employé les solutions cryogéniques définies pour le récepteur sauvage. Par contre, il a fallu mettre au point les conditions de refroidissement avec les cristaux obtenus dans le PEG 4000. Parmi les agents cryogéniques testés (glycérol, PEG 400, EG, MPD), aucun ne permit le refroidissement sans détériorer le pouvoir diffractant et la mosaïcité du cristal. En fait, les cristaux obtenus dans le PEG 4000 étaient très fragiles, et on pouvait constater leur détérioration à la binoculaire : ils se fissaient au contact d'une solution cryoprotectante non adaptée. Néanmoins, parmi toutes les solutions testées, l'éthylène glycol (EG) permettait au cristal de conserver un certain pouvoir diffractant (la diffraction était intermédiaire entre celle d'un cristal testé en capillaire et celle d'un cristal refroidi avec les autres solutions). Nous avons donc essayé de stabiliser les cristaux en augmentant la concentration en PEG 4000 de 2.5% dans la goutte avant le trempage dans la solution cryoprotectante. De plus, nous avons testé l'effet de trempages successifs dans des concentrations croissantes en EG. Ainsi un cristal (obtenu dans 10% PEG 4000, 50mM imidazole pH 6.9, 300mM NaCl) prélevé de la goutte stabilisée (à 12.5% PEG 4000) fut trempé, pendant quelques secondes, dans des solutions contenant 5, 10, 15 et finalement 20% EG en présence de 12.5% PEG 4000, 50mM imidazole pH 6.9, 300mM NaCl. Ce traitement permit au cristal de conserver son pouvoir diffractant.

3.3 Analyse cristallographique préliminaire

Les caractéristiques des cristaux de complexe, résumées dans le Tableau 15, montrent que les cristaux obtenus dans le PEG 400 et le PEG 4000 présentent différents paramètres de maille et groupe d'espace. Les différentes conditions de cristallisation ont donc permis de modifier l'empilement cristallin.

- Les cristaux hexagonaux, qui apparurent dans le PEG 4000, appartiennent au même groupe d'espace et présentent les mêmes paramètres de maille que les cristaux de triple mutant C→S. La distance D entre le cristal et le détecteur était de 200 mm, le temps

d'exposition de 3 secondes et l'oscillation de 0.3° (à l'E.S.R.F., Grenoble, sur ID14-EH4). Les cristaux diffractent jusqu'à $1.7\text{\AA}$ de résolution.

- Les cristaux obtenus dans le PEG 400, sont monocliniques. Leur pouvoir diffractant est limité, de par leur petite taille de $10 \times 10 \times 200 \mu\text{m}^3$ (la résolution atteint dans le meilleur des cas $3.5 \text{\AA}$). Le cliché montré dans la Figure 49 a également été enregistré sur ID14-EH4 ($D = 260 \text{ mm}$, 3 sec d'exposition et 0.3° d'oscillation). Nous n'avons pas pu enregistrer un jeu de donnée, car le seul cristal diffractant suffisamment les rayons X a été perdu au cours des réglages de l'alignement du cristal dans les rayons X. D'autres cristaux devront être testés pour confirmer ces observations préliminaires.

	Cristaux hexagonaux PEG 4K	Aiguilles PEG 400
Système cristallin	Hexagonal	Monoclinique
Groupe d'espace	$P6_322$	$P2$
Multiplicité	12	2
Paramètres de maille	$a = b = 58.39 \text{\AA}$; $c = 275.82 \text{\AA}$ $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$	$a = 65 \text{\AA}$; $b = 105 \text{\AA}$; $c = 136 \text{\AA}$ $\alpha = \gamma = 90^\circ$; $\beta = 92.4^\circ$
Volume de la maille	$814\,400 \text{\AA}^3$	$927\,400 \text{\AA}^3$
Nombre de molécules / unité asymétrique.	1	6 ?
Densité relative	$2.3 \text{\AA}^3 \cdot \text{Dal}^{-1}$	$2.6 \text{\AA}^3 \cdot \text{Dal}^{-1}$
Pourcentage de solvant	46 %	52 %

Tableau 15 : Caractéristiques des cristaux de complexe ER double mutant C417S+C530S lié à l'œstradiol.

Nous n'avons que deux clichés de diffraction pour les aiguilles obtenus dans le PEG 400, toutes les données cristallographiques sont donc très « préliminaires » (en particulier le nombre de molécules dans l'unité asymétrique).

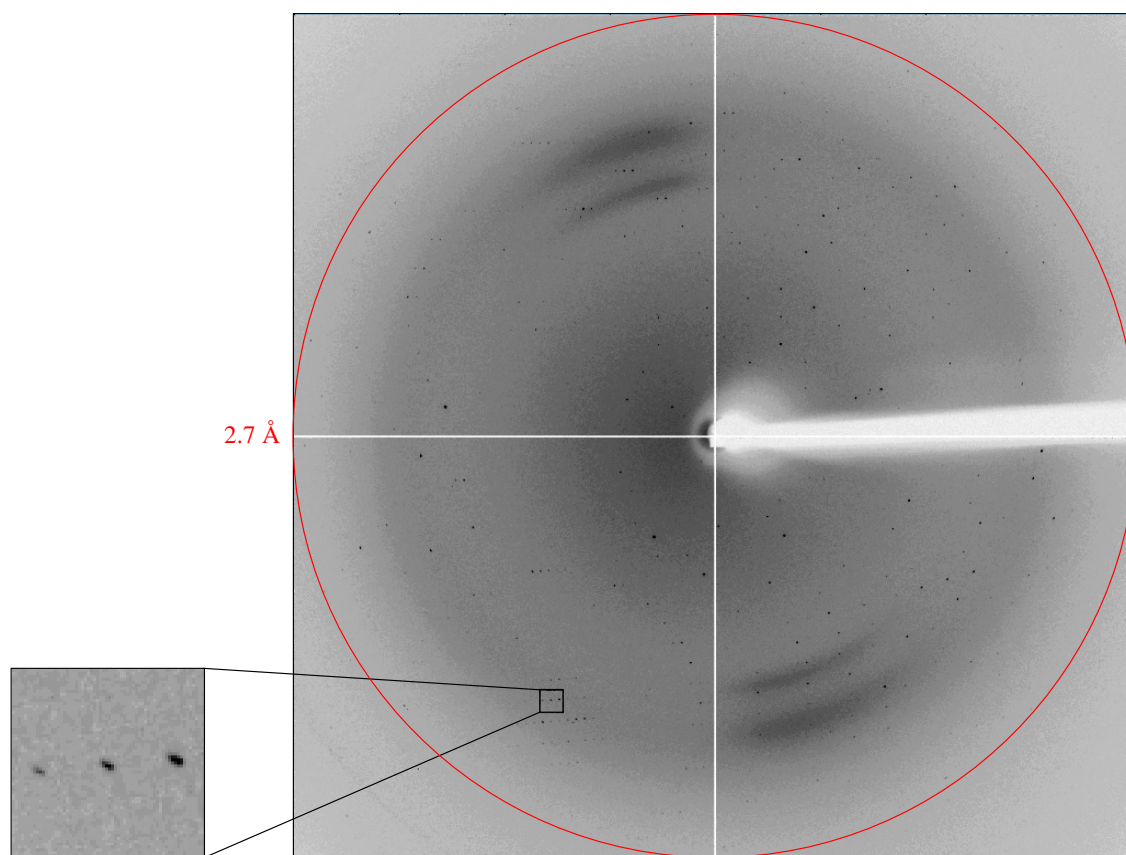


Figure 49 : Cliché de diffraction du double mutant C→S, cristallisé dans le PEG 400.

Ce cliché a été enregistré à -150°C à l'ESRF à Grenoble sur ID14-EH4. La distance entre le cristal et le détecteur est de 260 mm, le temps d'exposition de 3 sec et l'oscillation de 0.3° . Un agrandissement permet de visualiser quelques taches alignées.

4. Cristallisation du triple mutant C→S en complexe avec l'antagoniste ZK233702

Des complexes avec différents antagonistes de Schering ont été testés en purification et en cristallisation. L'obtention de cristaux de complexe lié au ZK233702 a été réalisée par ensemencement successifs.

4.1 Cristallisation par ensemencements successifs

Les premiers microcristaux du domaine E triple mutant C→S lié au ZK233702 ont été obtenus au cours d'un criblage de PEG8000/NaCl dans les mêmes conditions que le complexe triple mutant C→S lié à l'œstradiol. Ces microcristaux n'étaient pas utilisables pour une expérience de diffraction des rayons X (plaquettes en **a** de la Figure 50). Une plaquette a été prélevée et introduite dans une nouvelle goutte limpide, équilibrée contre un réservoir renfermant 10% PEG 8000, 0.3M NaCl, 50mM imidazole pH 6.9. Cette technique de macro-ensemencement a provoqué la cristallisation dans la goutte réceptrice, mais les microcristaux obtenus n'étaient pas plus utilisables que les précédentes plaquettes. Un deuxième ensemencement a été réalisé et a généré des cristaux diffractant les rayons X. Les microcristaux (sur la Figure 50 **b**) sont pêchés à l'aide d'une cryoboucle (*cryoloop* de *Hampton*) et écrasés dans la liqueur-mère. Une infime quantité de ce mélange est prélevée à l'aide d'une cryoboucle et utilisée pour ensemercer de nouvelles gouttes limpides équilibrées contre un réservoir renfermant 10% PEG 8000, 0.1M NaCl, 50mM imidazole pH 6.9, par simple trempage. Les cristaux obtenus (Figure 50 **c**) ont une taille moyenne $30 \times 30 \times 40 \mu\text{m}^3$. Ils sont refroidis dans un mélange PEG 8000/glycérol (IV.B.2.2).

4.2 Analyse cristallographique préliminaire

Les cristaux sont de forme hexagonale et appartiennent au système cristallin hexagonal. Quoique très petits, ils diffractent jusqu'à 2.9 Å pour les meilleurs cristaux. Leurs caractéristiques cristallographiques sont résumées dans le Tableau 16.

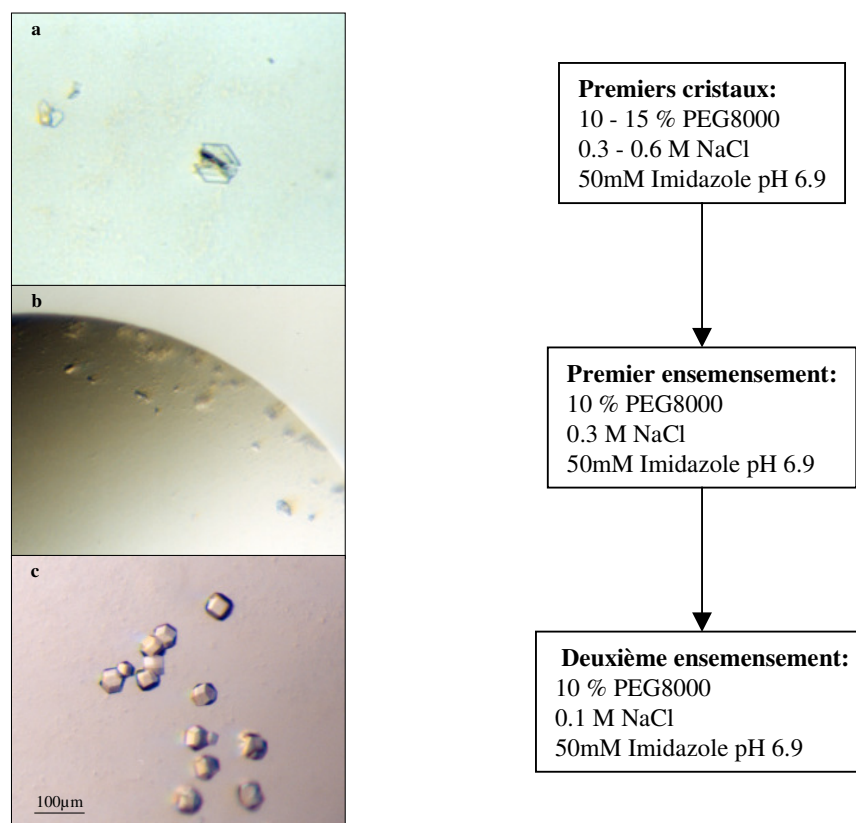


Figure 50 : Stratégie d'obtention de cristaux de complexe avec le ZK233702.

Photographie des premiers cristaux en **a** et conditions de cristallisation. Photographie des cristaux obtenus par macro-ensemencement en **b** dans une goutte équilibrée contre la solution réservoir indiquée. Un deuxième ensemencement est nécessaire pour obtenir des cristaux de taille moyenne $30 \times 30 \times 40 \mu\text{m}^3$ en **c**.

Système cristallin	Hexagonal
Groupe d'espace	P6 ₅ 22
Multiplicité	12
Paramètres de maille	$a = b = 58.15 \text{ \AA}$; $c = 273.15 \text{ \AA}$ $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$
Volume de la maille	$799\,900 \text{ \AA}^3$
Nombre de molécules / unité asymétrique.	1
Densité relative	$2.3 \text{ \AA}^3 \cdot \text{Dal}^{-1}$
Pourcentage de solvant	47 %

Tableau 16 : Caractéristiques des cristaux de complexe ER triple mutant C→S lié au ZK233702.

5. Cristallisation du mutant constitutif

Les pistes ne sont pas toujours obtenues à l'aide de criblage factoriel. La cristallisation du mutant constitutif Y537S illustre bien ces propos. Alors que des cristaux ont été obtenus en criblant de façon systématique le PEG 4000, en fonction de la concentration en NaCl, du pH et de la concentration protéique, aucune piste n'apparut dans les conditions des Crystal Screen I et II.

Ainsi apparurent au bout de trois semaines des microcristaux dans le PEG 4000. Ces cristaux continuèrent leur croissance et atteignirent la taille maximale de $50 \times 70 \times 400 \mu\text{m}^3$ après six semaines. Ces cristaux ont été testés en capillaire. Malheureusement, ils ne diffractaient pas. Ils ont également été caractérisés par spectrométrie de masse en conditions dénaturantes et en polarisation négative, ce qui a permis la détection d'un ligand dont la masse moléculaire correspondait à celle de l'œstradiol. Cette protéine avait été purifiée sur une colonne de gel-filtration contaminée à l'œstradiol. Le passage sur la colonne avait suffi au récepteur pour fixer les traces de ligand adsorbé sur la résine. L'hétérogénéité, qui peut résulter de cette contamination, pourrait être à l'origine du problème de diffraction de ces cristaux.



Figure 51 : Cristaux et conditions de cristallisation du mutant constitutif.

C. Bilan

En ce qui concerne la protéine sauvage, l'obtention de cristaux utilisables pour une expérience de diffraction des rayons X a non seulement nécessité l'affinement des conditions de cristallisation, mais également l'amélioration de la pureté et de l'homogénéité de l'échantillon protéique.

Alors que la protéine sauvage a cristallisé en présence du peptide polyhistidine, il fut nécessaire de le cliver pour cristalliser le double et le triple mutant C→S. Dans le cas du triple mutant, ce clivage fut « spontané ».

Les essais de cristallisation réalisés sur le double mutant C417S+C530S ont montré que les conditions de cristallisation influençaient l'empilement cristallin. Une forme cristalline, appartenant au même groupe d'espace que celle du triple mutant C→S, a été obtenue en présence de PEG 4000, tandis qu'une forme monoclinique est apparue dans le PEG 400.

Les cristaux obtenus avec le ligand de synthèse ZK233702 étaient très petits. Malgré leur petite taille, la structure tridimensionnelle du complexe a été déterminée à une résolution de 2.9 Å. On peut toutefois s'interroger sur l'influence de la séquence à l'extrémité N-terminale, étrangère au domaine E, et subsistant après thrombinolyse de la fusion à la thiorédoxine. Les 13 résidus restants pourraient gêner l'empilement régulier des molécules dans le cristal. Cette séquence pourrait être à l'origine d'une mosaïcité élevée et limiter la croissance cristalline, expliquant que l'obtention de ces cristaux a nécessité la technique de l'ensemencement. C'est pourquoi nous avons généré une construction dans laquelle il ne restera que 3 résidus après clivage de la fusion (cf. chapitre I A.2.3.2).

La résolution des structures cristallographiques des domaines E sauvage et triple mutant C→S est présentée dans le chapitre suivant. Celle du double mutant est en cours et ne sera pas présentée.

V. Étude cristallographique

Dans cette partie sont décrits l'enregistrement, le traitement des données de diffraction et la résolution des structures cristallographiques des domaines de fixation du ligand du récepteur sauvage lié à l'œstradiol et du triple mutant C→S, lié soit à l'œstradiol, soit à l'antagoniste ZK233702. J'ai travaillé sur le dernier complexe. Les structures de complexes liés à l'œstradiol ont été résolues par Marc Ruff.

A. Aspects méthodologiques

1. Collecte des données de diffraction

Le montage du cristal constitue la première étape dans une expérience de diffraction des rayons X. Il s'agit d'aligner le cristal sur le diffractomètre à l'aide d'une tête goniométrique, de telle sorte que le cristal reste dans le faisceau de rayons X au cours de sa rotation. La deuxième étape consiste à exposer le cristal et visualiser les données de diffraction enregistrées sur un détecteur. On découvre alors immédiatement si le cristal diffracte, s'il est mono- ou polycristallin et si les pics de diffraction sont bien séparés. Un deuxième et un troisième cliché sont pris respectivement à 45° et 90° de la première orientation, afin de vérifier l'isotropie de diffraction du cristal. Ces premiers clichés sont utilisés pour déterminer les paramètres de maille et l'orientation du cristal, permettant la mise au point de l'expérience de diffraction. À ce stade, des compromis sont faits sur la position du détecteur, le temps d'exposition et l'angle d'oscillation du cristal dans le faisceau.

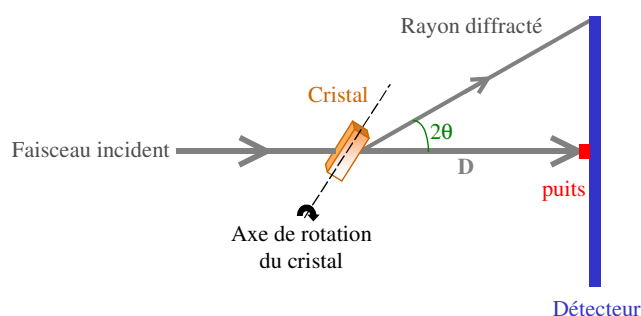


Figure 52 : Schéma d'une expérience de diffraction.

Le détecteur est protégé du faisceau direct par un puits (*beam stop*). La distance du cristal au détecteur D détermine la résolution maximale au bord du détecteur (en Å).

Il existe plusieurs techniques d'enregistrement de données de diffraction, celle que nous avons utilisée est la méthode de rotation du cristal autour d'un axe perpendiculaire au faisceau des rayons X. Un espace complet est obtenu en balayant l'ensemble de l'espace réciproque. Le mouvement d'oscillation du cristal entraîne le mouvement du réseau réciproque, dont certains nœuds peuvent alors se trouver en position de diffraction lors de la traversée de la sphère d'Ewald (la position du cristal représente le centre de la sphère, de rayon $1/\lambda$).

La stratégie d'enregistrement d'un cristal dépend de nombreux paramètres, lié au cristal lui-même (taille des cristaux, durée de vie du cristal dans le faisceau, mosaïcité, maille), mais également à la taille du détecteur, ainsi qu'à la source de rayons X (longueur d'onde, brillance) (Mitchell et al., 1999).

1.1 Sources de rayons X

Le choix des sources de rayons X dépend du pouvoir diffractant du cristal. Les sources de rayons X que nous avons utilisé sont les suivantes :

- le générateur à anode tournante du laboratoire, dans lequel les électrons issus d'un filament de tungstène, sont accélérés par un champ électrique, et frappent une anode de métal pur, le cuivre. Le rayonnement émis possède des raies caractéristiques. La raie $K\alpha$ de longueur d'onde $\lambda \approx 1.54 \text{ \AA}$ est ensuite sélectionnée par un système de doubles miroirs.

- les sources de rayonnement synchrotron de LURE (Paris), de l'ESRF (l'European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble), DESY (Hambourg). Ce rayonnement est émis par des électrons ou positons relativistes dont la trajectoire est déviée par un champ magnétique dans les anneaux de stockage d'accélérateurs de particules. Le faisceau intense de rayons X générés est polychromatique. Différents systèmes de monochromateurs permettent de sélectionner une longueur d'onde donnée (de l'ordre d' $1 \text{ \AA}$). Le faisceau doit également être focalisé.

1.2 Détecteurs

Les détecteurs sont choisis en fonction de leur taille, de leur précision (la taille des pixels) et de leur temps de lecture. La taille des détecteurs est importante pour enregistrer, dans de bonnes conditions, des cristaux possédant une grande maille. Plus la maille est grande, plus les taches de diffraction sont rapprochées. Pour séparer de telles taches, il faut reculer le détecteur, ce qui fait perdre en résolution, sauf si le détecteur est assez grand. Une très haute sensibilité (la gamme dynamique du détecteur) peut partiellement compenser la limite de taille d'un détecteur. Le temps de lecture du détecteur est un facteur déterminant lorsque le cristal se détériore rapidement dans le faisceau de rayons X.

- Les détecteurs de type Imaging Plate (*FUGI*, *MarResearch*, ...), sont des plaques photo-activables, contenant un composé photosensible (BaFBr:Eu^{2+}), dont les électrons passent à un niveau d'énergie supérieur lorsqu'ils sont excités par des photons X. Une partie de l'énergie incidente est stockée au niveau des points d'impact sur la plaque. L'information est restituée sous forme d'énergie lumineuse par l'illumination de la plaque par un laser (d'une longueur d'onde $\lambda \approx 630 \text{ nm}$). Un photomultiplicateur enregistre alors l'énergie réémise. La prise d'un cliché de diffraction comporte 3 étapes : l'exposition aux rayons X, la lecture avec digitalisation de l'image et l'effacement de la plaque par exposition à une lumière blanche intense. Les avantages de ce détecteur résident dans leur taille, leur haute sensibilité et leur excellente gamme dynamique (le signal restitué reste proportionnel à l'intensité enregistrée) ; l'inconvénient principal reste le temps de lecture de la plaque (1 à 3 minutes). De tels détecteurs se trouvent au laboratoire ainsi qu'aux synchrotrons de Paris, de Grenoble (ID2) et de Hambourg (BW7B).

- Les détecteurs CCD (« Charge Coupled Device ») utilisent également un phosphore activé, en fait un composé fluorescent ($\text{GdO}_2\text{S: Tb}$). Les photons X excitent ces composés photoactivables qui réémettent en ligne des photons visibles acheminés par des fibres optiques vers un système CCD permettant une conversion et une amplification du signal lumineux en signal électrique. Contrairement à l'Imaging Plate, ce type de détecteur est très rapide puisque la lecture de l'image ne prends que quelques secondes sans étape ultérieure d'effacement. Les détecteurs ont une taille limitée (inférieure à l'Imaging Plate), ce qui constituent leur plus grand inconvénient. De tels détecteurs se trouvent à Grenoble, par exemple sur ID14-EH1 (165 mm

diamètre), EH3 (132 mm diamètre) et EH4 (Quantum 4R constitué de 4 détecteurs carrés de 94mm de côté).

1.3 Distance cristal-détecteur

Le détecteur doit être positionné pour que toute sa surface soit utilisée, en évitant que les taches de diffraction ne se superposent et pour qu'une résolution maximale soit atteinte.

1.3.1 Atteindre la plus haute résolution

La loi de Bragg permet de calculer à quelle distance placer le détecteur pour obtenir une résolution donnée.

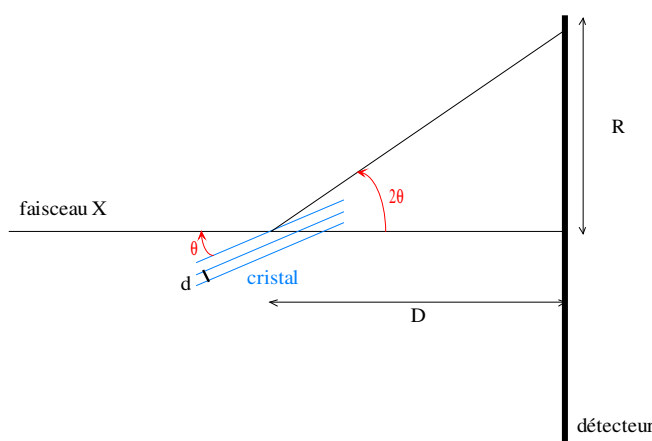


Figure 53 : Illustration schématique de la loi de Bragg.

La loi de Bragg explique la présence de taches de diffraction en terme de réflexions sur des familles de plans atomiques (représentées en bleu).

Loi de Bragg : $2 d \sin \theta = \lambda$

avec : d, la distance entre les plans atomiques du cristal,

θ , l'angle de diffraction,

λ , la longueur d'onde du faisceau de rayons X.

Dans un premier temps, la valeur de θ est déterminée à une résolution d donnée :

$$\theta = \arcsin (\lambda / 2d)$$

Puis, on calcule la distance cristal - détecteur D :

$$D = R / (\tan 2\theta)$$

avec : D , la distance cristal - détecteur

R , le rayon du détecteur

1.3.2 Éviter la superposition des taches de diffraction (*overlaps*)

Des taches de diffraction peuvent être séparées en augmentant la distance cristal – détecteur et/ou en diminuant l'angle d'oscillation du cristal au cours du cliché.

1.4 Angle d'oscillation

L'angle d'oscillation $\Delta\phi$ est choisi dans le but d'optimiser différents facteurs. L'oscillation doit être suffisamment faible pour éviter toute superposition de taches de diffraction, mais également suffisamment grande pour enregistrer un nombre minimal de clichés (car le cristal a une durée de vie limitée dans le faisceau). De plus, une valeur faible de $\Delta\phi$ permet d'optimiser le rapport signal/bruit en diminuant le temps d'enregistrement, ce qui permet d'évaluer le profil de la tache avec une bonne précision.

D'après l'équation de Laue, pour une maille orthogonale, nous avons :

$$a \cdot a^* = b \cdot b^* = c \cdot c^* = D \lambda$$

$$c^* = D \lambda / c$$

avec : c^* en mm^{-1} , D en mm, λ et c en Å

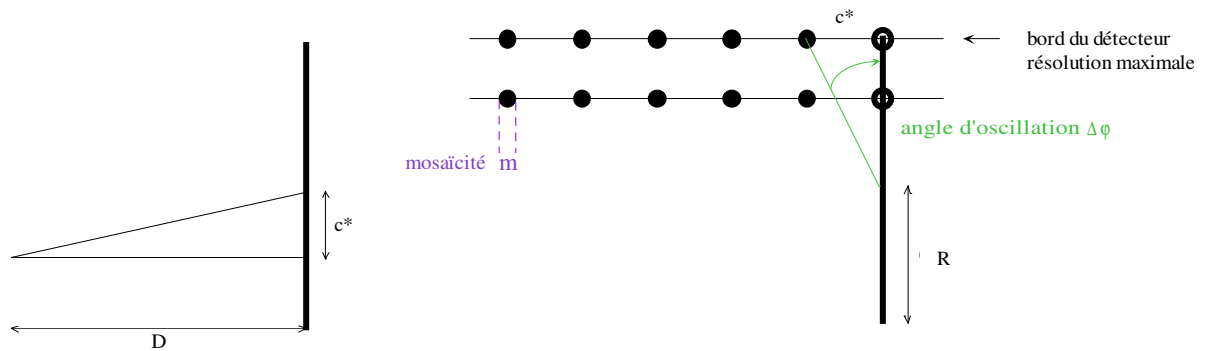


Figure 54 : Paramètres affectant la séparation des taches de diffraction

En pratique, la maille, la mosaïcité du cristal, et l'angle d'oscillation affectent la séparation des taches de diffraction. De nombreuses approximations résultent des formules suivantes, qui permettent d'estimer l'angle d'oscillation maximum $\Delta\phi_{\max}$ évitant la superposition des taches de diffraction.

$$\tan \Delta\phi = \frac{c^*}{R}$$

$$\Delta\phi = \text{Arctan} \frac{c^*}{R}$$

$$\Delta\phi_{\max} = \Delta\phi - m$$

1.5 Temps d'exposition

Le temps d'exposition doit être suffisamment long pour permettre la mesure de réflexions faibles, sans pour autant saturer les réflexions fortes (*overload*), sinon ces dernières devront être mesurées dans une expérience à part.

Le temps d'exposition doit assurer un rapport $I/\sigma(I)$ adéquat (I représente l'intensité de la réflexion, $\sigma(I)$ la déviation standard de l'intensité) : moins de 50% des taches avec un $I/\sigma(I) < 2$ dans la plus haute tranche de résolution.

1.6 Le nombre de clichés à enregistrer pour un espace complet

L'orientation et les relations de symétrie du cristal détermine le domaine angulaire minimal à enregistrer pour avoir un espace complet. La détermination de l'orientation du cristal et du nombre minimum d'images à enregistrer est facilitée par des programmes de stratégie de collection de données (par exemple : STRATEGY (Ravelli et al., 1997) et PREDICT (<http://biop.ox.ac.uk/www/distrib/predict.html>). Ces programmes sont mis en œuvre sur un enregistrement de quelques clichés consécutifs permettant l'affinement de l'orientation du cristal.

2. Traitement des données

Pendant et après l'enregistrement des données de diffraction, les données sont traitées, en utilisant la chaîne de programme *HKL* : les programmes *DENZO* (Otwinowski et Minor, 1997) pour l'indexation et l'intégration des données de diffraction et *SCALEPACK* pour la réduction et la mise à l'échelle des données.

L'analyse et la réduction des données de diffraction par *DENZO* et *SCALEPACK* est un processus comportant 3 étapes décrites sommairement ci-dessous. Les deux premières sont effectuées avec *DENZO*, la dernière avec *SCALEPACK*.

2.1 Visualisation et analyse préliminaire d'un premier cliché de diffraction.

L'indexation initiale n'utilise qu'une seule image. À partir de ce premier cliché, il est possible d'orienter le cristal et de proposer le réseau de Bravais se rapportant au cristal considéré avec intégration des taches de diffraction. Un affinement des paramètres du détecteur, du faisceau et du cristal est réalisé sur ce premier cliché indexé qui va servir de référence pour l'indexation de l'ensemble des clichés.

2.2 Indexation et intégration du jeu de données complet.

Dans un second temps, les clichés sont successivement traités en utilisant les paramètres déterminés sur la première image de chaque jeu. Après indexation (attribution des indices de Miller h, k, l), les taches de diffraction sont intégrées (estimation de l'intensité nette d'un pic de diffraction après soustraction du bruit de fond). Les paramètres du détecteur, du faisceau et du cristal sont affinés pour chaque cliché. Le profil d'intégration des taches de diffraction et la mosaïcité du cristal sont deux paramètres particulièrement importants à surveiller car ils peuvent évoluer au cours du temps et avec l'orientation du cristal.

2.3 La mise à l'échelle du jeu de données.

La mise à l'échelle consiste à prendre toutes les réflexions équivalentes et à les moyennner. Ce processus comprend le calcul d'un facteur de mise à l'échelle entre les différents clichés et l'affinement précis des paramètres du cristal (notamment la mosaïcité), du faisceau et du détecteur sur la totalité du jeu de données. Cette mise à l'échelle s'accompagne d'une analyse statistique des mesures reliées par les éléments de symétrie du groupe d'espace.

Après la mise à l'échelle dans *SCALEPACK*, le fichier de réflexions et de facteurs de structures $[(h,k,l) ; F_{hkl} ; \sigma(F_{hkl})]$ est généré en utilisant la chaîne de programmes *CCP4*. L'examen des extinctions systématiques permet de déterminer le groupe d'espace.

2.4 Nombre de molécules et pourcentage de solvant dans l'unité asymétrique

Le nombre de molécules dans l'unité asymétrique est déterminé par le coefficient de Matthews :

$$V_M = \frac{V}{M} \frac{1}{m} \frac{1}{n}$$

Avec : V_M le volume par unité de masse de la maille,

V représente le volume de la maille,

M le poids moléculaire de la protéine considérée,

m le nombre de molécules dans l'unités asymétrique,

n le nombre de positions équivalentes déterminé par le groupe d'espace

Pour un cristal de protéine, les valeurs moyennes V_M sont comprises entre 1.5 et 4 Å³.Dal⁻¹.

La fraction de solvant f_s est donnée par la relation suivante :

$$f_s = 1 - 1.66 \frac{\bar{v}}{V_M}$$

Avec $\bar{v}$ le volume spécifique partiel estimé à 0.74 cm³/g pour les protéines.

3. Résolution du problème de la phase

3.1 Remplacement isomorphe multiple

La méthode du remplacement isomorphe multiple (*MIR*) consiste à introduire dans le cristal de macromolécule native, par diffusion ou par cocrystallisation, des atomes lourds possédant un grand nombre d'électrons et capable de diffuser fortement les rayons X. Si ces atomes lourds se fixent spécifiquement en des sites précis de la molécule, sans en modifier l'empilement cristallin (isomorphisme entre forme dérivée et forme native), il est possible de déterminer la position des atomes lourds dans la maille. La position des atomes lourds permet de calculer leur contribution aux amplitudes des rayons X diffractés (étant donné que tous les atomes participent) et d'en extrapoler l'information de phase. En effet, des différences sont observées entre les facteurs de structure de la protéine native (F_P) et les facteurs de structure des dérivés lourds (F_{PH}). Le facteur de structure du dérivé lourd peut être décrit par :

$$F_{PH} = F_P + F_H$$

où F_H est la contribution de l'atome lourd.

Les enregistrements natif et dérivé nous donnent les valeurs des modules des facteurs de structure (F_P) et (F_{PH}), tandis que la position des atomes lourds dans la maille nous donne le vecteur F_H . De simples considérations géométriques (construction de Harker) nous montrent qu'il y a deux solutions possibles pour la valeur de α_P . Cette ambiguïté est idéalement levée par un deuxième dérivé lourd.

3.2 Remplacement moléculaire

La méthode du remplacement moléculaire permet la détermination de phases initiales pour une molécule dont la structure est inconnue à partir d'une molécule « parente ». La molécule-modèle de structure connue est placée et orientée dans la maille de la structure à déterminer par l'utilisation conjointe de fonctions de rotation et de translation (Rossmann, 1990). La molécule modèle ainsi positionnée dans la maille fournit le premier jeu de phases calculées à partir du modèle ($\varphi_{calc}^{modèle}$) utilisé avec les modules des facteurs de structure observés expérimentaux ($|F_{obs}^p|$). Les facteurs de structure de départ combinent donc une information expérimentale non biaisée à une information théorique calculée susceptible d'introduire un biais.

$$|F_p^p| = |F_{obs}^p| e^{i\varphi_{calc}^{modèle}}$$

Pour le remplacement moléculaire, nous avons utilisé le programme AMoRe (Navaza, 1994). Dans ce programme, principalement trois étapes peuvent être distinguées:

- trouver l'orientation du modèle moléculaire,
- localiser sa position,
- déterminer la qualité de la solution.

Les deux premières étapes sont réalisées en se basant sur des techniques de recherche utilisant la fonction de Patterson : la position du modèle est modifiée jusqu'à ce que sa fonction de Patterson soit en accord avec la fonction observée et correspondant à la structure inconnue. L'orientation du modèle est obtenue avec une fonction de rotation et sa localisation avec une fonction de translation. Un affinement en corps rigide permet d'optimiser les paramètres de positionnement. Les six paramètres définissant la meilleure position sont affectés de paramètres d'erreurs concernant les points suivants :

- la corrélation intrinsèque entre les paramètres de rotation et de translation,
- la qualité des données,
- la similarité entre le modèle de recherche et la structure inconnue,
- la petite taille du modèle de recherche comparé au contenu de la maille.

4. Affinement du modèle

L'affinement est la dernière étape au cours de la détermination de la structure cristallographique et consiste à améliorer le modèle issu de l'interprétation de la carte de densité électronique. C'est un processus itératif minimisant l'écart entre les modules des facteurs de structure observés et ceux calculés. Les paramètres à affiner sont les coordonnées des atomes, les facteurs d'agitation thermique et les facteurs d'occupation généralement fixés à 1. La dynamique moléculaire est la méthode la plus utilisée pour l'affinement des structures de macromolécules. Dans la technique du recuit simulé (*annealing*), le système est porté à une température élevée qui permet de franchir les barrières énergétiques et d'explorer une grande gamme de conformations. Le système est ensuite ramené lentement à température ambiante.

Au cours d'un cycle d'affinement, un modèle est construit d'après l'information de la carte de densité électronique, il est optimisé par les calculs décrits plus haut, aboutissant à l'obtention de nouveaux paramètres permettant de calculer une nouvelle carte de densité électronique. L'étape de construction est alors recommencée et l'affinement du nouveau modèle est effectué. Ce processus itératif est suivi par le calcul d'un facteur d'accord R_{cryst} .

Les différents calculs d'affinement tendent à faire diminuer le facteur R_{cryst} , en réduisant le désaccord entre les modules des facteurs de structures observés et calculés.

Pour déterminer la qualité du modèle et suivre le bon déroulement de l'affinement, un autre facteur d'accord est calculé : R_{free} , directement relié à l'erreur sur les phases (Brünger, 1992). Les formules mathématiques de ces facteurs d'accord sont données ci-dessous :

$$R_{cryst} = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs}^{hkl} - F_{calc}^{hkl}|}{\sum_{hkl} |F_{obs}^{hkl}|} \qquad R_{free} = \frac{\sum_{hkl \in T} |F_{obs}^{hkl} - F_{calc}^{hkl}|}{\sum_{hkl \in T} |F_{obs}^{hkl}|}$$

Le facteur R_{free} est calculé à partir de réflexions prises au hasard (le jeu test T comprend en général 5 à 10% des réflexions totales). Le jeu test n'est pas utilisé lors de l'affinement. Les valeurs de R_{cryst} et de R_{free} sont comparées et leur différence ne doit pas dépasser les 10%, ce qui traduirait un processus de suraffinement dans lequel la diminution de R_{cryst} ne correspondrait plus à une amélioration du modèle.

On considère que l'affinement est terminé lorsque :

- la valeur de R_{free} n'évolue plus,
- les cartes de densité ne permettent plus de modifications du modèle,
- le facteur R_{free} soit le plus bas possible, en fonction de la résolution et de la qualité des données (en général, il tend vers 20-25 %).

L'affinement du modèle est réalisé par différentes méthodes de dynamique moléculaire en utilisant le programme CNS (Brünger et al., 1998). Les différentes étapes au cours de l'affinement sont décrites ci-dessous :

- minimisation de l'énergie,
- recuit simulé,
- affinement des facteurs de température,
- positionnement des molécules de solvant.

Les cartes de densité calculées par CNS que nous avons utilisées sont de type :

- cartes-différences :
 $3|F_o| - 2|F_c|$
 $2|F_o| - |F_c|$
 $|F_o| - |F_c|$
- cartes d'omission (*omit map*) dans lesquelles certains atomes ont été exclus du calcul de densité.

B. Résultats

1. Acquisition et traitement des données

Le choix des conditions d'enregistrement dépend de la nature et de la qualité des cristaux, ainsi que de leur orientation dans la boucle, du faisceau de rayons X et de la géométrie du système de détection.

- Les cristaux de complexe sauvage - E2 ont un faible pouvoir diffractant : l'utilisation d'une source de rayonnement synchrotron est essentielle. Les cristaux ne pouvaient pas être testés au laboratoire.

- Les cristaux de complexe triple mutant – E2, quant à eux, diffractent bien les rayons X. Les mises au point ont pu être faites au laboratoire (détermination des conditions cryogéniques, du groupe d'espace).

- Les cristaux de complexe triple mutant – ZK233702 (ZK) sont particulièrement petits ($30 \times 30 \times 40 \mu\text{m}^3$) et ont directement été enregistrés au synchrotron.

Pour tous les cristaux, il a fallu veiller à ce que l'angle d'oscillation permette d'enregistrer la portion la plus grande possible de réflexions entières, tout en évitant la superposition des taches de diffraction (la limite maximale de l'angle d'oscillation est fonction de la distance minimale entre deux points de l'espace réciproque, de la mosaïcité du cristal, de la convergence du faisceau et de la résolution dans l'espace réciproque). Un compromis entre la résolution et la séparation des taches proches ou chevauchantes (*overlap*) a été réalisé en jouant sur la distance cristal-détecteur et l'angle d'oscillation.

Le cas du complexe triple mutant – ZK233702 est particulièrement typique : avec une mosaïcité de l'ordre de 0.6° , un grand axe de 270 Å, une orientation suboptimale du cristal dans la boucle (le grand axe perpendiculaire au faisceau), il a fallu prendre un angle d'oscillation de 0.2° , une distance cristal-détecteur de 190mm, et enregistrer un espace d'au moins 90° . La collecte de données a duré environ 12 heures, ce qui est particulièrement long pour un enregistrement synchrotron. D'autre part, cet enregistrement aurait gagné en qualité

avec un détecteur plus grand et un faisceau plus intense. Nous avons d'ailleurs essayé d'enregistrer des cristaux sur des lignes plus appropriées. Mais les autres cristaux étaient de moins bonne qualité (pouvoir diffractant inférieur, plus grande mosaïcité).

	Sauvage - E2	Triple mutant - E2	Triple mutant - ZK
Source de rayons X	E.S.R.F. (ID2)	L.U.R.E	E.S.R.F. (ID14-EH3)
Longueur d'onde	0.993 Å	1.099	0.931
Détecteur	IP	IP	CCD
Rayon du détecteur	90 mm	150 mm	66 mm
Angle d'oscillation	0.5°	0.5°	0.2°
Temps d'exposition	45 sec	5 min	3 × 10 sec
Distance cristal-détecteur	250 mm	260 mm	190 mm
Température (K)	100	100	100
Nombre de cristaux	1	1	1
Résolution (Å)	50.0 – 2.9	40 - 2.2	40.0 – 2.9
Réflexions uniques	19255	20231	6754
Complétude	96.0 %	99.9 %	92.4 %
Multiplicité	2	10	6
R_{sym} (%)	8.0	5.1	5.8

Tableau 17 : Acquisition et traitement des données cristallographiques.

Le facteur d'accord R_{sym} est défini par :

$$R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl,i}|}$$

Dans tous les cas, la principale difficulté rencontrée provenait de la combinaison d'une mosaïcité importante (0.5 à 1°) et de grands paramètres de maille (140 à 270 Å pour l'axe c), ce qui impose de petites oscillations (0.2 à 0.5°) pour éviter la superposition des taches de diffraction. La géométrie des cristaux rendait difficile, voire impossible leur orientation dans

la boucle : ils étaient rarement orientés de façon à osciller autour de leur plus grand paramètre, ce qui aurait permis d'observer en permanence le paramètre le plus court du réseau réciproque (et donc d'augmenter l'angle d'oscillation, de diminuer la distance cristal-détecteur et de gagner en résolution, dans certains cas).

2. Résolution des structures cristallographiques

La résolution des structures des complexes sauvage et mutants a été réalisée en appliquant deux méthodes différentes. Le problème de la phase a été résolu par la méthode de la série isomorphe pour le triple mutant C→S lié à l'œstradiol, alors que cette méthode avait échoué sur la protéine sauvage. La structure du triple mutant C→S lié à l'œstradiol a servi de modèle pour la résolution des autres structures par remplacement moléculaire.

2.1 Phasage du récepteur sauvage lié à l'œstradiol

Avant de disposer de la structure du triple mutant C→S lié à l'œstradiol, de nombreuses tentatives de phasage ont été réalisées sur la protéine sauvage :

- le remplacement isomorphe, soit par trempage, soit par cocrystallisation,
- le remplacement moléculaire, en se servant des structures des récepteurs de l'acide rétinoïque RAR et RXR, comme modèle.

En vue du remplacement isomorphe, un criblage systématique a été réalisé en modifiant les paramètres suivants :

- la nature des atomes lourds,
- leur concentration,
- la durée du trempage.

Différents atomes lourds ont été testés : le mercure (K_2HgI_4 , PCMBs), l'or ($KAu(CN)_2$), le platine (K_2PtCl_4), le samarium ($Sm_2(SO_4)_3$). Ces atomes lourds présentent une forte affinité pour certains résidus de la protéine, tels les cystéines et les méthionines. Différentes concentrations comprises entre 0.1 et 1mM ont été testées sur des durées de trempage allant de 6 heures à 7 jours, en ajoutant 0.2μl de solution concentrée 10× à une goutte de cristallisation de 2μl.

Aucune information de phase n'a pu être extraite de la mise à l'échelle des données des cristaux natifs et des cristaux ayant subi ces traitements (il n'y avait pas de différence d'intensité entre la native et les dérivés), indiquant que la substitution n'avait pas eu lieu. Des concentrations plus élevées en atomes lourds (2mM PCMBs) endommageaient les cristaux. Nous avons tenté de cocrystalliser la protéine en présence de mercure (PCMBs), ce qui a abouti à la cristallisation de sels. Nous avons également essayé de modifier la liqueur-mère afin d'éliminer les agents capables d'interférer avec la substitution des cristaux tels le β -mercaptoéthanol et l'imidazole. La modification de la liqueur-mère endommageait également les cristaux. Une dernière tentative fut entreprise en substituant le ligand par de l'éthinylestradiol-17 α substitué en iode (ZK110616) ou en brome (ZK95884). Les complexes furent formés dès la production de la protéine, en suivant le même protocole de purification qu'en présence d'œstradiol. Des cristaux furent obtenus dans les mêmes conditions de cristallisation, diffractant à une résolution de 3.2Å et appartenant au même groupe d'espace que le complexe lié à l'œstradiol. Mais là non plus, les données ne permettaient pas le phasage. La contribution d'un atome lourd pour 250 résidus dans la molécules pourraient en être la cause, on découvrit par la suite, que l'iode et le brome s'étaient dissociés du ligand : malgré une manipulation dans l'obscurité, cette liaison photosensible n'a probablement pas supporté le passage dans la cellule du spectrophotomètre du système chromatographique lors de la purification du complexe.

Malgré tous ces efforts, il nous fut impossible de déterminer des phases expérimentales. Une autre approche fut testée en parallèle : le remplacement moléculaire. Il a d'abord été tenté en prenant comme modèle, les structures du RXR α ou du RAR γ sous forme monomérique ou dimérique, en se servant des hélices H1 à H10 ou uniquement des hélices H1, H4, H5, H8-H10. L'estimation du contenu en solvant de 66% était compatible avec la présence d'un dimère par unité asymétrique ($V_M = 3.7\text{\AA}^3/\text{Da}$), par comparaison du contenu de 55% pour RXR et 33% pour RAR. Aucune solution claire n'apparut. Par contre, en utilisant comme modèle la structure du ER α triple mutant C $\rightarrow$ S (H12 exclu), le remplacement moléculaire trouva la solution et permit la résolution de la structure du récepteur sauvage.

2.2 Résolution de la structure du triple mutant C→S lié à l'œstradiol

Le phasage du triple mutant C→S lié à l'œstradiol a été réalisé grâce à la méthode du remplacement isomorphe. Trois dérivés ont été obtenus, deux avec le platine (K_2PtCl_4) à différentes concentrations et temps d'incubation et un avec l'or ($KAu(CN)_2$) :

- 1mM K_2PtCl_4 pendant 3 heures,
- 2mM K_2PtCl_4 pendant 2 jours,
- 1mM $KAu(CN)_2$ pendant 7 jours.

Les deux dérivés platinés ne sont pas équivalents et ont contribué tout deux au phasage. Ainsi le premier procure de l'information jusqu'à la résolution de 2.9 Å, mais présente un faible taux d'occupation par rapport au deuxième (voir le pouvoir de phasage dans le Tableau 18). À un nombre de sites équivalents (il y a 8 sites pour les deux dérivés), le taux d'occupation par sites est plus élevé pour le deuxième dérivé, reflétant un trempage plus long avec une solution plus concentrée en Pt. Dans ces conditions, le cristal a subi quelque dommage diminuant son pouvoir diffractant à une résolution de 3.4 Å. Le troisième dérivé, l'or, présente le pouvoir de phasage le plus bas, mais une bonne résolution de 2.9 Å. L'affinité de l'or pour la protéine doit être plus faible que celle du platine, car un temps de trempage de 7 jours a été nécessaire.

La détermination des positions des atomes lourds, ainsi que leur affinement, ont été réalisés avec les programmes CCP4 (Collaborative computational project No.4., 1994) et SHARP (de la Fortelle et Bricogne, 1997). Une carte initiale a été calculée à une résolution de 3.0 Å en utilisant les phases expérimentales MIR. Le phasage a été étendu à une résolution de 2.2 Å par la technique de nivellement de solvant, en utilisant le programme SOLOMON (Collaborative computational project No.4., 1994; de la Fortelle et Bricogne, 1997).

	Native	Pt (1mM, 3h)	Pt (2mM, 48h)	Au (1mM, 7j)
Résolution (Å)	2.0	2.9	3.4	2.9
Réflexions uniques	20231	6917	4415	6793
Complétude (%)	99.9	98.3	97.0	96.8
Multiplicité	10.0	5.0	3.0	4.0
R _{sym} (%)	5.1	6.9	6.2	6.5
Nombres de sites		8	8	4
R _{cullis} (centric/acentric/anomal)		0.64/0.64/0.91	0.65/0.59/0.86	0.79/0.83/0.94
Pouvoir de phasage (centric/acentric/anomal)		1.9/2.5/1.4	2.1/2.9/2.2	1.4/1.6/1.2
Figure de mérite (40-2.9Å)(centric/acentric)		0.7/0.67		
Figure de mérite (nivellement solvant, extension phases) (40→2Å)		0.87		

Tableau 18 : Statistiques d'enregistrement et de phasage du triple mutant C→S lié à l'œstradiol.

2.3 Résolution de la structure du complexe lié au ZK233702

La structure du domaine de fixation à l'hormone triple mutant (C381S+C417+C530S) en complexe avec l'œstradiol a été utilisée comme modèle pour le remplacement moléculaire. Le ligand a été exclu du modèle. Dans ce cas, la détermination de l'orientation relative du modèle dans le cristal et son positionnement furent aisés, parce qu'il n'y a qu'une seule molécule dans l'unité asymétrique et, surtout, parce que le modèle de recherche est en fait la même molécule dans le même groupe d'espace.

3. Qualité des structures

3.1 Statistiques finales d'affinement

Plusieurs cycles de reconstructions manuelles en utilisant le programme O (Jones et al., 1989) et d'affinement par minimisation d'énergie et dynamique moléculaire (Brünger et al., 1998) ont été effectués. Les résultats de l'affinement sont présentés dans le Tableau 19.

Statistiques d'enregistrement						
	Sauvage + E2	3C→S + E2				3C→S + ZK
	Native	Native	Pt ₁	Pt ₂	Au	Native
Résolution (Å)	2.9	2.0	2.9	3.4	2.9	2.9
Réflexions uniques	19255	20231	6917	4415	6793	6754
Complétude (%)	96.0	99.9	98.3	97.0	96.8	92.4
Multiplicité	1.8	10.0	5.0	3.0	4.0	6
R _{sym} (%)	8.0	5.1	6.9	6.2	6.5	5.8
Statistiques d'affinement						
Résolution (Å)	15 – 2.9	30 - 2.2				30 – 2.9
Nombre de réflexions utilisées	16364	14041				5676
Nombre de réflexions pour le jeu test	1778	715				336
Nombre de molécules de solvant	165	220				36
R _{cryst} / R _{free}	24.1 / 31.0 %	22.6 / 28.2 %				20.7 / 26.2%
Δ distances (Å)	0.016 Å	0.012 Å				0.008 Å
Δ angles (deg)	1.50 °	1.43 °				1.24 °
B moyen	61.2 Å ²	30.1 Å ²				32.8 Å ²

Tableau 19 : Statistiques cristallographiques.

Δ distances (Å) : écart quadratique moyen aux longueurs idéales de liaisons,

Δ angles (deg) : écart quadratique moyen aux angles idéaux de liaisons,

B moyen : facteur moyen d'agitation thermique moyen.

3.2 Diagrammes de Ramachandran

L'analyse de la géométrie des modèles a été réalisée par le programme PROCHECK (Laskowski et al., 1993). Les diagrammes de Ramachandran des trois complexes sont présentés dans les figures suivantes. Les diagrammes de Ramachandran montrent que la géométrie de chacun des modèles est de bonne qualité. Étant donné que le domaine E sauvage comprend trois molécules dans l'unité asymétrique, les diagrammes de Ramachandran sont représentées pour les trois molécules (notées wt1, wt2 et wt3).

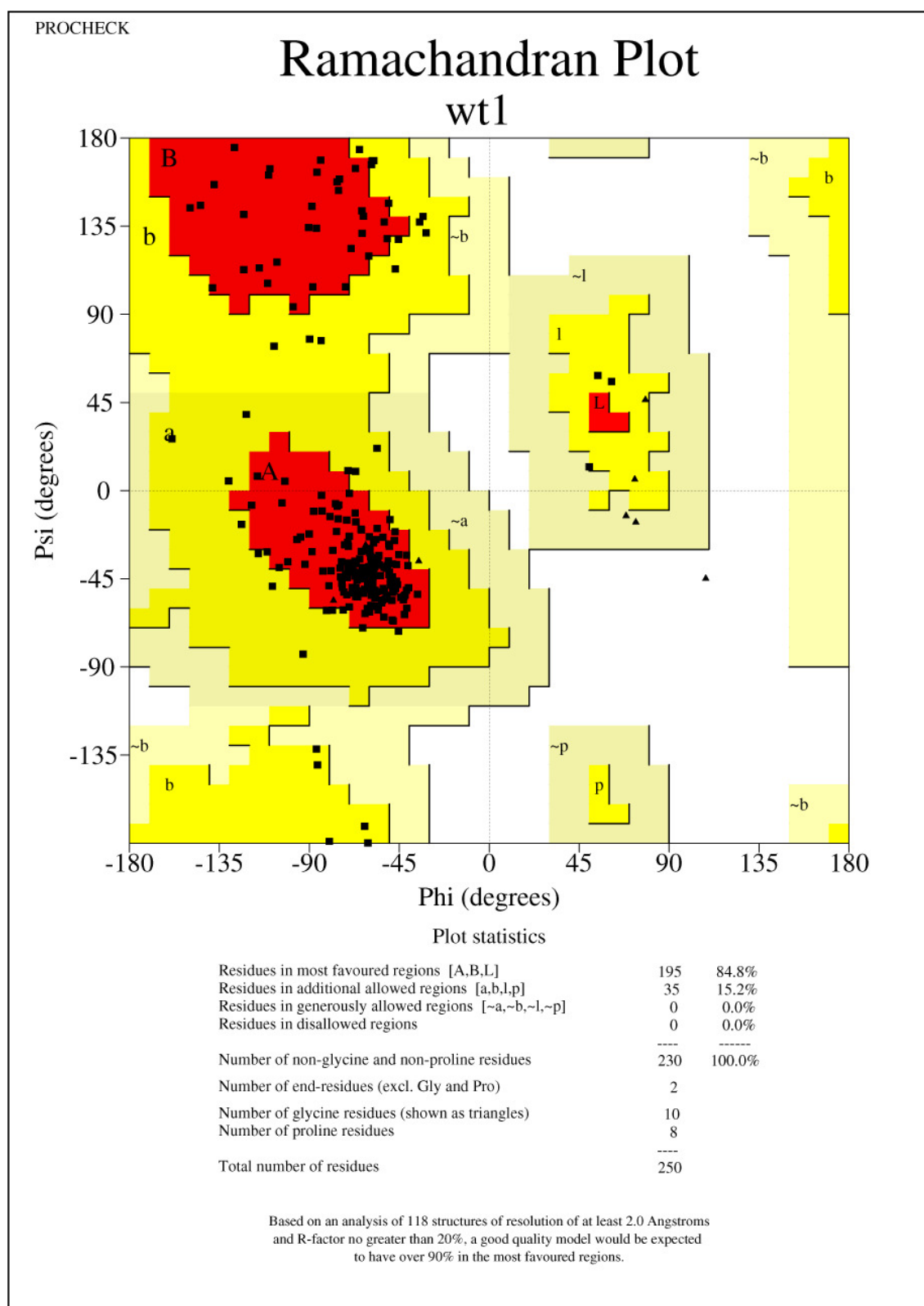


Figure 55 : Diagramme de Ramachandran pour le domaine E sauvage lié à l'œstradiol (molécule 1).

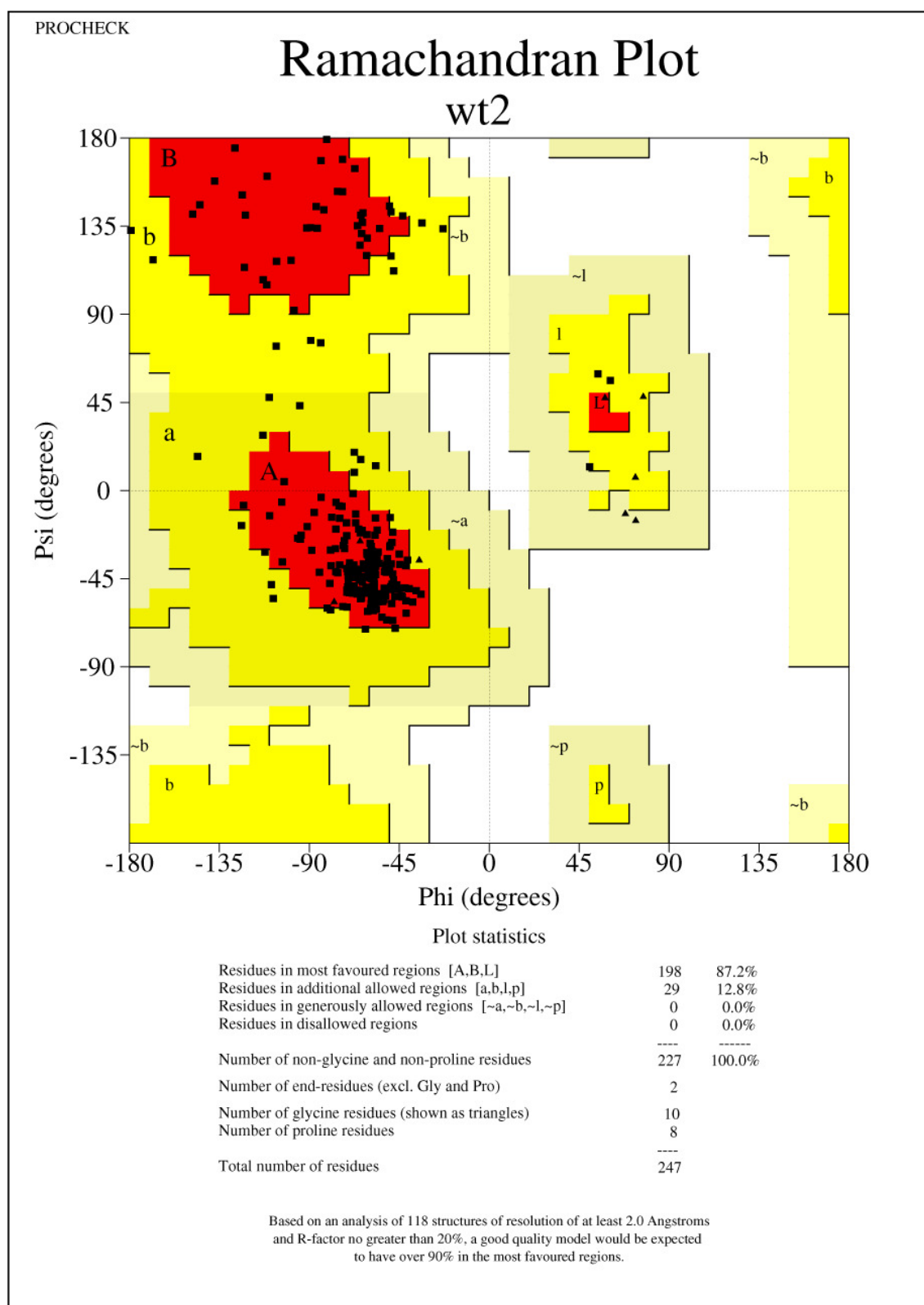


Figure 56 : Diagramme de Ramachandran pour le domaine E sauvage lié à l'œstradiol (molécule 2).

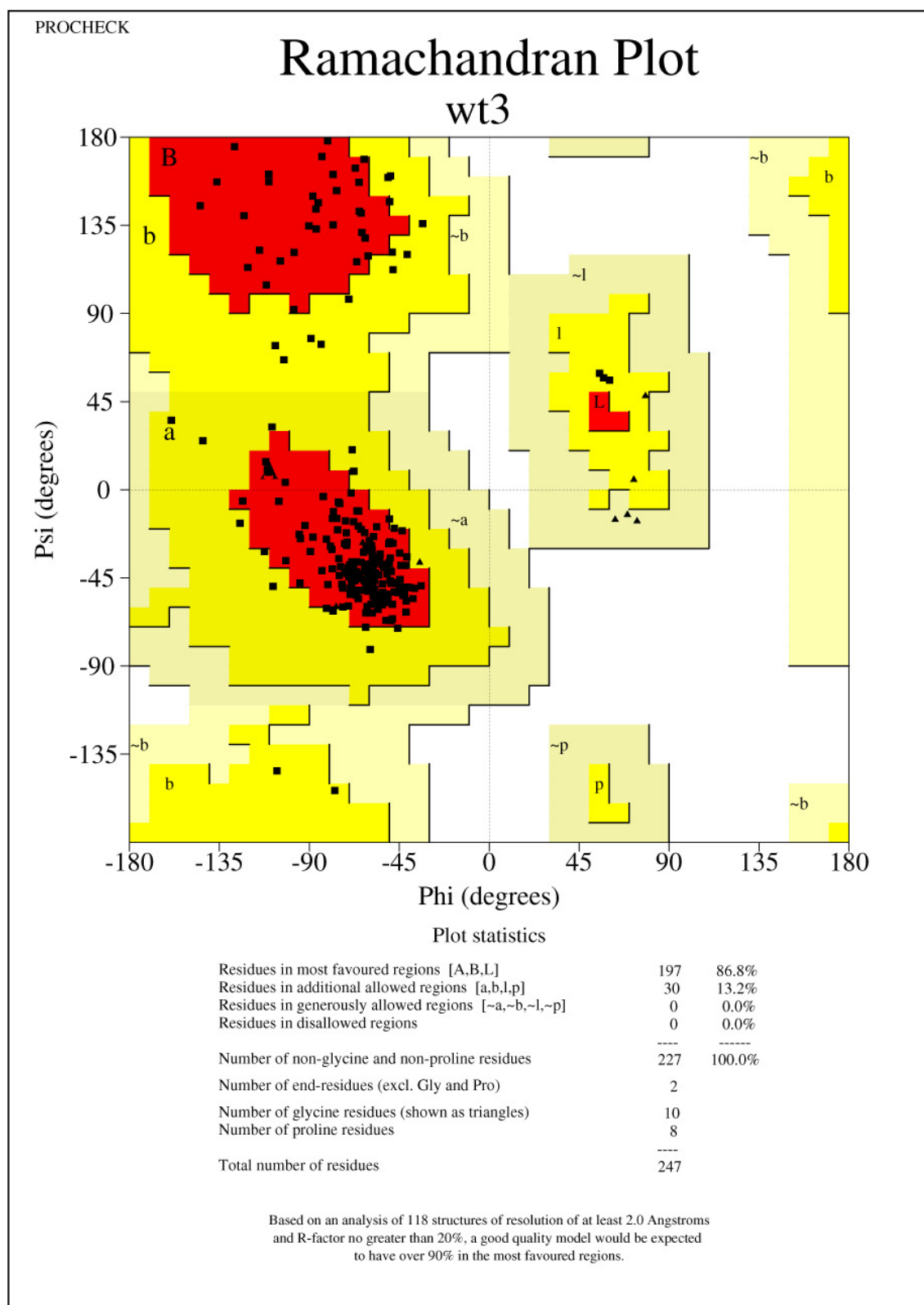


Figure 57 : Diagramme de Ramachandran pour le domaine E sauvage lié à l'œstradiol (molécule 3).

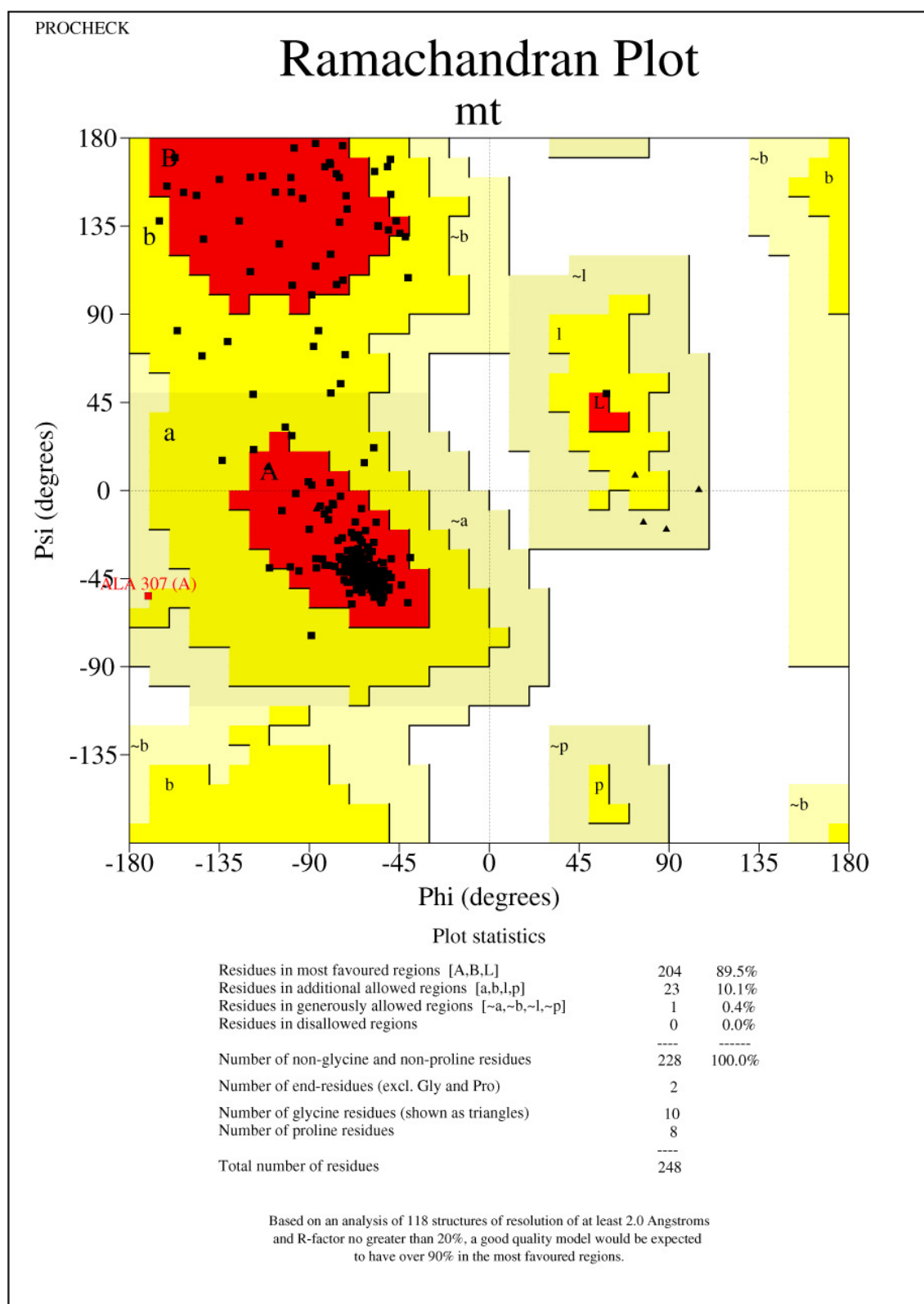


Figure 58 : Diagramme de Ramachandran pour le domaine E triple mutant C→S complexé à l'œstradiol.

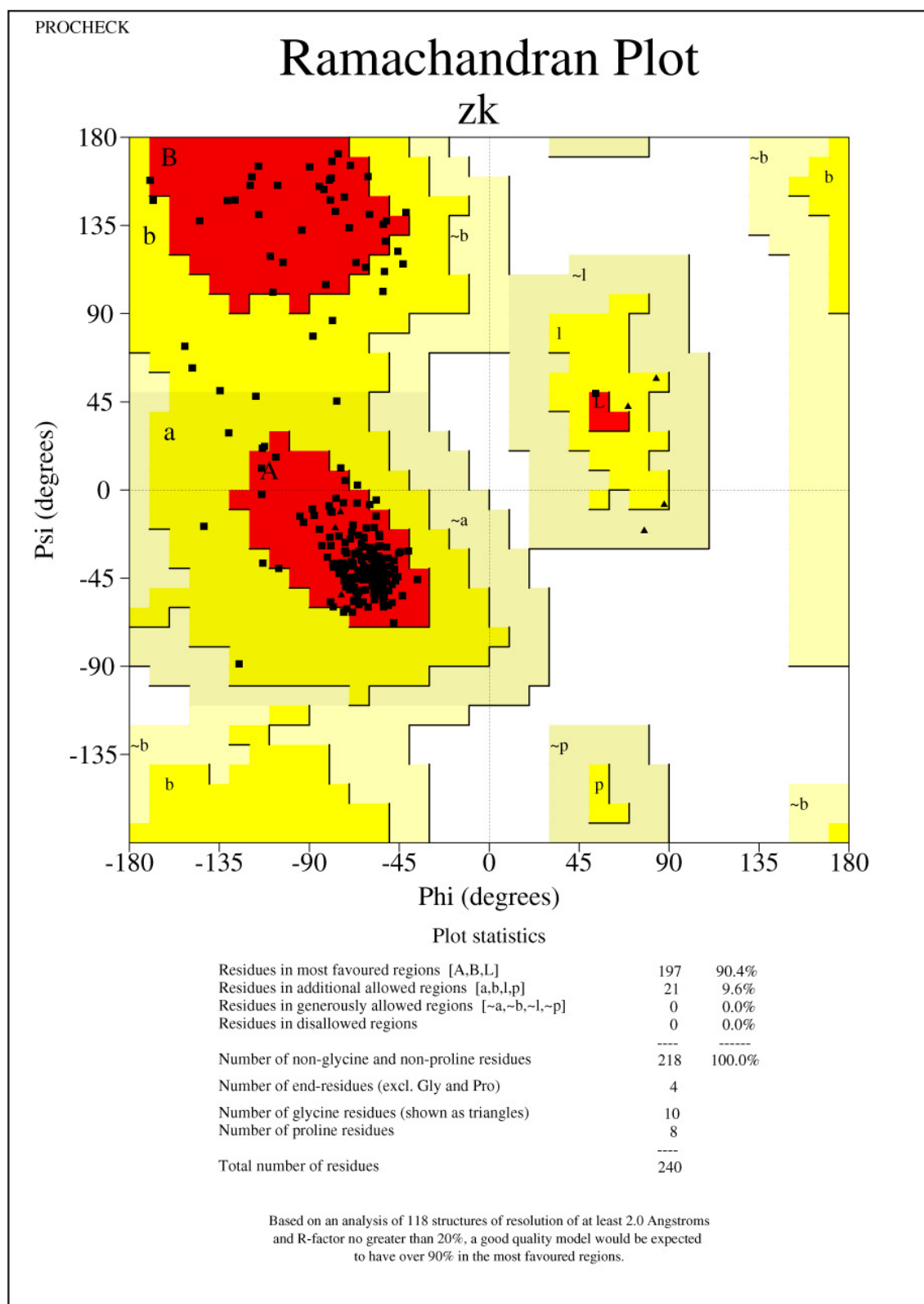


Figure 59 : Diagramme de Ramachandran pour le domaine E triple mutant C→S lié au ZK233702.

VI. Description et analyse des structures

Au laboratoire, nous avons déterminé les structures suivantes (sont indiqués, le cas échéant, les codes d'accès à la PDB) :

- ER α sauvage, sans modification chimique, lié à l'œstradiol, à une résolution de 2.9 Å (1g50 à 2.9 Å, et 1qku à 3.2 Å),
- ER α triple mutant C→S également en complexe avec l'œstradiol, à une résolution de 2.2 Å (1qkt),
- ER α triple mutant C→S lié à l'antagoniste ZK233702, à une résolution de 2.9 Å.

Les structures cristallographiques du domaine E de ER α humain et de ER β humain et de rat liés à divers ligands, ont été résolues par ailleurs :

- ER α carboxyméthylé lié à l'œstradiol (1ere) ou aux antagonistes : raloxifène (1err) et tamoxifène (3ert) (Brzozowski et al., 1997),
- un complexe ternaire entre ER α carboxyméthylé lié au DES et au peptide coactivateur GRIP1 portant la séquence LXXLL du motif *NR-box II* (3erd) (Shiau et al., 1998),
- ER α tétramérique lié à l'œstradiol (1a52) (Tanenbaum et al., 1998),
- ER β lié à la génistéine (hER β -GEN) (1qkm) et au raloxifène (rER β -RAL) (1qkn) (Pike et al., 1999).

Dans un premier temps je décrirai la structure du récepteur sauvage. J'aborderai en particulier, le repliement du domaine, l'interface dimérique, le mode de fixation du ligand et le positionnement de l'hélice de transactivation. Dans un deuxième temps, je décrirai le triple mutant lié à l'œstradiol. La comparaison des structures disponibles permettra de commenter les changements conformationnels subis par la protéine. Dans un troisième temps, je m'attacherai à l'étude du mode de fixation du ligand synthétique ZK233702 (ZK), et le comparerai à l'œstradiol et aux ligands *SERM*.

A. Architecture du domaine E sauvage

1. Repliement canonique

Le domaine de fixation de l'hormone du récepteur aux hormones œstrogènes adopte le repliement canonique des récepteurs nucléaires avec onze hélices- α arrangées en trois couches formant un motif en « sandwich à hélices- α antiparallèles » et un feuillet- β à deux brins (Figure 60). Les trois couches d'hélices sont constituées par :

- les hélices H1 et H3, d'un côté,
- les hélices H4, H5, H6, H8, H9, au centre,
- les hélices H7, H10, H11 de l'autre côté.

La poche de fixation du ligand est délimitée par les hélices H3, H5, H7 et H11, le feuillet- β d'un côté, et l'hélice H12 de l'autre.

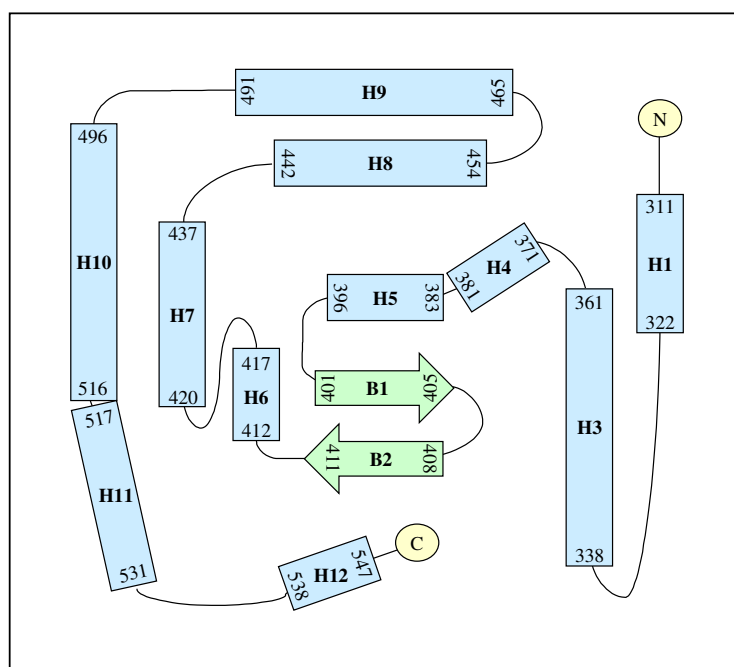


Figure 60 : Diagramme topologique du domaine E sauvage de ER α

		H1				H3									
hERa	304	NSLALSITAD--QMVSAALDA-----	-----EPPILYS-----	EYDPTR----	PFSG-----	ASMMGLL	346								
hERb	245	AKRSGGHAPRVRELLLDALS-----	-----PEQLVLT-----	LLEAEPPHVLISRPASAP--	-----FTEASMMMSL	298									
hPR	682	-----QLIPP-----LINLLMSI-----	-----EPDVIYA-----	GHDNTK-----	PDTs-----	SSLLTSL	718								
hRXRa	218	NEVESTSSANEDMPVERILEAEALAVEP-----	-----KTETYEAN-----	MGLNPSS-----	PNDP-----	VTNI	268								
hRARg	182	--LSPQL-EE---LITKVSKAHQET-----	-----FPSLCQL-----	GKYTTN-----	SSADHRVQLDLGLWDFK	230									
hPPARg	207	--ESADL-RA---LAKHLYDSYIKSFPLTKAKARAILTGKTTDKSPFVIYDMNSLMMGEDKIKFKHITPLQEQSKEVAIRIFQGC				285									
hVDR	120	--LRPKLSEEQQRITAIALLDAHHKTYDPTYS-----	-----DFCQFRPPVRVN-----	DGGGSVT-----	LELSQ-----	LSMLPHL	230								
hTR	211	---KPEPTDEEWELIKITVTEAHVATNAQG-----	-----SHWKQKRKFL-----	PEDIGQ-----	APKVD-----	LEAFSHF	272								
hMR	717	PSVNIALVLPQLSTISRALTSPVMVLEN-----	-----IEPEIVYA-----	GYDSSK-----	PDTA-----	ENLLSTL	769								
hGR	508	-SQETSENPGNKTIVPATLPQLTPTLVs-----	-----LLEVIEPEVLya-----	GYDSSV-----	PDST-----	WRIMTTL	563								
hAR	642	EGEASSTTSPTTEETTQKLTVSHIEGYEQPIFLN----	-----VLEAIEPGVVCa-----	GHDNNQ-----	PDSF-----	AALLSSL	704								
		H3		H4		H5		B1		B2		H6		H7	
hERa	347	TNLADRELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHLLC		AWLEILMIGLVWRSM		MEHP--GKLLFAPN--LLLDNRNQGC		C-VEGMV-EIFD						426	
hERb	299	TKLADKELVHMISWAKKIPGFVELSLFDQVRLLES		CWMVEVLMMGLMWRSIDHP--GKLI		FAPD-LVLDRDEGKC-VEGIL-EIFD								378	
hPR	719	NQLGERQLLSVVVWKSLSLPGFRNLHIDDQITLIQYSWMSLMVFLGWRSYKHVSGQMLYFAPD-LILNEQRMK--ESSFY-SLCL												799	
hRXRa	269	CQAADKQLFTLVEWAKRIPHFSFELPLDDQVILLRAGWNEILLIASFSHRISIAVK--DGILLATG-LHVHRNSAH--SAGVGAIFDR												348	
hRARg	231	SELATKCIIKIVEFAKRLPGFTGLSIADQITLLKAA		CLDILMLRICTR-YTPEQ-DTMTFSDG-LTLNRTQMH--NAGFG-PLTD										309	
hPPARg	286	QFRSVEAVQEITEYAKSIPGFVNLDLNDQVTLTKYGVHEIITYMLAS--LMNK--DGVLISEGGQFMTRFLKSLRKPF--DFME												365	
hVDR	231	ADLVSYSIQKVIQVIGFAKMIQVGRDLTSEDQIVLLKSSAIEVIMLRSNES-FTMDD-MSWTCGNQDYKYRVSDVT--KAGHSLELIE												311	
hTR	273	TKIITPAITRVVDFAKKLPMFC		ELPCEDEQIILLKGC		CCMEIMSLRAAVR-YDPES-ETLTLN-GEMAVTRGQLK--NGGLG-VVSD								351	
hMR	770	NRLAGKQMIQVVKWAKVLPGFKNLPLEDQITLIQYSWM		CLSSFALSWSRYKHTNSQFLYFAPD-LVFNEEKMH--QSAMY-ELCQ										850	
hGR	564	NMLGGRQVIAAVKWAKAIPGFRLHLDQMTLLQYSWMFLMAFALGWSYRQSSANLL		CFAPD-LIINEQRM--LPCMY-DQCK										644	
hAR	705	NELGERQLVHVVKWAKALPGFRNLHVDDQMAVIQYSWMGLVMFAMGWSFTNVNSRMLYFAPD-LVFNEYRMH--KSRMY-SQCV												785	
		H7		H8		H9		H10							
hERa	427	MLLATSSRFMRMNLQGEFVCLKSI		IILNSGVYTFSSILKSL		EEKDHIHRVLDKITDTLIHLM		AKAGLTILQ---QQHQR		LAQLL				508	
hERb	379	MLLATSSRFRELKLQHKYLCVKAMILLN		SSMYPLVTAT--QADSSRKL		LAHLLNAVTDALVWVIAKSGISSQ--QSSMR		LANLL						459	
hPR	800	TMWQIPQEFVKLVQSQEEFLCMKVLL		LLNT-----IPLEGLRSQTQFEEMRSSYIRELKAIG--LRQKGVVSSSQRFYQLT										874	
hRXRa	349	VLTELVSKMMDQMMDKTELGC		LRAIVLFNP-----DSKGLSNPAEVEALREKVYASLEAYCK--HKYP--EQPGRFAKLL										419	
hRARg	310	LVFAFAGQLPLEMDDTETGLLSAIC		CLICG-----DRM--DLEEPEKVDKLEPLLEALRLYAR--RRRP--SQPYMFPRML										380	
hPPARg	366	PKFEFAVKFNALELDDSDLAIFIAVILSG-----DRP--GLLNVKPIEDIQDNLQALELQLK--LNHP--ESSQLFAKLL												436	
hVDR	312	PLIKFQVGLKKLNLHEEEHVLLMAIC		IVSP-----DRP--GVQDAALIEAIDRLSNTLQTYIR--CRHP--P-PLLYAKMI										381	
hTR	352	AIFDLGMSLSSFNLDDEVALLOAVLLMSS-----DRP--GLACVERIEKYQDSFLLA		FEHYIN--YRKH--HVT		HFWEKLL								422	
hMR	851	GMHQISLQFVRLQLTFEETYIMKVLL		LLST-----IPKDLGKLSQA		AEEEMRTNYIKELRKMVTKCPNNSG--QSWQRFYQLT								925	
hGR	645	HMLYSSSELHRLQVSYYEYLC		MKTL		LLLS-----VPKDLGKLSQELFDEIRMTYIKELGKAIVKREGNSS--QNWQRFYQLT								719	
hAR	786	RMRHLSQEFGLWQLITPQEF		CMKALLFSI-----IPVDGLKNQKF		FDELRMNYIKELDRIIACK-RKNPT--SCSRRFYQLT								860	
		H10		H11		H12									
hERa	509	LILSHIRHMSNKGMEHLYSMK--		CK---NVVP--LYDLLLEMLDAH										547	
hERb	460	MLLSHVRHASNKGMEHLLNMK--		CK---NVVP--VYDLLLEMLNAH										498	
hPR	875	KLLDNLHDLVKQLHLVCLNTF--		IQSRALSVE-FPEMMSEVIAAQ										916	
hRXRa	420	LRLPALRSIGLCL		LEHLFFFKLIGD-----TP-IDTFLMEMLEAP										458	
hRARg	381	MKITDLRGISTKGAERAITLK--		ME---IPGP-MPPLIREMLEN--										418	
hPPARg	437	QKMTDLRQIVTEHVQLLQVIK--		TE---TDMS-LHPLLQEIYK--										474	
hVDR	382	QKLADLRSLNEEHSKQYRC		LSFQPE---CSMK-LTPLVLEVF--										420	
hTR	423	MKVTDLRMIGACHASRFLHMK--		VE---CPTFLFPPLFLEVF--										460	
hMR	926	KLLDSMHDVSDLL		LEFCFYTFRESH---ALKVEFPAMLVEIISDQ										967	
hGR	720	KLLDSMHEVVENLLNYC		FQTFDKT---MSIEFPEMLAEIITNQ										760	
hAR	861	KLLDSVQPIARELHQFTFDLLIKSH---		MVSVDFFPEMMAEIIISVQ										902	

Figure 61 : Alignement des domaines E basé sur la superposition des structures tridimensionnelles.

Les éléments de structures secondaires sont ceux du récepteur sauvage hER α . Les éclairs et trait en orange symbolisent le raccourcissement des hélices H3 du côté N-terminal, H11 en C-terminal et les limites de H12, tels qu'ils sont observés dans la structure du triple mutant C→S. Les colonnes en jaune matérialisent les régions se superposant dans les différents récepteurs, dont la structure a été résolue. Pour les trois derniers récepteurs, les structures 3D ne sont pas connues, et ces régions sont représentées en gris.

2. Empilement cristallin trigonal

Le récepteur sauvage cristallise dans le groupe d'espace $P3_221$. L'unité asymétrique contient trois protomères. Deux molécules forment un dimère relié par un axe de symétrie non cristallographique d'ordre deux. Le troisième protomère dimérise avec une molécule de l'unité asymétrique voisine, reliée par un axe cristallographique d'ordre deux (Figure 62).

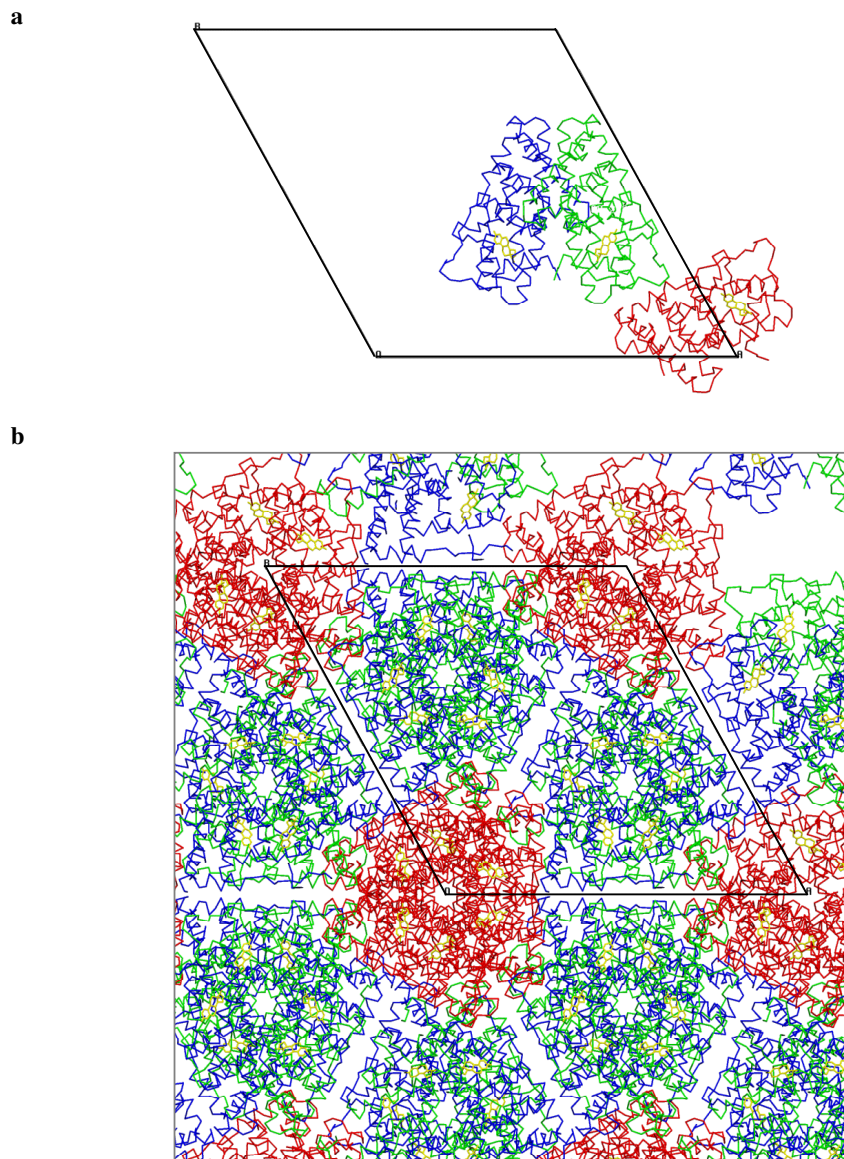


Figure 62 : Empilement cristallin trigonal.

En **a**, les trois molécules de l'unité asymétrique sont représentées en rouge, en bleu et en vert (l'œstradiol est représenté en jaune). La vue perpendiculaire à l'axe c montre la densité de l'empilement en **b**.

Des contacts entre les différentes molécules se font principalement au niveau de trois régions (autre que la surface de dimérisation) :

- la région N-terminale avec l'hélice H1 en contact avec la boucle L1-3 (le peptide polyhistidine n'est pas visible en densité électronique).
- la région du feuillet et de l'hélice H6, en contact avec la boucle entre H9 et H10.
- au niveau des hélices H3-H4.

Parmi ces contacts, il est particulièrement intéressant de noter celui dans la région H3-H4 (Figure 63). En effet, il s'agit du site de reconnaissance des coactivateurs ainsi comblé par une molécule voisine tête-bêche qui interagit avec la même zone. On peut supposer que la difficulté à cristalliser le complexe sauvage lié à l'œstradiol soit liée à la présence de cette région hydrophobe, qu'il paraît impératif de recouvrir. Le peptide porteur de la séquence LXXLL des coactivateurs, ou le CHAPS (un détergent), devrait faciliter la cristallisation des récepteurs en diminuant les contraintes liées à cette zone.

Un tel empilement cristallographique empêche l'hélice H12 d'adopter une position antagoniste (et vice-versa).

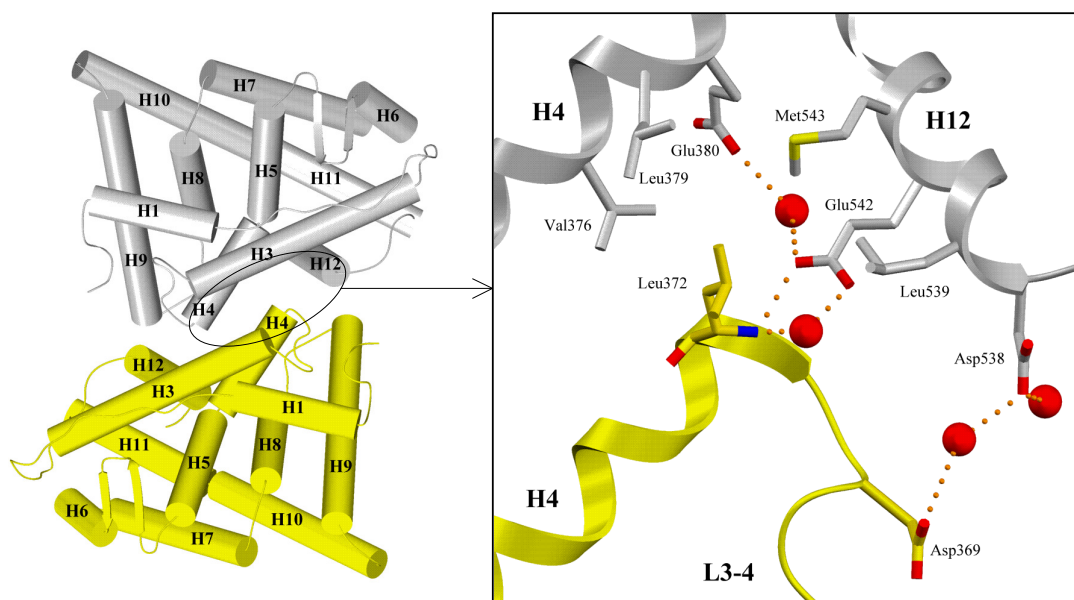


Figure 63 : Contact cristallographique dans le site de reconnaissance des coactivateurs

3. Interface de dimérisation

L'interface de dimérisation du récepteur sauvage est de $1686 \text{ \AA}^2$, après avoir enlevé la contribution ($140 \text{ \AA}^2$) des résidus C-terminaux après l'hélice H12, qui entrent en contact avec l'hélice H7 de l'autre monomère. La surface de dimérisation comprend une zone hydrophobe qui contribue pour environ 60% à l'interface. Cette interface hydrophobe est essentiellement constituée des résidus de l'hélice H10 (Gln 498, Leu 504, Ala 505, Gln 506, Leu 508, Leu 509, Ile 510, Leu 511), mais également des résidus des hélices H7 (Met 427, Ala 430, Met 437), H8 (Ile 451), H9 (Lys 472, Thr 483, Ile 487), H11 (Asn 519), ainsi que de la boucle entre les hélices H8-H9 (Asn 455, Tyr 459, Thr 460). Les atomes polaires et chargés contribuent également et sont localisés à la surface au niveau des hélices H7 (Arg 434), H9 (His 476, Asp 480, Asp 484), H10 (His 501, Gln 502, Gln 506, Ser 512, His 513, Arg 515, His 516) et H11 (Asn 519, Lys 520, Glu 523). Des détails de l'interface de dimérisation sont montrés dans la Figure 64 et le Tableau 20.

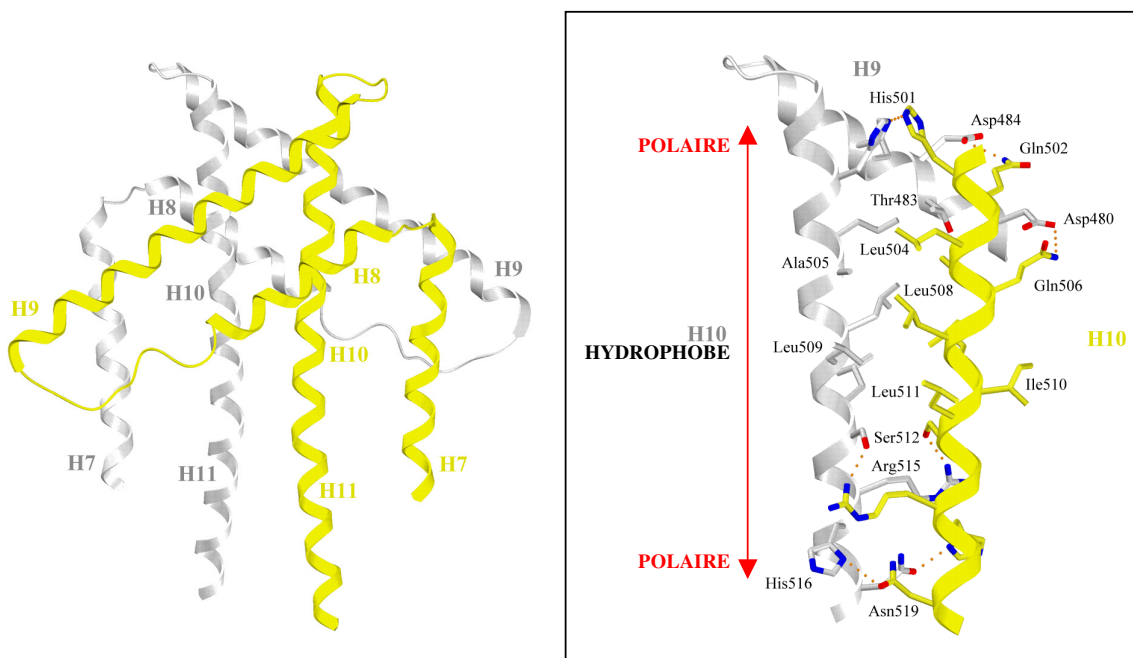


Figure 64 : Détail de l'interface de dimérisation du domaine E sauvage lié à l'œstradiol.

Les hélices H7, H8, H9, H10, H11 et la boucle L8-9 contribue à l'interface de dimérisation. Cette région est représentée en gris pour le monomère 1 et en jaune pour le monomère 2. L'interface est successivement polaire, hydrophobe et polaire.

Monomère 1			Monomère 2			Distance (Å)
Atome	Résidus	Structure	Structure	Résidus	Atome	
N η_1	ARG 434	H7	H9	HIS 476	N ϵ_2	3.1
N ϵ_2	HIS 476	H9	H7	ARG 434	N η_1	2.7
O δ_1	ASP 480	H9	H10	GLN 506	N ϵ_2	3.3
O δ_1	ASP 484	H9	H10	GLN 502	N ϵ_2	2.9
N ϵ_2	HIS 501	H10	H10	HIS 501	N ϵ_2	3.0
N ϵ_2	GLN 502	H10	H9	ASP 484	O δ_1	3.2
O γ	SER 512	H10	H10	ARG 515	N η_1	2.7
N η_1	ARG 515	H10	H10	SER 512	O γ	2.6
N δ_1	HIS 516	H10	H10	ARG 515	N ϵ	3.4
N δ_1	HIS 516	H10	H11	ASN 519	O δ_1	2.9
O δ_1	ASN 519	H11	H10	HIS 516	N δ_1	2.8
N δ_2	ASN 519	H11	H11	ASN 519	N δ_2	2.4

Tableau 20: Détail de l'interface de dimérisation du domaine E sauvage lié à l'œstradiol.

Ce tableau présente les interactions (à moins de 3.5 Å) entre les atomes polaires et chargés contribuant à l'interface de dimérisation par formation de liaison hydrogène.

L'hélice H12 d'un monomère pointe en direction de l'autre, ce qui soulève la question de l'influence du domaine F (résidus 553-595) sur la dimérisation. En effet, la protéine cristallisée est dépourvue d'une quarantaine de résidus du côté C-terminal, le domaine F, dont le rôle précis n'est pas élucidé. Dans la structure du PR lié à la progestérone, l'extension C-terminale est présente. Cette région (résidus 922 à 933), quoique plus petite que la région F du ER, contient un brin qui forme un petit feuillet- β avec un brin de la boucle L8-9. Le brin C-terminal se prolonge par une boucle en proximité de H10-H11, empêchant par gêne stérique le mode de dimérisation, tel qu'il a été décrit pour RXR et ER (Figure 65). De plus, il semblerait que, contrairement à ER, le domaine E de PR complexé à la progestérone soit monomérique en solution, suggérant que l'interface de 705 Å² de PR consiste en un contact cristallographique, mais non physiologique.

Quoique ER et PR appartiennent tous deux au même sous-groupe de récepteurs nucléaires stéroïdiens, ER adopte un comportement plus proche de RXR que de PR, quant au mode de dimérisation.

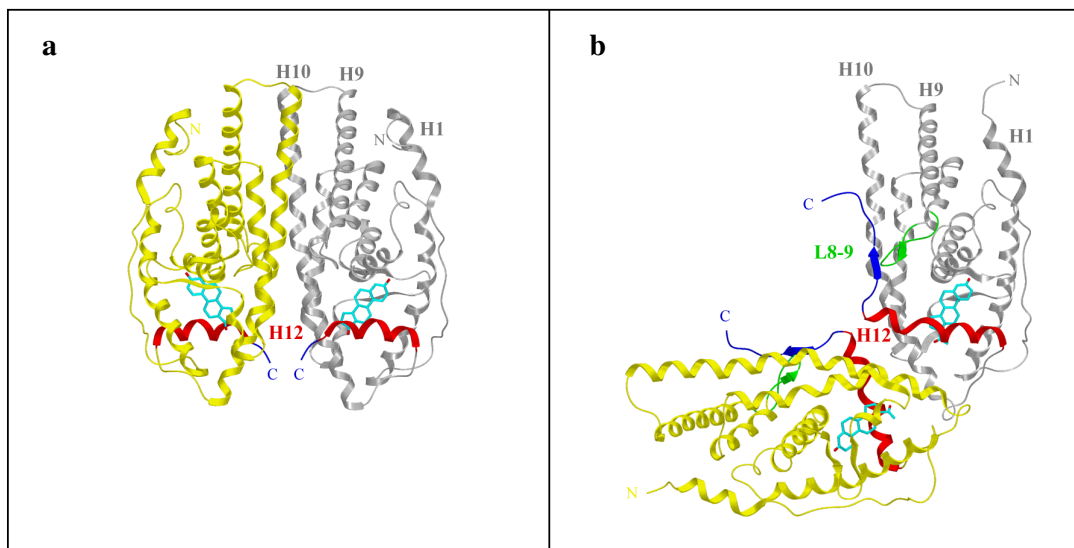


Figure 65 : Comparaison des modes de dimérisation des domaines E de ER et de PR.

En **a**, le dimère de ER et en **b**, celui du PR. Les monomères sont représentés en gris et en jaune. L'hélice H12 est en rouge, l'extrémité C-terminale en bleu. Dans PR, l'extrémité C-terminale participe à un feuillet- β antiparallèle, dont le premier brin se situe entre les hélices 8 et 9 (en vert), empêchant la dimérisation au niveau de cette région. Alors que dans ER, l'interface de dimérisation est constituée principalement de l'hélice H10, cette interface se situe au niveau des hélices H11 et H12 dans PR.

4. Mode de fixation du ligand

L'œstradiol lié semble faire partie intégrante du cœur hydrophobe et de la structure tertiaire du domaine E. La poche de fixation est constituée par des résidus majoritairement hydrophobes, dont 13 seulement sont en contact avec le ligand et proviennent des hélices H3 (Leu 346, Ala 350), H5 (Leu 387, Met 388, Leu 391), H7 (Met 421, Ile 424, Leu 428), H11 (Leu 525) et du feuillet- β (Phe 404, stabilisant le cycle A, par l'interaction des électrons π des deux cycles aromatiques). Des résidus polaires permettent l'ancrage des groupements hydroxyls en positions 3 et 17 de l'œstradiol. Le groupement en position 17 forme une liaison hydrogène avec un résidu de H11 (His 524), alors que celui en position 3 est maintenu par des résidus des hélices H3 (Glu 353) et H5 (Arg 394) (Figure 66). Une carte de densité électronique est présentée dans la Figure 67. Cette carte de type $(2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}})\Phi_{\text{calc}}$, contourée à

une déviation standard de la densité électronique moyenne (à 1σ) montre l'œstradiol et les résidus d'ancrage en densité. La combinaison des interactions polaires et apolaires est à l'origine de la spécificité de ER pour les hormones œstrogènes et de leur affinité inférieure au nanomolaire.

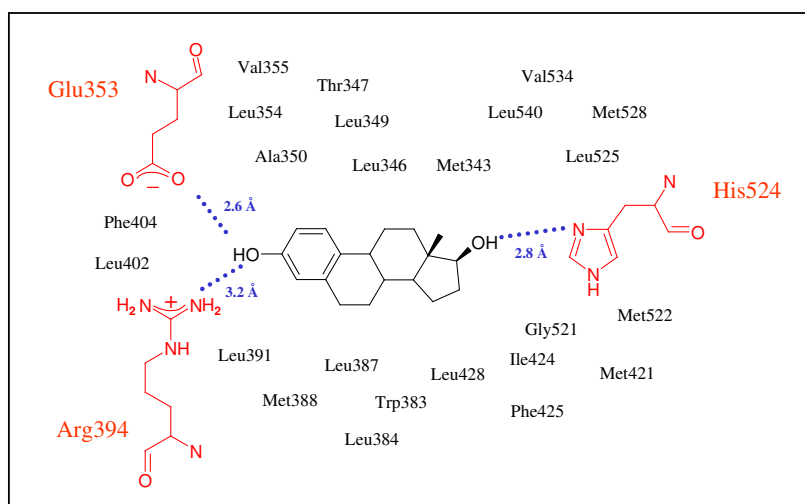


Figure 66 : Détail des interactions entre la protéine sauvage et l'œstradiol.

Représentation schématique des interactions entre l'œstradiol et les résidus de la poche de fixation du ligand. Les ancres polaires sont indiqués en rouge et les liaisons hydrogène, en bleu.

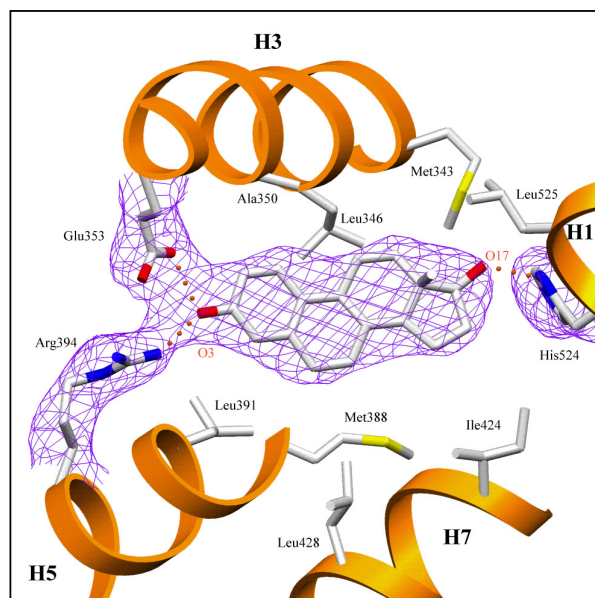


Figure 67 : L'œstradiol dans la poche de fixation du ligand.

La densité électronique représentée pour le ligand et pour les résidus d'ancrage hydrophile est de type $(2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}) \Phi_{\text{calc}}$ contournée à 1σ .

5. Conformation agoniste de l'hélice de transactivation H12

Dans le récepteur sauvage lié à l'œstradiol, l'hélice de transactivation H12 se replie sur le core de la protéine, scelle la poche de fixation du ligand, en adoptant la conformation agoniste, telle qu'elle a été observée pour d'autres complexes entre récepteurs nucléaires et ligands activateurs. La région que recouvre H12 sur le corps du domaine est appelée le sillon agoniste et comprend les éléments de structures secondaires suivants : les hélices H3 (Thr 347, Asn 348, Ala350, Asp 351, Leu 354, Val 355, Ile 358), H4 (Glu 380), H5 (Trp 383), H11 (Met 522, Leu 525, Lys 529) et la boucle entre les hélices H11-H12 (Pro 535) formant essentiellement des contacts hydrophobes avec l'hélice H12 (Figure 68). Des résidus hydrophobes, tels Ala350 et Leu525, contactent le ligand d'un côté, et H12 de l'autre. Même si l'interaction n'est pas directe, le ligand contribue à la stabilisation de la conformation agoniste de H12.

Des liaisons hydrogènes participent à la stabilisation de l'hélice H12 :

- le dernier résidu de la boucle précédent l'hélice H12, Tyr 537, forme une liaison hydrogène avec un résidu de l'hélice H3 (Asn 348). Lorsque le résidu Tyr 537 est muté en asparagine ou sérine, la fonction de transactivation ligand-dépendante du récepteur devient constitutive (Carlson et al., 1997; Weis et al., 1996; Zhang et al., 1997). Ce résidu est donc directement impliqué dans le positionnement agoniste de H12, par un mécanisme que l'analyse de la structure de la protéine sauvage ne permet pas d'expliquer.

- une liaison hydrogène est formée entre le noyau indole du résidu Trp 383 situé sur l'hélice H5 et le groupement carbonyle de la chaîne principale du résidu Met 543 situé sur l'hélice H12. On peut noter que le résidu Trp 383 est strictement conservé dans les récepteurs stéroïdiens (Trp 755 dans PR) et dans RXR α (Trp 305). Dans les structures de PR lié à la progestérone (Williams et Sigler, 1998) et de RXR α lié à l'acide rétinoïque 9-cis (Egea et al., 2000), ce résidu contribue également à la stabilisation de l'hélice H12.

- deux liaisons hydrogène entre le groupement carboxylique du résidu Asp 351 situé sur H3 et le groupement amide de la chaîne principale du résidu Leu 540, d'une part, et deux molécules d'eau, reliant l'aspartate sur H3 au résidu Asp 538 sur H12 d'autre part. Des interactions similaires ont été décrites pour les récepteurs PR et RXR α . En effet, la

comparaison des structures cristallographiques de ER, de PR et de RXR montre que les résidus Asp 351 de ER, Asp 273 de RXR α et Glu 723 de PR interagissent avec l'hélice H12 de la même manière.

On n'observe pas de pont salin entre l'hélice H12 et le core du domaine E de ER. Une telle interaction a été décrite dans le cas des holo-récepteurs RAR γ (Renaud et al., 1995) et VDR (Rochel et al., 2000). Cette interaction ionique concerne un résidu basique conservé de l'hélice H4 (Lys 264 de RAR γ et VDR) et le résidu glutamique strictement conservé de l'hélice H12 (Glu 414 de RAR γ , Glu 420 de VDR). Ce type d'interaction n'a pas été observé dans RXR α (entre les résidus Arg 302 sur H4 et Glu 453 sur H12), alors que dans les récepteurs stéroïdiens, la formation d'un pont salin est carrément impossible, étant donné que les positions équivalentes sur H4 sont occupées par des résidus polaires ou chargés (Glu 380 dans ER, Gln 752 dans PR).

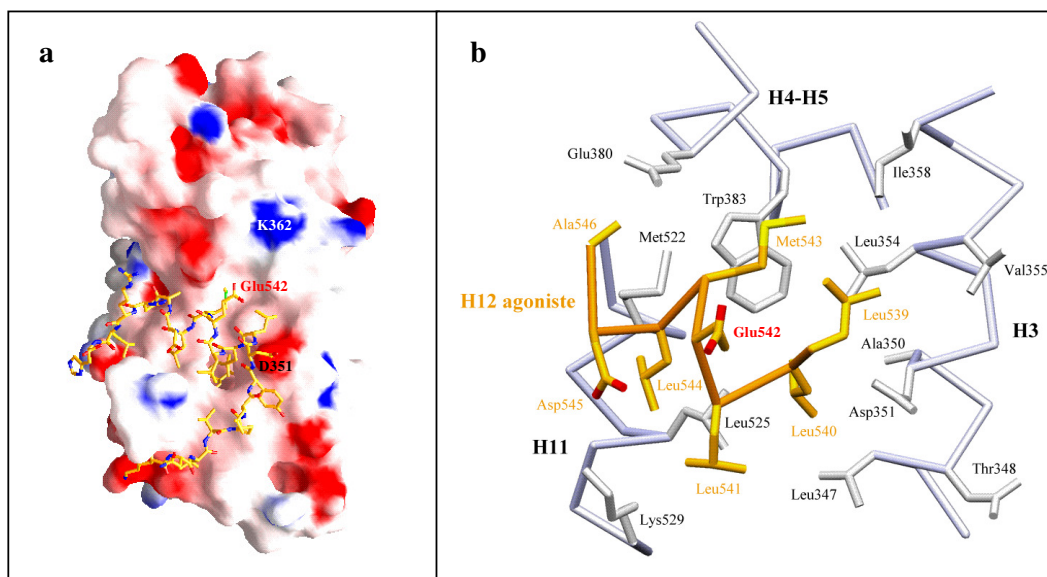


Figure 68: Position agoniste de l'hélice H12.

En **a** : Surface moléculaire du corps du domaine E sauvage, colorée en fonction du potentiel électrostatique local (bleu = positif ; rouge = négatif), tel qu'il est calculé dans GRASP (Nicholls et al., 1991), et représentation des chaînes latérales de l'hélice H12, ainsi que la boucle H11-H12. En **b** : zoom sur le sillon agoniste majoritairement constitué de résidus hydrophobes.

L'hélice H12 est amphipatique : une face hydrophobe interagit avec le sillon agoniste, alors que l'autre face est chargée et exposée au solvant. Les résidus de l'hélice H12 (Asp 538, Leu 539, Glu 542 et Met 543) sont ainsi en position pour permettre le recrutement des coactivateurs, décrit dans le complexe ternaire entre ER α -DES et un peptide de GRIP1 (Shiau et al., 1998). L'accessibilité du résidu Glu 542 est primordial dans ce type d'interaction, étant donné qu'il participe, avec un résidu strictement conservé de l'hélice H3 (Lys362) à la formation d'une pince électrostatique indispensable à la reconnaissance des coactivateurs portant le motif LXXLL.

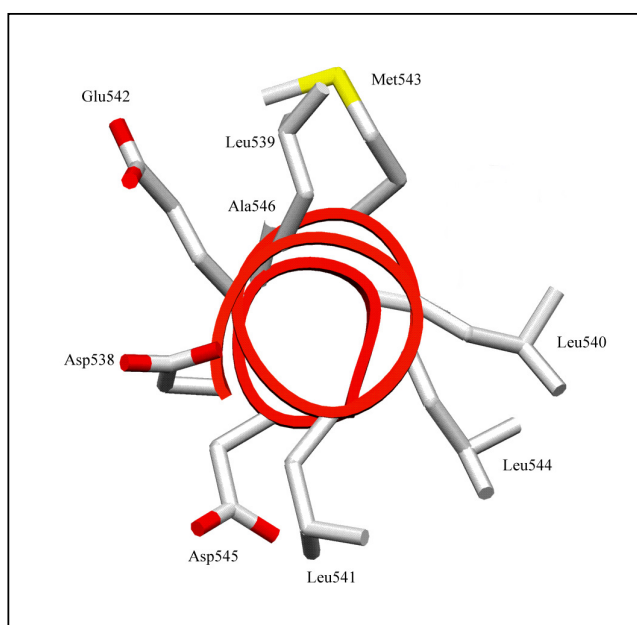


Figure 69 : H12 est une hélice amphipatique.

D'un côté, les résidus chargés sont exposés au solvant (en particulier le résidu Glu 542 impliqué dans la fixation des coactivateurs), de l'autre les résidus hydrophobes interagissent avec le sillon agoniste du domaine E.

Dans l'arrangement tétramérique de ER (Tanenbaum et al., 1998), produit du repliement *in vitro* et de l'oxydation des cystéines en position 530 (formant un pont disulfure intermoléculaire), l'hélice H12 adopte une « pseudo-conformation agoniste », car H12 recouvre le sillon agoniste d'une molécule voisine tête-bêche (Figure 70). Un autre point remarquable réside dans le fait qu'un tel arrangement semble être rencontré naturellement

dans le cas du RXR, dont la structure cristallographique du tétramère a été résolue récemment (Mangelsdorf et al., 1991; Gampe, Jr. et al., 2000).



Figure 70 : Arrangement tétramérique de ER dans la structure oxydée de Tanenbaum.

La protéine a subi une semi-dénaturation dans l'urée en vue de sa purification. Il s'agit d'une protéine sauvage ayant subi l'oxydation d'un résidu à l'extrémité C-terminale de l'hélice H11 (Cys 530). La structure qui en résulte présente une organisation quaternaire originale, celle d'un tétramère dans lequel les hélices H12 de chacun des monomères se positionnent dans le sillon agoniste de la molécule voisine et tête-bêche.

6. Comparaison des structures sauvage et carboxyméthylée

Nous avons superposé les monomères des domaines E sauvage et carboxyméthylé (Brzozowski et al., 1997) tous deux liés à l'œstradiol, à l'aide du programme O (Jones et al., 1989). Après avoir comparé les 3 molécules de l'unité asymétrique de notre structure avec les 6 molécules de la structure de Brzozowski, nous n'avons pas observé de changement conformationnel induit par la modification chimique des cystéines. En effet, les structures se

superposent parfaitement avec une déviation quadratique moyenne de 0.4 Å sur 235 atomes C α , ce qui permet de valider les observations structurales sur les récepteurs carboxyméthylés. De plus, deux boucles non définies dans la structure carboxyméthylée, l'une entre les hélices H1 et H3 (résidus 331 à 336), l'autre entre les hélices H8 et H9 (résidus 462 à 464), sont visibles en densité électronique et ont pu être construites pour le récepteur sauvage.

7. Bilan

La résolution de la structure du récepteur sauvage permet de valider les observations structurales sur les récepteurs modifiés chimiquement au niveau des cystéines (les deux structures se superposent parfaitement).

La conformation agoniste de l'hélice de transactivation H12 est stabilisée par des contacts hydrophobes avec le corps de la protéine et par des liaisons hydrogène, dans lesquelles sont impliquées des molécules de solvant. Le ligand stabilise cette conformation par un effet hydrophobe indirect. Une telle conformation de l'hélice H12 expose des résidus du domaine AF-2 AD, impliqués dans des interactions protéine-protéine avec les coactivateurs.

B. Structure du triple mutant C→S

1. Position alternative de l'hélice H12

Les mutations C→S sont localisées sur les hélices H4 (C381S), H6 (C417S) et H11 (C530S) (Figure 71). La structure cristallographique de ce triple mutant a été résolue en présence d'œstradiol. Alors que ce ligand est un agoniste pur, la conformation obtenue est une conformation antagoniste, suggérant que les mutations altèrent le mécanisme de positionnement de l'hélice de transactivation H12, de la même manière qu'un ligand antagoniste tel que le tamoxifène (TAM).

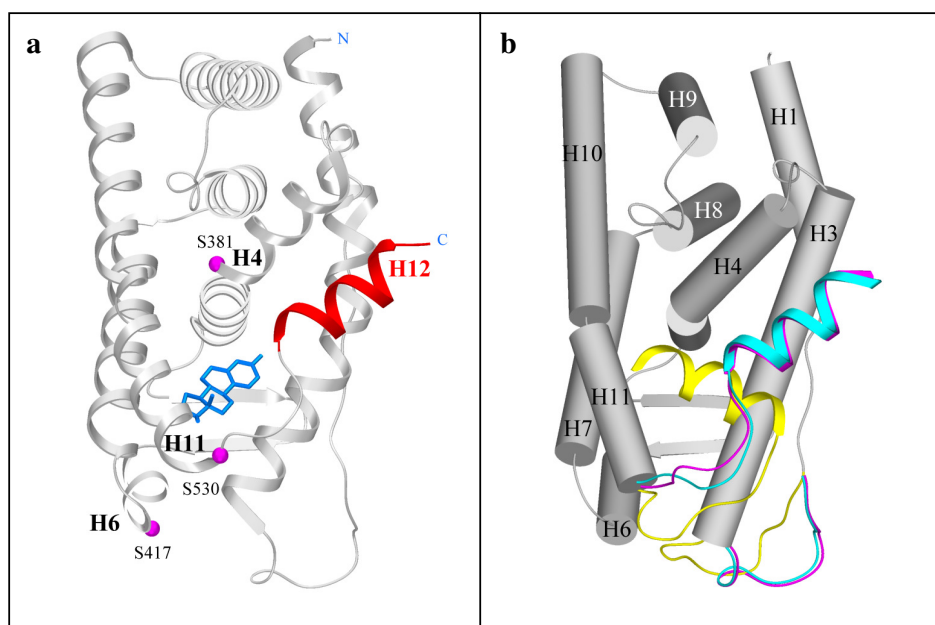


Figure 71 : Localisation des mutations et superposition des complexes liés à l'œstradiol et au tamoxifène.

En **a**, les mutations C→S sont en mauve. Alors que le mutant est lié à l'œstradiol, un agoniste pur, l'hélice C-terminale H12 adopte la même conformation qu'en présence d'un ligand antagoniste tel que TAM. En **b**, les complexes liés à l'œstradiol (sauvage en jaune et mutant en mauve) et au-TAM (en bleu) (Shiau et al., 1998) sont superposés. Les régions conservées sont présentées en gris.

Le complexe ER-TAM résolu par Shiau et le triple mutant lié à l'œstradiol se superposent parfaitement (Figure 71) : la déviation quadratique moyenne est de 0.676 Å sur 244 atomes C α (hélice H12 comprise). Les mutations n'agissent pas directement sur l'hélice H12, comme le fait un ligand antagoniste tel que TAM. Elles ne génèrent pas de contraintes stériques empêchant la conformation agoniste. Il est donc possible que nous ayons cristallisé une conformation particulière du complexe, dans laquelle H12 adopte une position antagoniste peut-être plus stable. Mais la conformation agoniste reste possible et des expériences de cristallisation de cette forme sont en cours (notamment les essais sur le double mutant C417S et C530S, dans les conditions de cristallisation du récepteur sauvage).

2. Empilement cristallin hexagonal

Le récepteur triple mutant lié à l'œstradiol cristallise dans le groupe d'espace P6₅22. L'unité asymétrique contient un protomère formant un dimère avec une molécule reliée par un axe cristallographique d'ordre deux (perpendiculaire à l'axe 6₅). Hormis la surface de dimérisation, les contacts cristallographiques impliquent essentiellement les boucles. La boucle L1-3 vient se nicher entre les hélices H12 et H3 ou se superposer aux boucles L8-9 et L9-10 dans différents contacts d'empilement. Cette région, d'une grande flexibilité, si l'on compare les structures sauvage et mutante, est ainsi stabilisée par de nombreux contacts. La région entre H11 et H12 est bien définie en densité dans le triple mutant, contrairement au complexe avec le raloxifène (Brzozowski et al., 1997), où cette zone est désordonnée. Les contacts d'empilement cristallin sont plus nombreux dans cette zone pour le triple mutant et dans le complexe avec le tamoxifène (Shiau et al., 1998) qui a cristallisé dans le même groupe d'espace avec des paramètres de maille similaires. Les résidus C-terminaux localisés après l'hélice H12 sont également impliqués dans un contact intermoléculaire et tendent vers le feuillet- β . Mise à part cette interaction, aucun contact cristallographique n'explique la conformation alternative de l'hélice H12, dont la position ne semble être influencée ni par le *packing*, ni par une gêne stérique quelconque (voir paragraphe VI.A.2).

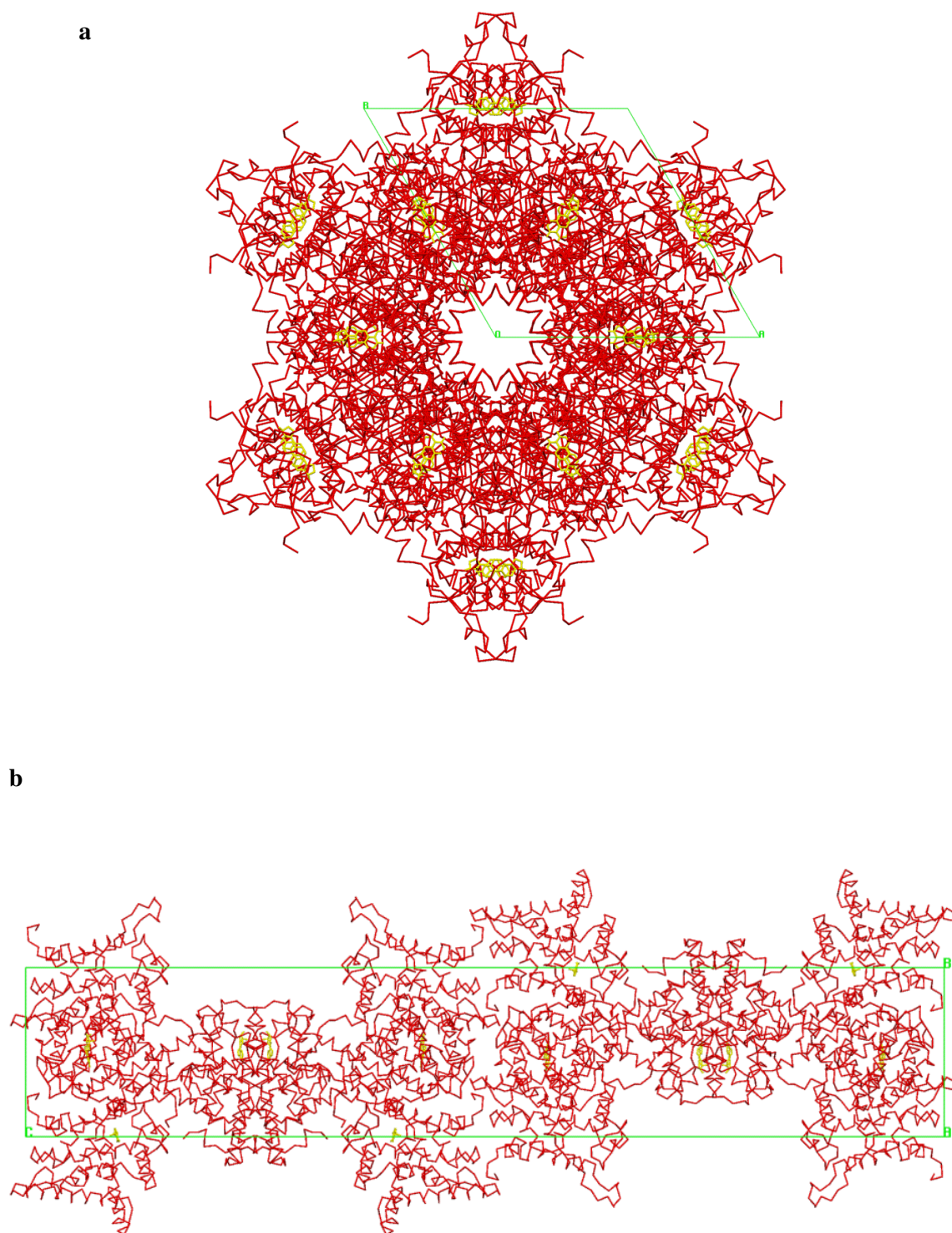


Figure 72 : Empilement cristallin hexagonal du triple mutant C→S.

Il y a 12 molécules dans la maille. En **a** : vue perpendiculaire à l'axe c. En **b** : vue perpendiculaire à l'axe a.

3. Interface de dimérisation

Les mutations n'altèrent pas le mode dimérisation du récepteur. Les homodimères sauvage et triple mutant se superposent parfaitement avec un écart minime de 0.64 Å sur 418 atomes C α . On peut cependant noter que, dans la forme mutante, la contribution est moins importante au niveau des éléments de structures secondaires H7, H9 et H10, par rapport à la protéine sauvage. En effet, l'interface de dimérisation du mutant est plus petite que celle du récepteur sauvage (1475 Å², soit une différence de 210 Å² comparée au sauvage)(Figure 73).

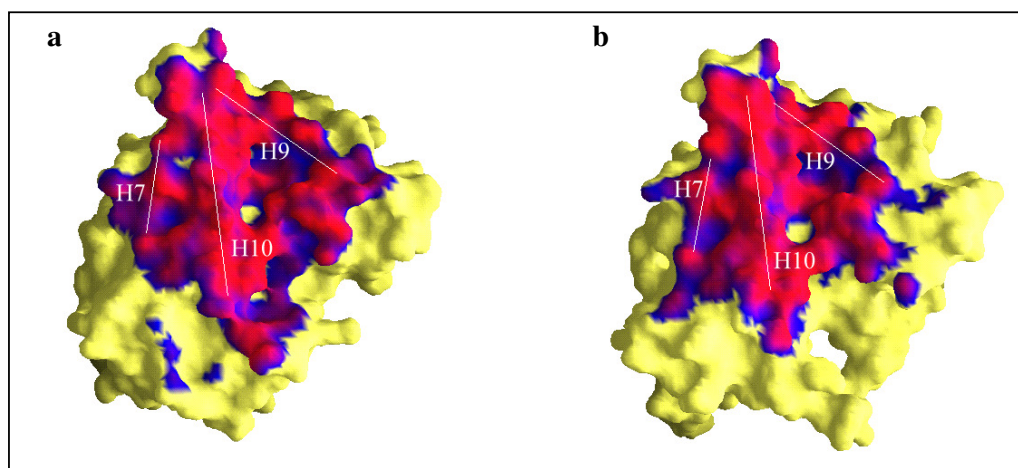


Figure 73: Interfaces de dimérisation des récepteurs sauvage (a) et triple mutant C→S (b).

Représentation des surfaces moléculaires des domaines E monomériques sauvage en **a**, et triple mutant C→S en **b**, montrant l'empreinte de dimérisation en rouge (contacts à moins de 3.8 Å) et bleu (contacts à moins de 4.2 Å). La localisation des éléments de structures secondaires H7, H9 et H10 est indiquée en blanc.

4. La poche de fixation du ligand

4.1 Mode de fixation de l'œstradiol

Dans le mutant, le cycle A de l'œstradiol se superpose parfaitement avec sa position dans la protéine sauvage ou carboxyméthylée (Figure 74). Par contre, le cycle D est déplacé de 0.5 Å environ vers les hélices H3 et H12. Ce déplacement n'altère pas outre mesure l'entourage du ligand. Les ancrages hydrophiles sont maintenus par les résidus Glu 353, Arg 394 et His 524. Les chaînes latérales de certains résidus (Met 343 et Leu 354 de H3 ; Leu 410

du brin s2 ; Leu 525 et Met 528 de H11) sont quelque peu réorientées. Une molécule d'eau impliquée dans les liaisons hydrogène entre le groupement hydroxyl en position 3, Glu 353 et Arg 394 est bien définie en densité. Invisible dans le récepteur sauvage (structure de plus basse résolution), cette molécule a également été identifiée dans le complexe impliquant la protéine carboxyméthylée et l'œstradiol, décrit par Brzozowski.

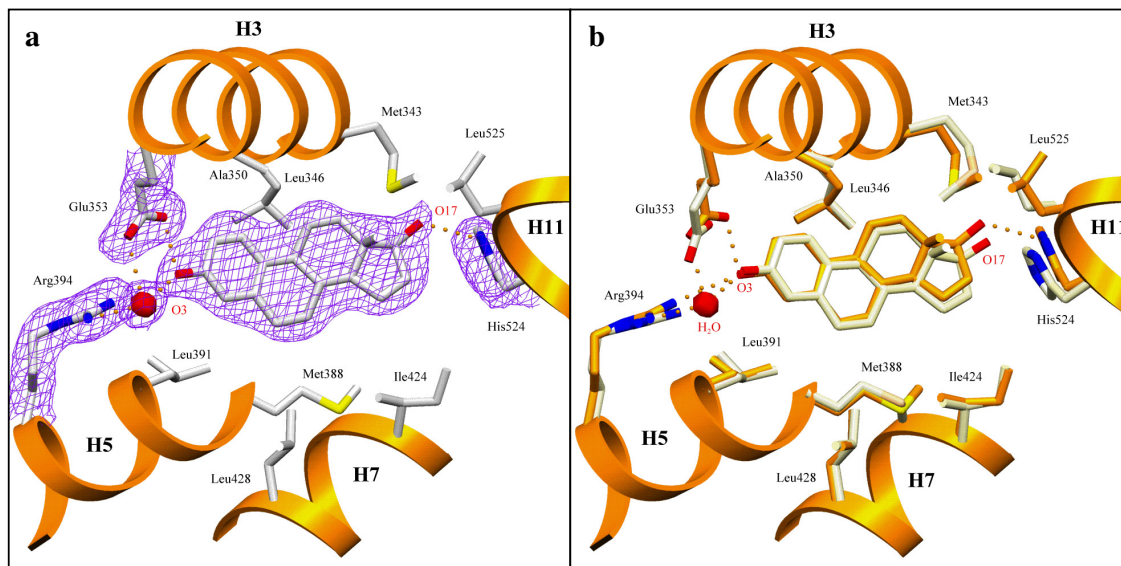


Figure 74 : L'œstradiol dans la poche de fixation du ligand du récepteur triple mutant C→S.

En **a** : la densité électronique représentée pour le ligand et pour les résidus d'ancrage hydrophile est de type $(2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}) \Phi_{\text{calc}}$ contourée à 1σ . La résolution de 2.2 Å permet de distinguer une molécule d'eau formant des liaisons hydrogène avec le ligand et les résidus Glu 353 et Arg 394.

En **b** : la superposition entre le triple mutant (en orange) et le sauvage (en écru).

4.2 La poche est ouverte

Dans le triple mutant C→S, du fait de la position alternative de H12, la cavité du ligand n'est pas scellée. Contrairement au récepteur sauvage, la poche est ouverte non seulement du côté de l'hydroxyl en position 17 de l'œstradiol (côté O17), mais également du côté de l'hydroxyl en position 3 (côté O3) (Figure 75). La première ouverture est béante et se situe en-dessous de l'extrémité N-terminale de l'hélice H12, entre les hélices H3 et H11. la seconde ouverture est beaucoup plus petite que la première et n'atteint la surface de la protéine qu'à

travers un chemin tortueux qui passe entre les hélices H3, H5 et la boucle L1-3. Il est remarquable que ces ouvertures n'affectent pas outre mesure le mode de liaison du ligand, étant donné que la première couche de résidus maintient des contacts avec le ligand de façon analogue à ceux de la protéine sauvage.

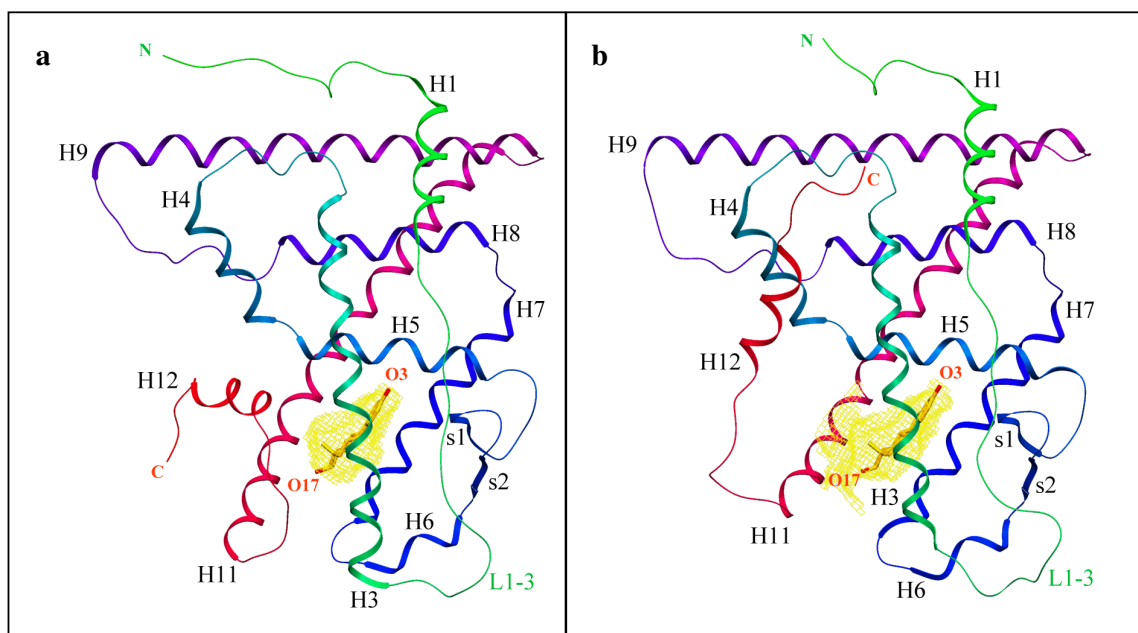


Figure 75 : Comparaison des poches de fixation du ligand dans les domaines E sauvage et mutant.

En **a**, est représenté le monomère sauvage lié à l'œstradiol. En **b**, le monomère portant les trois mutations C→S, également complexé à l'œstradiol, est montré dans la même orientation. Les structures secondaires sont représentées en ruban, dont le code couleur facilite l'identification (un gradient de l'extrémité N- vers C-terminale : vert / bleu / rouge).

En jaune est représenté la surface accessible de la poche du ligand, telle qu'elle a été calculée par Voidoo (Kleywegt et Jones, 1994). La surface *accessible* est délimitée par le trajet du centre d'une sphère de rayon 1.4 Å (le rayon d'une molécule d'eau), sur la surface de la protéine.

La surface accessible est fermée dans le récepteur sauvage et ouverte dans le récepteur mutant, non seulement du côté de l'hydroxyl en position 17 du ligand mais également en position 3, ce qui sera montré dans la figure suivante.

Les canaux qui rejoignent la surface de la protéine sont partiellement occupés par des molécules de solvant (Figure 76). Du côté O17, les molécules d'eau sont stabilisées par le résidu Asp351 de l'hélice H3, mais elles n'interagissent pas directement avec le ligand. Par contre, du côté O3, le ligand forme une liaison hydrogène avec une molécule d'eau, premier maillon d'un réseau d'interaction incluant non seulement des molécules de solvant, mais également des résidus des hélices H3 (Glu 353), H5 (Arg 394) et H8 (Lys 449) et de la boucle L1-3 (Glu 323, Pro 324, Pro 325, Ile 326). La superposition des structures de la protéine sauvage et triple mutante montre que l'ouverture du côté O3 est générée par des mouvements de chaînes latérales des résidus cités plus haut, ainsi que d'un résidu hydrophobe de H5 (Leu 387) en contact van der Waals avec le ligand. Dans le triple mutant, les chaînes latérales sont déplacées en moyenne de 1.2 Å par rapport au récepteur sauvage, alors que leurs C α ne bougent que d'environ 0.5 Å, ce qui correspond à l'écart quadratique moyen entre les deux structures (qui est de 0.66 Å sur 217 atomes C α , H12 exclue).

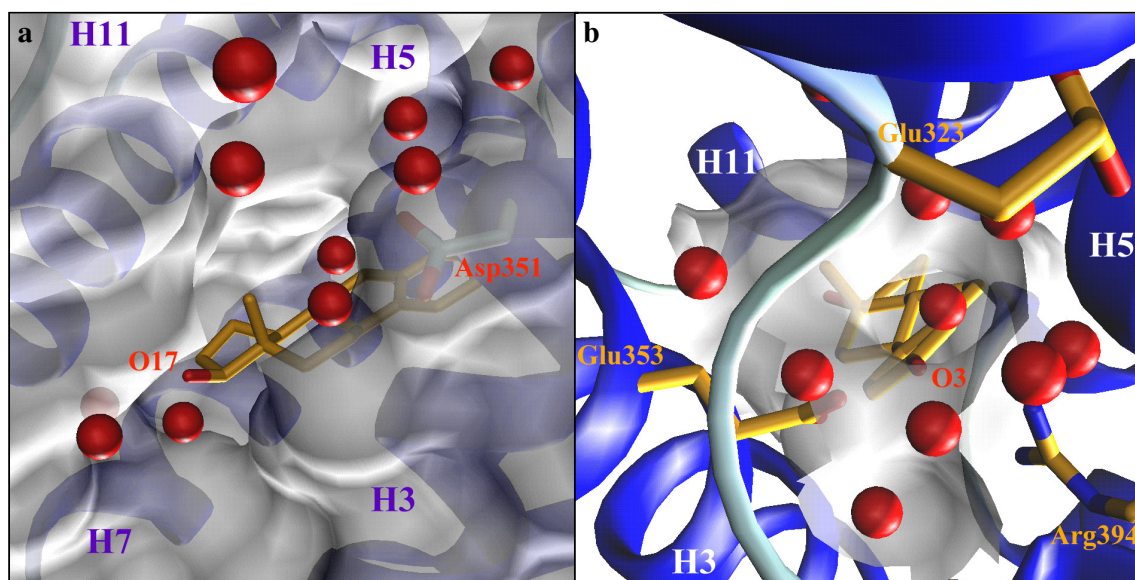


Figure 76 : La poche de fixation du ligand est ouverte dans le triple mutant.

En **a**, une vue du côté O17 de l'œstradiol. La surface moléculaire du domaine E mutant est montrée en gris et en transparence, laissant apparaître les éléments de structure secondaire. Les molécules d'eau (sphères rouge) sont essentiellement stabilisées par le résidu Asp 351.

En **b**, une vue du côté O3 du ligand. La surface, représentée en gris, est celle de la poche. Elle présente une ouverture restreinte dans laquelle s'engage des molécules d'eau en interaction avec le groupement O3 du ligand, les résidus d'ancrage polaire Glu 353 et Arg 394, ainsi que d'autres résidus (Glu 323 et des résidus non représentés sur la figure).

5. L'interface H12-protéine

5.1.1 La surface de reconnaissance des coactivateurs (ou sillon antagoniste)

L'hélice H12 dans sa position antagoniste se positionne dans une crevasse hydrophobe (Figure 77), constituée de résidus des hélices H3 (Ile 358), H4 (Leu 372, Gln 375, Val 376, Leu 379) et H5 (Trp 383). Des contacts polaires stabilisent également cette hélice :

- le résidu Tyr 537, du côté N-terminal de H12, contactent deux résidus de H3 (His 373 et Glu 380) par liaisons hydrogène.
- le groupement carboxylate du résidu Leu 544 forme une liaison hydrogène avec une molécule de solvant en interaction avec le résidu strictement conservé de l'hélice H3 (Lys 362).

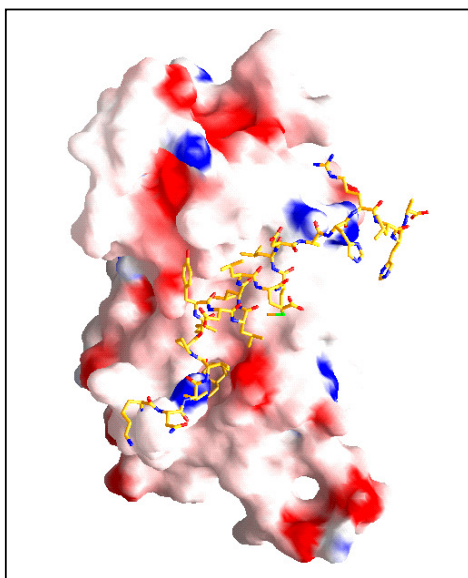


Figure 77: Positionnement de H12 dans une crevasse hydrophobe.

Surface moléculaire du corps du domaine E triple mutant, colorée en fonction du potentiel électrostatique local (bleu = positif ; rouge = négatif), tel qu'il est calculé dans GRASP (Nicholls et al., 1991), et représentation des chaînes latérales de l'hélice H12, ainsi que la boucle H11-H12.

L'hélice H12 (portant le motif LLEML) se superpose remarquablement avec le peptide coactivateur GRIP1 (de motif LHRL), tel qu'il a été observé dans le complexe ternaire avec le domaine E carboxyméthylé lié au DES (Shiau et al., 1999) (Figure 78).

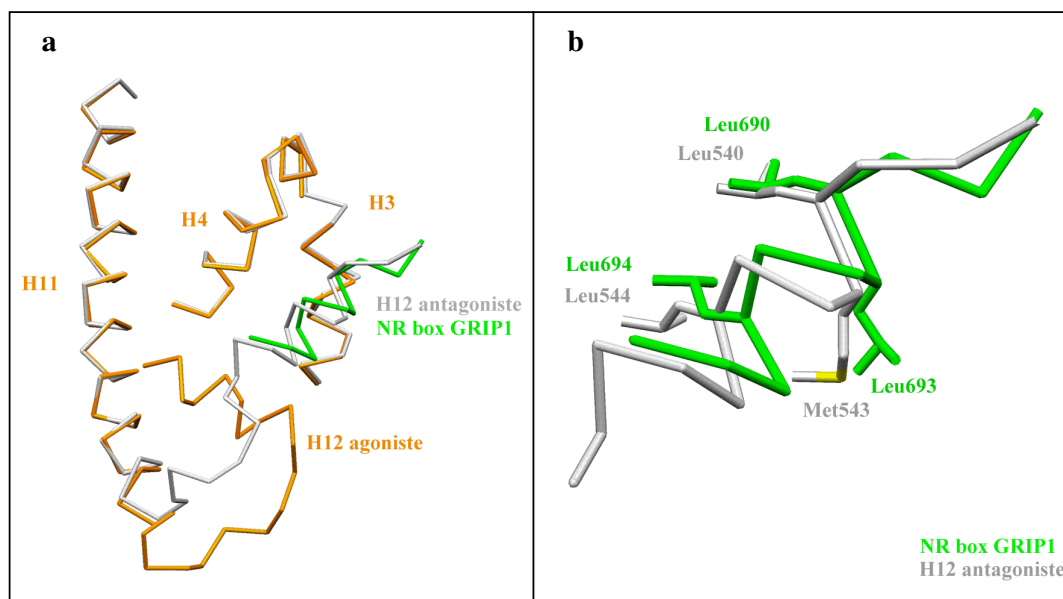


Figure 78: Positionnement de H12 dans le sillon de reconnaissance des coactivateurs.

Superposition du complexe ER-DES en présence du peptide GRIP1 (quelques éléments de structure secondaire sont représentés en orange, et le peptide en vert) et du complexe triple mutant C→S lié à l'œstradiol (en gris), dans lequel H12 est en position antagoniste. Vues d'ensemble en **a**, et en détail en **b**.

5.1.2 Le sillon agoniste

Dans le récepteur sauvage, la cystéine en position 381 est localisée au niveau de l'hélice H4, partiellement recouverte par l'hélice H12 en position agoniste. Par contre, dans le mutant, le résidu devenu sérine est totalement accessible à la surface de la protéine et stabilise un réseau de molécules d'eau dans le sillon agoniste. Contrairement à la gêne stérique provoquée par la fixation de ligands antagonistes, dont la chaîne latérale sort de la cavité de la poche et interfère directement avec H12, l'interface n'est pas altérée dans le cas du triple mutant lié à l'œstradiol. Seule la présence d'un réseau de molécules d'eau pourrait donc gêner la position agoniste (Figure 79). Pour adopter cette position, l'hélice H12 devrait chasser les molécules d'eau dans le sillon agoniste, ce qui est beaucoup plus coûteux, en terme d'énergie, en présence d'une sérine stabilisant les molécules d'eau, que d'une cystéine plus hydrophobe.

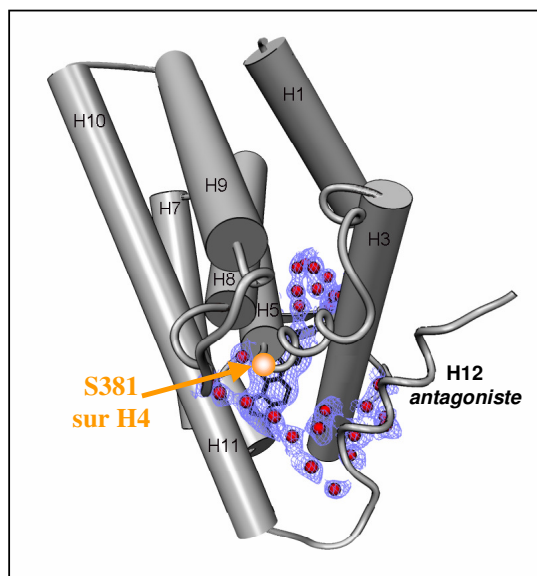


Figure 79: La mutation C381S favorise la solvation du sillon agoniste de l'hélice H12.

Les molécules d'eau, représentées par des sphères rouge, sont clairement définies en densité électronique (en bleu). Elles forment un canal contactant la sérine en position 381 (sphère orange). La position agoniste de l'hélice H12 est énergétiquement défavorisée en présence de la sérine 381, par rapport à une cystéine plus hydrophobe. Pour atteindre cette position, l'hélice H12 doit chasser les molécules d'eau localisées dans le sillon agoniste à la surface de la protéine.

5.2 Les hélices H3 et H11

Les mutations C417S et C530S altèrent les hélices H3 et H11 :

- La mutation C417S se situe sur l'hélice H6. Cette région est impliquée dans un réseau de contacts Van der Waals avec l'hélice H3 (Phe 337 et Leu 345) et le feuillet- β (Leu 408 et Leu 410). La sérine, de par son caractère polaire, exerce un effet répulsif sur ce réseau, ce qui se traduit par le raccourcissement de l'extrémité N-terminale de H3 d'un tour d'hélice et le déplacement de la boucle L1-3, s'écartant du core de la protéine (Figure 80 a).

- La dernière mutation C530S est localisée sur l'hélice H11. La présence d'un résidu polaire au lieu de la cystéine déstabilise un contact Van der Waals avec la Tyr 526. L'extrémité C-terminale de l'hélice H11 se trouve raccourcie d'un tour d'hélice, exposant ainsi la sérine au solvant et allongeant la boucle L11-12 (Figure 80 b).

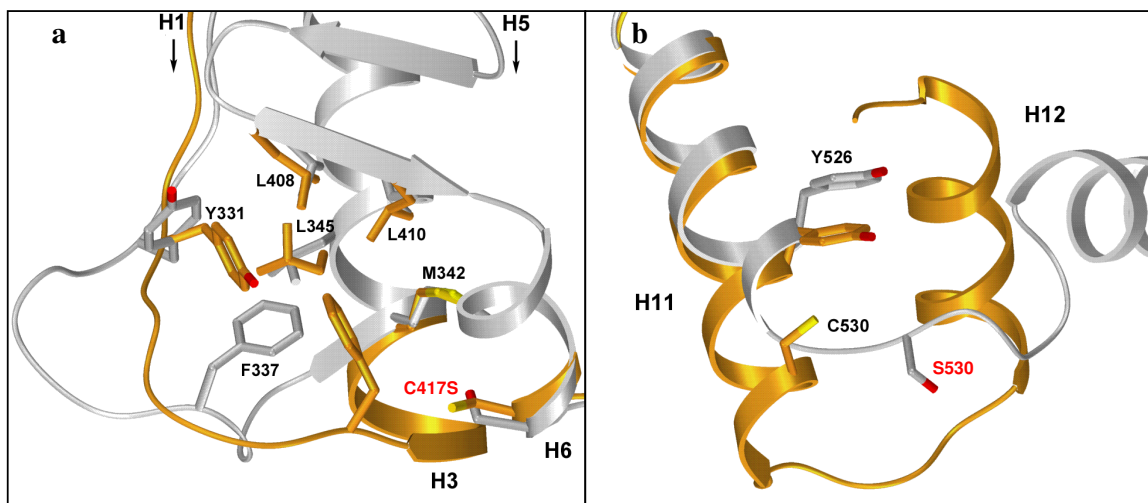


Figure 80 : Effets des mutations C417S et C530S sur les hélices H3 et H11.

Le récepteur sauvage est représenté en jaune, le triple mutant en gris. L'extrémité N-terminale de H3 est raccourcie d'un tour et la boucle L1-3 est déplacée sous l'effet de la mutation C417S. La mutation C530S déstabilise l'extrémité C-terminale de H11, qui est raccourcie d'un tour d'hélice

6. Bilan

Les mutations C→S ont généré une conformation antagoniste de l'hélice H12 portant la fonction de transactivation AF2-AD. Ils n'ont pas un contact direct avec l'hélice H12, ni avec le ligand.

Nous verrons que ces mutations agissent de manière indirecte et partielle sur le positionnement de H12 dans la discussion, en comparant les résultats structuraux et fonctionnels.

C. Mode de fixation du ligand antagoniste ZK 233702

J'ai résolu la structure de ER α triple mutant C $\rightarrow$ S lié à l'antagoniste ZK233702, à une résolution de 2.9 Å. Ce complexe cristallise dans le même groupe d'espace et les mêmes paramètres de maille que le complexe triple mutant lié à l'œstradiol. Les deux structures se superposent parfaitement avec un écart quadratique moyen de 0.42 Å sur 240 atomes C α (H12 incluse). Contrairement au complexe précédent lié à l'œstradiol (de résolution 2.2 Å), dans lequel toutes les régions sont clairement définies en densité électronique, il y a, dans cette structure, deux résidus dans la boucle L11-12 (Ser 530 et Lys 531) qui ne sont pas visibles dans la carte de densité électronique. Cette boucle présente des facteurs d'agitation thermique plus élevés que le reste de la structure (d'agitation thermique moyenne 40 Å²). La Figure 81 illustre l'agitation thermique du complexe : le cœur de la protéine est figé et les zones périphériques sont agitées.

Dans cette partie, nous ne décrivons que le mode de fixation du ligand. En effet, le domaine E triple mutant adopte le même repliement que dans le complexe lié à l'œstradiol.

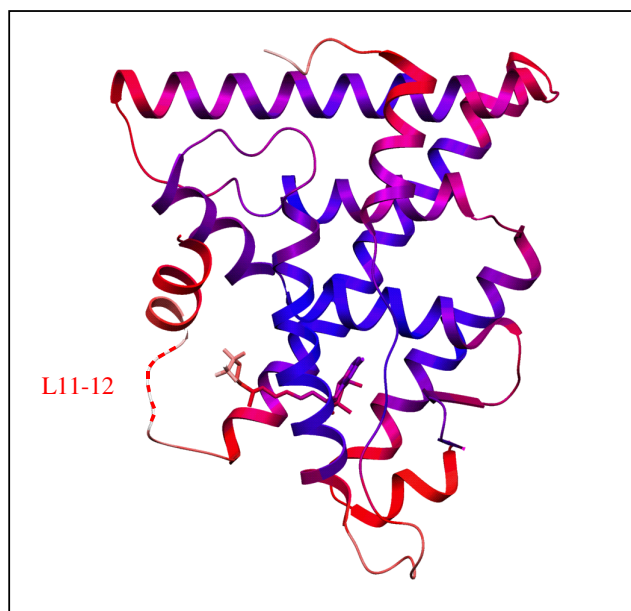


Figure 81 : Représentation de l'agitation thermique du complexe mutant-ZK233702.

L'agitation thermique est schématisée par un code couleur allant du bleu, pour de faibles valeurs, au rouge, pour une forte agitation. Les boucles et les zones périphériques paraissent plus désordonnées par rapport au cœur de la protéine, en particulier la boucle L11-12 mal définie en densité.

1. Description du ligand ZK233702

Le ligand ZK233702 est un antagoniste stéroïdien (Figure 82). Il possède deux groupements supplémentaires par rapport à l'œstradiol : une longue chaîne latérale en position 7α et un substituant fluoré en position 11β . D'un point de vue fonctionnel, on pourrait décomposer cette molécule en deux parties :

- un corps « agoniste » comprenant les cycles A, B, C, D, les deux groupements hydroxy en position 3 et 17β , identiques à l'œstradiol, et le substituant en 11β renforçant les interactions hydrophobes dans la poche du ligand,
- et un appendice « antagoniste » constitué par une longue chaîne latérale en position 7α .

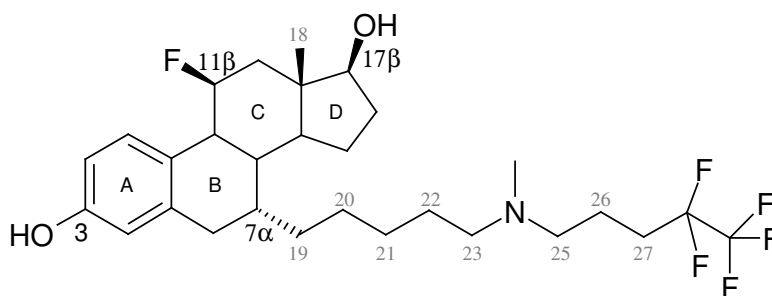


Figure 82 : Formule chimique du ligand ZK233702.

Le ligand ZK233702 est un antagoniste stéroïdien, présentant deux substitutions en positions 7α et 11β par rapport à l'œstradiol. L'appendice chimique en 7α est indispensable à l'activité antagoniste de ce ligand.

2. Le mode liaison du ligand

Le ligand ZK233702 adopte un mode de liaison dans lequel le corps stéroïdien est enfoui dans la poche majoritairement hydrophobe. La chaîne latérale en position 7α sort de la cavité entre les hélices H3 et H12 (Figure 83). Cette extension est pratiquement perpendiculaire au corps stéroïdien du ligand, mais présente une forte courbure au niveau de l'atome C25. L'exposition au solvant du groupement hydrophobe pentafluoré est ainsi minimisée, par contact apolaire avec le corps de la protéine.

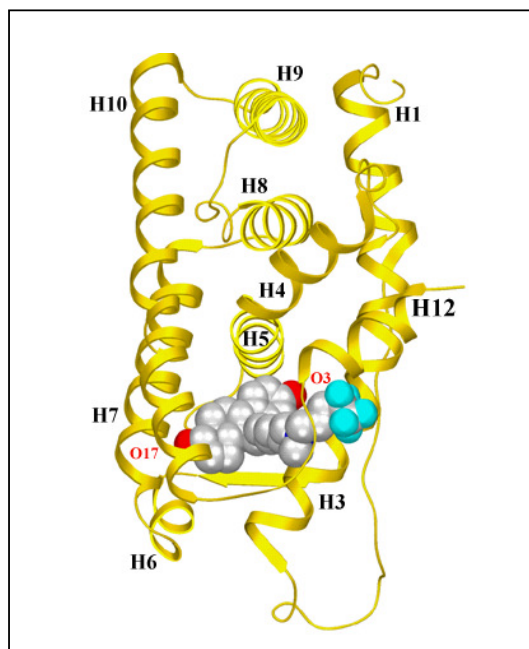


Figure 83 : Orientation du ligand dans le récepteur.

Le ligand ZK233702 est un antagoniste stéroïdien, dont la chaîne latérale en position 7α sort de la poche et s'insinue entre les hélices H12 (en position antagoniste) et H3. Les structures secondaires du domaine E sont représentées en mode ruban, les atomes du ligand, en sphère van der Waals (en gris pour les atomes de carbone, rouge pour l'oxygène, cyan pour le fluor).

Une carte de densité électronique ($2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$) Φ_{calc} contourée à 1σ , du ligand et des résidus d'ancrage est présentée dans la Figure 84. Cette carte montre que le ligand est bien définie en densité. La Figure 85 décrit les contacts ligand-protéine. En ne considérant que les contacts ligand-protéine à moins de $4.2 \text{ \AA}$, on peut noter que l'antagoniste contacte 11 résidus supplémentaires, par rapport aux résidus en interaction avec l'œstradiol. Ces résidus sont localisés sur les hélices H3 (Met 343, Thr 347, Asp 351, Leu 354), H5 (Trp 383, Leu 384, Met 388), H7 (Phe 425) et H12 (Leu 536, Leu 539, Met 543).

- L'ancrage du ligand du côté de l'hydroxyl en position 3 de ZK233702 implique une molécule d'eau, formant des liaisons hydrogènes avec les résidus Glu 353 (H3) et Arg 394 (H5). Tandis que le résidu Glu 353 établit également une forte liaison hydrogène avec l'hydroxyl du ligand, le groupement guanidinium de l'Arg 394 forme, quant à lui, une très faible liaison avec le ligand (à $3.4 \text{ \AA}$).

- L'ancrage du groupement hydroxyl en position 17 est maintenue par le résidu His 524, dont la flexibilité permet d'accommoder l'orientation alternative de ce groupement, par rapport à l'œstradiol (Figure 87).

- La chaîne latérale du ZK233702 est stabilisée par une liaison hydrogène entre son amine tertiaire en position 24 (groupement donneur de liaison hydrogène, sous la forme protonée) et le résidu Asp 351 de l'hélice H3 (groupement accepteur de liaison hydrogène). Cette interaction semble commune à tous les antagonistes *SERM* présentant une chaîne latérale avec un groupement aminé à la bonne distance (à ≈ 8 Å du corps enfoui du ligand). Elle se retrouve dans les complexes liés aux ligands 4-hydroxytamoxifène TAM (Shiau et al., 1998) et raloxifène RAL (Brzozowski et al., 1997).

Le ligand établit des contacts Van der Waals avec l'hélice H12 et la stabilise en position antagoniste. Le groupement pentafluoré à l'extrémité de la chaîne latérale de ZK233702 présente un caractère fortement hydrophobe, et se niche contre l'hélice H12 (Figure 84). Le groupement fluoré en position 11 β , établit des contacts van der Waals avec les résidus Phe 404 et Leu 428.

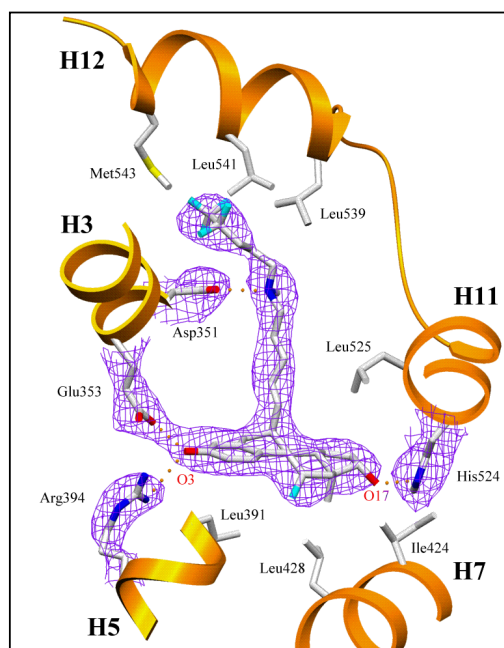


Figure 84: Ligand en densité électronique dans la poche de fixation du ligand.

La densité électronique représentée pour le ligand et pour les résidus d'ancrage hydrophile est de type $(2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}})$ Φ_{calc} contourée à 1σ .

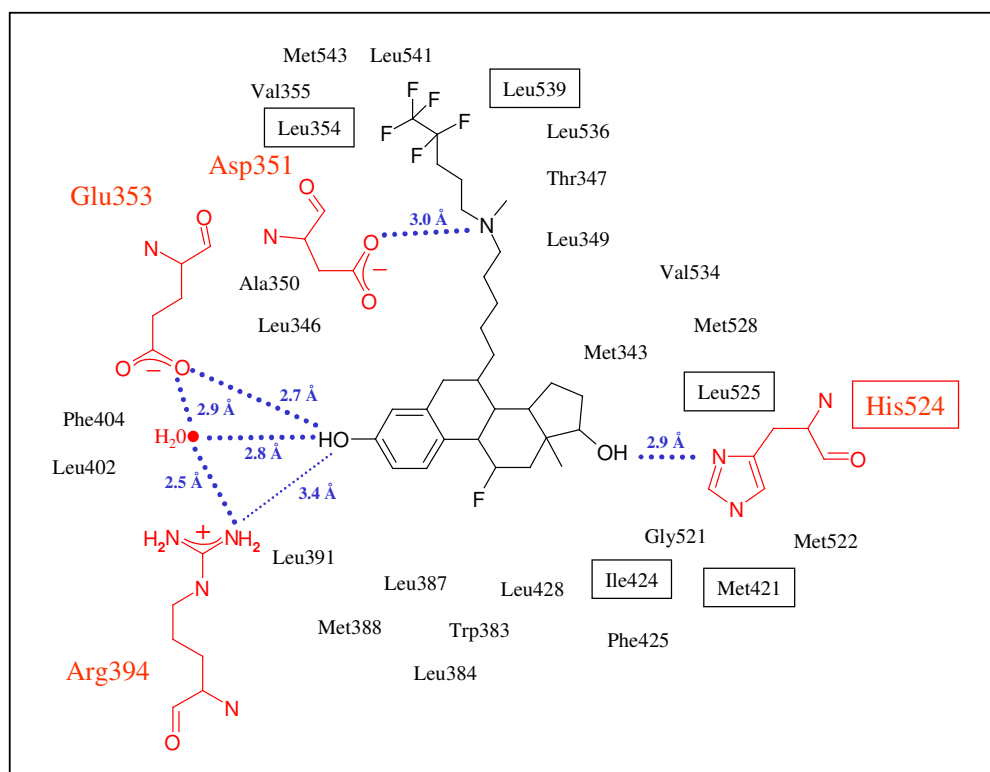


Figure 85 : Détail des interactions protéine-ligand.

Les ancrages polaires sont représentés en rouge, les liaisons hydrogène, en bleu. La superposition des monomères des complexes triple mutant lié à l'œstradiol et au ZK233702 a révélé la présence de résidus flexibles (les résidus encadrés).

3. Comparaison des modes de fixation de l'œstradiol et du ZK233702

Le corps stéroïdien est enfoui dans la cavité hydrophobe, mais l'orientation qu'il adopte est différente de celle de l'œstradiol. La molécule est retournée (rotation d'environ 180° autour de l'axe reliant les deux groupements hydroxyles en position 3 et 17). En effet, en superposant les protéines des complexes triple mutant lié à l'œstradiol et au ZK233702 dans O (Jones et al., 1989), il apparaît que les ligands se superposent également dans un plan moyen défini par les cycles A et B (Figure 86 a), tandis que les cycles C et D s'en éloignent de part et d'autre (les atomes de carbone du cycle D, C15 de l'œstradiol et C13 de ZK233702, sont distants de 1.4 Å). Il est remarquable que les atomes C7 de l'œstradiol et C11 de ZK233702 se superposent parfaitement (Figure 86 b). Ce retournement de ZK233702 par rapport à l'œstradiol permet à la protéine d'accommoder le groupement substituant en position 7 α , tout en maintenant la restriction structurale sur le positionnement du cycle A.

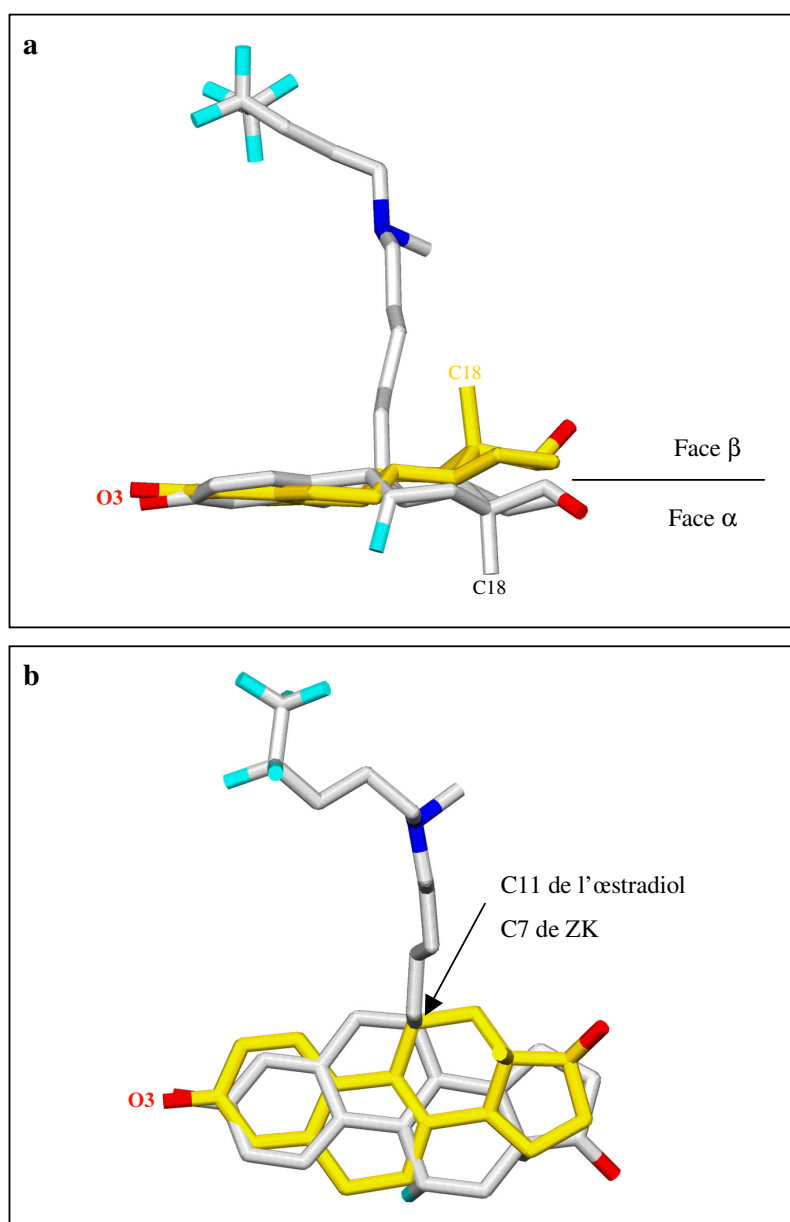


Figure 86 : Comparaison de l'orientation de l'œstradiol et du ZK233702 dans la poche.

Les représentations vue de profil en **a**, et vue de haut en **b** des ligands ont été générées en superposant les protéines des complexes triple mutant lié à l'œstradiol et au ZK233702 dans O (Jones et al., 1989). En **a**, un plan moyen passe par les cycles stéroïdiens A et B. Les carbones C18 pointent dans des directions opposées de la cavité : les faces β et α . Nous avons défini ces deux faces en référence aux orientations des groupements α et β de l'œstradiol. En **b**, les atomes C11 de l'œstradiol et C7 du ZK233702 occupent exactement la même position du fait du retournement de ZK233702 dans la poche.

Certains résidus tels que Leu 354 (H3), Met 421 et Ile 424 (H7), His 524 et Leu 525 (H11) et Leu 539 (H12) (résidus entourés dans la Figure 85), présentent des chaînes latérales avec une orientation légèrement différente par rapport au complexe triple mutant lié à l'œstradiol. Le retournement du corps stéroïdien de ZK233702 par rapport à l'œstradiol engendre une orientation des groupements méthyl C18 et hydroxyl O17 vers le bas (Figure 86 a), ce qui a pour effet de déplacer les résidus Met 421 et His 524 (maintenant l'ancrage de l'hydroxyl 17). L'espace laissé vacant dans cette nouvelle orientation est comblé par le déplacement de la chaîne latérale du résidu Leu 525. Sous l'effet d'une gêne stérique avec la chaîne latérale en 7 α , les chaînes latérales des résidus Leu354 et Leu 539 sont réorientées par rapport au complexe lié à l'œstradiol. Ces résidus forment des contacts van der Waals avec le ZK233702. La cavité présente une flexibilité remarquable qui lui permet d'accommoder le ZK233702 en optimisant les contacts non polaires entre le ligand et la protéine.

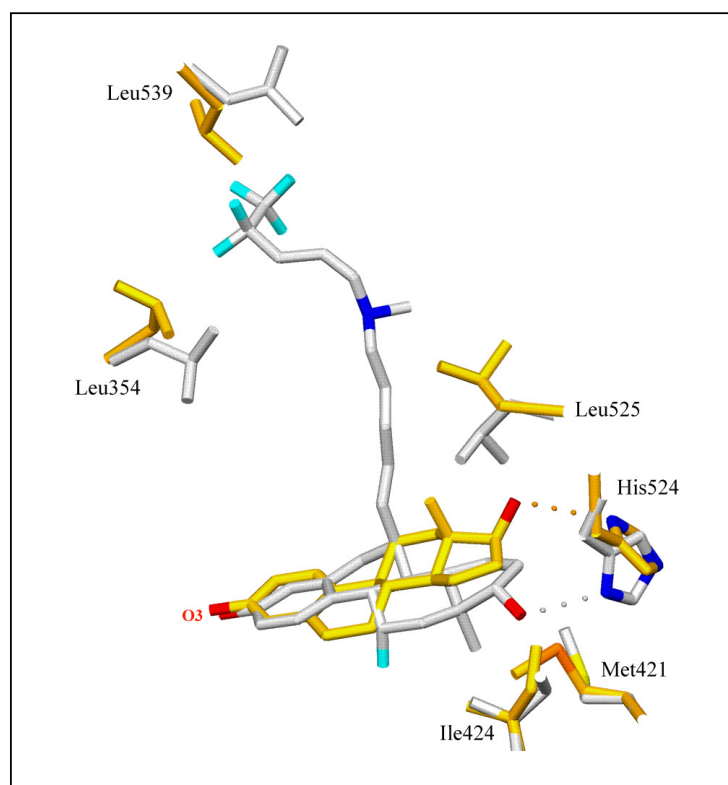


Figure 87 : Plasticité de la poche de fixation du ligand.

La superposition des complexes lié à l'œstradiol en jaune et au ZK233702, en gris, montre la flexibilité de la poche de fixation du ligand capable d'adapter des ligands très différents, par la réorientation de certaines chaînes latérales des résidus dans la poche et sur l'hélice H12 (Leu539).

4. Comparaison avec le tamoxifène et le raloxifène

Les antagonistes ou *SERM* tels que le tamoxifène, le raloxifène et le ZK233702 appartiennent à des familles de molécules chimiques très différentes (le tamoxifène possédant un squelette hydroxystilbène, le raloxifène portant un groupement benzothiophène, et le ZK233702, un dérivé stéroïdien). Ces ligands (liés à ER α) sont présentés dans la Figure 88.

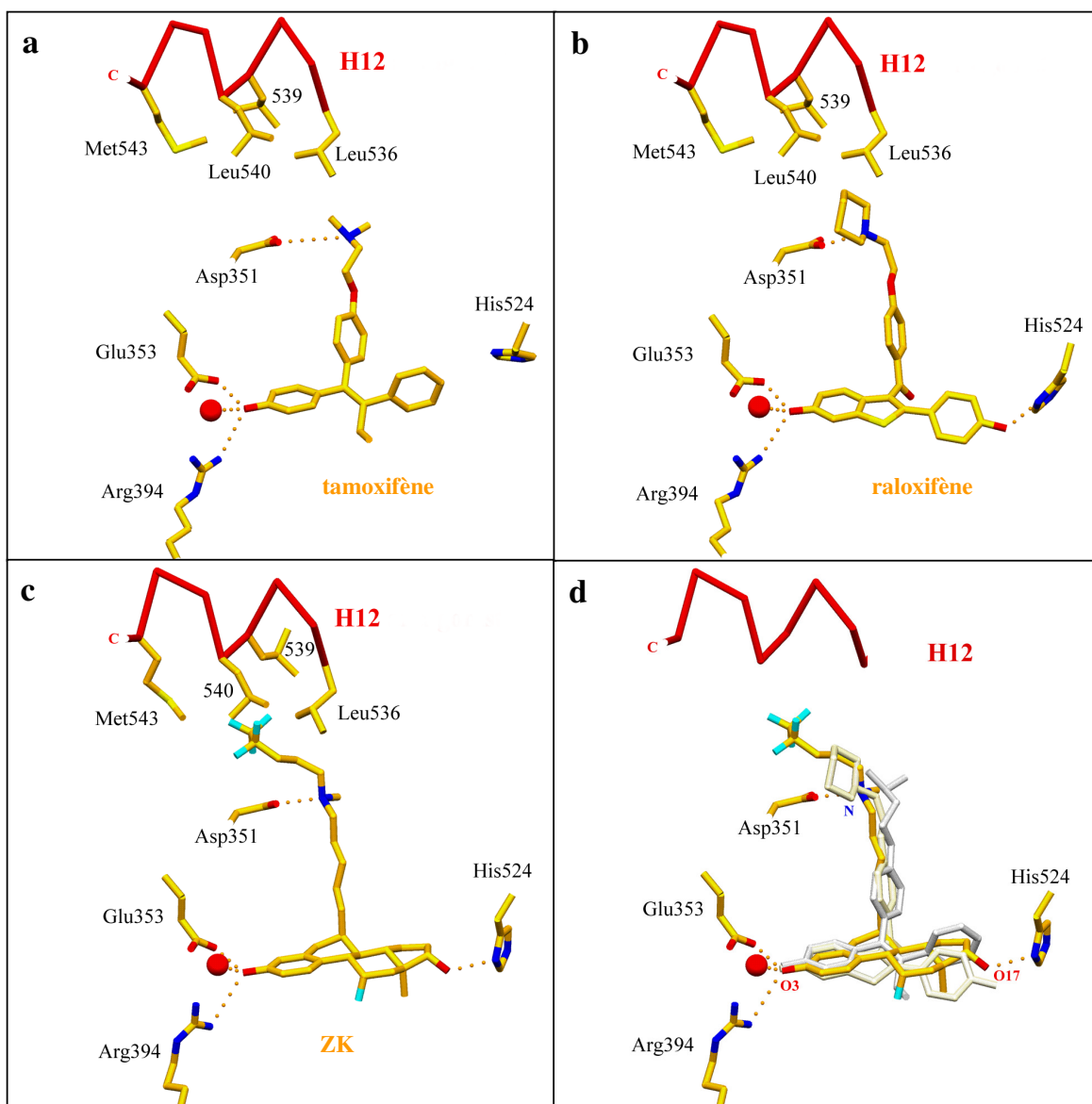


Figure 88 : Ancrage des ligands SERM.

Les structures des domaines E des complexes liés au tamoxifène (a), au raloxifène (b) et au ZK233702 (c), ont été superposées (d). La chaîne latérale des trois ligands, pointant vers H12, est ancrée par un résidu de l'hélice H3, Asp 351. Les ligands se superposent parfaitement au niveau du cycle A portant le groupement hydroxyl O3, par contre, leur cycle D adopte des orientations assez différentes.

Malgré leurs différences chimiques, ces ligands présentent de nombreux points communs, en particulier dans leur mode de liaison. Les domaines E des trois complexes ont été superposés à l'aide du programme O. Les ligands se superposent parfaitement au niveau de leur cycle A. En effet, ce groupement phénolique, indispensable à une liaison de haute affinité au récepteur, est maintenu en place par un ancrage polaire (Glu 353 et Arg 394) et par les électrons π d'un résidu Phe 404 du feuillet (non montré).

Les ligands *SERM* portent des chaînes latérales qui pointent vers l'hélice H12, provoquant une gêne stérique avec la conformation agoniste de celle-ci. Il en résulte un changement conformationnel, qui positionne H12 dans le sillon des coactivateurs (conformation antagoniste). Il est remarquable que les chaînes latérales des *SERM* présentent la même orientation dans les trois complexes. En fait, elles sont maintenues par le même ancrage polaire : par le résidu Asp 351 de l'hélice H3, une liaison supplémentaire par rapport au mode de fixation de l'œstradiol.

L'importance de l'ancrage par le résidu Asp351 dans l'activité des *SERM* a d'abord été suggéré par la caractérisation de la mutation naturelle D531Y, isolée à partir d'une tumeur du sein stimulée par le tamoxifène (Wolf et Jordan, 1994). Cette mutation convertit les *SERM* en agonistes (Anghel et al., 2000; Levenson et Jordan, 1998). Par contre, il a été montré récemment que la mutation D351G abolissait toute activité agoniste du complexe ER-tamoxifène (MacGregor et al., 2000).

Dans le complexe sauvage lié à l'œstradiol, le résidu Asp 351 forme une liaison hydrogène avec le groupement amine de la liaison peptidique entre les résidus Leu 539 et Leu 540 de l'hélice H12 en conformation agoniste (Figure 89 **a**). Il est donc délicat d'analyser l'importance d'un résidu qui intervient à la fois dans la stabilisation de la conformation agoniste de l'hélice H12 et dans l'ancrage des *SERM* (Figure 89 **b**), ligand qui induisent un changement conformationnel :

- par gêne stérique sur la position agoniste de H12,
- par stabilisation de la conformation antagoniste de H12.

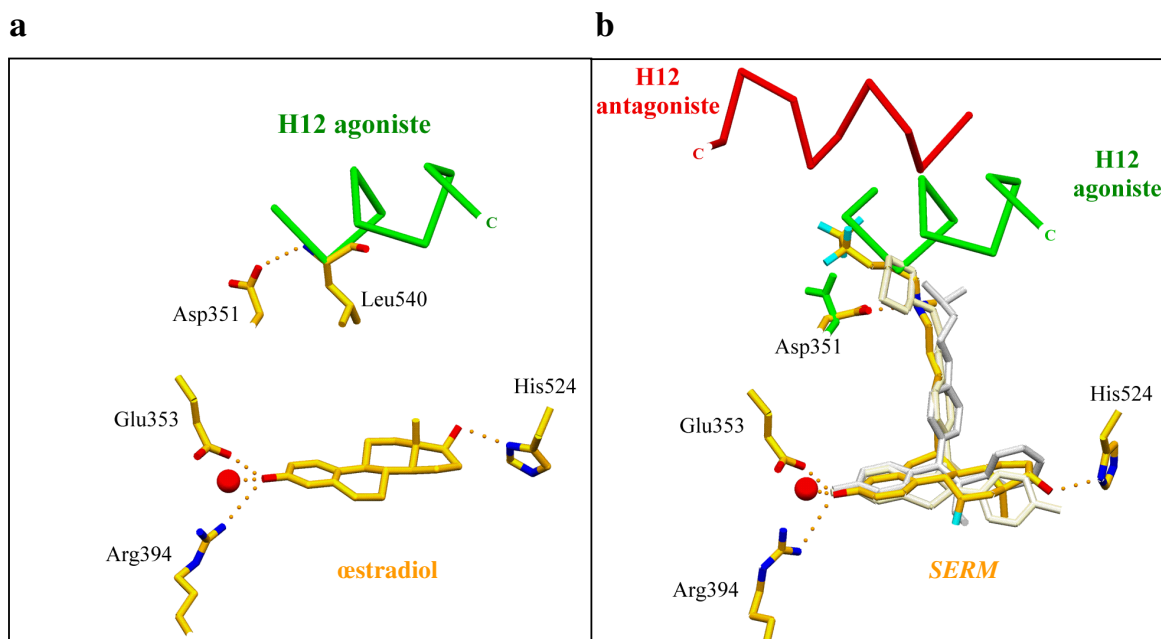


Figure 89 : Importance du résidu Asp351 dans le positionnement de H12 et l'ancrage des ligands SERM.

En **a** : dans le complexe lié à l'œstradiol, le résidu Asp 351 stabilise la conformation agoniste de l'hélice H12. En **b** : la chaîne latérale de l'Asp 351 présente une orientation alternative et forme une liaison hydrogène avec le groupement amine des ligands *SERM*.

5. Bilan

- Pour accommoder le groupement substituant en position 7α , le corps stéroïdien du ligand ZK233702 subit un « retournement » par rapport à l'œstradiol, suggérant qu'il n'y a qu'une seule issue par laquelle la chaîne latérale puisse s'échapper. Les contraintes de positionnement sont maintenues sur le cycle A. Le point d'ancrage polaire sur H11 (His524) s'adapte par un léger mouvement à l'orientation alternative du groupement hydroxyl en position 17. Les groupements méthyl en position 18 de l'œstradiol et du ZK233702 pointent dans des directions opposées de la cavité. La réorientation des chaînes latérales de quelques résidus dans la poche témoigne de la plasticité de la cavité.

- La chaîne latérale du ligand ZK233702 sort de la poche de fixation du ligand entre les hélices H3 et H12, empêchant la conformation agoniste de H12 par gêne stérique et stabilise la conformation antagoniste par de nombreux contacts van der Waals.

- Le ZK233702 possède des caractéristiques communes avec les autres *SERM*, tels que le tamoxifène et le raloxifène. Sa chaîne latérale pointe dans la même direction et elle est stabilisée par le même résidu de l'hélice H3, Asp 351, qui joue un rôle important, non seulement dans l'ancrage polaire des *SERM*, mais également dans le positionnement de H12.

VII.Étude fonctionnelle

Le fait de muter les cystéines réactives (C381, C417 et C530) en sérines a permis de produire le domaine de fixation du ligand sous une forme stable et insensible à l'oxydation. Il a ainsi été possible de purifier et de cristalliser la protéine en absence d'agent réducteur, ce qui a permis le phasage par remplacement isomorphe multiple et la résolution de la structure tridimensionnelle de ce domaine.

Alors que la protéine sauvage adopte la conformation agoniste, capable de recruter les coactivateurs au niveau de la surface AF-2, la protéine triple mutante présente une conformation antagoniste en présence d'œstradiol, ligand qui est pourtant un agoniste pur.

Avons-nous généré un mutant d'inversion qui interprète les agonistes comme des antagonistes ? Pour répondre à cette question, nous avons entrepris l'étude fonctionnelle des récepteurs portant les mutations C→S.

Nous présenterons également dans cette partie l'étude fonctionnelle du triple mutant EEK→A (E339A+E419A+K531A), conçu d'après la comparaison des structures cristallographiques agoniste et antagoniste de ER α (voir VIII.A.1.2), dans le but d'analyser l'importance de ces résidus dans la fonction AF-2 (et donc le positionnement de l'hélice H12).

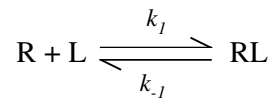
A. Aspects méthodologiques

1. Constructions utilisées pour l'étude fonctionnelle

Les mutations ont été introduites dans les différentes constructions par PCR (voir chapitre I et annexe). La fusion polyhistidine–domaine E est utilisée dans l'étude de la capacité de liaison du ligand (vecteur d'expression procaryotique pET-15b). Les tests de transactivation ont été réalisés sur le récepteur entier (vecteur d'expression eucaryotique pSG5) (Tora et al., 1989) et sur le récepteur chimérique GAL-ER (vecteur d'expression eucaryotique pG4M) (Webster et al., 1988).

2. Étude de la capacité de liaison du ligand

La liaison du ligand au récepteur répond à la loi d'action de masse :



où R représente la molécule de récepteur, L le ligand, RL le complexe, k_I la constante cinétique d'association et k_{-I} la constante cinétique de dissociation.

Lorsque le système décrit dans la relation précédente est à l'équilibre, on peut écrire :

$$\frac{[L] [R]}{[LR]} = \frac{k_{-I}}{k_I} = K_D$$

où K_D représente la constante de dissociation à l'équilibre du complexe et traduit l'affinité du ligand pour le récepteur.

Il y a plusieurs façons d'accéder à la valeur du K_D , en mesurant soit les concentrations à l'équilibre en ligand, en récepteur et en complexe, soit les vitesses d'association et de dissociation du complexe. Comme en enzymologie, la linéarisation de cette relation permet une détermination plus précise du K_D : c'est la représentation de Scatchard (Figure 90 b).

$$\frac{B}{U} = - \frac{1}{K_D} B + \frac{B_{\max}}{K_D}$$

où B (pour *bound*, radioligand lié) représente la concentration en complexe ligand-récepteur, U (pour *unbound*) représente le ligand libre et $B_{\max}$ la concentration totale en récepteur. La représentation de B/U en fonction de B est une droite de pente $-1/K_D$ pour la liaison spécifique (courbes en rouge dans la Figure 90). Si l'on considère que la préparation de récepteur contient à la fois des sites spécifiques et des sites aspécifiques (courbes bleues dans la Figure 90), la relation devient :

$$\frac{B}{U} = -\frac{1}{K_D} B + \frac{B_{\max}}{K_D} + \beta$$

où B représente la liaison totale (spécifique et non spécifique), et β la contribution des sites de fixation aspécifiques du ligand (courbes en vert dans la Figure 90). En effet, contrairement aux sites spécifiques qui sont saturables, les sites non spécifiques sont illimités et directement proportionnels à la quantité totale de ligand T, ce que l'on peut traduire par les relations :

$$B = \alpha T \quad \text{avec} \quad T = B + U$$

$$B = \alpha (B + U)$$

$$\frac{B}{U} = \frac{\alpha}{1 - \alpha} = \beta$$

où B représente la liaison non spécifique et α une constante.

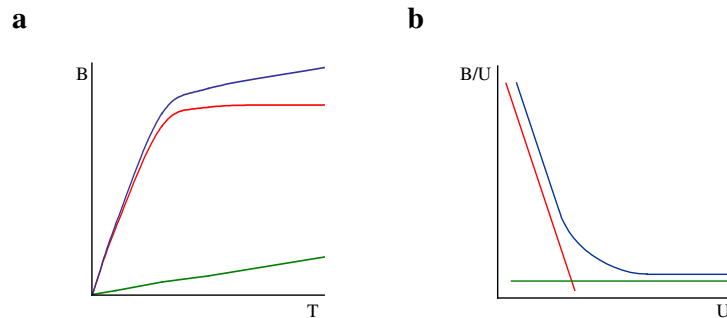


Figure 90 : Courbes de saturation d'un radioligand au niveau d'une population de récepteur.

La liaison totale est représentée en bleu, la liaison spécifique en rouge et la liaison non spécifique en vert. En **a**, le graphique représente la variation de ligand lié B en fonction de la concentration totale en ligand T, ce qui donne une courbe hyperbolique pour la liaison spécifique ne permettant pas la détermination précise du K_D . En **b**, la représentation de Scatchard.

Il existe différentes techniques pour séparer le ligand lié du ligand libre (dialyse, séparation de phase, migration différentielle, ultra-filtration, adsorption, précipitation). Nous avons utilisé la technique d'adsorption du ligand libre sur charbon-dextran.

Au cours de tests de liaison, les valeurs expérimentales déterminées sont :

- la quantité totale en ligand T,
- la quantité en ligand lié B, déterminée après le traitement au charbon actif.

Lorsque les échantillons sont incubés avec le radioligand seul, B représente la liaison totale. La liaison non spécifique peut être mesurée en incubant les échantillons avec le radioligand et un excès de ligand froid.

2.1 Étape préliminaire : Quantification du nombre de sites

La mesure de la constante de dissociation nécessite la connaissance de la concentration en récepteur de l'échantillon, pour se placer dans les conditions de la loi d'action de masse (avec $[R] < K_D$). Cette concentration est estimée par un test de saturation, dans lequel des concentrations croissantes de la préparation de récepteur sont mélangées à une concentration donnée de ligand tritié pour la mesure de la liaison totale. La mesure de la liaison non spécifique est réalisée en présence de ligand tritié et d'un excès de ligand froid. Lorsque l'équilibre est atteint, le ligand libre est séparé du ligand lié par adsorption sur charbon-dextran. La quantité de ligand lié est exprimée en fonction de la concentration en récepteur. Dans la phase croissante de la courbe, la concentration en récepteur est égale à la concentration en ligand lié, ce qui permet la quantification du récepteur. La technique est décrite en annexe.

2.2 Mesure du K_D

Pour la détermination de la constante de dissociation à l'équilibre, la préparation de récepteur (à une concentration appropriée) est mélangée à des concentrations croissantes d'œstradiol tritié (de 10^{-10} à 10^{-7} M). Trois aliquotes servent à mesurer la quantité d'œstradiol tritié au départ (T) et ne subissent pas le traitement au charbon-dextran. Trois autres aliquotes permettent la mesure de la liaison totale (B) après traitement au charbon. La radioactivité est mesurée dans ces échantillons par comptage à scintillation en milieu liquide. De ces deux

mesures est déduite la concentration en ligand libre (U , avec $U = T - B$). Les valeurs expérimentales de B/U en fonction de B sont analysées par la méthode non linéaire des moindres carrées décrite par Claire M. (Claire et al., 1978) qui permet la détermination du K_D (en nM), du nombre de sites $B_{\max}$ (en nM) et de la liaison non spécifique β (en %). Ces expériences sont reproduites deux à trois fois.

3. Étude de l'activité transcriptionnelle

L'activité transcriptionnelle des récepteurs mutants a été analysée en utilisant les récepteurs entiers (possédant les fonctions de transactivation AF-1 et AF-2), ainsi que sur les récepteurs chimériques GAL-ER (dépourvus de la fonction AF-1). Cette activité est mesurée après coexpression dans les cellules COS1 (cellules de rein de singe CV1 transfectées par l'antigène T du virus SV40) de ces récepteurs avec un gène rapporteur, la chloramphénicol-acétyl-transférase (CAT), sous le contrôle de l'élément de réponse œstrogène contenu dans le promoteur du gène de la vitellogénine A_2 de *Xenopus* et placés en amont du promoteur de la thymidine kinase du virus *Herpès simplex*, vit-tk-CAT (Klein-Hitpass et al., 1986). Quant aux récepteurs chimères GAL-ER, le gène rapporteur se trouve sous le contrôle d'un élément de réponse synthétique, un 17-mère, de GAL4 (17m-tk-CAT (Chen et Evans, 1995)).

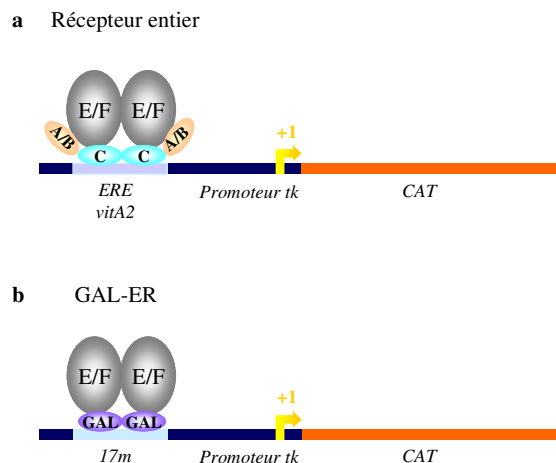


Figure 91 : Représentation schématique des tests de transactivation.

En **a**, le récepteur ER entier contrôle l'activité du gène rapporteur de la chloramphénicol-actétyl-transférase (CAT) en se fixant sur l'élément de réponse œstrogène du gène de la vitellogénine A_2 (*vitA2*) et en contactant la machinerie transcriptionnelle localisée au niveau de la région du promoteur de la thymidine kinase (*tk*). En **b**, GAL-ER interagit avec un élément de réponse synthétique de GAL4 (*17m*).

L'activité des récepteurs sauvage et mutants est stimulée par l'addition d'œstradiol dans le milieu de culture cellulaire. Des expériences de dose-réponse sont réalisées en présence de concentrations croissantes d'œstradiol (de 10^{-10} à 10^{-3} M). Les expériences de compétition sont réalisées en présence de 10^{-8} M d'œstradiol et de concentrations croissantes de raloxifène (10^{-11} à 10^{-7} M). Les taux d'expression des récepteurs sauvage et mutants dans les cellules COS sont vérifiées par détection immunologique. Les techniques de transfection cellulaire, de Western blot et de dosages enzymatiques sont décrites en annexe.

4. Dosage de la β -galactosidase

La β -galactosidase est une enzyme qui hydrolyse les β -D-galactosides et dont l'activité peut aisément être quantifiée en utilisant des substrats chromogéniques (Xgal, α -nitrophényl- β -D-galactoside ONPG).

Les cellules sont cotransfectées avec les vecteurs plasmidiques permettant l'expression du récepteur, du gène rapporteur CAT, et de la β -galactosidase (CMV- β gal). L'expression de la β galactosidase est constitutive, grâce au promoteur du virus CMV (*cytomegalovirus*). L'activité de la β -galactosidase reflète l'efficacité de la transfection cellulaire. Ce dosage permet donc de normaliser l'expression du gène rapporteur pour chaque condition expérimentale.

5. Dosage de la CAT

L'expression de la CAT est dosée par ELISA (*Roche*) selon les recommandations du fournisseur. La quantité de CAT, estimée à partir d'une gamme étalon, est normalisée par rapport à la β -galactosidase contenue dans l'extrait cellulaire. L'expression basale du gène (bruit de fond) est mesurée sur des cellules transfectées par le gène rapporteur en absence de récepteur.

L'activité transcriptionnelle des récepteurs sauvage et mutants est exprimée en pourcentage de transactivation par rapport à l'activité maximale du récepteur sauvage après soustraction du bruit de fond. Chaque mesure a été réalisée en double sur au moins trois expériences indépendantes. L'erreur donnée représente l'écart-type de la moyenne.

B. Résultats

1. Capacité de liaison du ligand par les mutants

1.1 Quantification du nombre de sites récepteurs

Nous avons réalisé des expériences de liaison du ligand sur les domaines E sauvage et mutants portant les triples mutations C381S+C417S+C530S ou E339A+E419A+K531A. Pour chaque expérience de liaison et pour chaque construction testée, nous avons quantifié le nombre de sites dans l'extrait brut fraîchement préparé. L'extrait brut est dilué d'un facteur 100 dans un lysat clarifié de bactéries non recombinantes pour atteindre une concentration en protéines d'environ 5 mg/ml (permettant de saturer les pores du charbon). Des dilutions supplémentaires sont réalisées et incubées en présence du ligand tritié à 10nM pour la détermination de la liaison totale, en présence d'un excès de ligand froid (5μM) pour la détermination de la liaison non spécifique. Le ligand libre est éliminé par adsorption sur le charbon-dextran à 4%, comme décrit dans le mode opératoire. La Figure 92 présente une expérience typique sur le triple mutant C→S. Dans ce cas, le récepteur atteint une concentration d'environ 0.2 nM avec une dilution d'un facteur 20 de la préparation. Cette même dilution sera appliquée pour la détermination de la constante de dissociation à l'équilibre.

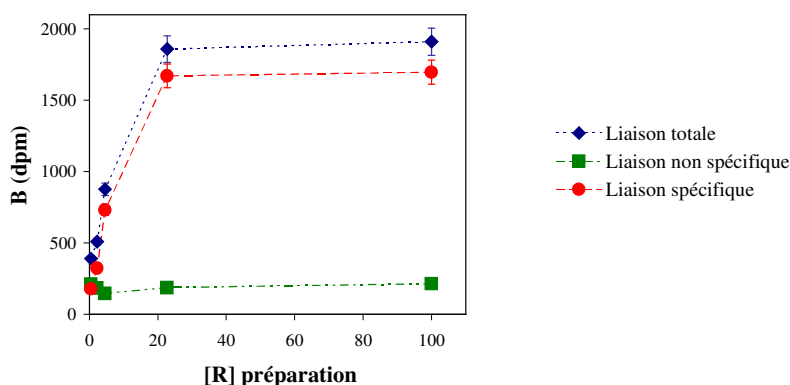


Figure 92 : Quantification du nombre de sites récepteurs pour le triple mutant C→S.

Le graphique représente la liaison du ligand B (totale en bleu, spécifique en rouge, non spécifique en vert) en désintégration par minutes, en fonction de la concentration en récepteur de la préparation.

Quelques remarques peuvent être tirées de cette expérience :

- La présence de sulfobétaïne n'empêche pas la liaison du ligand.
- La liaison non spécifique n'augmente pas en fonction de la concentration en récepteur. Ce résultat est attendu car ni la concentration en ligand, ni la concentration en protéines totales (≈ 5 mg/ml) ne varient.
- La liaison non spécifique représente moins de 10% de la liaison totale.
- La production de récepteur dans les bactéries est d'environ 12mg / litre de culture.

1.2 Les mutants lient l'œstradiol avec une forte affinité

L'œstradiol présente une affinité très forte pour son récepteur. Une grande affinité de liaison est nécessaire pour cette hormone diluée dans l'organisme pour atteindre sa cible. Nous avons comparé l'affinité du domaine E seul (0.26 ± 0.05 nM pour la forme sauvage) par rapport au récepteur entier (0.35 ± 0.05 nM (Tora et al., 1989), 0.29 ± 0.08 nM (Neff et al., 1994)). L'affinité pour le ligand n'est pas altérée par l'absence des autres domaines de la protéine.

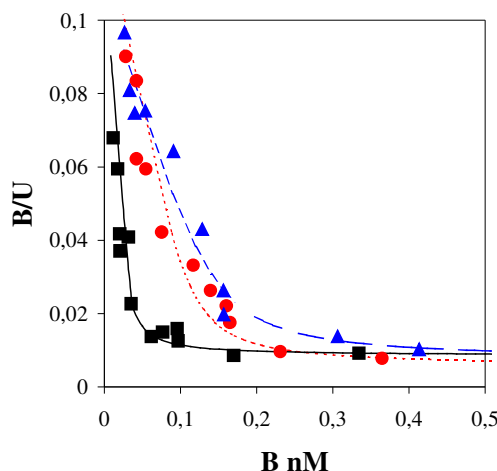


Figure 93 : Représentation de Scatchard.

Les expériences de capacité de liaison de l'œstradiol ont été réalisées sur les domaines de fixation à l'hormone de hER α sauvage (en noir) et mutants C381S+C417S+C530S (en rouge) et E339A+E419A+K531A (en bleu). Les courbes théoriques sont affinées contre les points expérimentaux par la méthode non linéaire des moindres carrés (Claire et al., 1978).

Les constantes de dissociation à l'équilibre obtenues pour les mutants sont du même ordre de grandeur que celle de la protéine sauvage. Les mutations n'altèrent pas la liaison du ligand de façon significative.

ER(302-552)	K_D (nM)	B_{max} (nM)	β
sauvage	0.26 ± 0.05	0.026 ± 0.002	0.0085 ± 0.0003
C381S+C417S+C530S	0.92 ± 0.09	0.111 ± 0.007	0.0056 ± 0.0003
E339A+E419A+K531A	1.39 ± 0.09	0.282 ± 0.001	0.0143 ± 0.0005

Tableau 21 : Résultats typiques d'analyse de Scatchard sur le domaine E sauvage et mutants.

La constante de dissociation à l'équilibre (K_D), la concentration en récepteur (B_{max}) et le taux de liaison non spécifique (β) ont été déterminés sur les domaines E sauvage et mutants en fusion au peptide polyhistidine.

2. Activité transcriptionnelle des mutants

2.1 Effet des mutations C→S sur l'activité transcriptionnelle du récepteur

Le récepteur hER α contient quatre cystéines dans le domaine de fixation à l'hormone. Parmi ces quatre résidus C381, C417, C447 et C530, seul la cystéine en position 447 est enfoui au cœur de la protéine. Les trois autres résidus sont accessibles au solvant et sensibles à des modifications chimiques telles que la carboxyméthylation (Hegy et al., 1996). Du fait de leur exposition au solvant, nous avons décidé de muter ces résidus en sérines, ce qui représente une substitution de l'atome de soufre par celui de l'oxygène. Ces mutations ont permis la production d'une protéine plus stable, toujours capable de lier l'hormone. Qu'en est-il de l'activité transcriptionnelle ?

2.1.1 Effet additif des mutations

Nous avons analysé l'effet des mutations simples, doubles et triple sur l'activité transcriptionnelle du récepteur entier. Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'un

graphique (Figure 94) et résumés dans un tableau (Tableau 22). Le graphique représente le taux de transactivation en fonction de la concentration en œstradiol. Le tableau présente le taux de transactivation (moyennes et écart-type de la moyenne sont indiqués) et la concentration en œstradiol nécessaire pour induire 50% de l'effet (concentration efficace CE_{50} en nM). Les valeurs CE_{50} sont déterminées d'après les courbes dose-réponse de la Figure 94.

Chaque mutation C→S réduit l'activité du récepteur. Les mutations simples provoquent une baisse d'environ 15% de l'activité transcriptionnelle du récepteur, les mutations doubles d'environ 40% et finalement le triple mutant ne présente plus que 44% d'activité par rapport au récepteur sauvage. La concentration efficace CE_{50} augmente légèrement avec le nombre de mutation. Il y a un effet additif des mutations C→S sur l'activité transcriptionnelle du récepteur. Les mutations diminuent la capacité de l'œstradiol à induire pleinement l'activité du récepteur. Elles transforment le caractère agoniste pur de l'œstradiol en agoniste partiel.

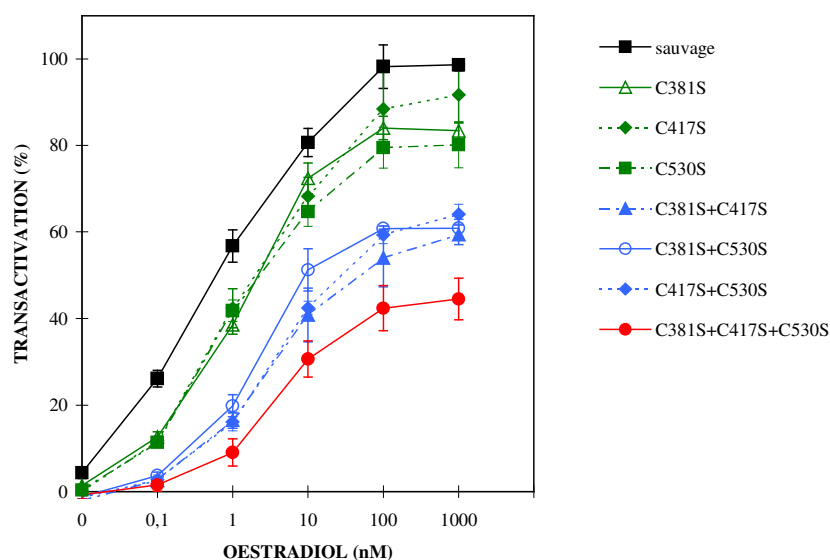


Figure 94 : Effet additif des mutations C→S.

Courbes de dose-réponse de l'activité transcriptionnelle des récepteurs mutants C→S stimulés par des concentrations croissantes en œstradiol. Chaque mutation diminue l'activité du récepteur d'environ 15%.

Récepteur entier	Taux de transactivation	CE ₅₀ (nM)
Sauvage	100 %	0.7 ± 0.1
Simple mutant	85 ± 3%	1.2 ± 0.1
Double mutant	61 ± 1%	3.1 ± 0.5
Triple mutant	44 ± 5%	4.0 ± 1.5

Tableau 22 : Récapitulatif des taux de transactivation des récepteurs portant des mutations C→S.

L'activité du récepteur sauvage est pris comme référence. La diminution du taux de transactivation est proportionnelle au nombre de mutation. La concentration en œstradiol capable d'induire 50% de l'activité (CE₅₀) est exprimée en nM. Elle augmente sensiblement avec le nombre de mutation.

2.1.2 Influence de la fonction AF1

En analysant l'effet des mutations à l'aide du récepteur entier, on ne distingue pas la part de l'activité transcriptionnelle due à la fonction constitutive AF-1 contenue dans le domaine A/B. C'est pourquoi nous avons également analysé l'effet de la triple mutation C→S en utilisant la construction GAL-ER (Webster et al., 1988; Webster et al., 1989; Brou et al., 1993). Il a été montré que le domaine de liaison à l'ADN (résidus 1 à 148) de GAL4 de levure était exprimé et fonctionnel dans les cellules de mammifères utilisées pour les tests de transactivation. Le gène rapporteur est sous le contrôle d'un élément de réponse spécifique de GAL4 et la fusion aux domaines DEF (résidus 282 à 595) de ER permet une régulation de l'activité transcriptionnelle de GAL-ER purement ligand-dépendante. Le graphique représente des courbes de dose-réponse de l'activité transcriptionnelle des récepteurs sauvage et triple mutant C→S stimulés par des concentrations croissantes en œstradiol (10^{-10} à 10^{-6} M). Le taux de transactivation atteint par GAL-ER est du même ordre de grandeur que celui du récepteur entier (environ 48% par rapport aux 44% avec le récepteur entier). AF-1 n'est pas impliquée dans l'activité transcriptionnelle du triple mutant C→S.

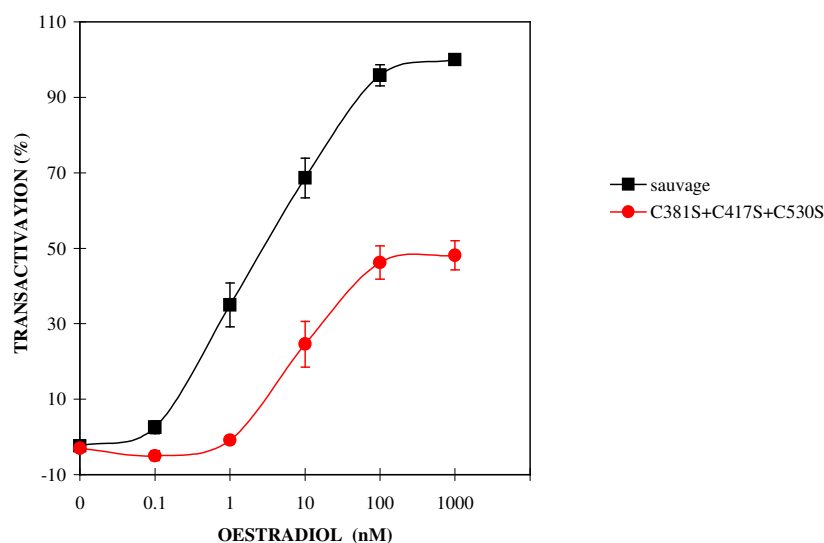


Figure 95 : Effet des mutations C→S sur l'activité transcriptionnelle de GAL-ER (DEF).

Courbes de dose-réponse de l'activité transcriptionnelle des récepteurs sauvage et triple mutant C→S stimulés par des concentrations croissantes en œstradiol.

GAL-ER	Taux de transactivation	CE ₅₀ (nM)
Sauvage	100 %	2.7 ± 0.9
Triple mutant	48 ± 4 %	9.8 ± 4.5

Tableau 23 : Taux de transactivation et CE₅₀ de GAL-ER sauvage et triple mutant C→S.

2.1.3 Test de compétition

Étant donné que les mutations C→S modifient l'activité AF2 induite par un ligand agoniste tel que l'œstradiol, qu'en est-il avec des ligands antagonistes ? Sont-ils encore capables d'inhiber l'activité du récepteur ? Pour répondre à ces questions, nous avons réalisé un test de compétition dans les cellules COS1 en utilisant les constructions GAL-ER(282-595) sauvage et triple mutant C→S. L'activité des récepteurs est stimulée par 10nM œstradiol en absence et en présence de concentrations croissantes de raloxifène (10^{-11} à 10^{-7} M). La Figure 96 présente les taux de transactivation (exprimé en pourcentage de l'activité maximale de GAL-ER sauvage) en fonction de la concentration en raloxifène. Chaque mesure a été

réalisée en triple sur deux lots de cellules. Les valeurs de CI_{50} sont déduites d'après les courbes de compétition (Figure 96), la CI_{50} étant la concentration inhibitrice en raloxifène nécessaire pour inhiber 50% de l'activité du récepteur. Ces valeurs sont présentés dans le Tableau 24 et comparé avec les valeurs précédentes de CE_{50} .

Le raloxifène inhibe efficacement l'activité transcriptionnelle de GAL-ER triple mutant. Les valeurs de CE_{50} et de CI_{50} entre le récepteur sauvage et le récepteur mutant suggèrent que les mutations C→S n'ont pas le même effet sur ces deux types de ligands : on peut noter une légère diminution dans l'efficacité de l'œstradiol et un pouvoir antagoniste sensiblement accru pour le raloxifène.

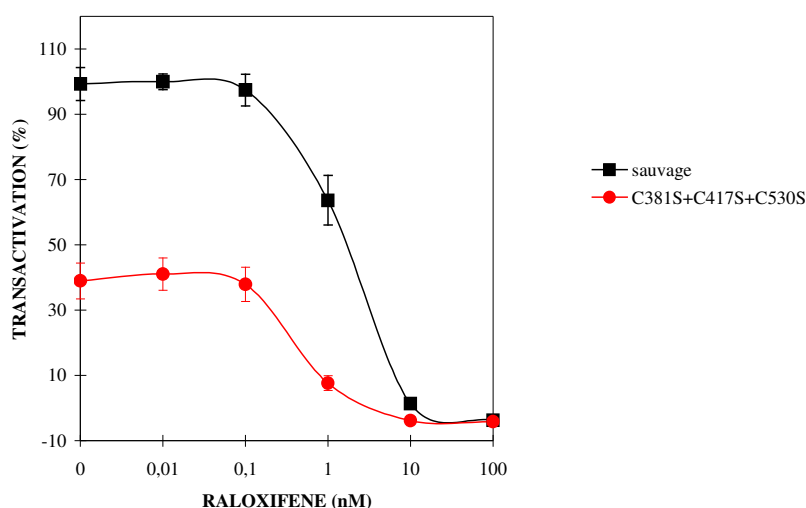


Figure 96 : Test de compétition en présence d'œstradiol 10nM.

L'activité transcriptionnelle des récepteurs sauvage et triple mutant C→S est stimulée par l'œstradiol à 10 nM et inhibée par des concentrations croissantes en raloxifène.

GAL-ER	CE ₅₀ (nM)	CI ₅₀ (nM)
Sauvage	2.7 ± 0.9	1.8 ± 0.4
C381S+C417S+C530S	9.8 ± 4.5	0.7 ± 0.1

Tableau 24 : Récapitulatif des concentrations efficaces et inhibitrices de l'activité de GAL-ER sauvage et triple mutant C→S.

2.1.4 Influence du domaine F

L'extrémité C-terminale du récepteur ne porte pas de fonction de transactivation mais joue un rôle dans la modulation de l'efficacité de certains ligands agonistes ou antagonistes (Montano et al., 1995; Nichols et al., 1998). L'exemple le plus remarquable de l'importance de F est illustré par un mutant d'inversion. La mutation L540Q provoque un phénomène d'inversion de l'activité du récepteur qui interprète des antiestrogènes comme des œstrogènes et vice-versa (Montano et al., 1996). Ce phénomène est dépendant de la présence de F : si cette région est délétée, le récepteur se comporte à nouveau normalement.

Nous avons analysé l'effet de la région F sur l'activité des récepteur sauvage et triple mutant C→S en utilisant le récepteur chimérique GAL-ER stimulée par une concentration saturante en œstradiol. Le résultat est présenté dans la Figure 97. L'activité transcriptionnelle de GAL-ER (DEF) (282-595) et GAL-ER (DE) (282-552) est stimulée par 1µM œstradiol et exprimée en pourcentage de transactivation par rapport à l'activité de GAL-ER(DEF) sauvage. La présence de la région C-terminale F diminue de 60% l'activité du récepteur sauvage mais uniquement de 10% celle du triple mutant C→S. L'effet de la région F est plus important sur le récepteur sauvage que sur le mutant. Les mutations C→S exercent leur effet d'atténuation de l'activité transcriptionnelle en absence et en présence de la région F.

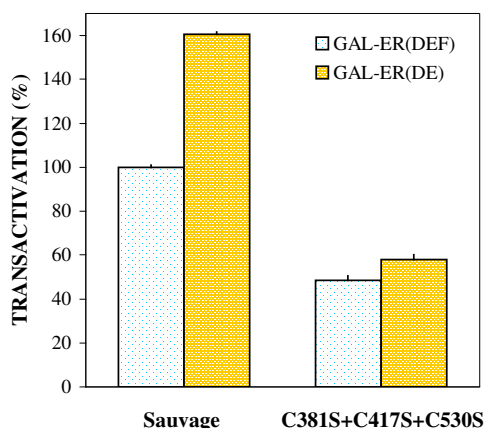
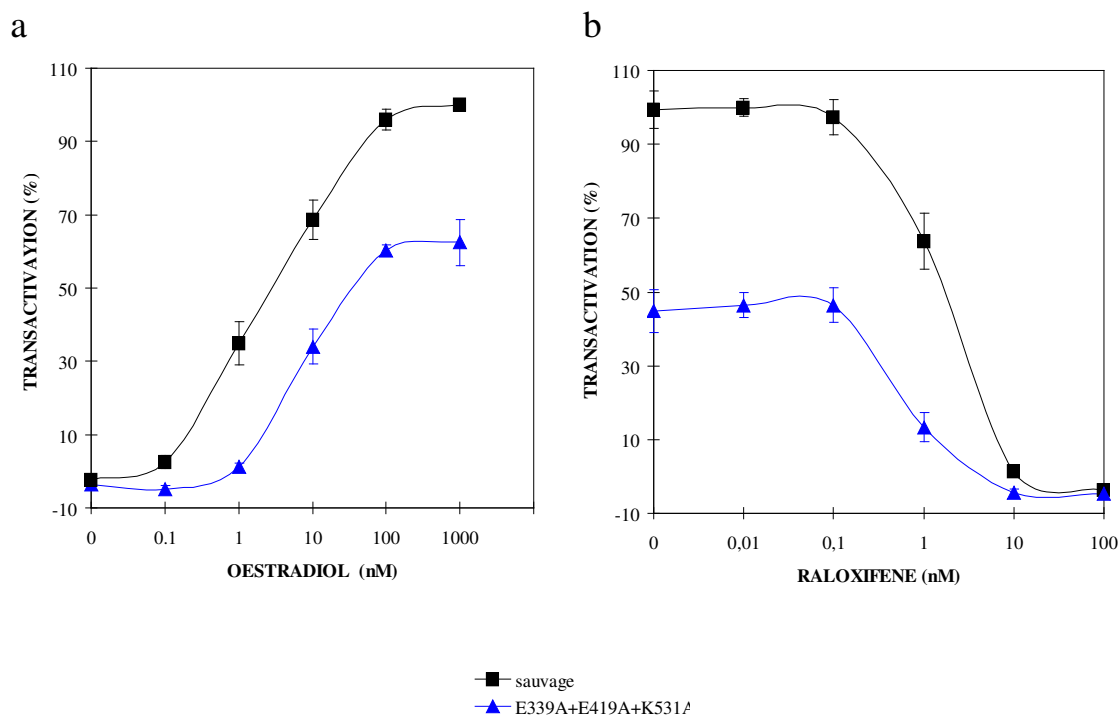


Figure 97 : Influence de la région F sur l'activité de GAL-ER sauvage et triple mutant C→S.

L'activité transcriptionnelle des récepteurs sauvage et triple mutant C→S est stimulée par l'œstradiol à 1µM. La présence du domaine F diminue l'activité de GAL-ER. Cet effet est plus important sur la forme sauvage que sur le triple mutant C→S.

2.2 Effet des mutations E339A, E419A et K531A

Alors que les mutations C→S ont été générées pour la production d'une protéine plus stable en vue de l'étude cristallographique, les mutations E339A, E419A et K531A ont été réalisées dans une toute autre optique. Les trois résidus, impliqués dans un réseau de liaisons hydrogène, ont été changées en alanine, pour étudier l'importance fonctionnelle de ces interactions.



c

GAL-ER	Transactivation	CE ₅₀ (nM)	CI ₅₀ (nM)	K _D (nM)
sauvage	100 %	2.7 ± 0.9	1.8 ± 0.4	0.26 ± 0.05
E339A+E419A+K531A	62 ± 6 %	5,4 ± 3,7	0.7 ± 0.2	1.39 ± 0.09
C381S+C417S+C530S	48 ± 4 %	9.8 ± 4.5	0.7 ± 0.1	0.92 ± 0.09
ER entier C417S+C530S	64 ± 2 %	3.7 ± 0.6	-	-

Figure 98 : Activité transcriptionnelle du triple mutant EEK→A.

En **a**, les courbes de dose-réponse de transactivation en réponse à des concentrations croissantes en œstradiol. En **b**, le graphique représente un test de compétition réalisé en stimulant l'activité transcriptionnelle de GAL-ER sauvage ou mutant par 10nM œstradiol en présence de concentrations croissantes de raloxifène (10^{-11} à 10^{-7} M). En **c**, tableau récapitulatif des résultats de transactivation et de liaison du ligand.

Le triple mutant EEK→A présente un taux de transactivation réduit (Figure 98 **a** et **c**). Même à des concentrations saturantes en œstradiol, le récepteur mutant présente une activité transcriptionnelle atténuée et du même ordre de grandeur que celle du double mutant C417S et C530S. Il semble plus sensible à l'inhibition par le raloxifène (CI_{50} légèrement inférieur au sauvage d'un facteur 3) qu'à l'activation par l'œstradiol (CE_{50} légèrement supérieur au sauvage d'un facteur 2) et se comporte ainsi comme le triple mutant C→S.

3. Bilan des essais fonctionnels

Nous avons montré que les mutations C→S et EEK→A atténuaient le taux de transactivation du récepteur et que l'accumulation des mutations C→S présentait un effet additif (non coopératif) dans cette réduction.

L'œstradiol, dont l'affinité n'est pas altérée par les mutations (K_D de l'ordre du nanomolaire), n'agit plus comme un agoniste pur, mais plutôt comme un agoniste partiel sur les récepteurs mutants. Le raloxifène demeure, quant à lui, un puissant antagoniste.

VIII. Discussion

Relations structure-fonction

A. Mécanisme de positionnement de l'hélice H12

La fonction de transactivation AF-2 a été caractérisée en détail pour de nombreux récepteurs nucléaires. Il a ainsi été montré que la région C-terminale du domaine de fixation du ligand, conservée dans la superfamille des récepteurs nucléaires, comportait une région AF2-AD, dont l'intégrité est essentielle pour l'activation de la transcription dépendante du ligand (Baretino et al., 1994; Henttu et al., 1997; Jurutka et al., 1997; Danielian et al., 1992; Durand et al., 1994). La résolution des structures cristallographiques des domaines E de différents récepteurs nucléaires a montré que cette région se présentait toujours sous la forme d'une hélice- α amphipatique, appelée H12. Différentes positions ont été décrites pour cette hélice en fonction de la présence d'un ligand et de son caractère biologique (agoniste, antagoniste) (Figure 99). Dans la structure de l'apo-RXR α (Bourguet et al., 1995), H12 est exposée au solvant. Par contre, dans la structure du complexe RAR γ lié à l'acide rétinoïque tout-trans (Renaud et al., 1995), le domaine lié à son ligand naturel et agoniste présente un repliement plus compact, dans lequel H12, repliée sur le corps du domaine, scelle la poche de fixation du ligand. Dans cette conformation dite « agoniste », des résidus de l'hélice H12, ainsi que d'autres résidus du cœur du domaine, exposés à la surface, forment un sillon hydrophobe et une pince électrostatique capable de recruter les coactivateurs (Darimont et al., 1998; Shiau et al., 1998; Nolte et al., 1998; Gampe et al., 2000). Par contre, la liaison de ligands antagonistes empêchent l'hélice H12 d'adopter cette conformation « agoniste », et induit un changement conformationnel. L'hélice H12 se retrouve alors dans le sillon hydrophobe de reconnaissance des coactivateurs (Shiau et al., 1998; Bourguet et al., 2000; Brzozowski et al., 1997), empêchant le recrutement de ces derniers, et donc l'activation transcriptionnelle médiée par la fonction AF-2.

L'étude structurale et fonctionnelle du domaine E triple mutant C $\rightarrow$ S a permis d'éclairer d'un jour nouveau le mécanisme de positionnement de l'hélice H12. En effet, les conformations agonistes et antagonistes de ER α ont été observées en présence du même ligand lié, l'œstradiol, totalement enfoui dans le cœur hydrophobe de la protéine. Les résultats structuraux et fonctionnels de ce travail suggèrent un mécanisme pour l'agonisme partiel au niveau d'AF2, qui peut être généralisé aux autres récepteurs nucléaires.

Nous avons également essayé de produire et de purifier des complexes liés à des antagonistes purs (voir III.C.1.1). La fixation de ces ligands provoquaient l'agrégation de la protéine. La comparaison des différentes structures antagonistes disponibles et celle en complexe avec le *SERM* stéroïdien ZK233702, suggère un mécanisme pour l'antagonisme « pur », par un effet déstabilisant induit par ces ligands.

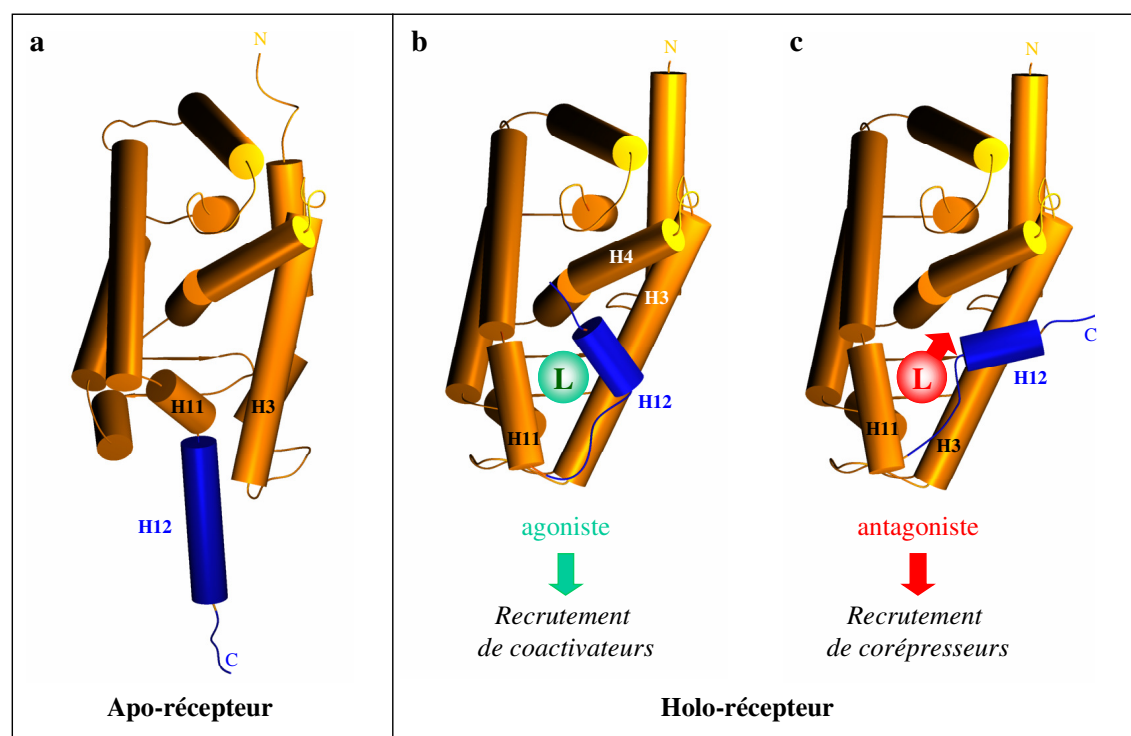


Figure 99 : Conformations du domaine de fixation du ligand : effet des ligands agonistes et antagonistes sur le positionnement de l'hélice H12.

En **a**, la structure du domaine E de RXR α (Bourguet et al., 1995), dans laquelle l'hélice H12, en bleu, présente une conformation étendue. Les résidus de H11 remplissent partiellement la poche de fixation du ligand. En **b**, une représentation de la structure de RAR γ complexé à l'acide rétinoïque tout-trans (Renaud et al., 1995). Le ligand est symbolisé par une sphère verte. H12 adopte la conformation « agoniste » permettant le recrutement des coactivateurs et l'activation transcriptionnelle. En **c**, une représentation de la structure de ER α lié au tamoxifène (Shiau et al., 1998). Le ligand antagoniste est schématisé en rouge. H12 adopte une conformation « antagoniste » empêchant la fixation des coactivateurs. De même que pour la structure apo-récepteur, il a été montré que cette conformation permettrait le recrutement des corépresseurs.

1. Effet des mutations C→S : relation structure-fonction

Les structures cristallographiques des domaines E sauvage et triple mutant C381S/C417S/C530S (C→S) ont été résolues en complexe avec l'œstradiol, un agoniste pur. Tandis que la protéine sauvage adopte la conformation agoniste canonique des récepteurs nucléaires, la structure du triple mutant C→S se superpose parfaitement à celle du complexe lié au raloxifène et au tamoxifène (Brzozowski et al., 1997, Shiau et al., 1998), exhibant une conformation antagoniste (cf. Figure 71). La comparaison des structures sauvage et mutante a montré que les mutations exerçaient un effet allostérique sur trois régions décrites ci-dessous :

- **l'interface entre H12 et le corps de la protéine** : la mutation C381S stabilise des molécules d'eau dans le sillon agoniste,

- **l'hélice H3** : la mutation C417S exerce un effet répulsif sur un réseau de contacts hydrophobes, ce qui se répercute sur l'extrémité N-terminale de l'hélice H3, raccourcie d'un tour,

- **l'hélice H11** : la mutation C530S déstabilise l'extrémité C-terminale de l'hélice H11. Le raccourcissement de l'hélice H11 et la position de la boucle L11-12 permettent à l'hélice H12 d'atteindre le site de fixation des coactivateurs, autre site favorable et probablement de basse énergie pour la liaison de H12.

Dans la structure cristallographique du triple mutant C→S, le mode de liaison de l'œstradiol est conservé par rapport au récepteur sauvage, comme le suggérait la mesure de la capacité de liaison du ligand : l'affinité est du même ordre de grandeur que celle du récepteur sauvage (de l'ordre du nanomolaire). Mais du fait de la conformation antagoniste, la poche de liaison du ligand est ouverte dans la structure tridimensionnelle du mutant. Deux canaux de solvant contactent d'un côté, un résidu de l'hélice H3, Asp 351 (impliqué dans l'ancrage des ligands *SERM*, cf. paragraphe VI.C.4) et, de l'autre, le groupement hydroxyl en position 3 du ligand.

Les tests de transactivation dans les cellules COS montrent que les mutations C→S diminuent l'activité transcriptionnelle du récepteur, sans toutefois l'abolir entièrement. À chaque fois qu'une cystéine est transformée en sérine, le taux de transactivation diminue de 15 - 20 %. La capacité transcriptionnelle d'un simple mutant est en moyenne de 85%, celle d'un double mutant, d'environ 60%, et celle du triple mutant est de l'ordre de 45% (Figure 100). L'absence de coopérativité dans l'effet des mutations suggèrent que les régions affectées sont structuralement distinctes, et que ces régions agissent sur le positionnement de l'hélice H12 de manière indépendante.

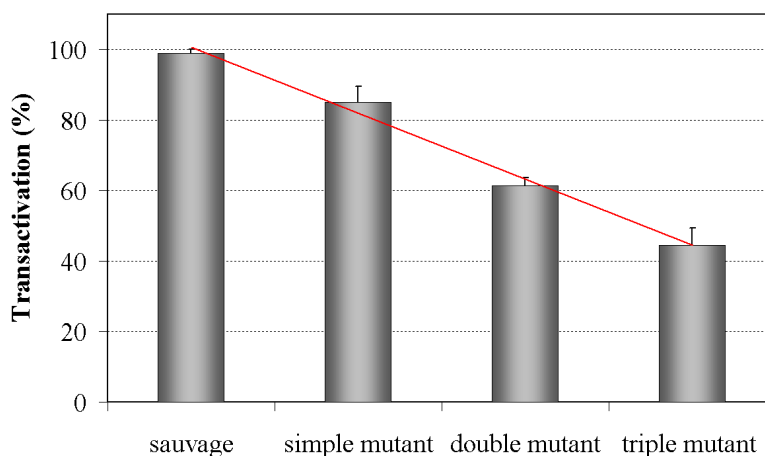


Figure 100 : Effet additif des mutations C→S sur l'activité transcriptionnelle du récepteur.

L'activité transcriptionnelle des récepteurs sauvage et mutant C→S est stimulée par 1 μ M œstradiol. Les taux de transactivation (en pourcentage par rapport à l'activité du récepteur sauvage) sont représentés en fonction du nombre de mutations C→S. Une courbe de tendance, de type régression linéaire (droite en rouge), souligne l'effet additif des mutations.

Etant donné que d'un point de vue fonctionnel, le triple mutant C→S est activé par l'œstradiol et inhibé par le raloxifène (cf. paragraphe VII.B.2.1.3), nous n'avons pas généré un mutant d'inversion qui interprète un agoniste comme un antagoniste. Les résultats structuraux et fonctionnels suggèrent un modèle dynamique, dans lequel l'hélice H12 est en équilibre entre deux positions : agoniste et antagoniste. Il est possible qu'*in vivo*, cet équilibre

soit influencé par la composition intracellulaire de coactivateurs et de corépresseurs (Smith et al., 1997; Zhang et al., 1998), en fonction de leur affinité pour le récepteur.

1.1 Un effet entropique

Les mutations C→S transforment des résidus relativement hydrophobes en résidus polaires, ce qui affecte le fonctionnement du récepteur. Par contre, il a été montré que les mutations en alanine des mêmes résidus n'avaient que peu d'effet sur la capacité transcriptionnelle du récepteur, capable d'atteindre le taux d'activité du récepteur sauvage (Reese et al., 1992). En fait, les mutations C→A ne perturbent pas les contacts apolaires ou les liaisons hydrogène. Ces résultats corroborent l'importance de l'effet entropique dans la transition structurale « agoniste → antagoniste ». La modification de la solvation à la surface de la protéine est illustrée par l'effet de la mutation C381S. La sérine stabilise des molécules de solvant qui forment un canal s'étendant au sillon agoniste de l'hélice H12. Pour atteindre cette position agoniste, l'hélice H12 devra chasser ces molécules d'eau. Ce processus est plus coûteux, en terme d'énergie, en présence de la sérine, que de la cystéine plus hydrophobe.

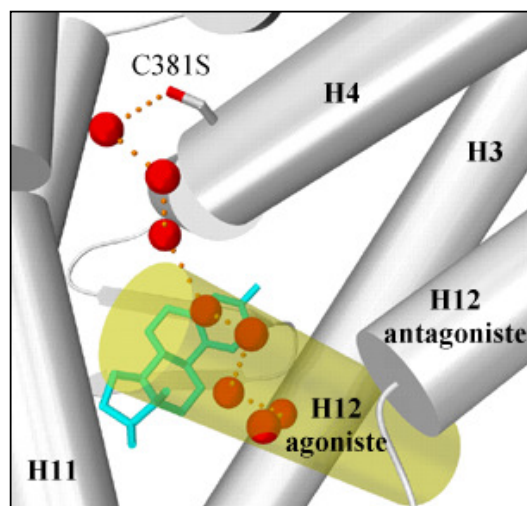


Figure 101 : Effet entropique de la mutation C381S.

La protéine mutante est représentée en gris, avec la mutation C381S sur l'hélice H4. Les molécules d'eau (sphères rouge) occupent le sillon agoniste de l'hélice H12, schématisé par un tube jaune. L'œstradiol est représenté en bleu.

1.2 Rôle des hélices H3 et H11

Nous avons montré que des régions structurellement indépendantes jouaient un rôle important dans le positionnement de l'hélice H12. Nous allons maintenant voir comment les hélices H3 et H11 interviennent dans les transitions structurales affectant le domaine de fixation du ligand dans un contexte général, puis à la lumière de nos résultats structuraux et fonctionnels, en particulier.

Les hélices H3 et H11 exercent un rôle central dans les transitions structurales affectant le domaine E des récepteurs nucléaires. La structure de ER n'est pas connue en absence de ligand, mais a été décrite pour RXR α (31% d'identité et 48% de similarité). Les structures cristallographiques ont été résolues en absence de ligand (Bourguet et al., 1995), et en présence d'acide rétinoïque 9-*cis* (Egea et al., 2000). La comparaison de ces structures montre l'importance des hélices H3 et H11 dans le changement conformationnel induit par le ligand (cf. Figure 9). Le mouvement de H3 est impliqué dans le déplacement de H11 hors de la poche, et accompagne la fixation du ligand. Les résidus des hélices H3, H6, H7 et H11 « cristallisent autour du ligand » et enfouissent le ligand dans une cavité majoritairement hydrophobe, dont l'accès est scellé par H12. Le ligand joue ainsi un rôle dans le positionnement de H12, par le biais des hélices H3 et H11.

Dans ER α , les mutations C417S et C530S perturbent des contacts hydrophobes (cf. Figure 80), ce qui se répercute sur le repliement du domaine, en provoquant le raccourcissement des hélices H3 et H11. Il est remarquable que l'instabilité conformationnelle transmise à l'hélice H12 (induite par ces mutations), implique à nouveau ces deux éléments structuraux.

En comparant les structures sauvage et triple mutante C $\rightarrow$ S, nous avons identifié un réseau de liaisons hydrogène reliant les hélices H3 et H11 (Figure 102). Ce réseau concerne les résidus Glu 339 (à l'extrémité N-terminale de H3), Glu 419 (sur la boucle entre H6 et H7), His 524 (sur H11), Lys 531 (à l'extrémité C-terminale de H11) et des molécules d'eau. Ce réseau contacte à la fois le ligand, par l'intermédiaire du résidu His 524, et les extrémités des hélices H3 et H11.

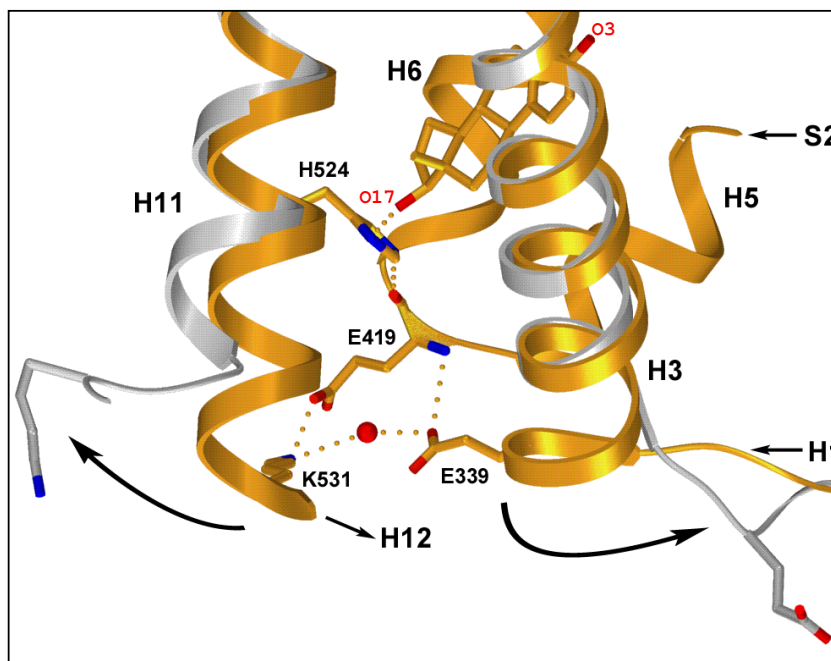


Figure 102 : De la liaison du ligand à la stabilisation de la conformation agoniste.

La superposition des structures sauvage (en orange) et triple mutante C→S (en gris) a permis de mettre en évidence un réseau de liaisons hydrogène reliant l'œstradiol aux extrémités N-terminale de l'hélice H3 (E339) et C-terminale de H11 (K531), par l'intermédiaire du résidu d'ancrage H524 (sur l'hélice H11) et E419 (situé sur la boucle entre les hélices H5 et H6). Ce réseau est détruit dans la structure du récepteur mutant C→S (effet des mutations C417S sur H3 et C530S sur H11). En mutant les résidus E339, E419 et K531 en alanines (EEK→A), le réseau est également rompu. Toutefois, dans le triple mutant EEK→A, l'ancrage de l'œstradiol demeure intact, étant donné que la liaison hydrogène entre le résidu H524 et le carboxylate du résidu en position 419, est maintenue.

Nous avons étudié l'importance fonctionnelle de ce réseau, en mutant les résidus Glu 339, Glu 419 et Lys 531 en résidus Ala (EEK→A), incapables de former des liaisons hydrogène. Le résidu His 524, n'a pas été modifié pour ne pas altérer l'ancrage polaire du ligand. Les expériences de liaison du ligand ont montré que l'œstradiol était encore capable de se lier au récepteur triple mutant EEK→A avec une forte affinité (de l'ordre du nanomolaire). L'activité transcriptionnelle du récepteur mutant est altérée de la même façon que celle du double mutant C417S et C530S (qui provoquent respectivement le raccourcissant les hélices H3 et H11). Cette similarité fonctionnelle suggère des caractéristiques structurales communes entre les mutants EEK→A et C→S.

La diminution du pouvoir transcriptionnel du triple mutant EEK→A souligne la contribution de ces résidus dans la stabilisation de la forme active du récepteur, par le biais de la formation d'un réseau de liaisons hydrogène entre les hélices H3 et H11. Il est important de noter que ce réseau contacte également l'hydroxyl O17 du ligand.

Nous avons donc pu établir un lien entre le ligand, les éléments structuraux H3, H11 et la position de H12. De même que les mutations EEK→A et C→S, les ligands *SERM* comme le tamoxifène, peuvent également déstabiliser ce réseau et agir par ce biais sur le positionnement de l'hélice H12. Le tamoxifène est dépourvu d'un groupement hydroxyl équivalent à celui en position O17 de l'œstradiol. Il est donc incapable de mettre en place ce réseau de liaisons hydrogène. Il en résulte une structure parfaitement identique à celle du triple mutant C→S, dans laquelle les hélices H3 et H11 sont raccourcies, et H12 adopte une conformation antagoniste. Dans la littérature, on ne cite que le mécanisme de la gêne stérique, pour expliquer l'effet antagoniste des *SERM*. La réalité semble plus complexe. En plus de l'interface H12-corps du domaine E que les *SERM* perturbent avec leur chaîne latérale, nous avons montré que d'autres régions pouvaient être importantes dans le positionnement de H12.

1.3 Les bases structurales de l'agonisme partiel

L'étude structurale et fonctionnelle du triple mutant C→S a permis de clarifier les bases structurales de l'agonisme partiel. Au niveau fonctionnel, l'agonisme partiel se traduit par une activité transcriptionnelle réduite par rapport à celle induite par un agoniste pur, tel l'œstradiol sur le récepteur sauvage. Grâce au triple mutant C→S lié à l'œstradiol, nous avons pu identifier les différentes origines de cette activité suboptimale du récepteur (effet entropique, rupture de contacts polaires et apolaires).

Récemment, trois structures cristallographiques de complexes liés à des agonistes partiels ont été résolues :

- le complexe avec ERβ lié à la génistéine, une molécule de la famille des phyto-œstrogènes isoflavonoïdes, se trouvant en quantités importantes dans le soja (Pike et al., 1999),

- la structure du mutant RXR α F318A lié à l'acide oléique (un acide gras ubiquitaire contenant 18 atomes de carbone), dans laquelle la mutation a changé la spécificité de ligand et a permis la fixation d'un ligand atypique de faible affinité (Bourguet et al., 2000),
- le complexe PPAR γ lié au ligand synthétique GW0072 (Oberfield et al., 1999).

Ces structures, ainsi que la structure du triple mutant C $\rightarrow$ S lié à l'œstradiol, corroborent l'existence d'un équilibre dans le positionnement de l'hélice H12 (Figure 103). D'une part, tous ces ligands sont capables d'induire une certaine activité transcriptionnelle, quoique réduite par rapport à des agonistes purs. D'autre part, dans ces structures, l'hélice H12 adopte soit une conformation agoniste (Oberfield et al., 1999), soit des conformations « non agonistes » (Bourguet et al., 2000; Pike et al., 1999). Plusieurs positions antagonistes de l'hélice H12 ont été décrites (Pike et al., 1999), suggérant que celles-ci ne sont pas uniques, contrairement à la position agoniste (Klaholz et al., 1998). En présence des ligands agonistes partiels (ou des mutations C $\rightarrow$ S et EEK $\rightarrow$ A), le positionnement de H12 ne serait donc pas stabilisé, ce qui se traduit par une oscillation entre différentes positions plus ou moins favorables. Les agonistes partiels présentent quelques unes des caractéristiques d'un agoniste pur, notamment l'absence de gêne stérique sur le positionnement de l'hélice H12, sans pour autant avoir tous les effets requis pour stabiliser la conformation agoniste (Figure 104). En déstabilisant les hélices H3 et surtout H11 par rupture de contacts polaires ou apolaires, les ligands mixtes présentent des caractéristiques communes avec les antagonistes et sont capables d'induire une position antagoniste de l'hélice H12 (Figure 103 **b** et **d**).

Si l'hélice H12 n'est pas stabilisée, comment sont recrutés les corégulateurs qui reconnaissent des régions spécifiques à la surface du domaine ? Cette question est délicate, en particulier pour la reconnaissance de la surface AF-2 par les coactivateurs, étant donné que l'hélice H12 en position agoniste en fait partie intégrante. En absence de gêne stérique sur le positionnement de l'hélice H12, la présence de coactivateurs pourrait contribuer à pousser l'équilibre vers une conformation active du récepteur et la stabiliser par un jeu d'interactions, comme nous l'avons déjà suggéré plus haut (Smith et al., 1997; Zhang et al., 1998).

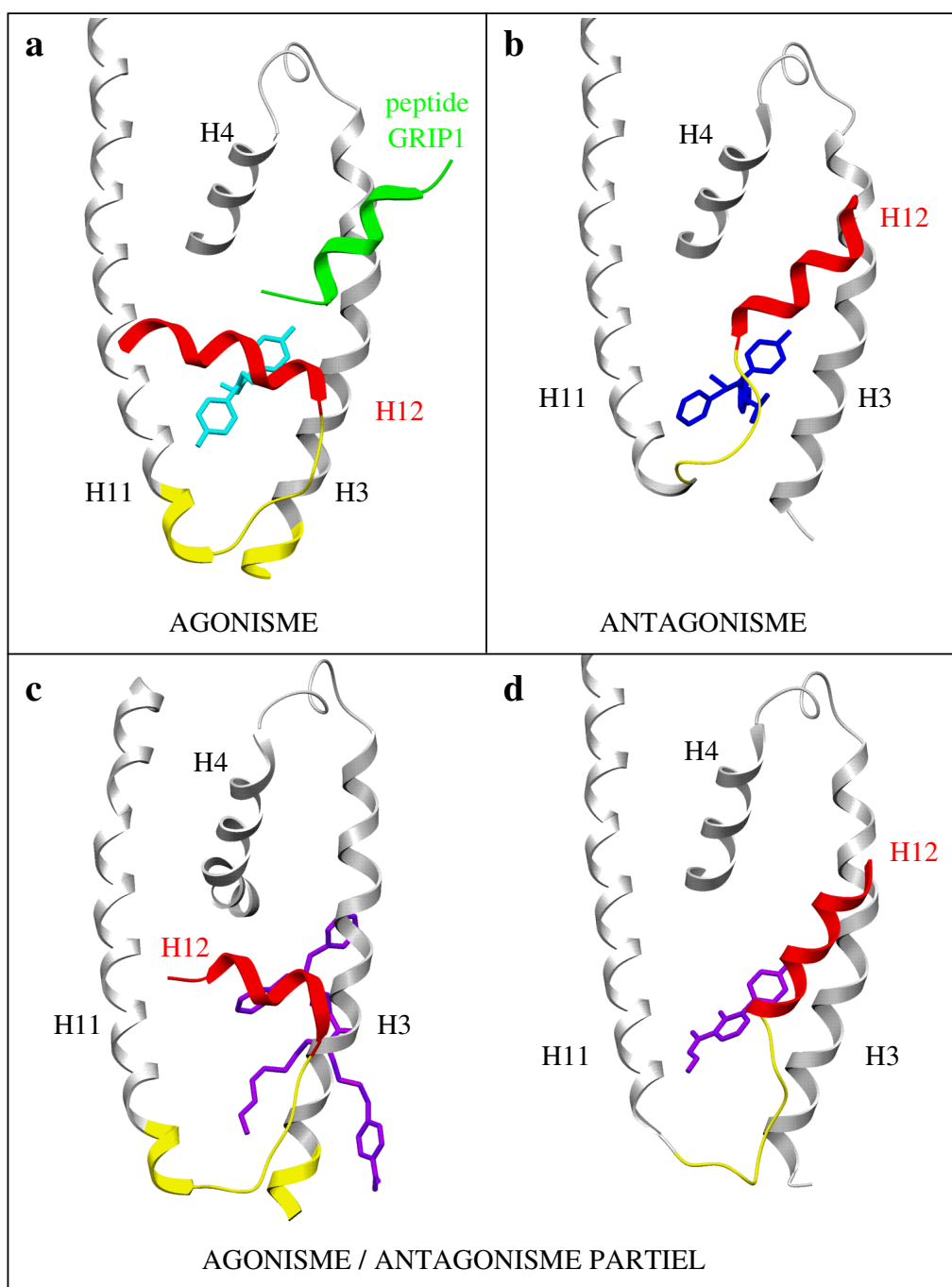


Figure 103 : Changements conformationnels induits par les ligands purs et les agonistes partiels.

En **a**, le complexe ternaire ER α /DES/GRIP1. En **b**, le complexe ER α /Tamoxifène (Shiau et al., 1998). En **c**, le complexe PPAR γ /GW0072 (Oberfield et al., 1999). En **d**, le complexe ER β /Génistéine (Pike et al., 1999). Comparez les positions des hélices H12 (en rouge) et la longueur des hélices H3 et H11 (supplément en jaune). Les complexes liés à des ligands mixtes (**c**, **d**) partagent des caractéristiques communes avec les complexes liés à des ligands purs (**a**, **b**).

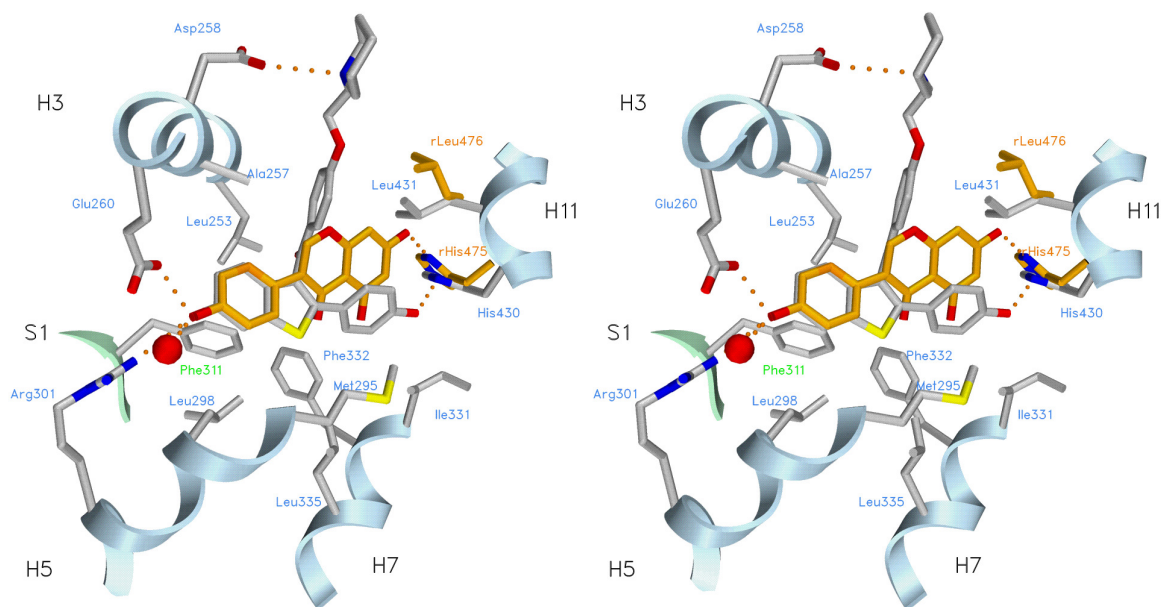


Figure 104 : La génistéine et le raloxifène dans la poche de fixation du ligand de ER β .

Vue stéréo. Contrairement au raloxifène RAL (en gris), la génistéine GEN (en orange) est totalement enfouie dans la poche de fixation du ligand de rER β . La génistéine n'induit donc pas de gêne stérique sur le positionnement de l'hélice H12. Son ancrage polaire par les résidus de H3, H5 et H11 est également conservé. Mais la présence de ses groupements polaires en positions 4, 6 et 9, faisant face à des résidus apolaires de la poche (tels les résidus Met 295 et Phe 332 de hER β), diminue l'efficacité de ce ligand dans la stabilisation de la conformation agoniste de l'hélice H12. La superposition des complexes rER β -GEN et hER β -RAL montre que seules certaines chaînes latérales de résidus de la poche (tels Leu476 et His475 de rER β correspondant respectivement à Leu431 et His 430 de hER β) sont altérées par la liaison de la génistéine. Leur mouvement accomode le déplacement du ligand dû à l'effet répulsif de la poche hydrophobe.

En résumé, le positionnement de l'hélice H12 est régi par différentes régions que les mutations C $\rightarrow$ S et EEK $\rightarrow$ A ou les ligands affectent de différentes manières (Tableau 25) :

- l'interface H12-corps du domaine,
- l'hélice H3 (et L1-3, la boucle qui la précède),
- le réseau de liaisons hydrogène entre H3 et H11 (médié par le résidu Glu 419 de l'hélice H6),
- l'hélice H11 (et L11-12, la boucle qui la suit),
- et enfin, la poche de fixation du ligand.

Complexes	Ligand	L1-3 et H3	H6 et L6-7	H11 et L11-12	H12	Poche
Sauvage + E2	Agoniste pur				agoniste	fermée
hER α^* + E2	Agoniste pur	L1-3 invisible		L11-12 invisible	agoniste	fermée
hER α^* + DES	Agoniste pur				agoniste	fermée
3C-S + E2	Agoniste pur	L1-3 s'écarte (6 Å) H3 raccourcie	Liaisons H déstabilisées	H11 raccourcie L11-12 bien définie	antagoniste pas de gêne stérique	ouverte
3C-S + ZK	SEEM	L1-3 s'écarter (6 Å) H3 raccourcie (effet C-S)	Liaisons H déstabilisées	H11 raccourcie L11-12 mal définie	antagoniste stabilisé par contact avec ZK	ouverte
hER α^* + RAL	SEEM	id au sauvge + E2	Liaisons H déstabilisées	H11 raccourcie L11-12 non visible	antagoniste	ouverte
hER α^* + TAM	SEEM	L1-3 s'écarter (5 Å) H3 raccourcie	Liaisons H déstabilisées L6-7 déplacée (4 Å)	H11 raccourcie	antagoniste	ouverte
hER β^* + GEN	Phyto-estrogène	L1-3 invisible Nter de H3 invisible	Même tracé que hER β^* + RAL	H11 raccourcie	antagoniste alternative	Répulsion du ligand polaire/poche apolaire
hER β^* + RAL	SEEM	L1-3 s'écarter (3-4 Å) H3 raccourcie		Nter de H11 invisible	antagoniste	ouverte

Tableau 25 : Comparaison des structures cristallographiques ER α et ER β .

Toutes les structures sont comparées à celle de ER α sauvage lié à l'œstradiol (E2). Les notations ER α^* et ER β^* se réfèrent aux protéines carboxyméthylées. Les quatre zones affectant le positionnement de l'hélice H12 sont indiquées en couleur.

2. Etude structurale d'un complexe lié à un antagoniste stéroïdien

Nous avons déterminé la structure d'un complexe entre le domaine de fixation du ligand de hER α portant la triple mutation C381S/C417S/C530S (C $\rightarrow$ S) et un antagoniste stéroïdien ZK233702 (ZK), que nous avons réussi à cristalliser après avoir criblé différents ligands synthétisés par le laboratoire de recherche pharmaceutique Schering AG (Berlin). Ce ligand est un dérivé stéroïdien portant deux substitutions : un groupement fluoré en position 11 β et une longue chaîne alkylamide en position 7 α (Figure 105). Ce ligand se comporte comme le tamoxifène et le raloxifène, ce n'est pas un antagoniste pur, comme le sont les autres dérivés stéroïdiens ICI 182,780 et ICI 164,384. Il présente des activités agonistes ou antagonistes en fonction du contexte cellulaire et du promoteur, il s'agit donc d'un ligand *SERM*.

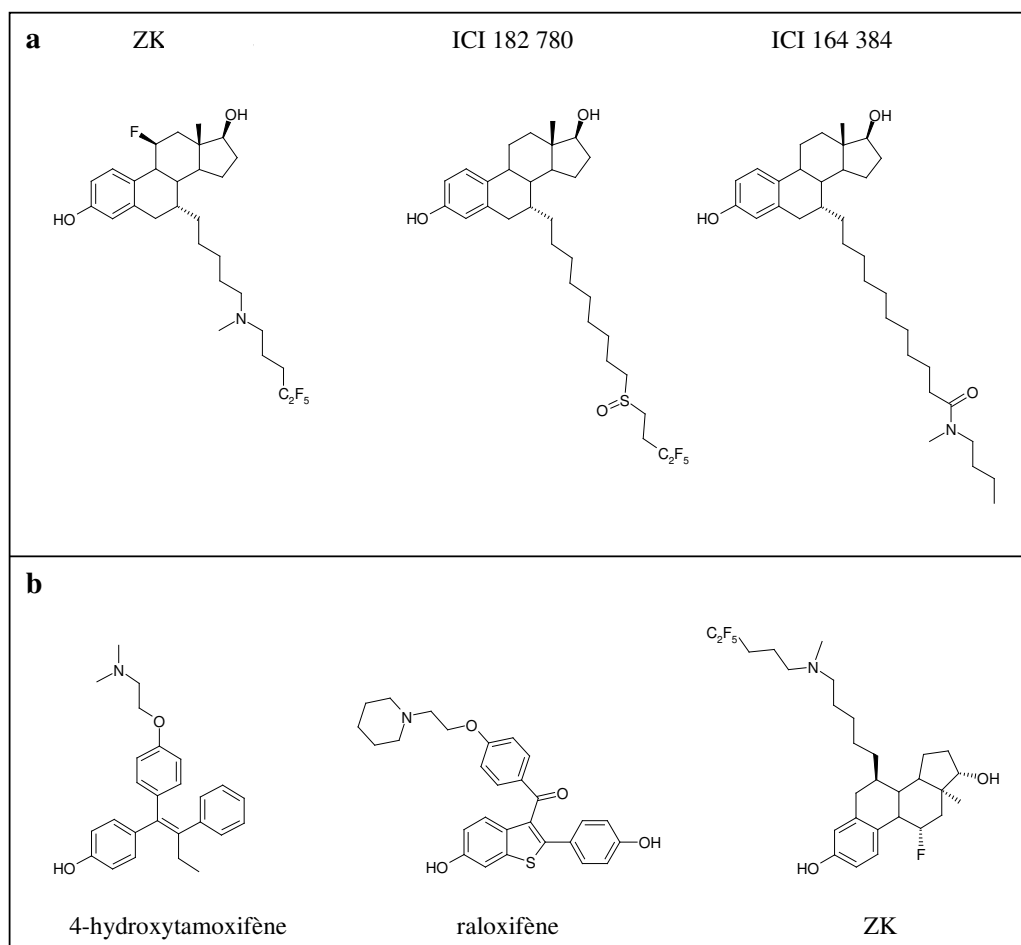


Figure 105 : Formules chimiques des ligands stéroïdiens et non stéroïdiens.

En **a** sont présentés le ZK, un ligand *SERM*, ainsi que deux antagonistes stéroïdiens purs, ICI, 182 780 et ICI 164 384. Ces ligands portent tous les trois de longues chaînes latérales en position 7 α . En **b**, les ligands *SERM*. Le ZK est représenté dans une orientation, qui souligne les points communs entre ligands *SERM*.

2.1 Mode de liaison du ligand

La structure cristallographique du complexe ER α lié au ZK233702 (ZK) a révélé le mode de liaison surprenant de ce ligand stéroïdien (cf. chapitre VI.C). Le ligand conserve ses points d'ancrage polaire dans la poche de fixation du ligand, à savoir :

- le groupement hydroxyl O3 forme des liaisons hydrogène avec les résidus Glu 353 de H3 et Arg 394 de H5 et une molécule d'eau structuralement conservée,
- le groupement hydroxyl O17 est ancré par une liaison hydrogène avec le résidu His 524 de H11.

Par contre, il subit un « retournement » par rapport à l'œstradiol (Figure 86) pour accommoder le groupement substituant en position 7 α , qui peut ainsi s'échapper de la poche, comme le font les *SERM*. Ce résultat suggère qu'il n'y a qu'une seule issue par laquelle la chaîne latérale puisse s'échapper du cœur de la protéine, sans démolir entièrement son repliement. Le « retournement » du ligand implique le réarrangement de quelques chaînes latérales des résidus tapissant la cavité (résidus apolaires de H3, H7, H11 et H12). Les contacts van der Waals sont ainsi optimisés et renforcés par la présence de groupement fluorés très hydrophobes (que ce soit en 11 β ou à l'extrémité de l'appendice en 7 β). Ces données révèlent la plasticité de la poche, s'adaptant à la rigidité du corps stéroïdien du ZK233702.

2.2 Gêne stérique sur la position agoniste et stabilisation de la position antagoniste de l'hélice H12

La chaîne latérale du ZK233702 (ZK) sort de la poche de fixation du ligand entre les hélices H3 et H12 (Figure 83), empêchant la conformation agoniste de H12 par gêne stérique (Figure 106). Le ZK possède des caractéristiques communes avec les autres *SERM*, tels que le tamoxifène et le raloxifène. Sa chaîne latérale pointe dans la même direction et elle est ancrée par le même résidu de l'hélice H3, Asp 351, qui joue un rôle important, non seulement dans l'ancrage polaire des *SERM*, mais également dans le positionnement de H12 (Figure 89). La Figure 105 **b** montre que les trois ligands portent des groupements amines structuralement équivalents, contrairement aux antagonistes purs, présentés dans la Figure 105 **a**. Ces derniers portent des groupements polaires trop éloignés de leur corps stéroïdien pour que ceux-ci

soient maintenus par une interaction avec l'Asp 351. D'autres points d'ancrage à la surface du domaine ne sont pas connus.

La Figure 106 suggère une gêne stérique croissante pour la position agoniste de H12 et un gain de stabilité par contact van der Waals de la position antagoniste, dans le sens : tamoxifène < raloxifène < ZK233702. Mais l'importance de ce phénomène reste encore mal compris et nous ne disposons pas de suffisamment de données biologiques sur le ZK233702.

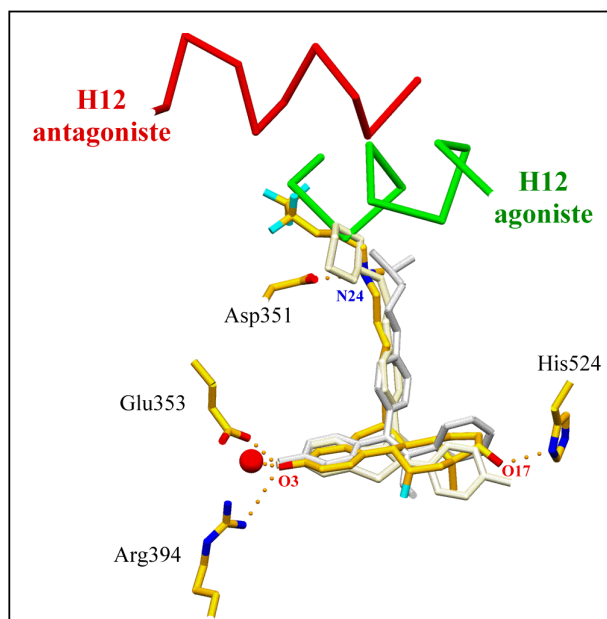


Figure 106 : Mode de fixation et effets des ligands SERM.

Le ZK233702 est représenté en jaune, le raloxifène en écru et le tamoxifène en gris. Tous les trois sont ancrés de la même manière et leur chaîne latérale interfère avec la position agoniste de l'hélice H12.

2.3 La question de l'ancrage et de l'antagonisme pur

Les ligands *SERM* (tamoxifène, raloxifène et ZK233702) forment tous les trois une liaison hydrogène avec le résidu Asp 351. Leur chaîne latérale est ainsi maintenue en place. Malgré le changement conformationnel produit par la fixation de ces ligands, le résidu Asp 351 maintient un certain « ordre » en ancrant leur chaîne latérale. Il a été montré récemment que la mutation de ce résidu en glycine, transformait les *SERM* en antagoniste pur (MacGregor et al., 2000). L'effet induit par l'élimination de la charge négative peut conduire

à un « désordre ». Cette hypothèse semble également s'appliquer aux antagonistes purs, dont le mode d'ancrage de la chaîne latérale, s'il existe, n'a pas encore été élucidé.

Il est possible que le « désordre » soit le seul mécanisme possible pour inhiber complètement un récepteur nucléaire, engendrant l'inhibition de la dimérisation, de la liaison à l'ADN, voire de l'import nucléaire et enfin la dégradation totale par la voie de l'ubiquitination (Dauvois et al., 1993; Devin-Leclerc et al., 1998; Mahfoudi et al., 1995; van de Velde et al., 1994).

Dans un système « ordonné », par contre, le récepteur en complexe avec le *SERM* se fixe à l'ADN sous forme dimérique et régule la transcription en interagissant avec des corégulateurs. Il interfère ou synergise avec d'autres voies de signalisation, tel AP1 et Sp1 (voir I.B.4). Il s'agit d'un complexe fonctionnel répresseur, activateur ou de corégulation, en fonction du contexte cellulaire et du promoteur, probablement par le biais d'AF-1 ou d'autres régions du récepteur.

Cette théorie présente des limites. En effet, une autre mutation D351Y, isolée à partir d'une tumeur du sein (Wolf et Jordan, 1994), convertit les *SERM* en agonistes (Anghel et al., 2000; Levenson et Jordan, 1998), ce qui est difficilement interprétable en analysant les données cristallographiques du domaine de fixation du ligand.

Quoique les notions d'« ordre » et de « désordre » soient assez séduisantes, nous ne disposons pas de toutes les données. Il ne faut pas oublier que nous avons uniquement travaillé sur le domaine de liaison du ligand et non sur le récepteur entier.

B. Apport des données cristallographiques dans la conception de médicaments

L'importance des œstrogènes au niveau médical (traitement de la fertilité, de la ménopause, du cancer du sein, de l'ostéoporose, voire la prévention de la maladie d'Alzheimer) justifie l'investigation en détail du mode de fixation des ligands naturels et synthétiques. C'est ainsi que nous nous sommes lancés dans l'étude structurale du domaine de fixation de l'hormone de $ER\alpha$, en collaboration avec le laboratoire de recherche pharmaceutique Schering AG (Berlin). La conception de médicaments se fait en général par un criblage à haut débit de ligands contenus dans des bibliothèques chimiques ou synthétisés par chimie combinatoire. Cette approche permet d'identifier des « têtes de série ». Celles-ci sont alors affinées pour augmenter leur affinité ou leur sélectivité. Une approche beaucoup plus récente, et à laquelle nous participons, est la conception rationalisée de ligands. La détermination de la structure tridimensionnelle à l'échelle atomique par cristallographie aux rayons X permet de visualiser avec la plus grande précision possible les interactions protéine-ligand. La poche du ligand peut également être utilisée comme une enveloppe, soit pour y positionner des ligands connus, soit pour y concevoir de nouveaux ligands.

1. La connaissance de la poche de fixation du ligand

La poche de fixation du ligand de $ER\alpha$ tolère la présence de substituants inhabituels par rapport à son ligand naturel, l'œstradiol- 17β , car elle est beaucoup plus grande que le ligand ($450 \text{ \AA}^3$, par rapport au volume de l'œstradiol : $245 \text{ \AA}^3$) (Figure 107). On observe des volumes inoccupés en deux endroits de la cavité :

- à proximité du carbone C11, délimité par les résidus des hélices H3 et H5. Cette région de la cavité est appelée la face β , en référence au groupement 17β de l'œstradiol qui pointe dans cette direction.
- à proximité du carbone C7, délimité par les résidus des hélices H3 et H7, et du feuillet- β . C'est la face α de la cavité.

Ces espaces laissés vacants au niveau de la poche ouvrent des perspectives intéressantes pour la conception rationalisée de ligand. En effet, la poche peut aisément accommoder des ligands portant des groupements stériquement plus encombrants, gain potentiel d'affinité et de sélectivité (Figure 108).

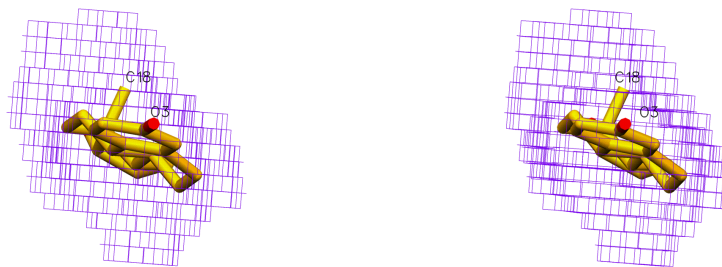
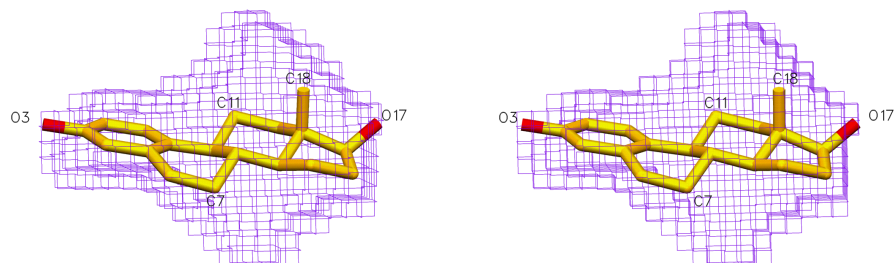
a**b**

Figure 107 : Volumes inoccupés dans la poche de fixation du ligand.

Représentation en stéréo de la poche de fixation du ligand de ER α lié à l'œstradiol E2. En violet est représentée la surface *accessible* de la poche du ligand, telle qu'elle a été calculée par Voidoo (Kleywegt et Jones, 1994). Des espaces restent inoccupés en présence de ce ligand : du côté β , à proximité de l'atome C11, et du côté α , à proximité de l'atome C7.

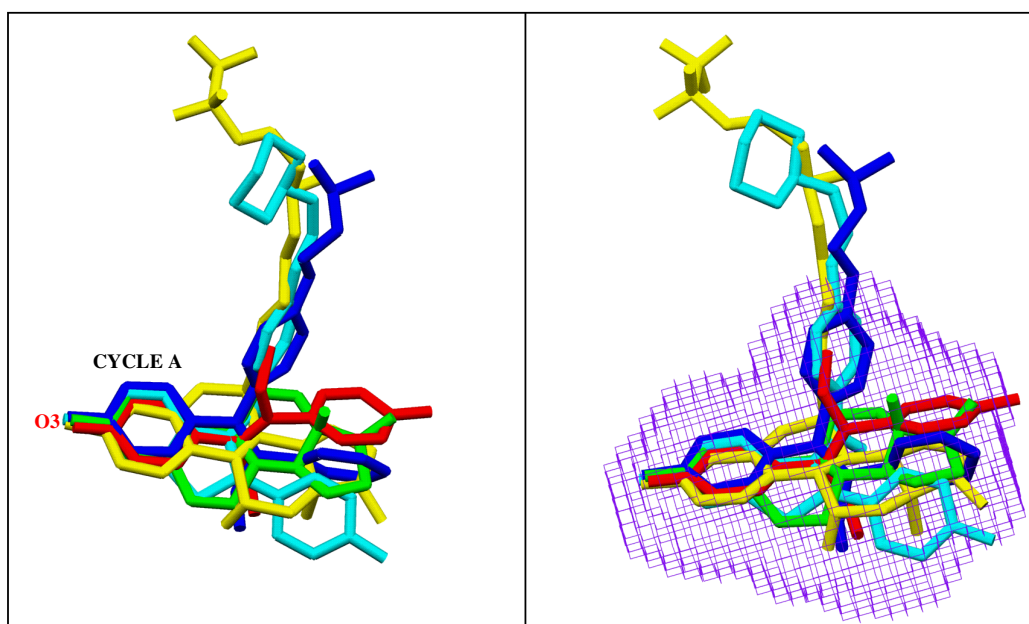


Figure 108 : La poche de fixation du ligand peut accommoder des ligands chimiquement très différents.

◀ Représentation de la poche de fixation du ligand de ER α lié à différents ligands dont les structures cristallographiques ont été résolues : œstradiol E2 (en vert), diéthylstilbestrol DES (rouge), 4-hydroxytamoxigène TAM (bleu), raloxifène RAL (cyan) et ZK233702 (jaune). En violet est représentée la surface *occupée*, telle qu'elle a été calculée par Voidoo pour le complexe ER α sauvage lié à l'œstradiol (Kleywegt et Jones, 1994). Cette surface est analogue à la surface de Connolly (Connolly, 1993).

Dans la Figure 108, le critère fondamental pour la liaison au récepteur ER α apparaît clairement : le cycle phénolique A présente une orientation strictement conservée, en superposant les protéines des différents complexes, dont la structure cristallographique a été résolue. Les ligands qui ne présentent pas cette caractéristique, ont une faible affinité pour ER. Par contre, il y a apparemment moins de contraintes sur les cycles B, C et D ou groupements équivalents, qui s'éloignent de part et d'autre de ceux de l'œstradiol, et occupent différents volumes de la poche, sans que cela n'affecte leur affinité (Tong et al., 1997).

2. L'effet du ligand sur la position de l'hélice H12

Cette étude des relations structure-fonction a permis de mettre en évidence différentes régions importantes dans le positionnement de l'hélice de transactivation H12 (l'interface H12-corps de la protéine, les hélices H3/H11, les réseaux polaires et apolaires, la poche) et de suggérer un mode d'action pour les ligands mixtes et les antagonistes purs. Il est possible de prédire avec une certaine précision, l'action d'un ligand en fonction de sa structure chimique. Ces informations peuvent contribuer au développement de ligands selon la demande : des ligands *SERM* tissu-spécifiques pour une affection locale, ou des antagonistes purs, pour éradiquer un mal résistant à un traitement classique.

3. Des ligands spécifiques des isotypes

Les deux isotypes ER α et ER β joueraient des rôles très différents dans la signalisation œstrogène (Pennisi, 1997). Des ligands capables de moduler sélectivement l'un ou l'autre type de récepteur permettraient, dans un premier temps, d'étudier l'importance physiologique de chacun, et dans un deuxième temps, de répondre à des applications médicales distinctes. Là encore, la connaissance des structures cristallographiques des deux isotypes (et en particulier de leur poche) devrait accélérer la conception de ligands isotype-spécifiques, comme dans le cas des récepteurs de l'acide rétinoïque RAR α , β et γ (Klaholz et al., 2000a).

C. Activité transcriptionnelle et signalisation rédox : le rôle des cystéines

L'étude structurale du domaine de fixation du ligand sauvage de ER α a été délicate, du fait de la sensibilité à l'oxydation des cystéines à la surface de la protéine. Ce récepteur possède en tout 13 cystéines, dont 9 sont localisées dans le domaine de liaison à l'ADN et 4 dans le domaine de fixation du ligand (voir annexe X.A). Parmi ces dernières, une seule est totalement enfouie au cœur de la protéine, Cys 447 sur l'hélice H8, et c'est d'ailleurs la seule qui soit conservée chez la plupart des récepteurs stéroïdiens et chez RXR. Nous avons décidé de muter les trois autres cystéines en sérines, du fait de leur exposition au solvant, afin de contourner ce problème d'oxydation. Ces mutations ont affecté le repliement et donc le fonctionnement du récepteur.

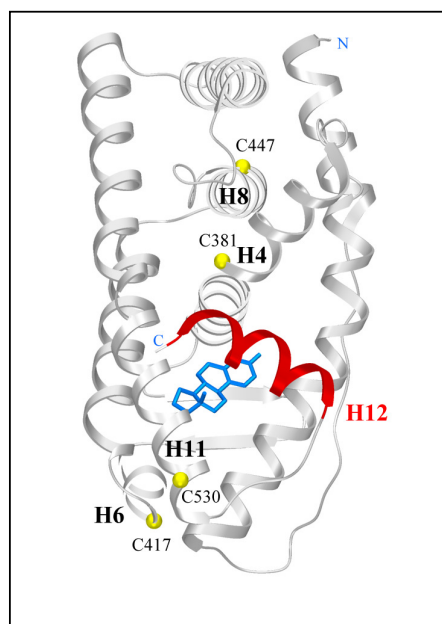


Figure 109 : Localisation des quatre cystéines au niveau du domaine E de hER α .

Un grand nombre de facteurs de transcription sont régulés par le stress oxydatif (Adler et al., 1999). Ces protéines possèdent des cystéines réactives, dont l'état d'oxydo-réduction est capable de moduler leur activité (Galigniana et al., 1999). L'état oxydé de ces résidus est, en générale, réversible sous l'action de protéines oxydo-réductases, telles que la thiorédoxine TRX ou la glutathion-S-transférase GST.

De nombreuses pistes ont été suivies pour élucider le ou les mécanismes impliqués dans la régulation rédox des récepteurs nucléaires et des facteurs de transcription. La présence de cystéines, cibles potentielles de cette régulation, dans de nombreux domaines fonctionnels complique l'analyse. Le plus souvent, une régulation indirecte de l'activité transcriptionnelle a été décrite. Quelques exemples sont donnés ci-dessous :

- il a été suggéré que les conditions oxydantes empêchaient la « transformation » des récepteurs stéroïdiens GR et AR, inhibant ainsi leur activité transcriptionnelle de façon indirecte, en empêchant la dissociation de la protéine de choc thermique HSP90 (Blicq et al., 1988; Elez et al., 2000; Tienrungroj et al., 1987; Wilson et al., 1986)

- Okamoto a montré que l'oxydation d'une cystéine du domaine charnière D inhibait l'import nucléaire de GR, en affectant le signal de translocation nucléaire (NL1). La localisation cellulaire de GR a été suivie par la fusion du récepteur à la GFP (*green fluorescent protein*) (Okamoto et al., 1999).

- la capacité de liaison à l'ADN de nombreux récepteurs nucléaires et facteurs de transcription serait inhibée par le stress oxydatif. C'est le cas de GR (Makino et al., 1996a; Makino et al., 1996b; Makino et al., 1999), ER (Hayashi et al., 1997), et pour les facteurs de transcription tels NF- κ B (Schenk et al., 1994; Hayashi et al., 1993), et Sp-1 (Wu et al., 1996). Le domaine de liaison à l'ADN contient, en effet, de nombreuses cystéines, qui ne sont pas toutes impliquées dans des liaisons de coordination avec le zinc (liaisons qui devraient les protéger de l'attaque rédox, dans une certaine mesure).

- la capacité de liaison du ligand de certains récepteurs stéroïdiens seraient compromises par le stress oxydatif. Il semblerait que les cystéines, directement impliquées dans la liaison du ligand de MR et de GR, soient réactives, lorsque les récepteurs ne sont pas ligandés (Galigniana et al., 1999; Lupo et al., 1998; Piwien-Pilipuk et Galigniana, 2000; Souque et al., 1996).

De rares exemples de régulation directe de l'activité transcriptionnelle par la signalisation rédox ont été décrit jusqu'à présent. Il y a le cas du facteur de transcription NFI/CTF (*nuclear factor I/CCAAT transcription factor*) (Morel et Barouki, 2000), qui peut réguler l'initiation de la transcription de gènes, tels que le collagène, l'albumine, la

vitellogénine ou le cytochrome P450 A1 (Morel et Barouki, 1998), en fonction du potentiel rédox cellulaire. Ce facteur a d'abord été impliqué dans la transcription et la réplication de l'ADN viral (Santoro et al., 1988). L'activité de NFI est modulée par différents facteurs, tels un traitement à l'eau oxygénée H_2O_2 ou une déplétion en glutathion (Morel et Barouki, 1998). Dans un premier temps, lors d'expériences *in vitro*, les cystéines du domaine de liaison à l'ADN avaient été identifiées comme cible potentielle de cette régulation (Bandyopadhyay et Gronostajski, 1994). Mais les concentrations en H_2O_2 qui diminuaient la liaison à l'ADN était bien supérieure à celles nécessaires à altérer l'activité transcriptionnelle de NFI. Des études de mutagenèse ont révélé le rôle d'une cystéine du domaine d'activation de la transcription dans la régulation rédox. Le mécanisme par lequel ce résidu influence l'activité transcriptionnelle de NFI n'est pas connu, ni même la modification chimique provoquée par son oxydation (formation d'un pont disulfure inter- ou intramoléculaire, oxydation avec gain d'atomes d'oxygène). Il a été suggéré que l'oxydation de cette cystéine pouvait provoquer un changement conformationnel ou modifier des interactions protéine-protéine.

En ce qui concerne les récepteurs nucléaires, il a été montré que le stress oxydatif diminuait leur activité transcriptionnelle (Hayashi et al., 1997; Liang et al., 1998; Meshinchi et al., 1990). Mais, pour l'instant, seule la diminution de la capacité de liaison à l'ADN a été incriminée dans cet effet. De même que pour NFI, l'effet de l'oxydation sur la fonction AF-2 n'est pas à exclure et nécessiterait des recherches plus approfondies.

Dans notre étude de l'effet des mutations C→S sur le récepteur $ER\alpha$, nous avons montré le rôle structural des trois cystéines réactives à la surface du domaine E :

- impliquées dans la solvation de la protéine, en ce qui concerne le résidu Cys 381,
- dans des contacts hydrophobes importants dans la stabilisation de la conformation agoniste, pour les deux autres résidus Cys 417 et Cys 530.

Il serait donc aisément envisageable que ces résidus soient également la cible de voies de régulation rédox, contribuant à la diminution de l'activité du récepteur dans les conditions de stress oxydatif.

ix. Conclusion et perspectives

Quand nous avons démarré cette étude, il n'y avait aucune donnée cristallographique sur les récepteurs stéroïdiens. Le mécanisme de la régulation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires n'était pas connu et on ignorait tout sur le mécanisme de l'antagonisme. Nous avons réalisé une étude sur les relations structure-fonction dans le récepteur des œstrogènes hER α , dans le but de répondre aux questions suivantes :

- Quelle est la structure de ce domaine et quel est le mode de fixation du ligand ?
- Quel est le mécanisme de l'antagonisme ?

Ce travail a nécessité une importante mise au point des conditions d'expression, de purification et de cristallisation du domaine de fixation du ligand. En effet, le manque de solubilité et l'instabilité de la protéine sauvage a semé d'embûches l'étude structurale du récepteur. Nous avons surmonté ces difficultés en utilisant différentes approches combinant les outils de la biologie moléculaire et de la biochimie, ce qui a permis la cristallisation de la protéine sauvage. La résolution de sa structure tridimensionnelle s'est heurtée au problème de la phase, qu'il n'aurait été possible de résoudre sans un modèle suffisamment proche, tel que celui du récepteur triple mutant C $\rightarrow$ S. En effet, la protéine, dans laquelle trois cystéines à la surface ont été substituée par des sérines, a pu être purifiée et cristallisée en absence d'agent réducteur, ce qui a permis la substitution des cristaux par les atomes lourds et donc le phasage. Ce travail a eu d'importantes retombées au niveau du laboratoire en encourageant l'utilisation de la mutagenèse dirigée pour résoudre des problèmes de solubilité (Rochel et al., 2000) et d'oxydation des protéines (travaux en cours de Catherine Stehlin et de Jean-Paul Renaud).

Détermination de la structure du récepteur sauvage

La structure cristallographique du domaine de fixation du ligand du récepteur sauvage, outre le fait de répondre à la première question, a permis de valider les observations structurales réalisées sur la protéine carboxyméthylée. La carboxyméthylation a été utilisée dans d'autres laboratoires (Brzozowski et al., 1997; Pike et al., 1999; Shiao et al., 1998) pour contourner le problème de l'oxydation des cystéines.

Le mécanisme de positionnement de l'hélice H12

Dans un premier temps, la structure cristallographique du triple mutant C $\rightarrow$ S a été résolue en présence d'œstradiol. Alors que ce ligand est un agoniste pur, la conformation obtenue est une conformation antagoniste semblable à celle induite par un ligand antagoniste,

tel que le tamoxifène. Les mutations altèrent donc le mécanisme de positionnement de l'hélice de transactivation H12. La comparaison des conformations agoniste du récepteur sauvage et antagoniste du triple mutant C→S (tous les deux liés à l'œstradiol) a confirmé le rôle des hélices H3 et H11 dans le positionnement de H12.

Les mutations C→S n'empêchent pas le récepteur d'être actif, même si cette activité est atténuée par rapport au récepteur sauvage, suggérant qu'une conformation particulière a été cristallisée, mais que celle-ci n'est pas unique. L'analyse des différentes structures de récepteurs nucléaires liés à des ligands mixtes corroborent cette hypothèse, avec des structures adoptant différentes conformations : agoniste dans le cas de PPAR γ lié au ligand de synthèse GW0072 (Oberfield et al., 1999), antagoniste dans le cas du mutant RXR α F318A lié à l'acide oléique (Bourguet et al., 2000), et « intermédiaire » dans le cas du complexe ER β lié à la génistéine (Pike et al., 1999), dans lequel l'hélice H12 ne recouvre pas entièrement le sillon de reconnaissance des coactivateurs.

Jusqu'à présent nous avons une vue simpliste se décomposant en trois mouvements d'hélice H12 : (1) apo, (2) holo-agoniste et (3) holo-antagoniste (Figure 99). Nos résultats, ainsi que ceux publiés par ailleurs, ont montré que la réalité était plus complexe. Nous pouvons maintenant distinguer des différences plus subtiles dans le positionnement de H12. Nous avons mis en évidence l'effet entropique (la solvation à la surface de la protéine est modifiée par la mutation C381S), des réseaux d'interactions polaires (ligand/H524/E339/E419/K531) et de contacts apolaires (C417S/C530S), affectant l'équilibre conformationnel du domaine E et en particulier, celui de l'hélice de transactivation H12.

Rôle structural des cystéines

L'étude des relations structure-fonction de ER α a montré l'importance structurale des résidus cystéines au niveau du domaine de fixation du ligand, suggérant un rôle biologique de ces résidus. En effet, il a été montré que l'activité du récepteur était sensible au potentiel rédox cellulaire (Hayashi et al., 1997). Il s'agirait maintenant de montrer que les voies de signalisation hormonale et de stress oxydatif communiquent par le biais de ces résidus.

Criblage de ligands synthétiques

Le complexe lié au ZK233702 fut obtenu laborieusement, nécessitant de nombreuses mises au point sur la fusion à la thiorédoxine, le protocole de purification, et les conditions de

cristallisation. Ces techniques sont maintenant au point, et ont permis la cristallisation de nombreux autres complexes, dont les structures sont en cours de résolution.

Apo-récepteur

L'un des buts initiaux était aussi de mieux comprendre le mécanisme de fixation du ligand, représenté par les trois états conformationnels : apo, holo-agoniste et holo-antagoniste. Jusqu'à présent les essais de cristallisation de la forme apo n'ont pas abouti, que ce soit avec les récepteurs sauvage, triple mutant C→S ou mutant constitutif. Ceci est en accord avec une stabilité réduite du domaine et une fragilité accrue à la protéolyse en absence de ligand.

PERSPECTIVES

...Domaines E-F, ΔAB et le récepteur entier

Nous avons travaillé jusqu'à présent, sur des domaines isolés des récepteurs nucléaires. L'information obtenue sur le domaine de fixation de l'hormone est précieuse dans le cadre de l'étude du mode de fixation du ligand. Mais ce n'est qu'une information partielle, et il faut s'attendre à ce qu'elle soit donc partiellement fautive dans le cadre du récepteur entier. Il a été clairement établi que le domaine N-terminal, contenant la fonction constitutive AF-1, interagissait de manière fonctionnelle et synergique avec le domaine C-terminal portant la fonction AF-2, pour contribuer ensemble à la régulation de l'activité transcriptionnelle du récepteur. D'autre part, le domaine F altère l'activité des ligands SERM, peut-être en jouant sur la dimérisation du récepteur. Il faudra franchir un pas important avec l'étude du récepteur entier. C'est une protéine multidomaine, flexible et peu stable. Nous comptons sur le pouvoir solubilisant et stabilisant de la fusion à la thiorédoxine, pour son expression dans *E. coli*.

Étude structurale de complexes multiprotéiques

L'étude structurale de complexes multiprotéiques est envisagée avec le récepteur entier ou privé de sa région N-terminale, ΔAB. Trois types de complexes seront à considérer :

- avec les protéines de choc thermique et les immunophilines,
- un complexe entre le récepteur, l'élément de réponse ERE et un coactivateur,
- avec les corépresseurs, également en présence d'ADN.

Ces projets impliquent probablement le recours aux techniques de coexpression et de copurification, pour favoriser l'obtention de quantités raisonnables de complexes purs, biologiquement fonctionnels et structuralement homogènes.

X. Annexes techniques

A. Alignement de séquences sur le groupe des récepteurs œstrogènes

Pour générer un alignement sur le groupe des ER, nous avons utilisé DbClustal (Thompson et al., 2000), qui est un programme d'alignement multiple. Il aligne les séquences d'une banque de données BlastP sur une séquence donnée : nous avons choisi la séquence protéique de hER α (*sw_esr1_human*) et lancé une recherche sur les banques SwissProt et TrEMBL. Sur les 250 séquences ainsi obtenues, l'alignement a été travaillé manuellement sur 62 récepteurs (ER et ERR), dans SeqLab de GCG (*Genetics Computer Group*), dont 40 sont présentés dans ce qui suit. Ordali (développé par le Dr. Luc Moulinier) permet de visualiser les invariances et les conservations globales (conservation des résidus physico-chimiques équivalents : C, DEQN, KRH, PAGST, ILMV, FYW), ainsi que les conservations inter- et intra-groupes. Nous avons scindé le groupe des récepteurs aux œstrogènes en trois sous-groupes :

1. **ER α** : les résidus conservés à l'intérieur de ce sous-groupe sont surlignés en rouge,
2. **ER β** : les résidus conservés à l'intérieur de ce sous-groupe sont surlignés en bleu,
3. **Récepteurs orphelins ERR** : les résidus conservés à l'intérieur de ce sous-groupe sont surlignés en jaune.

Le tableau ci-dessous indique le code couleur :

Conservations globales	FRMNL	Résidus invariants
	FRMNL	Résidus conservés à 80%
	FRMNL	Résidus physico-chimiques conservés
Conservations Intra-groupes	FRMNL	Résidus conservés à 80% chez ER α
	FRMNL	Résidus conservés à 80% chez ER β
	FRMNL	Résidus conservés à 80% chez ERR
	FRMNL	Résidus conservés à 80% chez ER α et les autres groupes ont un résidu physico-chimiquement équivalent
	FRMNL	Résidus conservés à 80% chez ER β et les autres groupes ont un résidu physico-chimiquement équivalent
	FRMNL	Résidus conservés à 80% chez ERR et les autres groupes ont un résidu physico-chimiquement équivalent
Conservations Inter-groupes	FRMNL	Résidus conservés à 80% chez ER α et ER β
	FRMNL	Résidus conservés à 80% chez ER β et ERR
	FRMNL	Résidus conservés à 80% chez ER α et ERR

Domaine A/B variable (résidus 1 à 180) Numérotation des résidus de hERα.

	1	21	41	61	81
sw_esr1_human					
spt_q9tv98					
sw_esr1_chick					
sw_esr1_pig					
sw_esr1_mouse					
spt_q9qzj5					
sw_esr1_xenla					
sw_esr1_oryla					
spt_q9yh33					
sw_esr1_oreau					
sw_esr1_pagma					
spt_q9ps28					
sw_esr1_salsa					
sw_esr1_oncmv					
sptnew_bab16893					
spt_q9yh27					
spt_q9yh32					
sptnew_cac06714					
spt_q9w669					
spt_q9w6m2					
spt_o13012					
spt_q9ial9					
sptnew_aag16711					
spt_q9iak1					
sptnew_aag16712					
spt_q9tu15					
sw_esr2_human					
sw_esr2_rat					
sw_esr2_mouse					
spt_q9ts2					
spt_q95171					
spt_q9pve2					
spt_o93511					
spt_q9ptu5					
spt_q9rif3					
sw_esr2_human					
spt_o95718					
sw_esr2_mouse					
sw_esr1_human					

Phosphorylation
par MAPK

	101	121	141	161
sw_esr1_human				
spt_q9tv98				
sw_esr1_chick				
sw_esr1_pig				
sw_esr1_mouse				
sw_esr1_rat				
spt_q9qzj5				
sw_esr1_xenla				
sw_esr1_oryla				
spt_q9yh33				
sw_esr1_oreau				
sw_esr1_pagma				
spt_q9ps28				
sw_esr1_salsa				
sw_esr1_oncmv				
sptnew_bab16893				
spt_q9yh27				
spt_q9yh32				
sptnew_cac06714				
spt_q9w669				
spt_q9w6m2				
spt_o13012				
spt_q9ial9				
sptnew_aag16711				
spt_q9iak1				
sptnew_aag16712				
spt_q9tu15				
sw_esr2_human				
sw_esr2_rat				
sw_esr2_mouse				
spt_q9ts2				
spt_q95171				
spt_q9pve2				
spt_o93511				
spt_q9ptu5				
spt_q9rif3				
sw_esr2_human				
spt_o95718				
sw_esr2_mouse				
sw_esr1_human				

Domaine C très conservé (résidus 180 à 256) Numérotation des résidus de hERA.

	181		201		221		241		261	
sw_esr1_human	SHAME.....SAKSTLYCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
spt_q9tv98	SHAME.....SAKSTLYCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sw_esr1_chick	SLSE.....STKSTLYCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sw_esr1_pig	SHAME.....SAKSTLYCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sw_esr1_mouse	NHME.....SAKSTLYCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sw_esr1_rat	NHME.....SAKSTLYCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
spt_q9qzj5	SHAME.....SVKSTLYCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sw_esr1_xenla	PPSE.....STKSTLYCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sw_esr1_oryla	GFEMA.....KDTFFCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
spt_q9yh33	GFEMT.....KDTFFCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sw_esr1_oreau	GFEMT.....KDTFFCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sw_esr1_pagma	GFEMA.....KDTFFCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
spt_q9ps28	VFEMA.....NETLYCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sw_esr1_salsa	VFEMA.....NETLYCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sw_esr1_oncmy	VFEMA.....NETLYCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sptnew_bab16893	GFDSG.....KDTFFCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
spt_q9yh27	SGAGPSGAIGLVKSTLYCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
spt_q9yh32	MYSSG.....GVALHNCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sptnew_cac06714	STSLR.....GVALHNCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
spt_q9w669	STSLR.....GVALHNCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
spt_q9w6m2	EVSSG.....GVALHNCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
spt_o13012	TSSVGGC..FAGSGNHNCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
spt_q9ial9	NPSPG.....ILGSGNTHCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sptnew_aag16711	NSSLCSS..AVGNAHNCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
spt_q9iak1	SSSSG.....AVVWDMNCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sptnew_aag16712	VVTSG.....GNTLHNCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
spt_q9tu15	SPVSG.....PSGRDAHNCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sw_esr2_human	SPVTS.....PGSRDAHNCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sw_esr2_rat	SPVTS.....PNAHDAHNCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sw_esr2_mouse	SPVTS.....PSAARDAHNCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
spt_q9tts2	SPVTS.....PSSARDAHNCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
spt_q95171	SPVTS.....PSSARDAHNCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
spt_q9pve2	SPVTS.....PGSRDAHNCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
spt_o93511	SPTASN.....PGSRDAHNCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sw_err1_human	KLVLSS.....SLPKDVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
spt_q9rf3	EYMLN.....SMPKDCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sw_err2_human	EYMLN.....ALPKDCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
spt_o95718	EYMLN.....ALPKDCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sw_err2_mouse	EYMLN.....ALPKDCVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG
sw_err1_human	KLVLSS.....SLPKDVCNDASGYHYGV...SCE		CAFFKFR	IQGHNY	CPATN	CTDRI	RRKSCQACRLKCYVGHMK	GIR	DRRG	DLKHKKRQD.....DG

Région charnière D variable (résidus 256 à 302) Numérotation des résidus de hERA.

	281			301			321			341			361		
sw_esr1_human	DGEGRGVEVSGAGDRAANLNPSPVLK.....			RSKKNLSLALSLTADMVSAALLD			EDPIVLEYDPTREFSASNG			GLTNADRELVA			ITNAKRPGEFDTSLDQ		HLL
spt_q9tv98	DGEGRGVEVSGAGDRAANLNPSPVLK.....			HTKKNSPALSLTADMVSAALLD			EDPIVLEYDPTREFSASNG			GLTNADRELVA			ITNAKRPGEFDTSLDQ		HLL
sw_esr1_chick	DGEGRGVEVSGAGDRAANLNPSPVLK.....			HTKKNSPALSLTADMVSAALLD			EDPIVLEYDPTREFSASNG			GLTNADRELVA			ITNAKRPGEFDTSLDQ		HLL
sw_esr1_pig	DGEGRGVEVSGAGDRAANLNPSPVLK.....			HTKKNSPALSLTADMVSAALLD			EDPIVLEYDPTREFSASNG			GLTNADRELVA			ITNAKRPGEFDTSLDQ		HLL
sw_esr1_mouse	DGEGRGVEVSGAGDRAANLNPSPVLK.....			HTKKNSPALSLTADMVSAALLD			EDPIVLEYDPTREFSASNG			GLTNADRELVA			ITNAKRPGEFDTSLDQ		HLL
sw_esr1_rat	DGEGRGVEVSGAGDRAANLNPSPVLK.....			HTKKNSPALSLTADMVSAALLD			EDPIVLEYDPTREFSASNG			GLTNADRELVA			ITNAKRPGEFDTSLDQ		HLL
spt_q9qzj5	DGEGRGVEVSGAGDRAANLNPSPVLK.....			HTKKNSPALSLTADMVSAALLD			EDPIVLEYDPTREFSASNG			GLTNADRELVA			ITNAKRPGEFDTSLDQ		HLL
sw_esr1_xenla	DGEGRGVEVSGAGDRAANLNPSPVLK.....			HTKKNSPALSLTADMVSAALLD			EDPIVLEYDPTREFSASNG			GLTNADRELVA			ITNAKRPGEFDTSLDQ		HLL
sw_esr1_oryza	DGEGRGVEVSGAGDRAANLNPSPVLK.....			HTKKNSPALSLTADMVSAALLD			EDPIVLEYDPTREFSASNG			GLTNADRELVA			ITNAKRPGEFDTSLDQ		HLL
spt_q9yh33	DKPAKDL PTHRASPDQGRKRAMSSST.....			SGGGGRSSLLNMPDPVLLLCQ			EDPILSRQKMSRYVTVT			TLTSHADRELVA			ITNAKRPGEFDTSLDQ		LLL
sw_esr1_oreau	QTSQNL.....PTHRASPDQGRKRAMSSST.....			SGGGGRSSLLNMPDPVLLLCQ			EDPILSRQKMSRYVTVT			TLTSHADRELVA			ITNAKRPGEFDTSLDQ		LLL
sw_esr1_pagma	DKASKGL.....EHRTPAPDQGRKRAMSSST.....			SGGGGRSSLLNMPDPVLLLCQ			EDPILSRQKMSRYVTVT			TLTSHADRELVA			ITNAKRPGEFDTSLDQ		LLL
spt_q9ps28	EGKPYGLD.....EHRTPAPDQGRKRAMSSST.....			SGGGGRSSLLNMPDPVLLLCQ			EDPILSRQKMSRYVTVT			TLTSHADRELVA			ITNAKRPGEFDTSLDQ		LLL
sw_esr1_salsa	EKPYGLD.....EHRTPAPDQGRKRAMSSST.....			SGGGGRSSLLNMPDPVLLLCQ			EDPILSRQKMSRYVTVT			TLTSHADRELVA			ITNAKRPGEFDTSLDQ		LLL
sw_esr1_oncmy	EKPYVTN.....STGTPQGRKRAMSSST.....			SGGGGRSSLLNMPDPVLLLCQ			EDPILSRQKMSRYVTVT			TLTSHADRELVA			ITNAKRPGEFDTSLDQ		LLL
sptnew_bab16893	DKSSSDCSRAGVTRTPQGRKRAMSSST.....			SGGGGRSSLLNMPDPVLLLCQ			EDPILSRQKMSRYVTVT			TLTSHADRELVA			ITNAKRPGEFDTSLDQ		LLL
spt_q9yh27	ERKYSKAGSSDVRALPDQGRKRAMSSST.....			SGGGGRSSLLNMPDPVLLLCQ			EDPILSRQKMSRYVTVT			TLTSHADRELVA			ITNAKRPGEFDTSLDQ		LLL
spt_q9yh32	LTRLSSQSGKTA.EPK..GITGPAEGSL.....			NKPEKPA			TPEOLIERIL			EDPIVLEYDPTREFSASNG			ITNAKRPGEFDTSLDQ		HLL
sptnew_cac06714	LARFSGGRMRTS.GPRSQEMKSVCPPLSG.....			NEVVMHA			TPEOLIERIL			EDPIVLEYDPTREFSASNG			ITNAKRPGEFDTSLDQ		HLL
spt_q9w669	LTRFSGGRMRTS.GPRSQEIKTVPORPLSG.....			NKVVTMA			TPEOLIERIL			EDPIVLEYDPTREFSASNG			ITNAKRPGEFDTSLDQ		HLL
spt_q9w6m2	VTRLSSQSGRTS.GPS.VLNGPAVGLP.....			HTPQPPA			TPEOLIERIL			EDPIVLEYDPTREFSASNG			ITNAKRPGEFDTSLDQ		HLL
spt_o13012	MPHIRELAGTGGGARTQRRGEGVVPQT.....			QEAQSSA			TPEOLIERIL			EDPIVLEYDPTREFSASNG			ITNAKRPGEFDTSLDQ		HLL
spt_q9ial9	MPHIRELAGTGGGARTQRRGEGVVPQT.....			QEAQSSA			TPEOLIERIL			EDPIVLEYDPTREFSASNG			ITNAKRPGEFDTSLDQ		HLL
sptnew_aag16711	MPHIRELAGTGGGARTQRRGEGVVPQT.....			QEAQSSA			TPEOLIERIL			EDPIVLEYDPTREFSASNG			ITNAKRPGEFDTSLDQ		HLL
spt_q9iak1	MPHIRELAGTGGGARTQRRGEGVVPQT.....			QEAQSSA			TPEOLIERIL			EDPIVLEYDPTREFSASNG			ITNAKRPGEFDTSLDQ		HLL
sptnew_aag16712	MPHIRELAGTGGGARTQRRGEGVVPQT.....			QEAQSSA			TPEOLIERIL			EDPIVLEYDPTREFSASNG			ITNAKRPGEFDTSLDQ		HLL
sw_esr2_human	DEQLHCLSKTKRNGGPH.....			PRVKELLSDA			SPQOLVLTLL			EDPHVLISRPST			ITNAKRPGEFDTSLDQ		RLL
sw_esr2_rat	DEQLHCLSKTKRNGGPH.....			PRVKELLSDA			SPQOLVLTLL			EDPHVLISRPST			ITNAKRPGEFDTSLDQ		RLL
sw_esr2_mouse	DEQLHCLSKTKRNGGPH.....			PRVKELLSDA			SPQOLVLTLL			EDPHVLISRPST			ITNAKRPGEFDTSLDQ		RLL
spt_q9tts2	DEQLHCLSKTKRNGGPH.....			PRVKELLSDA			SPQOLVLTLL			EDPHVLISRPST			ITNAKRPGEFDTSLDQ		RLL
spt_q95171	DEQLHCLSKTKRNGGPH.....			PRVKELLSDA			SPQOLVLTLL			EDPHVLISRPST			ITNAKRPGEFDTSLDQ		RLL
spt_q9pve2	DEQLHCLSKTKRNGGPH.....			PRVKELLSDA			SPQOLVLTLL			EDPHVLISRPST			ITNAKRPGEFDTSLDQ		RLL
spt_o93511	DEQLHCLSKTKRNGGPH.....			PRVKELLSDA			SPQOLVLTLL			EDPHVLISRPST			ITNAKRPGEFDTSLDQ		RLL
spt_q9ptu5	DEQLHCLSKTKRNGGPH.....			PRVKELLSDA			SPQOLVLTLL			EDPHVLISRPST			ITNAKRPGEFDTSLDQ		RLL
spt_q9rf3	ENSPY.....LNPQVOPAKKYNKSHLVAEDEK			YAMPDPVVD			DLIKA			TTLCEDAD			ITNAKRPGEFDTSLDQ		SLL
sw_err2_human	ENSPY.....LNPQVOPAKKYNKSHLVAEDEK			YAMPDPVVD			DLIKA			TTLCEDAD			ITNAKRPGEFDTSLDQ		SLL
spt_o95718	ENSPY.....LNPQVOPAKKYNKSHLVAEDEK			YAMPDPVVD			DLIKA			TTLCEDAD			ITNAKRPGEFDTSLDQ		SLL
sw_err2_mouse	ENSPY.....LNPQVOPAKKYNKSHLVAEDEK			YAMPDPVVD			DLIKA			TTLCEDAD			ITNAKRPGEFDTSLDQ		SLL
sw_err1_human	DPLPPPPPPPPAG.....LAVAGSPKRTAVNAVSHLVAEDEK			YAMPDPVVD			DLIKA			TTLCEDAD			ITNAKRPGEFDTSLDQ		SLL
	1	351	161	371	381	391	401	411	421	431	441	451			

Domaine E conservé (résidus 302 à 552) Numérotation des résidus de hERα.

	381	401	417	421	441	461	481	
sw_esrl_human	I	C	A	M	D	I	L	I
spt_q9tv98	I	C	A	M	D	I	L	I
sw_esrl_chick	I	C	A	M	D	I	L	I
sw_esrl_pig	I	C	A	M	D	I	L	I
sw_esrl_mouse	I	C	A	M	D	I	L	I
sw_esrl_rat	I	C	A	M	D	I	L	I
spt_q9qzj5	I	C	A	M	D	I	L	I
sw_esrl_xenla	I	C	A	M	D	I	L	I
sw_esrl_oryla	I	C	A	M	D	I	L	I
spt_q9yh33	I	C	A	M	D	I	L	I
sw_esrl_oreau	I	C	A	M	D	I	L	I
sw_esrl_pagma	I	C	A	M	D	I	L	I
spt_q9paz8	I	C	A	M	D	I	L	I
sw_esrl_salsa	I	C	A	M	D	I	L	I
sw_esrl_oncmy	I	C	A	M	D	I	L	I
sptnew_bab16893	I	C	A	M	D	I	L	I
spt_q9yhz7	I	C	A	M	D	I	L	I
spt_q9yh32	I	C	A	M	D	I	L	I
sptnew_cac06714	I	C	A	M	D	I	L	I
spt_q9w669	I	C	A	M	D	I	L	I
spt_q9w6m2	I	C	A	M	D	I	L	I
spt_o13012	I	C	A	M	D	I	L	I
spt_q9ia19	I	C	A	M	D	I	L	I
sptnew_aag16711	I	C	A	M	D	I	L	I
spt_q9iak1	I	C	A	M	D	I	L	I
sptnew_aag16712	I	C	A	M	D	I	L	I
spt_q9tu15	I	C	A	M	D	I	L	I
sw_esr2_human	I	C	A	M	D	I	L	I
sw_esr2_rat	I	C	A	M	D	I	L	I
sw_esr2_mouse	I	C	A	M	D	I	L	I
spt_q9tts2	I	C	A	M	D	I	L	I
spt_q95171	I	C	A	M	D	I	L	I
spt_q9pwe2	I	C	A	M	D	I	L	I
spt_o93511	I	C	A	M	D	I	L	I
spt_q9ptu5	I	C	A	M	D	I	L	I
spt_q9rif3	I	C	A	M	D	I	L	I
sw_err2_human	I	C	A	M	D	I	L	I
spt_o95171	I	C	A	M	D	I	L	I
sw_err2_mouse	I	C	A	M	D	I	L	I
sw_err1_human	I	C	A	M	D	I	L	I

	501	521	530	541	561	581	
sw_esrl_human	K	A	L	T	L	I	I
spt_q9tv98	K	A	L	T	L	I	I
sw_esrl_chick	K	A	L	T	L	I	I
sw_esrl_pig	K	A	L	T	L	I	I
sw_esrl_mouse	K	A	L	T	L	I	I
sw_esrl_rat	K	A	L	T	L	I	I
spt_q9qzj5	K	A	L	T	L	I	I
sw_esrl_xenla	K	A	L	T	L	I	I
sw_esrl_oryla	K	A	L	T	L	I	I
spt_q9yh33	K	A	L	T	L	I	I
sw_esrl_oreau	K	A	L	T	L	I	I
sw_esrl_pagma	K	A	L	T	L	I	I
spt_q9paz8	K	A	L	T	L	I	I
sw_esrl_salsa	K	A	L	T	L	I	I
sw_esr2_rat	K	A	L	T	L	I	I
sw_esr2_mouse	K	A	L	T	L	I	I
sptnew_bab16893	K	A	L	T	L	I	I
spt_q9yhz7	K	A	L	T	L	I	I
spt_q9yh32	K	A	L	T	L	I	I
sptnew_cac06714	K	A	L	T	L	I	I
spt_q9w669	K	A	L	T	L	I	I
spt_q9w6m2	K	A	L	T	L	I	I
spt_o13012	K	A	L	T	L	I	I
spt_q9ia19	K	A	L	T	L	I	I
sptnew_aag16711	K	A	L	T	L	I	I
spt_q9iak1	K	A	L	T	L	I	I
sptnew_aag16712	K	A	L	T	L	I	I
spt_q9tu15	K	A	L	T	L	I	I
sw_esr2_human	K	A	L	T	L	I	I
sw_esr2_rat	K	A	L	T	L	I	I
sw_esr2_mouse	K	A	L	T	L	I	I
spt_q9tts2	K	A	L	T	L	I	I
spt_q95171	K	A	L	T	L	I	I
spt_q9pwe2	K	A	L	T	L	I	I
spt_o93511	K	A	L	T	L	I	I
spt_q9ptu5	K	A	L	T	L	I	I
spt_q9rif3	K	A	L	T	L	I	I
sw_err2_human	K	A	L	T	L	I	I
spt_o95171	K	A	L	T	L	I	I
sw_err2_mouse	K	A	L	T	L	I	I
sw_err1_human	K	A	L	T	L	I	I

Région F variable (résidus 552 à 595) Numérotation des résidus de hERα.

	581	
sw_esr1_human	LATAGSTSSHSLQKYVI.TGEAEGFPATV.....	
spt_q9tv98	LATTGSTSPHSMQTYVI.TGEAEGFPNTI.....	
sw_esr1_chick	LTTA.PASSHSLQSFYINSKEESMQNTI.....	
sw_esr1_pig	LATSGSTPSSHLOMYVI.TGEAENFPNTI.....	
sw_esr1_mouse	LATTSTSTSAHSLQTYVI.PPEAEGFPNTI.....	
sw_esr1_rat	LTTTSTSTSAHSLQTYVI.PPEAEGFPNTI.....	
spt_q9qzj5	LTTTNTSTSSHSLQTYVI.PPEAEGFPNTI.....	
sw_esr1_xenla	PTTTVNGASPCLOPYVT.NTEEVSLQSTV.....	
sw_esr1_oryza	GGIAPGSIASR.GRIESP.....SRGPFAPSVLQYGGSRPDCTPALQD.....	
spt_q9yh33	CDDEGASSAGSSSGPQ.GSHESPRRENLSRAPKPGVQLQYRGSHSDCTTRIP.....	
sw_esr1_oreau	GGG.GSSSAGSTSGPR.VSHESP.....TSPGVQLQYGGSRSECTHIL.....	
sw_esr1_pagma	TGSSIGPMRGSQDTHIRSP.....GSGVLQYGGSPSSDQMPIP.....	
spt_q9ps28	TGSSIGPMRGSQDTHIRSP.....GSGVLQYGGSPSSDQMPIP.....	
sw_esr1_salsa	TGSSIGPMRGSQDTHIRSP.....GSGVLQYGGSPSSDQMPIP.....	
sw_esr1_oncmy	TGSSIGPMRGSQDTHIRSP.....GSGVLQYGGSPSSDQMPIP.....	
sptnew_bab16893	STPTTSSSSSSNNSPRGG.....AAAIQSNAGCHSHSPDP.....	
spt_q9yhz7	TNTTTTTTTTTTHPSMGST.....CPADLPSPNPPGPGQSPSP.....	
spt_q9yh32	PAPLHSSA.GGPSNTNT.....PSSARAGGESQ.....	
sptnew_cac06714	PAPKESTG...VQEAT.....LSVLKNDL.....	
spt_q9w669	PVPKESNC...VQETF.....TCTSQHGGTLRP.....	
spt_q9w6m2	PARPHSPGTSGTNTNT.....PSTCGGKGEPQ.....	
spt_o13012	PHSQAAQSQPGPPPPSCS.....GECPCPPKESSTI.....	
spt_q9ial9	SKQQPALKESQDTRHSPQAE.....GTVDKTLHRVDKTLHRVDVDT.....	
sptnew_aag16711	VPQPSHLHPGSEYTTA.....DHAIVPPLGPTDDPILDCHLDAHPLQSSPPFQSLVVPMDTNDYIHPEQNSLGTGDAAAP5VEPTDYITTRVVMETALVTQF.....	
spt_q9iak1	PVTPTATSPNTPLPQLH.....SPVAHHTQVMEQSCSQE.....	
sptnew_aag16712	SGSGPSYTTNTPSSSEGAGEPQ.....	
spt_q9tu15	LAEDSESKESGQKPQAA.....	
sw_esr2_human	PAEDSESKESGQNPQSQ.....	
sw_esr2_rat	STEDSKNKESQNLQSQ.....	
sw_esr2_mouse	STEDSKNKESQNLQSQ.....	
spt_q9tts2	LVEDSESKESGQKPQAA.....	
spt_q95171	PAEDSESKESGQNPQSQ.....	
spt_q9pve2	PLEQMEPGSELKKEPQ.....	
spt_o93511	QVSHFQV.....	
spt_q9ptu5	QVSHFQV.....	
spt_q9r1f3		
sw_err2_human		
spt_o95718	KRQHVFHFLTELP PPPSVANUGTAQAGYHLEVF LPQRAGMPRAA.....	
sw_err2_mouse		
sw_err1_human		
	661 671 681 691 701 711 721 731 741 751 761 771	

B. Techniques de biologie moléculaire et cellulaire

Les protocoles de biologie moléculaire proviennent des ouvrages suivants:

- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989).
- Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Perbal P. (1988).
- A practical guide to molecular cloning. Wiley Intersciences

1. Souches d'*Escherichia coli*

XL1-Blue de génotype *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻ F'[proAB⁺ lacI^f lacZΔM15 Tn10(*tet^r*)]*. Cette souche a été utilisée pour la production et l'amplification de vecteur.

BL21 (DE3) de génotype *hsdS gal (λCIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)* a été utilisée lors des étapes de productions. Son génome est lysogénisé par le bactériophage λ DE3 et comporte le gène de l'ARN polymérase du phage T7 sous contrôle du promoteur UV5 inducible à l'IPTG.

2. Préparation et transformation de bactéries compétentes

Deux méthodes de transformation bactérienne ont été utilisées : un traitement chimique ou l'électroporation. Toutes les étapes sont effectuées stérilement.

2.1 Méthode chimique

Cette technique a été utilisée lorsque le rendement de la transformation bactérienne n'était pas limitant, c'est-à-dire en-dehors du clonage. Cette méthode est basée sur la perméabilité membranaire en présence de certains cations métalliques (Rb^+ , Cs^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+}) par formation de pores autorisant la pénétration de l'ADN.

2.1.1 Préparation de bactéries chimiocompétentes

Une culture de 100ml estensemencée par une colonie et cultivée à 37°C jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0.5. Le milieu de culture est refroidi pendant 30 minutes dans la glace. Les cellules sont récupérées par centrifugation (4000 g, 15 min, 4°C). Puis le culot est repris dans 50ml de $CaCl_2$ 50mM et maintenu sur la glace pendant 10min. Après une nouvelle centrifugation, le culot est repris cette fois-ci dans 4.3ml de $CaCl_2$ 50mM et 1ml de glycérol 87%. Les cellules sont alors aliquotées par 100µl et conservées à - 80°C après trempage dans l'azote liquide.

2.1.2 Transformation chimique

Un aliquote de bactéries chimiocompétentes (50µl) est mélangé à l'ADN plasmidique (25 à 250ng) et le mélange est laissé pendant 15min sur la glace. Un choc thermique est alors réalisé à 42°C pendant 45sec. Le mélange de transformation est placé sur la glace pendant 1min avant d'y ajouter 400µl de LB. Ce milieu est placé à 37°C sous agitation pendant 30min. Différents volumes de mélange de transformation (entre 20 et 200µl au maximum) sont étalés sur milieu gélosé sélectif.

2.2 *Electroporation*

L'efficacité de la transformation bactérienne par électroporation est au moins 100 fois supérieure à la technique précédente. La transformation est causée par un choc électrique qui forme des pores dans les parois bactériennes. Le milieu doit être pauvre en sel afin qu'il ne se forme pas d'arc électrique.

2.2.1 Préparation de bactéries électrocompétentes

Une culture de 1 l est réalisée la souche bactérienne voulue à 37°C jusqu'à une DO_{600nm} de 0.4. Le milieu de culture est refroidi pendant 30 minutes dans la glace. Puis les cellules sont récupérées par centrifugation (4000 g, 15 min, 4°C). Le culot est lavé successivement dans 1 l, 0.5 l d'eau froide, puis dans 20ml glycérol 10%. Le culot est finalement repris dans 2ml de glycérol 10% et les cellules sont aliquotées par 50µl, congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

2.2.2 Transformation par électroporation

L'ADN plasmidique (5µl de milieu de ligation dilué avec 15µl d'eau ou 20ng d'ADN recombinant) est ajouté à 50µl de bactéries électrocompétentes. Le mélange est laissé pendant 1min sur la glace, avant d'être placé dans une cuve à électroporation de 0.1cm de largeur, afin de recevoir une décharge électrique (25µF ; 2,5kV ; 200Ω). Le mélange de transformation est placé sur la glace pendant 1min. Les bactéries sont reprises dans 1ml de LB. Ce milieu est placé à 37°C sous agitation pendant 30min. Le mélange de transformation (entre 20 et 200µl au maximum) est étalé sur milieu gélosé sélectif.

3. Préparation d'ADN plasmidique

3.1 Minipréparation d'ADN plasmidique

Une colonie isolée obtenue après transformation est cultivée pendant la nuit sous agitation à 37°C dans 3ml de milieu LB en présence de l'antibiotique adéquat. L'ADN plasmidique est extrait par lyse cellulaire dans le tampon de lyse suivant : Tris-HCl pH8.0, 10mM, EDTA 1mM, saccharose 15%, lysozyme 2mg/ml, RNase pancréatique 0.2mg/ml, BSA 0.1mg/ml. Le culot bactérien repris dans 100µl de tampon de lyse. La lyse s'effectue à température ambiante pendant 5 min. Puis ce milieu est mis à bouillir pendant 1min et refroidi sur la glace pendant 1min. Après centrifugation (14000g, 15min, 4°C), le surnageant renfermant l'ADN plasmidique peut être analysé directement par digestion enzymatique.

3.2 Maxipréparation d'ADN plasmidique

Les vecteurs sont amplifiés dans la souche XL1-Blue cultivée en milieu LB en présence de l'antibiotique adéquat. Les plasmides sont ensuite extraits et purifiés selon une version modifiée de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979). C'est une technique qui permet une extraction rapide de l'ADN plasmidique :

- d'abord les cellules sont traitées au lysozyme, ce qui fragilise leur membrane,
- une lyse complète s'effectue en présence de soude et de SDS. L'ADN chromosomique, de très haute masse moléculaire, est ainsi dénaturé et lorsque le pH est neutralisé par l'acétate de potassium acide, il forme des agrégats insolubles. La forte

concentration en acétate de potassium permet d'autre part de précipiter les complexes protéines-SDS et les ARN de grande masse moléculaire.

Le protocole suivi est celui du fabricant Macherey-Nagel, Düren. Après la lyse alcaline, l'extrait bactérien est déposé sur une colonne échangeuse d'ions Nucleobond. L'ADN plasmidique purifié est repris dans une solution TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) et conservés à -20°C . Sa concentration est déterminée par spectrophotométrie d'absorption à 260nm.

3.3 Préparation de plasmide par double gradient de chlorure de césium

Cette technique a été employée pour la préparation de plasmides utilisés dans les expériences de transfections transitoires de cellules eucaryotiques.

Une colonie est repiquée dans 2ml de milieu sélectif LB et cultivée à 37°C , sous agitation, pendant 12h. Une culture de 500ml de LB estensemencée la veille au soir et poussée à 37°C durant la nuit. Après centrifugation à 4000g, 20mn, 4°C , le culot de cellules est repris dans 10ml de solution 1 (50mM Tris-HCl, 5mM EDTA) et laissé 5mn à température ambiante. La solution 2 (20ml à 1% SDS, 0.2M NaOH, préparée extemporanément) est ajoutée, le mélange est homogénéisé et laissé 5min à température ambiante. Suite à l'ajout de 15ml de solution 3 (7.5M acétate d'ammonium, 3% acide acétique), il faut homogénéiser et laisser le mélange 5min dans la glace. Après centrifugation (15 min, 4000g, 20°C), le surnageant limpide est filtré sur gaze et réparti en deux volumes d'environ 20ml.. Les solutions sont mélangés à 25ml isopropanol par volume de surnageant pour la précipitation de l'ADN (5min sur la glace). Après centrifugation (10 min, 4000g, 4°C), le culot d'ADN est séché et repris dans 1ml de TE. L'ADN est placé dans un tube d'ultracentrifugation dans lequel se trouvent 200 μl de BET 10mg/ml et 4.4g de CsCl. Les tubes d'ultracentrifugation sont équilibrés avec du TE et centrifugés pendant 4 h, à 65000rpm, à 20°C (rotor Vti65, Beckman). La bande contenant l'ADN plasmidique est prélevée sous UV à l'aide d'une seringue. L'ADN est placé dans un nouveau tube d'ultracentrifugation complété de 0.8g/ml CsCl repris dans le tampon TE. Après une nouvelle ultracentrifugation de 15 h, à 50000rpm à 20°C , la bande plasmidique est de nouveau prélevée. Un volume de 3ml d'eau millipore est ajouté à la solution pour éviter la précipitation du CsCl pendant l'extraction du BET. Trois

extractions au butanol saturé en eau sont effectuées (le butanol constitue la phase supérieure). Environ 8ml d'isopropanol sont ajoutés puis centrifugés pendant 15 mn, à 5000g et à 20°C. Le culot est séché puis dissous dans 500µl de TE. Il subit encore des traitement à la RNase A (0.1 mg/ml à 37°C, 1 h), à la protéinase K (0.1 mg/ml à 37°C, 1 h), une déprotéinisation au phénol/chloroforme et une précipitation à l'éthanol avant d'être prêt à l'emploi.

4. Amplification d'ADN par PCR

Cette méthode enzymatique très fréquemment utilisée est très efficace pour amplifier des fragments d'ADN *in vitro*. Elle est basée sur la répétition de trois phases effectuées à températures différentes :

- la séparation ou fusion des deux brins d'ADN matriciel par dénaturation thermique à 94°C.
 - l'hybridation des sondes ou des amorces oligonucléotiques en amont de l'extrémité 5' de la partie à amplifier. Cette opération se fait à température plus basse.
 - l'extension de chaque amorce grâce à une ADN polymérase thermostable.
- L'activité de cet enzyme est optimal à 72°C, mais la protéine reste stable à la température de dénaturation de l'ADN.

La réaction requiert la présence d'ADN matriciel (20ng), d'amorces oligonucléotidiques (100pmol), les 4 dNTP (20nmol), 2U de Deep-Vent-polymérase (*Biolabs*) et le tampon conseillé par le fournisseur dans un volume final de 100µl. Les conditions de PCR sont les suivantes : 25 cycles d'1min 30sec à 94°C, 1min à 55°C, 1min/kpb à 72°C, puis une dernière étape d'élongation de 7min à 72°C.

4.1 Amplification d'ADN avec introduction de nouveaux sites de restriction en 5' et en 3'

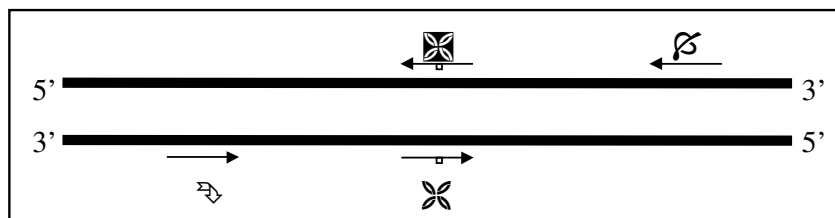
L'ADN matriciel est amplifié en utilisant deux amorces convergentes contenant chacune une extrémité 3' correspondant aux nouveaux sites de restriction à ajouter en 5' et en 3', respectivement. Ces amorces sont des 30-mères afin que la plus grande partie de l'amorce soit spécifique du fragment à amplifier : l'hybridation se fait sur 18 nucléotides, les 12

restants comportent éventuellement un codon de terminaison de la traduction (en 3' de la séquence), le site de restriction et quelques nucléotides en plus pour augmenter l'efficacité de la coupure par l'enzyme de restriction.

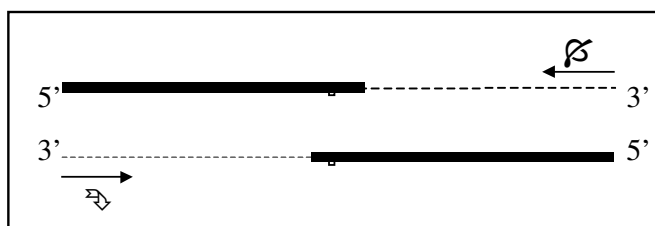
4.2 Mutagenèse dirigée

Nous avons introduit des mutations ponctuelles par PCR (Ho et al., 1989). L'ADN matriciel, compris entre deux sites de restriction uniques, est amplifié tout en introduisant une mutation. Cette réaction s'effectue en deux étapes :

- Deux PCR sont effectuées en parallèle : l'une est réalisée avec les amorces ❶ et ❸, l'autre avec les amorces ❷ et ❹. Les amorces ❶ et ❹ portent la séquence des sites de restriction uniques, alors que les amorces ❷ et ❸ portent la mutation (l'hybridation de ces amorces se fait sur 15 nucléotides de part et d'autre de la mutation).



- Puis on réalise une troisième PCR où les produits des deux PCR précédentes servent de matrice et les oligonucléotides ❶ et ❹ d'amorces. Seuls les fragments qui s'hybrident comme indiqué ci-dessous seront amplifiés (polymérisation de 5' vers 3').



4.3 Oligonucléotides de sous-clonage et de mutagenèse

Les oligonucléotides de sous-clonage et de mutagenèse sont présentés sous forme de deux tableaux dans lesquels sont indiqués :

- les numéros de synthèse,
- les séquences nucléotidiques (les sites de restriction et les codons mutés sont soulignés, les codons « stop » de terminaison de la traduction sont indiqués en rouge),
- les enzymes de restriction utilisés pour les sous-clonages,
- les fragments amplifiés,
- les mutations générées.

Numéro	Oligonucléotides	Remarques	Sous-clonages
UN83 TW160	5' GGGAATTCC <u>CATATG</u> AAGAAGAAGACAGCCTGG 3' 5' CGC <u>GGATCC</u> CTA CTTGCACTTCATGCTGTA 3'	Amorce5' (NdeI) Amorce3' (BamHI)	Résidu 302-531 dans pET-15b*
UN83 UN84	5' GGGAATTCC <u>CATATG</u> AAGAAGAAGACAGCCTGG 3' 5' CGC <u>GGATCC</u> CTA GGGCGCATGTAGGCG 3'	Amorce5' (NdeI) Amorce3' (BamHI)	Résidu 302-552 dans pET-15b*
UN83 WY220	5' GGGAATTCC <u>CATATG</u> AAGAAGAAGACAGCCTGG 3' 5' CGC <u>GGATCC</u> CTA GTGGCTTTGGTCCGT 3'	Amorce5' (NdeI) Amorce3' (BamHI)	Résidu 302-567 dans pET-15b*
TR151 TR152	5' GGCT <u>TTCGAA</u> AAGAAGAAGACAGCCTGGCCTTG 3' 5' GCC <u>GGTACC</u> GGGCGCATGTAGGCGGTGGCG 3'	Amorce 5' (NspV) Amorce 3' (KpnI)	Résidu 302-552 dans pET-32b
XN128 XN129	5' GGCT <u>TTCGAA</u> TCTAAGAAGAAGACAGCCTG 3' 5' GCC <u>GGTACC</u> AGTGGGCGCATGTAGGCG 3'	Amorce 5' (NspV) Amorce 3' (KpnI)	Résidu 301-553 dans pET-32b
TR151 XN130	5' GGCT <u>TTCGAA</u> AAGAAGAAGACAGCCTGGCCTTG 3' 5' GCC <u>GGTACC</u> CTA AGTGGGCGCATGTAGGCG 3'	Amorce 5' (NspV) Amorce 3' (KpnI)	Résidu 302-553 dans pET-32b*
VK27 VK17	5' GGCT <u>TTCGAA</u> AAGGAGACTCGCTACTGTGCA 3' 5' GCC <u>GGTACC</u> GACTGTGGCAGGGAACCCCTC 3'	Amorce 5' (NspV) Amorce 3' (KpnI)	Résidu 180-595 dans pET-32b
VK16 VK17	5' GGCT <u>TTCGAA</u> ATGACCATGACCCTCCACACC 3' 5' GCC <u>GGTACC</u> GACTGTGGCAGGGAACCCCTC 3'	Amorce 5' (NspV) Amorce 3' (KpnI)	Résidu 1-595 dans pET-32b
TS232 TS233	5'CCAGACCCTTCAGTGA <u>AAGCTT</u> CGATGATGGGC3' 5'GGCACACAACTCCTCTCC <u>TGCAG</u> ATTCATCATGCG	Amorce5' (HindIII) Amorce 3' (PstI)*	Résidu 340-423 dans pSG5-ERα
UG247 YC154	5'GAGGGCATGGTGG <u>AGATCT</u> TCGACATGCTGCTGGC 3' 5' <u>AGATCT</u> GGATCCGAATTCTCAGAC 3'	Amorce 5' (BglII) Amorce 3' (BglII)	Résidu 424-595 dans pSG5-ERα
YW28 YS171	5' TCCG <u>CTCAG</u> CCTCTGCTGGAGACATGAGA 3' 5' GCG <u>GGATCC</u> TCAGACTGTGGCAGGGAA 3'	Amorce5' (XhoI) Amorce3' (BamHI)	Résidu 282-595 dans pG4M

Tableau 26 : Liste des oligonucléotides de sous-clonage.

* **CTA** est un codon de terminaison de la traduction.

* Le fragment PCR généré est plus long que nécessaire, il n'est pas digéré par HindIII-PstI mais par HindIII-BglII.

Numéro	Oligonucléotides	Mutation
UN85 UN86	5' TCCACCTTCTAGAAT <u>CT</u> GCCTGGCTAGAGAT 3' 5' ATCTCTAGCCAGGC <u>AGA</u> TTCTAGAAGGTGGA 3'	C381S
UN87 UN88	5' GGAACCAGGGAAAA <u>TCT</u> GTAGAGGGCATGGT 3' 5' ACCATGCCCTCTAC <u>AGA</u> TTTCCCTGGTTCC 3'	C417S
UN89 UN90	5' CTGTACAGCATGAAG <u>AGCA</u> AACGTGGTGC 3' 5' GCACCACGTTCTTGCT <u>TCT</u> TCATGCTGTACAG 3'	C530S
YS172 YS173	5' CCAGACCCTTCAGTG <u>CAG</u> CTTCGATGATGGG 3' 5' CCCATCATCGGAGCT <u>TGC</u> ACTGAAGGGTCTGG 3'	E339A
YS174 YS175	5' AGGGAAAATGTGTA <u>GCGG</u> GCATGGTGGAGAT 3' 5' ATCTCCACCATGCC <u>GCT</u> TACACATTTCCCT 3'	E419A
YS176 YS177	5' TACAGCATGAAGTG <u>GCG</u> AACGTGGTGCCCT3' 5' AGGGGCACCACGTT <u>GCG</u> CACTTCATGCTGTA3'	K531A
YA135 YA136	5' ACGTGGTGCCCTCT <u>TCT</u> GACCTGCTGCTGG 3' 5' TCCAGCAGCAGGTC <u>AGAG</u> AGGGGCACCACG 3'	Y537S

Tableau 27 : Oligonucléotides de mutagenèse.

5. Sous-clonage

5.1 Clonage d'un produit PCR

Le milieu réactionnel de PCR est d'abord déprotéinisé, puis précipité à l'éthanol. Le culot est repris dans 25µl de TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA). On digère l'ADN avec les enzymes de restriction adéquats dans un volume final de 30 µl. Les produits de la digestion sont purifiés sur gel polyacrylamide 6% non dénaturant. Le filtrat est précipité à l'éthanol. Le culot est dissout dans 20µl de TE.

5.1.1 Déprotéinisation et précipitation de l'ADN

Cette opération permet l'inactivation de toutes les enzymes résiduelles. La solution contenant l'ADN est déprotéinisée en présence d'un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1), puis avec un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1). Les protéines précipitent à l'interphase, le surnageant renfermant l'ADN ainsi purifié est prélevé.

L'ADN est précipité en présence d'acétate de sodium 0,3M pH5 par addition de 2.5 volumes d'éthanol absolu à froid (-80°C) pendant 30min. Après centrifugation (14000g, 30min, 4°C), le culot est séché et repris dans un volume approprié de tampon TE.

5.1.2 Digestion d'ADN par les enzymes de restriction

Les plasmides ou les fragments de PCR sont digérés par les enzymes de restriction en les incubant de 2 à 5 heures en présence de 2 à 10 unités d'enzyme par µg d'ADN à la température optimale pour l'enzyme et dans le tampon adéquat proposé par le fournisseur. Le résultat de la digestion est contrôlé par électrophorèse sur gel d'agarose.

5.1.3 Déphosphorylation du vecteur plasmidique

Ce traitement empêchera la ligation d'un plasmide sur lui-même, par hydrolyse de la liaison phosphodiester et élimination du groupement phosphate en 5'. Le plasmide, linéarisé par un ou plusieurs enzyme(s) de restriction, est traité à la phosphatase alcaline (20U/µg d'ADN) dans un tampon de 50mM Tris-HCl pH 9, 1mM MgCl₂, 0,1mM ZnCl₂, 1mM spermidine, incubé 30 min à 37°C, pour éviter la recircularisation. La phosphatase est inactivée par dénaturation à l'EDTA 250mM et par chauffage à 75°C pendant 15 min. Ce traitement est suivi d'une déprotéinisation et d'une précipitation à l'éthanol.

5.1.4 Ligation

La ligation entre un fragment d'ADN et un vecteur plasmidique, tous deux digérés par les mêmes enzymes de restriction, se fait dans un rapport molaire fragment/vecteur de 1 à 5. On estime la quantité d'ADN en comparant après électrophorèse sur gel d'agarose, l'intensité de fluorescence au BET sous UV d'un aliquote avec des quantités connues d'ADN.

La ligation est effectuée en présence d'1U d'ADN ligase T4 dans le tampon suivant : Tris-HCl 50mM (pH 7,6), MgCl₂ 10mM, DTT 1mM, ATP 1mM, PEG 6000 à 5%, pendant 4h à 16°C. Pour 10µl de volume réactionnel, on utilise de 50 à 250ng de vecteur déphosphorylé.

Cette étape est la plus délicate du clonage. La stoechiométrie relative entre l'insert et le vecteur est déterminante, c'est pourquoi nous testons systématiquement plusieurs

concentrations en vecteur et en insert. Parallèlement, une ligation témoin est réalisée en absence d'insert.

5.1.5 Transformation à partir du mélange de ligation.

Le milieu de ligation est utilisé pour transformer les bactéries XL1-Blue, soit par méthode chimique, soit par électroporation. L'électroporation est plus efficace mais requiert soit de diluer le mélange avant électroporation, soit d'effectuer une étape supplémentaire de précipitation du mélange de ligation pour se débarrasser des sels. Après transformation des aliquotes sont étalés sur milieu LB gélosé avec l'antibiotique adéquat.

5.1.6 Obtention du vecteur de clonage et vérification de la séquence.

Les colonies bactériennes issues de la transformation sont prélevées et amplifiées en vue de l'extraction de l'ADN plasmidique. La présence et la séquence de l'insert sont vérifiées de trois manières :

- par digestion avec les enzymes de restrictions utilisés,
- par PCR en utilisant les oligonucléotides amorces qui ont servi à amplifier le fragment à insérer,
- par séquençage de l'ADN plasmidique, afin de vérifier que la polymérase n'a pas introduit de mutation. Tous les sous-clonages par PCR ont été vérifiés au service commun de séquençage, dirigé par Serge Vicaire à l'IGBMC.

5.2 Clonage d'oligonucléotides

Cette technique permet de modifier des séquences courtes entre deux sites de restriction distincts, par insertion d'oligonucléotides double-brin. Nous avons utilisé le clonage par oligonucléotides pour modifier un plasmide (en substituant le site spécifique de l'entérokinase par celui de la thrombine dans pET-32b). Cette technique a également été employée au laboratoire pour modifier les cassettes de clonage de différents plasmides.

Les oligonucléotides ne doivent pas être trop longs (une cinquantaine de nucléotides au maximum) pour minimiser les possibilités d'erreur en cours de synthèse. Les deux

oligonucléotides simple brin sont repris dans l'eau à la concentration de 500ng/μl. Ils sont mélangés (2μl soit 1μg de chacun) et dilués dans 46μl de Tris-HCl 10mM pH7.5, NaCl 100mM. L'hybridation est réalisée après un chauffage à 75°C pendant 5min, en présence de 200mM NaCl. Les oligonucléotides hybridés sont phosphorylés pour générer des extrémités 5' phosphate capable de se liquer dans un vecteur déphosphorylé. La T4 polynucléotide kinase (10U/μg d'ADN) est utilisée en présence de 0.1mM dATP à 37°C pendant 1h. Les oligonucléotides sont purifiés par une extraction au phénol-chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol. Le culot est repris dans 10μl d'eau millipore. La ligation se fait en présence des oligonucléotides ainsi préparés (1μl estimé environ à 5ng) et de vecteur déphosphorylé (100ng). Le clonage est vérifié par séquençage de l'ADN.

C. Techniques de caractérisation fonctionnelle

1. Etude de la capacité de liaison du ligand

Les expériences de liaison du ligand ont été réalisées en utilisant l'œstradiol tritié [6,7- $^3\text{H}(\text{N})$]-œstradiol (*NEN, Du Pont De Nemours*) dont l'activité spécifique est de 40Ci/mmol.

1.1 Préparation de l'échantillon à analyser

Le domaine E sauvage ou mutant, en fusion au peptide polyhistidine, a été préparé à partir de lysat clarifié d'*E. coli* (extrait brut) dans le tampon de « *binding* ». Un culot bactérien de 20ml de culture est repris dans 1ml de tampon de « *binding* ». La technique du charbon-dextran nécessite de travailler en présence d'une forte concentration en protéines (≈ 5 mg/ml) pour saturer les pores du charbon et éviter ainsi l'adsorption du récepteur. L'extrait brut est dilué d'un facteur 100 dans un lysat clarifié de bactéries non recombinantes (dépourvu de sites récepteurs), que l'on ajuste à une concentration en protéines d'environ 5 mg/ml.

Tampon de « *binding* »

Composition	Concentration
NaCl	50 mM
Tris-HCl pH 8.0	50 mM
SB201	1 M
EDTA	1 mM
DTT	1mM

1.2 Préparation du charbon-dextran

Le charbon-dextran doit être préparé au moins une heure avant son utilisation, pour qu'il soit en suspension homogène, et ne doit pas être conservé plus de deux jours. Il demeure sous agitation constante et soutenue à 4°C.

Charbon-dextran

Composition	Quantité
Charbon actif Norit A	2g
Dextran T70	0.2g
tampon de « <i>binding</i> »	qsp. 50ml

1.3 Quantification du nombre de sites récepteurs

Des dilutions croissantes de la préparation de récepteur (d'un facteur 2 à 200, dans l'extrait bactérien) sont mélangées à 10nM de ligand tritié (40Ci/mmol) pour la mesure de la liaison totale (liaison spécifique + liaison non spécifique). La mesure de la liaison non spécifique est réalisée en présence de 10nM de ligand tritié et d'un excès de ligand froid (œstradiol à 5µM). Le mélange est laissé pendant 5 heures à 4°C. Après incubation, 50µl de charbon-dextran (charbon actif *Norit A* 4%, 0.4% dextran, en suspension dans le tampon de « *binding* ») sont ajoutés à 25µl du mélange ligand-récepteur. Au bout de 5 minutes, le charbon-dextran est sédimenté par centrifugation (à 13000 g, 4°C, 5min). Le surnageant renfermant le ligand lié est mesuré par comptage à scintillation (LS6000SC *Beckmann*). La quantité de ligand lié est exprimée en désintégrations par minute (dpm) en fonction de la dilution en récepteur. Dans la phase exponentielle de la courbe (Figure 110), la concentration en récepteur est égale à la concentration en ligand lié, ce qui permet la quantification du récepteur. La concentration en récepteur ou en ligand lié est aisément déterminée en convertissant les unités dpm en Ci, ce qui est décrit par la relation :

$$[RL^*] = \frac{B \text{ (dpm)}}{V(\text{ml}) \times AS \text{ (Ci/mmol)} \times 2,220.10^{12}} \quad (M)$$

où [RL*] représente à la fois la concentration en récepteur et celle en ligand lié, B la liaison spécifique (en dpm), V le volume du mélange ligand-récepteur (0.025ml), AS l'activité spécifique de l'œstradiol tritié (40Ci/mmol) et 2,220.10¹² le facteur de conversion de Ci en dpm (1Ci = 2,220.10¹² dpm).

Ainsi à 500 dpm, le mélange est à une concentration de 0.2 nM en récepteur. Cette dilution est adaptée aux expériences de mesure de la constante de dissociation à l'équilibre (en respectant les conditions dans lesquelles la loi d'action de masse s'applique).

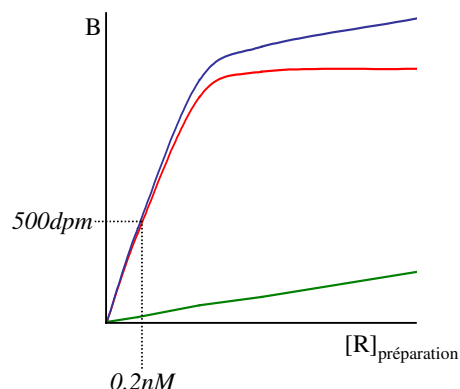


Figure 110: Quantification du nombre de sites récepteurs dans la préparation.

Le graphique représente la liaison du ligand B (totale en bleu, spécifique en rouge, non spécifique en vert) en fonction de la concentration en récepteur.

1.4 Détermination de la constante de dissociation

La préparation de récepteur est utilisée à une concentration de l'ordre de 0.2 nM et à une concentration en protéines de 5 mg/ml. Des aliquotes de 200 μ l sont mélangés à des concentrations croissantes d'œstradiol tritié (de 10^{-10} à 10^{-7} M). Le mélange est laissé à 4°C toute la nuit. Le lendemain, le mélange est fractionné en six volumes de 25 μ l. Trois servent à mesurer la quantité d'œstradiol tritié au départ (T) et ne subissent pas le traitement au charbon-dextran. Les 25 μ l sont mis à compter directement. Les trois autres permettent la mesure de la liaison totale (B) après traitement au charbon. Pour cela, 50 μ l de charbon-dextran (4%) sont ajoutés à 25 μ l du mélange ligand-récepteur. Au bout de 5 minutes, le charbon-dextran est sédimenté par centrifugation (à 13000 g, 4°C, 5min). Le surnageant renfermant le ligand lié est mesuré par comptage à scintillation en milieu liquide.

2. Test de transactivation

2.1 Culture de cellules mammifères

Environ 5.10^5 cellules COS1 sont étalées dans les puits de boîtes 6-puits (*Costar*) et cultivées dans un milieu d'Eagle modifié par Dulbecco, supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal traité par le charbon-dextran (adsorption des hormones lipidiques libres) et contenant des antibiotiques (gentamycine, streptomycine, spécilline. *Specia*). Il est important de noter que le milieu est dépourvu de rouge de phénol qui induirait une activation du récepteur des hormones œstrogènes (Berthois et al., 1986).

2.2 Transfection cellulaire

La transfection des cellules est réalisée selon la technique de la précipitation au phosphate de calcium (Chen et Okayama, 1987) où chaque précipité contient :

- 0.2µg du vecteur d'expression sauvage ou mutant,
- 2µg du vecteur vit-tk-CAT (Klein-Hitpass et al., 1986) ou 17m-tk-CAT (Chen et Evans, 1995),
- 0,5µg du plasmide CMV-βgal (contrôle interne de transfection contenant le gène de la βgalactosidase).
- la quantité d'ADN est complétée à 10µg avec le plasmide Bluescript KS⁺.

Les plasmides sont mélangés dans 420µl de TE pour transfection auxquels sont ajoutés au goutte à goutte 50µl CaCl₂ 2M. Ceci est ajouté goutte à goutte dans 480µl HBS 2× puis incubé 30min avant d'être dispersé sur les cellules.

Tampon TE pour transfection

Composition	Concentration
Tris-HCl pH8	1mM
EDTA pH8	0.05mM

HBS 2×

Composition	Concentration
NaCl	280mM
HEPES	50mM
Na ₂ HPO ₄	1.5mM

(pH ajusté à 7.12 avec NaOH)

2.3 Induction de la transactivation et lyse cellulaire

Quinze heures après la transfection cellulaire, des concentrations croissantes en œstradiol-17 β (de 10⁻¹⁰M à 10⁻⁶M) sont ajoutés dans les différents puits, en vue des expériences de dose-réponse. Quant aux expériences de compétition, elles sont réalisées en présence de 10nM œstradiol et de concentrations croissantes de ligand antagoniste (raloxifène de 10⁻¹¹M à 10⁻⁷M).

24h plus tard, les cellules sont directement lysées dans les boîtes 6-puits. Les débris cellulaires sont sédimentés à 14000 g, pendant 10min. Le cytosol est utilisé pour le dosage CAT et celui de l'activité de la β -galactosidase.

Tampon de lyse

Composition	Concentration
NaCl	10mM
MOPS	10mM
EGTA	1mM
Triton X100	1%

(pH ajusté à 6.5 avec NaOH)

2.4 Dosage de la β -galactosidase

L'activité de la β -galactosidase est mesurée sur un aliquote de 5 μ l d'extrait cellulaire dans 150 μ l de tampon β -galactosidase et 30 μ l de substrat ONPG (4mg/ml). La réaction

enzymatique, se traduisant par une coloration jaune, est stoppée par 75µl de Na₂CO₃ 1M. Le produit de la réaction est dosé par l'absorbance à 420nm.

Tampon βgalactosidase

Composition	Concentration
KCl	10mM
MgCl ₂ (6H ₂ O)	1mM
Na ₂ HPO ₄ (12H ₂ O)	60mM
NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O)	40mM
βMercaptoéthanol	50mM

2.5 Dosage de la CAT

L'expression de la CAT est dosée par ELISA (*Boehringer Mannheim/Roche*) selon les recommandations du fournisseur. Un volume adéquat d'extrait cellulaire (entre 5 et 50µl, selon l'efficacité de la transfection) est incubé 1h à 37°C en présence d'anticorps anti-CAT fixé sur le fond et les parois des puits d'une plaque « 96 puits ». L'extrait cellulaire est ensuite aspiré et les puits rincés avec 3×300µl de PBS, 0.05% Tween 20. Ce signal est amplifié par l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé à la digoxigénine, puis par un troisième anticorps anti-digoxigénine couplé à la peroxydase. Après rinçage, on rajoute le substrat de la peroxydase et on mesure l'absorbance à 405nm du milieu réactionnel coloré.

3. Estimation du taux d'expression des récepteurs dans les cellules transfectées

Cette technique permet de comparer les taux d'expression des récepteurs sauvage et mutants dans les cellules transfectées.

Pour disposer d'une quantité de récepteur adéquate à la détection immunologique par Western blot, environ 1.5.10⁶ cellules COS1 sont étalées dans des boîtes de culture de 9 cm de diamètre. Les cellules sont transfectées avec les quantités de plasmides suivantes :

- de 0.5µg à 5µg de vecteur d'expression sauvage ou mutant,

- 0,5µg du plasmide CMV-βgal,
- la quantité d'ADN est complétée à 10µg avec le plasmide Bluescript KS⁺.

Deux jours après la transfection, les cellules sont lavées dans 10ml de tampon Dulbecco-PBS 1×. Après avoir aspiré le tampon, les boîtes sont placées sur la glace. Puis on ajoute 1ml de tampon Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, NaCl 150mM froid par boîte. Les cellules sont récoltées à l'aide d'un *rubber-policeman* et transférer dans un tube Eppendorf de 1.5ml. Les cellules sont culotées par une brève centrifugation (30 secondes, 13000 g, 4°C). Le culot est mis en suspension dans un volume compris entre 100 à 300 µl de tampon de lyse.

Tampon de lyse

Composition	Concentration
NaCl	500 mM
Tris-HCl pH 7.5	50 mM
EDTA	5 mM
NP40	0.1 %
Cocktail d'inhibiteurs de protéases	1 : 1000
PMSF saturé dans l'isopropanol	1 : 500

La lyse est réalisée par choc thermique : 3 à 5 cycles de congélation/décongélation sont réalisés en alternant azote liquide et glace. Le lysat cellulaire est centrifugé pendant 15 min, à 13000 g et à 4°C. Le surnageant est analysé après séparation des protéines par électrophorèse en conditions dénaturantes par Western blotting en utilisant les anticorps appropriés (voir l'annexe X.D.4 pour la technique du Western blot).

D. Techniques biochimiques

1. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées de deux manières :

- par spectrophotométrie d'adsorption à 280nm en utilisant les coefficients d'extinction molaire calculés à partir de leur composition en acides aminés.

- par la méthode de Bradford en dosage spectrophotocolorimétrique à 595nm. Cette technique consiste à mélanger 800µl d'une dilution adéquate de protéine de concentration inconnue avec 200µl de bleu brillant de Coomassie (réactif Bio-Rad Protein Assay), d'en déterminer l'absorbance à 595nm et de la comparer à une gamme étalon de sérum albumine bovine de concentrations connues.

2. Transfert des protéines sur membranes

Les protéines séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes sont transférées du gel de polyacrylamide sur une membrane de nitrocellulose pour le Western blotting (membrane Hybond C-extra, Amersham) ou sur une membrane de PVDF pour le microséquençage. La membrane de nitrocellulose est rincée dans la solution de transfert alors que la membrane PVDF est plongée pendant 10min dans le méthanol et rincée trois fois 5min dans l'eau. Puis le gel est déposé sur la membrane, le tout étant pris en sandwich entre trois feuilles de papier Whatman imbibées au préalable de solution de transfert et placé dans l'appareil de transfert (appareil). Le transfert s'effectue à 100V pendant 1h.

Tampon de transfert (Western) 10×

Composition	Concentration	Quantité
Tris	250mM	60g
Glycine	1.9M	285g
Eau millipore	-	qsp. 2 l

Tampon de transfert (microséquençage) 25×

Composition	Concentration	Quantité
Tris	250mM	30g
Glycine	1.9M	140g
Méthanol	10%	100ml
Eau millipore	-	qsp. 1 l

3. Microséquençage

Le microséquençage N-terminal des protéines a été utilisé pour caractériser les protéines purifiées, vérifier la protéolyse des peptides de fusion et pour caractériser les cristaux de protéines. Cette technique nécessite une centaine de picomoles de protéines.

Après le transfert des protéines, la membrane de PVDF est colorée dans le tampon de coloration pendant 60 à 90sec. Le tampon de décoloration est laissé sur la membrane pendant 1h sans agitation et changé plusieurs fois. Puis la membrane est séchée. La bande de protéine à caractériser est découpée et analysée en microséquençage selon la technique d'Edman par Adrien Staub de l'IGBMC.

Tampon de coloration

Composition	Concentration
Coomassie R250	0.05%
Acide acétique	10%
Méthanol	10%

Tampon de décoloration

Composition	Concentration
Acide acétique	7%
Méthanol	5%

4. Western blotting par chimioluminescence

L'immunodétection par chimioluminescence a été utilisée pour détecter et caractériser la protéine recherchée lors de l'expression bactérienne et eucaryotique, de la purification et de la cristallisation (caractérisation de cristaux lavés et dissous dans l'eau).

- Rincer la membrane de nitrocellulose au PBS.
- Bloquer les sites de liaisons non spécifiques sur la membrane dans 200ml PBS-lait (3% de lait en poudre repris dans le PBS) pendant 30min à température ambiante et sous agitation lente.
- Fixation de l'anticorps primaire pendant 2h à température ambiante et sous agitation. L'anticorps doit être utilisé à une dilution appropriée dans 10ml PBS-lait.
- Lavage au PBS-Tween20 (0.05%) pendant 5min.
- Fixation de l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase dans 10ml PBS pendant 30min.
- Deux lavages de 5min chacun dans le PBS-Tween20
- Dépôt de la membrane sur une plaque de verre et ajout des réactifs (500µl de luminol et 500µl d'enhancer par membrane). Laisser en contact avec la membrane pendant 1 à 2min.
- Exposer le film (X-OMAT Kodak) pendant 1min.

5. Spectrométrie de masse

Les échantillons de spectrométrie de masse sont conditionnés dans une solution d'acétate d'ammonium à 50mM pH7.5. Cette solution permet d'effectuer des mesures de spectrométrie de masse aussi bien dans des conditions dissociantes que non dissociantes. Les mesures sont effectuées par Noëlle Potier.

La spectrométrie de masse sur des cristaux dissous est une technique qui a été mis au point par Valérie Lamour et Noëlle Potier. Les cristaux prélevés dans les gouttes de cristallisation à l'aide d'une cryoboucle (*Hampton*) sont lavés par trempages successifs dans la solution-mère, puis dans une solution d'acétate d'ammonium à 50mM pH7.5, et enfin dans l'eau. La dernière solution de lavage renfermant les cristaux dissous est analysée en condition dénaturante.

6. Techniques de purification des protéines

6.1 Sonication et ultracentrifugation

La lyse s'effectue principalement par sonication mais également par choc thermique lié à la décongélation des cellules. On utilise un sonicateur type VibraCell 72412 avec une sonde de diamètre 13 mm et une sonde de température. Paramètres de sonication : Intensité 40%, impulsions de 2.0 s de sonication pour 2.0 s de repos pendant au total 10 minutes. La température de l'extrait n'excède pas 10°C tout au long de la lyse. L'extrait total de lyse est clarifié par ultracentrifugation (1 heure à 45.000 g et à 4°C). Le surnageant contenant la fraction soluble est immédiatement utilisée.

6.2 Chromatographies sur colonnes

Les étapes chromatographiques ont été réalisées soit sur un système de chromatographie FPLC BioLogic Workstation (*BioRad*), soit sur un système BioCAD (Perseptive Biosystems).

6.3 Chromatographie d'affinité sur résine de chélation de cations métalliques

Nous avons utilisés deux types de colonnes pour cette chromatographie d'affinité :

- Les colonnes HiTrap Chelating (*Pharmacia*),
- La colonne POROS MC (*Applied Biosystems*).

6.3.1 Colonnes HiTrap Chelating (Pharmacia) de 1 ou 5ml :

Ces colonnes sont en polypropylène, composé biocompatible et non interactif avec les protéines. Elles sont remplies de Sépharose Haute Performance. Cette résine consiste en des billes d'agarose fortement réticulée auxquelles l'acide iminodiacétique a été couplé par des groupements éther stables, via un bras espaceur de sept atomes. Le gel est stable dans une large gamme de pH (de 2 à 14) et supporte tous les tampons couramment utilisés. Le débit de charge et d'élution est de 1 ml/min sur la colonne de 1ml et de 5ml/min sur celle de 5ml.

6.3.2 Colonne POROS MC (Perseptive Biosystems) de 20ml :

La matrice de cette résine est constituée de polystyrène-divinylbenzène (gel poreux et rigide qui ne change pas de volume après exposition au solvant) sur laquelle sont greffés les groupements fonctionnels iminodiacétate. Ce gel poreux permet la chromatographie de perfusion (Afeyan et al., 1990; Regnier, 1991) dont les caractéristiques sont les suivantes : un débit supérieur à celui sur une résine classique d'agarose ou de dextran, une capacité et une résolution élevée et indépendante du débit. Le débit de charge et d'élution utilisé est de 30ml/min.

6.3.3 Mode opératoire

Les colonnes sont fournies dépourvue d'ions métalliques et doivent être chargées avant utilisation. Après la charge de l'extrait brut, l'élution des protéines du gel peut être réalisée par différentes méthodes : modification de pH, agent chélateur ou ligand compétiteur. Nous avons choisi la dernière méthode qui consiste à éluer la protéine dans un gradient en imidazole.

Préparation de la colonne d'affinité au Zn^{2+}

Tampon de lavages et de charge	Volumes de colonne
- Eau millipore	20
- EDTA 0.05M, NaCl 0.5M	10
- Eau millipore	30
Saturation des sites iminodiacétiques :	
- $ZnCl_2$ 0.1M pH4.5	30
- NaCl 0.5M	10
Tampon de départ	10

Après dépôt de l'extrait brut on procède comme suit :

- lavage de la colonne avec 10 volumes de tampon de départ, ceci élimine les protéines liées de façon aspécifique.

- élution sélective de la protéine de fusion portant le peptide polyhisitidine dans un gradient de 0 à 0.5M imidazole dans le tampon de départ sur 15 volumes de colonne.
- nettoyage de la colonne dans une solution d'EDTA (EDTA 0.05M, NaCl 0.5M) sur 10 volumes de colonne.

6.4 Chromatographie d'échange d'ions

Nous avons utilisé la colonne POROS HQ de 1.7ml (*Applied Biosystems*). La colonne est équilibrée dans le tampon de faible force ionique pour que l'échantillon soit retenu.

Après dépôt de l'extrait brut on procède comme suit :

- lavage dans 20ml de tampon A, ce qui élimine les contaminants faiblement retenus sur la colonne,
- gradient sur 150ml de 100% A vers 70% A + 30% B, ce qui permet l'élution spécifique de la protéine d'intérêt et de séparer des espèces présentant une hétérogénéité de charge,
- lavage dans 5ml de mélange 70% A + 30% B,
- gradient de 5ml allant à 100% B,
- palier de 5ml à 100% B,
- gradient de 5ml de 100% B à 100% C,
- palier de 5ml à 100% C,
- gradient de 5ml de 100% C à 100% A, ce qui permet de régénérer la colonne.

Composition des tampons d'échangeuse d'anions

Composition	Tampon A	Tampon B	Tampon C
Tris-HCl pH 8.0	10mM	10mM	10mM
NaCl	10mM	1M	2M

6.5 Filtration sur gel

Nous avons essentiellement utilisé la colonne Fractogel EMD BioSec (S) Superformance 600-16 (600mm de long ,16mm de diamètre) de 120ml (*Merck*) à un débit de

3ml/min en collectant des fractions de 2ml. La colonne est lavée dans un volume d'eau millipore et équilibrée dans un volume de tampon de gel-filtration.

6.6 Protéolyse ménagée

6.6.1 Thrombine

La thrombinolyse ménagée est réalisée en utilisant de la thrombine bovine plasmatique (*Sigma Biochemicals*). L'enzyme est aliquotée dans un tampon de conditionnement à la concentration de 0.25 unités NIH/ μ l et conservée à -20°C .

tampon de conditionnement de la thrombine.

Composition	Concentration
Tris-HCl pH 8.0	20mM
Glycérol	30 %

6.6.2 Entérokinase

L'entérokinase (*Boehringer Mannheim*) est aliquotée dans l'eau à la concentration de 0.25 mg/ml et conservée à 4°C . Cette protéase a un pH optimal compris entre 7.0 et 8.0. Elle est inhibée par de hautes forces ioniques ($>50\text{mM}$ en NaCl par exemple).

6.6.3 Trypsine

La trypsine hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidiques du côté carboxylique des résidus lysine et arginine. L'enzyme utilisée (*Promega*) est aliquotée dans l'acide acétique 50mM et conservée à -20°C . Le milieu réactionnel recommandé est le carbonate d'ammonium 50mM à pH 7.8.

E. Cristallisation

1. Préparation de la solution protéique

La solution protéique purifiée est conditionnée dans un tampon de faible force ionique (50mM NaCl, 50mM Tris-maléate pH 8.0, $\pm 10\mu\text{M}$ ligand, $\pm 50\text{mM}$ β -mercaptoéthanol). Elle est en général concentrée à environ 10mg/ml par ultrafiltration sur Centricon-10 (*Amicon*) et centrifugée avant les essais de cristallisation (13000 g, 15 min, 4°C), ce qui permet de sédimenter les agrégats insolubles et les poussières.

2. Matrices d'échantillonnage statistique

Nous avons systématiquement démarré les essais de cristallisation d'une protéine en testant les matrices Crystal Screen I et II de *Hampton research*. Il s'agit d'un ensemble de conditions de cristallisations établies à partir de conditions de cristallisation connues et combinant plusieurs paramètres :

- les sels (de différentes natures, à différentes concentrations),
- les tampons (variation du pH entre 4.6 et 9.0),
- les agents précipitants (de différentes natures, à différentes concentrations).

Les tableaux suivants présentent les solutions des matrices Crystal Screen I et II. Il est important de noter que la valeur de pH donnée n'est pas celle du mélange, mais uniquement celle du tampon.

I. SELS	I. TAMPONS	I. AGENTS PRECIPITANTS
1. 0.02 M Calcium Chloride dihydrate	1. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	1. 30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
2. None	2. None	2. 0.4 M K/Na Tartrate tetrahydrate
3. None	3. None	3. 0.4 M mono NH_4^+ dihydrogen Phosphate
4. None	4. 0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	4. 2.0 M Ammonium Sulfate
5. 0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	5. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	5. 30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
6. 0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	6. 0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	6. 30% w/v Polyethylene Glycol 4000
7. None	7. 0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	7. 1.4 M Sodium Acetate trihydrate
8. 0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	8. 0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	8. 30% v/v iso-Propanol
9. 0.2 M Ammonium Acetate	9. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	9. 30% w/v Polyethylene Glycol 4000
10. 0.2 M Ammonium Acetate	10. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	10. 30% w/v Polyethylene Glycol 4000
11. None	11. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	11. 1.0 M mono NH_4^+ dihydrogen Phosphate
12. 0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	12. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	12. 30% v/v iso-Propanol
13. 0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	13. 0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	13. 30% v/v Polyethylene Glycol 400
14. 0.2 M Calcium Chloride dihydrate	14. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	14. 28% v/v Polyethylene Glycol 400
15. 0.2 M Ammonium Sulfate	15. 0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	15. 30% w/v Polyethylene Glycol 8000
16. None	16. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	16. 1.5 M Lithium Sulfate monohydrate
17. 0.2 M Lithium Sulfate monohydrate	17. 0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	17. 30% Polyethylene Glycol 4000
18. 0.2 M Magnesium Acetate tetrahydrate	18. 0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	18. 20% Polyethylene Glycol 8000
19. 0.2 M Ammonium Acetate	19. 0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	19. 30% v/v iso-Propanol
20. 0.2 M Ammonium Sulfate	20. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	20. 25% w/v Polyethylene Glycol 4000
21. 0.2 M Magnesium Acetate tetrahydrate	21. 0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	21. 30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
22. 0.2 M Sodium Acetate trihydrate	22. 0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	22. 30% w/v Polyethylene Glycol 4000
23. 0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	23. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	23. 30% v/v Polyethylene Glycol 400
24. 0.2 M Calcium Chloride dihydrate	24. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	24. 20% v/v iso-Propanol
25. None	25. 0.1 M Imidazole pH 6.5	25. 1.0 M Sodium Acetate trihydrate
26. 0.2 M Ammonium Acetate	26. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	26. 30 % v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
27. 0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	27. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	27. 20% v/v iso-Propanol
28. 0.2 M Sodium Acetate trihydrate	28. 0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	28. 30% w/v Polyethylene Glycol 8000
29. None	29. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	29. 0.8 M K/Na Tartrate tetrahydrate
30. 0.2 M Ammonium Sulfate	30. None	30. 30% w/v Polyethylene Glycol 8000
31. 0.2 M Ammonium Sulfate	31. None	31. 30% w/v Polyethylene Glycol 4000
32. None	32. None	32. 2.0 M Ammonium Sulfate
33. None	33. None	33. 4.0 M Sodium Formate
34. None	34. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	34. 2.0 M Sodium Formate
35. None	35. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	35. 0.8 M Na/K dihydrogen phosphate
36. None	36. 0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	36. 8% w/v Polyethylene Glycol 8000
37. None	37. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	37. 8% w/v Polyethylene Glycol 4000
38. None	38. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	38. 1.4 M tri-Sodium Citrate dihydrate
39. None	39. 0.1 M HEPES - Na pH 7.5	39. 2% v/v PEG 400, 2.0 M NH_4^+ Sulfate
40. None	40. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	40. 20% v/v isopropanol, 20% w/v PEG 4000
42. 0.05 M mono K dihydrogen Phosphate	42. None	42. 20% w/v Polyethylene Glycol 8000
43. None	43. None	43. 30% w/v Polyethylene Glycol 1500
44. None	44. None	44. 0.2 M Magnesium Formate
45. 0.2 M Zinc Acetate dihydrate	45. 0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	45. 18% w/v Polyethylene Glycol 8000
46. 0.2 M Calcium Acetate hydrate	46. 0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	46. 18% w/v Polyethylene Glycol 8000
47. None	47. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	47. 2.0 M Ammonium Sulfate
48. None	48. 0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	48. 2.0 M mono NH_4^+ dihydrogen Phosphate
49. 1.0 M Lithium Sulfate monohydrate	49. None	49. 2% w/v Polyethylene Glycol 8000
50. 0.5 M Lithium Sulfate monohydrate	50. None	50. 15% w/v Polyethylene Glycol 8000

II. SELS	II. TAMPONS	II. AGENTS PRÉCIPITANTS
1. 2.0 M Sodium chloride	1. None	1. 10% w/v PEG 6000
2. 0.01 M Hexadecyltrimethyl-NH ₄ ⁺ Bromide	2. None	2 0.5 M NaCl, 0.01 M MgCl hexahydrate
3. None	3. None	3. 25% v/v Ethylene Glycol
4. None	4. None	4. 35% v/v Dioxane
5. 2.0 M Ammonium Sulfate	5. None	5. 5% v/v iso-Propanol
6. None	6. None	6. 1.0 M Imidazole pH 7.0
7. None	7. None	7. 10% w/v PEG 1000, 10% w/v PEG 8000
8. 1.5 M Sodium Chloride	8. None	8. 10% v/v Ethanol
9. None	9. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	9. 2.0 M Sodium Chloride
10. 0.2 M Sodium Chloride	10. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	10. 30% v/v MPD
11. 0.01 M Cobaltous Chloride hexahydrate	11. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	11. 1.0 M 1,6 Hexanediol
12. 0.1 M Cadmium Chloride dihydrate	12. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	12. 30% v/v Polyethylene Glycol 400
13. 0.2 M Ammonium Sulfate	13. 0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	13. 30% w/v PEG Monomethyl Ether 2000
14. 0.2 M Na/K Tartrate tetrahydrate	14. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	14. 2.0 M Ammonium Sulfate
15. 0.5 M Ammonium Sulfate	15. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	15. 1.0 M Lithium Sulfate monohydrate
16. 0.5 M Sodium Chloride	16. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	16. 4% w/v Ethylene Imine Polymer
17. None	17. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	17. 35% v/v tert-Butanol
18. 0.01 M Ferric Chloride hexahydrate	18. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	18. 10% v/v Jeffamine M-600
19. None	19. 0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	19. 2.5 M 1,6 Hexanediol
20. None	20. 0.1 M MES pH 6.5	20. 1.6 M Magnesium Sulfate heptahydrate
21. 0.1 M Na/K dihydrogen phosphate	21. 0.1 M MES pH 6.5	21. 2.0 M Sodium Chloride
22. None	22. 0.1 M MES pH 6.5	22. 12% w/v Polyethylene Glycol 20,000
23. 1.6 M Ammonium Sulfate	23. 0.1 M MES pH 6.5	23. 10% v/v Dioxane
24. 0.05 M Cesium Chloride	24. 0.1 M MES pH 6.5	24. 30% v/v Jeffamine M-600
25. 0.01 M Cobaltous Chloride hexahydrate	25. 0.1 M MES pH 6.5	25. 1.8 M Ammonium Sulfate
26. 0.2 M Ammonium Sulfate	26. 0.1 M MES pH 6.5	26. 30% w/v Polyethylene Glycol mme 5000
27. 0.01 M Zinc Sulfate heptahydrate	27. 0.1 M MES pH 6.5	27. 25% v/v Polyethylene Glycol mme 550
28. None	28. None	28. 1.6 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 6.5
29. 0.5 M Ammonium Sulfate	29. 0.1 M HEPES pH 7.5	29. 30% v/v MPD
30. None	30. 0.1 M HEPES pH 7.5	30. 10% w/v PEG 6000, 5% v/v MPD
31. None	31. 0.1 M HEPES pH 7.5	31. 20% v/v Jeffamine M-600
32. 0.1 M Sodium Chloride	32. 0.1 M HEPES pH 7.5	32. 1.6 M Ammonium Sulfate
33. None	33. 0.1 M HEPES pH 7.5	33. 2.0 M Ammonium Formate
34. 0.05 M Cadmium Sulfate hydrate	34. 0.1 M HEPES pH 7.5	34. 1.0 M Sodium acetate
35. None	35. 0.1 M HEPES pH 7.5	35. 70% v/v MPD
36. None	36. 0.1 M HEPES pH 7.5	36. 4.3 M Sodium Chloride
37. None	37. 0.1 M HEPES pH 7.5	37. 10% w/v PEG 8000, 8% v/v EG
38. None	38. 0.1 M HEPES pH 7.5	38. 20% w/v Polyethylene Glycol 10,000
39. 0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	39. 0.1 M TRIS pH 8.5	39. 3.4 M 1,6 Hexanediol
40. None	40. 0.1 M TRIS pH 8.5	40. 25% v/v tert-Butanol
41. 0.01 M Nickel(II) Chloride hexahydrate	41. 0.1 M TRIS pH 8.5	41. 1.0 M Lithium Sulfate monohydrate
42. 1.5 M Ammonium Sulfate	42. 0.1 M TRIS pH 8.5	42. 12% v/v Glycerol anhydrous
43. 0.2 M mono NH ₄ ⁺ dihydrogen Phosphate	43. 0.1 M TRIS pH 8.5	43. 50% v/v MPD
44. None	44. 0.1 M TRIS pH 8.5	44. 20% v/v Ethanol
45. 0.01 M Nickel(II) Chloride hexahydrate	45. 0.1 M TRIS pH 8.5	45. 20% w/v Polyethylene Glycol mme 2000
46. 0.1 M Sodium Chloride	46. 0.1 M Bicine pH 9.0	46. 30% w/v Polyethylene Glycol mme 550
47. None	47. 0.1 M Bicine pH 9.0	47. 2.0 M Magnesium Chloride hexahydrate
48. 2% v/v Dioxane	48. 0.1 M Bicine pH 9.0	48. 10% w/v Polyethylene Glycol 20,000

3. Congélation des cristaux

Les cristaux sont manipulés à l'aide d'une boucle en nylon de 20 μm d'épaisseur (*cryoloop* de *Hampton research*). Un cristal est pêché dans la goutte de cristallisation et transféré dans le liquide cryoprotectant. Pour s'assurer de l'échange de solution, le cristal est sorti de la boucle et repêché. Le cristal est refroidi et conservé dans l'éthane liquide qui se solidifie au contact de l'azote liquide. Le dispositif est représenté dans la Figure 111.

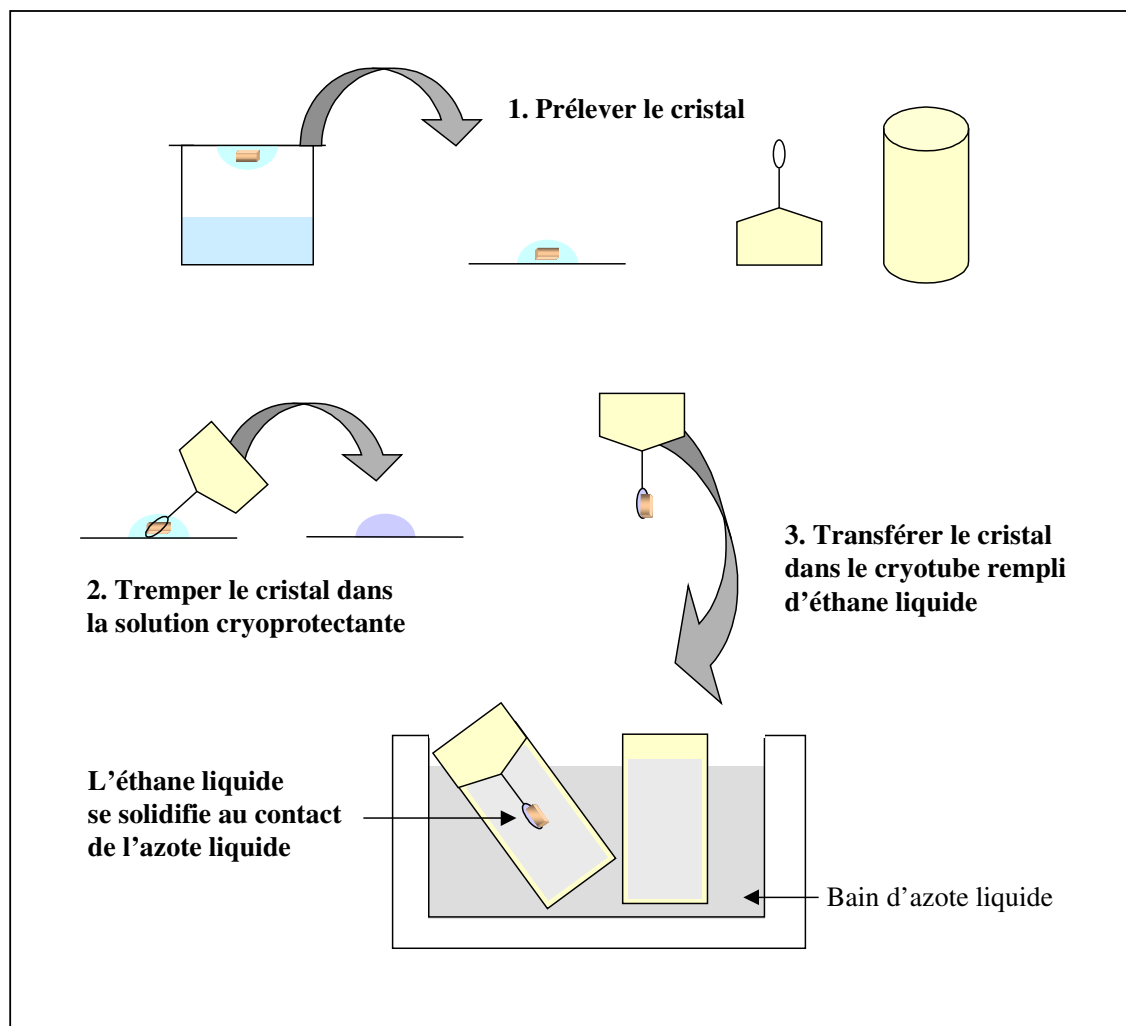


Figure 111 : Congélation des cristaux.

Le cristal poussant par diffusion de vapeur par la technique de la goutte suspendue est manipulée à l'aide d'une boucle et transféré dans la solution cryoprotectante. Puis le cristal est rapidement transféré dans l'éthane liquide. Le tube d'éthane est plongé dans l'azote liquide, dans lequel l'éthane se solidifie au bout de quelques minute

XI. Bibliographie

A

- Adler, V., Yin, Z., Tew, K.D., et Ronai, Z. (1999). Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 18, 6104-6111.
- Alland, L., Muhle, R., Hou, H., Jr., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N., and DePinho, R.A. (1997). Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression [see comments]. *Nature* 387, 49-55.
- Anghel, S.I., Perly, V., Melancon, G., Barsalou, A., Chagnon, S., Rosenauer, A., Miller, W.H., Jr., and Mader, S. (2000). Aspartate 351 of estrogen receptor alpha is not crucial for the antagonist activity of antiestrogens. *J.Biol.Chem.* 275, 20867-20872.
- Anstead, G.M., Carlson, K.E., and Katzenellenbogen, J.A. (1997). The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* 62, 268-303.
- Anzick, S.L., Kononen, J., Walker, R.L., Azorsa, D.O., Tanner, M.M., Guan, X.Y., Sauter, G., Kallioniemi, O.P., Trent, J.M., and Meltzer, P.S. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277, 965-968.
- Arbuckle, N.D., Dauvois, S., and Parker, M.G. (1992). Effects of antioestrogens on the DNA binding activity of oestrogen receptors in vitro [published erratum appears in *Nucleic Acids Res* 1992 Sep 11;20(17):4698]. *Nucleic.Acids.Res.* 20, 3839-3844.

B

- Bandyopadhyay, S. and Gronostajski, R.M. (1994). Identification of a conserved oxidation-sensitive cysteine residue in the NFI family of DNA-binding proteins. *J.Biol.Chem.* 269, 29949-29955.
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641-643.
- Baretino, D., Vivanco Ruiz, M.M., and Stunnenberg, H.G. (1994). Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. *EMBO J.* 13, 3039-3049.
- Bastien, J., Adam-Stitah, S., Riedl, T., Egly, J.M., Chambon, P., and Rochette-Egly, C. (2000). TFIIH interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7. *J.Biol.Chem.* 275, 21896-21904.
- Baumann, H., Paulsen, K., Kovacs, H., Berglund, H., Wright, A.P., Gustafsson, J.A., and Hard, T. (1993). Refined solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Biochemistry* 32, 13463-13471.
- Benecke A, Chambon, P., and Gronemeyer, H. (2000). Synergy between estrogen receptor alpha activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO Reports* 1, 151-157.
- Berry, M., Metzger, D., and Chambon, P. (1990). Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti- oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J* 9, 2811-2818.
- Bevan, C.L., Hoare, S., Claessens, F., Heery, D.M., and Parker, M.G. (1999). The AF1 and AF2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1. *Mol Cell Biol* 19, 8383-8392.
- Blicq, S., Danze, P.M., Dumur, V., Formstecher, P., and Dautrevaux, M. (1988). Inhibition of glucocorticoid receptor transformation, subunit dissociation, and temperature-dependent inactivation by various N-substituted maleimides. *Biochemistry* 27, 8436-8442.

- Blisnick, T., Morales-Betoulle, M.E., Vuillard, L., Rabilloud, T., and Braun, B.C. (1998). Non-detergent sulphobetaines enhance the recovery of membrane and/or cytoskeleton-associated proteins and active proteases from erythrocytes infected by *Plasmodium falciparum*. *Eur.J.Biochem.* 252, 537-541.
- Bocquel, M.T., Kumar, V., Stricker, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1989). The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific. *Nucleic.Acids.Res.* 17, 2581-2595.
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α [see comments]. *Nature* 375, 377-382.
- Bourguet, W., Vivat, V., Wurtz, J.M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (2000). Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. *Mol.Cell* 5, 289-298.
- Brou, C., Chaudhary, S., Davidson, I., Lutz, Y., Wu, J., Egly, J.M., Tora, L., and Chambon, P. (1993). Distinct TFIID complexes mediate the effect of different transcriptional activators. *EMBO J* 12, 489-499.
- Brown, R.S., Sander, C., and Argos, P. (1985). The primary structure of transcription factor TFIID has 12 consecutive repeats. *FEBS Lett.* 186, 271-274.
- Brünger, A.T. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* 355, 472-475.
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L.G.P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nigles, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., and Warren, G.L. (1998). Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr.D* 54, 905-921.
- Bryant, H.U. and Dere, W.H. (1998). Selective estrogen receptor modulators: an alternative to hormone replacement therapy. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 217, 45-52.
- Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A., and Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389, 753-758.
- Bunone, G., Briand, P.A., Miksicek, R.J., and Picard, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.* 15, 2174-2183.
- Burris, T.P., Nawaz, Z., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1995). A nuclear hormone receptor-associated protein that inhibits transactivation by the thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 9525-9529.

C

- Carlson, K.E., Choi, I., Gee, A., Katzenellenbogen, B.S., and Katzenellenbogen, J.A. (1997). Altered ligand binding properties and enhanced stability of a constitutively active estrogen receptor: evidence that an open pocket conformation is required for ligand interaction. *Biochemistry* 36, 14897-14905.
- Cavaillès, V., Dauvois, S., Danielian, P.S., and Parker, M.G. (1994). Interaction of proteins with transcriptionally active estrogen receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91, 10009-10013.
- Chakraborti, P.K., Garabedian, M.J., Yamamoto, K.R., and Simons, S.S.J. (1991). Creation of "super" glucocorticoid receptors by point mutations in the steroid binding domain. *J Biol Chem.* 266, 22075-22078.
- Chakraborti, P.K., Garabedian, M.J., Yamamoto, K.R., and Simons, S.S.J. (1992). Role of cysteines 640, 656, and 661 in steroid binding to rat glucocorticoid receptors. *J Biol Chem.* 267, 11366-11373.

- Chakravarti, D., LaMorte, V.J., Nelson, M.C., Nakajima, T., Schulman, I.G., Juguilon, H., Montminy, M., and Evans, R.M. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling [see comments]. *Nature* 383, 99-103.
- Chen, D., Riedl, T., Washbrook, E., Pace, P.E., Coombes, R.C., Egly, J.M., and Ali, S. (2000). Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIID and participation of CDK7. *Mol.Cell* 6, 127-137.
- Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y., and Evans, R.M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90, 569-580.
- Chen, H., Lin, R.J., Xie, W., Wilpitz, D., and Evans, R.M. (1999). Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* 98, 675-686.
- Chen, J.D. and Evans, R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors [see comments]. *Nature* 377, 454-457.
- Ciocca, D.R. and Roig, L.M. (1995). Estrogen receptors in human nontarget tissues: biological and clinical implications. *Endocr.Rev.* 16, 35-62.
- Claire, M., Rafestin-Oblin, M.E., Michaud, A., Corvol, P., Venot, A., Roth-Meyer, C., Boisvieux, J.F., and Mallet, A. (1978). Statistical test of models and computerised parameter estimation for aldosterone binding in rat kidney. *FEBS Lett.* 88, 295-299.
- Collaborative computational project No.4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica D* 50, 760-763.
- Collingwood, T.N., Urnov, F.D., and Wolffe, A.P. (1999). Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J.Mol.Endocrinol.* 23, 255-275.
- Collins, P. and Webb, C. (1999). Estrogen hits the surface [news] [see comments]. *Nat.Med.* 5, 1130-1131.
- Connolly, M. L. The molecular surface package. *J.Mol.Graphics* 11, 139-141. 1993. (GENERIC)
Ref Type: Generic
- Couse, J.F. and Korach, K.S. (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? [published erratum appears in *Endocr Rev* 1999 Aug;20(4):459]. *Endocr.Rev.* 20, 358-417.
- Czar, M.J., Lyons, R.H., Welsh, M.J., Renoir, J.M., and Pratt, W.B. (1995). Evidence that the FK506-binding immunophilin heat shock protein 56 is required for trafficking of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus. *Mol.Endocrinol.* 9, 1549-1560.

D

- Dahlman-Wright, K., Baumann, H., McEwan, I.J., Almlof, T., Wright, A.P., Gustafsson, J.A., and Hard, T. (1995). Structural characterization of a minimal functional transactivation domain from the human glucocorticoid receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 1699-1703.
- Danielian, P.S., White, R., Lees, J.A., and Parker, M.G. (1992). Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors [published erratum appears in *EMBO J* 1992 Jun;11(6):2366]. *EMBO J* 11, 1025-1033.
- Danielsen, M., Hinck, L., and Ringold, G.M. (1989). Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor. *Cell* 57, 1131-1138.
- Darimont, B.D., Wagner, R.L., Apriletti, J.W., Stallcup, M.R., Kushner, P.J., Baxter, J.D., Fletterick, R.J., and Yamamoto, K.R. (1998). Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev.* 12, 3343-3356.

- Dauvois, S., Danielian, P.S., White, R., and Parker, M.G. (1992). Antiestrogen ICI 164,384 reduces cellular estrogen receptor content by increasing its turnover. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89, 4037-4041.
- Dauvois, S., White, R., and Parker, M.G. (1993). The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci.* 106, 1377-1388.
- de la Fortelle, E. and Bricogne, G. (1997). *Methods in Enzymology* 472-494.
- DeFranco, D.B. (1999). Regulation of steroid receptor subcellular trafficking. *Cell Biochem Biophys* 30, 1-24.
- Ding, X.F., Anderson, C.M., Ma, H., Hong, H., Uht, R.M., Kushner, P.J., and Stallcup, M.R. (1998). Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC- 1): multiple motifs with different binding specificities. *Mol.Endocrinol.* 12, 302-313.
- Dittmar, K.D. and Pratt, W.B. (1997). Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90-based chaperone machinery. The initial hsp90.p60.hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation. *J Biol Chem* 272, 13047-13054.
- Ducruix, A. and Giegé, R. (1992). *Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach* (IRL Press, Oxford).
- Durand, B., Saunders, M., Gaudon, C., Roy, B., Losson, R., and Chambon, P. (1994). Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *EMBO J.* 13, 5370-5382.

E

- Eddy,E.M., Washburn,T.F., Bunch,D.O., Goulding,E.H., Gladen,B.C., Lubahn,D.B., and Korach,K.S. (1996). Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137, 4796-4805.
- Egea, P.F., Klaholz, B.P., and Moras, D. (2000a). Ligand-protein interactions in nuclear receptors of hormones. *FEBS Lett.* 476, 62-67.
- Egea, P.F., Mitschler, A., Rochel, N., Ruff, M., Chambon, P., and Moras, D. (2000b). Crystal structure of the human RXRalpha ligand-binding domain bound to its natural ligand: 9-cis retinoic acid. *EMBO J.* 19, 2592-2601.
- Elbrecht, A., Chen, Y., Adams, A., Berger, J., Griffin, P., Klatt, T., Zhang, B., Menke, J., Zhou, G., Smith, R.G., and Moller, D.E. (1999). L-764406 is a partial agonist of human peroxisome proliferator- activated receptor gamma. The role of Cys313 in ligand binding. *J Biol Chem.* 274, 7913-7922.
- Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S., and Kato, S. (1999). Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. *Mol Cell Biol* 19, 5363-5372.
- Enmark, E. and Gustafsson, J.A. (1996). Orphan nuclear receptors--the first eight years. *Mol.Endocrinol.* 10, 1293-1307.
- Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjold, M., and Gustafsson, J.A. (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 82, 4258-4265.
- Escriva, H., Langlois, M.C., Mendonca, R.L., Pierce, R., and Laudet, V. (1998). Evolution and diversification of the nuclear receptor superfamily. *Ann.N Y.Acad.Sci.* 839:143-6, 143-146.

Escriva, H., Safi, R., Hanni, C., Langlois, M.C., Saumitou-Laprade, P., Stehelin, D., Capron, A., Pierce, R., and Laudet, V. (1997). Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94, 6803-6808.

Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.

F

Felsenfeld, G. (1996). Chromatin unfolds. *Cell* 86, 13-19.

Fink, A.L. (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev.* 79, 425-449.

Fondell, J.D., Ge, H., and Roeder, R.G. (1996). Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 8329-8333.

Fondell, J.D., Roy, A.L., and Roeder, R.G. (1993). Unliganded thyroid hormone receptor inhibits formation of a functional preinitiation complex: implications for active repression. *Genes Dev.* 7, 1400-1410.

Fraser, R.A., Heard, D.J., Adam, S., Lavigne, A.C., Le Douarin, B., Tora, L., Losson, R., Rochette-Egly, C., and Chambon, P. (1998). The putative cofactor TIF1alpha is a protein kinase that is hyperphosphorylated upon interaction with liganded nuclear receptors. *J.Biol.Chem.* 273, 16199-16204.

Fraser, R.A., Rossignol, M., Heard, D.J., Egly, J.M., and Chambon, P. (1997). SUG1, a putative transcriptional mediator and subunit of the PA700 proteasome regulatory complex, is a DNA helicase. *J.Biol.Chem.* 272, 7122-7126.

Freedman, L.P., Luisi, B.F., Korszun, Z.R., Basavappa, R., Sigler, P.B., and Yamamoto, K.R. (1988a). The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature* 334, 543-546.

Freedman, L.P., Yamamoto, K.R., Luisi, B.F., and Sigler, P.B. (1988b). More fingers in hand [letter]. *Cell* 54, 444

Fritsch, M., Leary, C.M., Furlow, J.D., Ahrens, H., Schuh, T.J., Mueller, G.C., and Gorski, J. (1992). A ligand-induced conformational change in the estrogen receptor is localized in the steroid binding domain. *Biochemistry* 31, 5303-5311.

Fronsdal, K., Engedal, N., Slagsvold, T., and Saatcioglu, F. (1998). CREB binding protein is a coactivator for the androgen receptor and mediates cross-talk with AP-1. *J.Biol.Chem.* 273, 31853-31859.

Fujimoto, N. and Katzenellenbogen, B.S. (1994). Alteration in the agonist/antagonist balance of antiestrogens by activation of protein kinase A signaling pathways in breast cancer cells: antiestrogen selectivity and promoter dependence. *Mol.Endocrinol.* 8, 296-304.

G

Galigniana, M.D., Piwien-Pilipuk, G., and Assreuy, J. (1999). Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide. *Mol.Pharmacol.* 55, 317-323.

Gampe, R.T., Montana, V.G., Lambert, M.H., Miller, A.B., Bledsoe, R.K., Milburn, M.V., Kliewer, S.A., Willson, T.M., and Xu, H.E. (2000). Asymmetry in the PPAR gamma /RXR alpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol.Cell* 5, 545-555.

Giguere, V., Tini, M., Flock, G., Ong, E., Evans, R.M., and Otulakowski, G. (1994). Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev.* 8, 538-553.

Giguere, V., Yang, N., Segui, P., and Evans, R.M. (1988). Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* 331, 91-94.

- Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 2000.Jan 15;14.(2):121-41. *14*, 121-141.
- Green, S. and Chambon, P. (1986). A superfamily of potentially oncogenic hormone receptors [news]. *Nature* 324, 615-617.
- Gronemeyer, H. (1993). Transcription activation by nuclear receptors. *J Recept.Res.* 13, 667-691.
- Gronemeyer, H. and Laudet, V. (1995a). Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile.* 2, 1173-1308.
- Gronemeyer, H. and Moras, D. (1995b). Nuclear receptors. How to finger DNA [news; comment]. *Nature* 375, 190-191.
- Gu, W., Malik, S., Ito, M., Yuan, C.X., Fondell, J.D., Zhang, X., Martinez, E., Qin, J., and Roeder, R.G. (1999). A novel human SRB/MED-containing cofactor complex, SMCC, involved in transcription regulation [published erratum appears in *Mol Cell* 1999 Apr;3(4):following 541]. *Mol.Cell* 3, 97-108.
- Gustafsson, J.A. (1999). Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J.Endocrinol.* 163, 379-383.

H

- Halachmi, S., Marden, E., Martin, G., MacKay, H., Abbondanza, C., and Brown, M. (1994). Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone- induced transcription. *Science* 264, 1455-1458.
- Hall, J.M. and McDonnell, D.P. (1999). The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140, 5566-5578.
- Hanstein, B., Eckner, R., DiRenzo, J., Halachmi, S., Liu, H., Searcy, B., Kurokawa, R., and Brown, M. (1996). p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 11540-11545.
- Hard, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B.A., Dahlman, K., Freedman, L.P., Carlstedt-Duke, J., Yamamoto, K.R., Gustafsson, J.A., and Kaptein, R. (1990). Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science* 249, 157-160.
- Hayashi, S., Hajiro-Nakanishi, K., Makino, Y., Eguchi, H., Yodoi, J., and Tanaka, H. (1997). Functional modulation of estrogen receptor by redox state with reference to thioredoxin as a mediator. *Nucleic.Acids.Res.* 25, 4035-4040.
- Hayashi, T., Ueno, Y., and Okamoto, T. (1993). Oxidoreductive regulation of nuclear factor kappa B. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin. *J.Biol.Chem.* 268, 11380-11388.
- He, B., Kemppainen, J.A., and Wilson, E.M. (2000). FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH2-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor. *J.Biol.Chem.* 275, 22986-22994.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M.G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors [see comments]. *Nature* 387, 733-736.
- Hegy, G.B., Shackleton, C.H., Carlquist, M., Bonn, T., Engstrom, O., Sjöholm, P., and Witkowska, H.E. (1996). Carboxymethylation of the human estrogen receptor ligand-binding domain- estradiol complex: HPLC/ESMS peptide mapping shows that cysteine 447 does not react with iodoacetic acid. *Steroids* 61, 367-373.
- Henttu, P.M., Kalkhoven, E., and Parker, M.G. (1997). AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors. *Mol Cell Biol* 17, 1832-1839.

- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction [see comments]. *Gene* 77, 51-59.
- Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D.L., and Stallcup, M.R. (1996). GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 4948-4952.
- Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzel, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., and Glass, C.K. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor [see comments]. *Nature* 377, 397-404.
- Horwitz, K.B., Jackson, T.A., Bain, D.L., Richer, J.K., Takimoto, G.S., and Tung, L. (1996). Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol.Endocrinol.* 10, 1167-1177.
- Hu, X. and Lazar, M.A. (1999). The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* 402, 93-96.

I

- Imhof, A., Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nakatani, Y., Wolffe, A.P., and Ge, H. (1997). Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr.Biol* 7, 689-692.

J

- Jackson, T.A., Richer, J.K., Bain, D.L., Takimoto, G.S., Tung, L., and Horwitz, K.B. (1997a). The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endocrinol* 11, 693-705.
- Jackson, T.A., Richer, J.K., Bain, D.L., Takimoto, G.S., Tung, L., and Horwitz, K.B. (1997b). The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Mol Endocrinol* 11, 693-705.
- Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y., Davidson, I., Chambon, P., and Tora, L. (1994). Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell* 79, 107-117.
- Jamil,A., Croxtall,J.D., and White,J.O. (1991). The effect of anti-oestrogens on cell growth and progesterone receptor concentration in human endometrial cancer cells (Ishikawa). *J.Mol.Endocrinol.* 6, 215-221.
- Jones, P.S., Parrott, E., and White, I.N. (1999). Activation of transcription by estrogen receptor alpha and beta is cell type- and promoter-dependent. *J.Biol.Chem.* 274, 32008-32014.
- Jones, T., Bergdoll, M., and Kjeldgaard, M. (1989). O : a macromolecular modelling environment : an overview. In *Crystallographic computing and modeling methods in macromolecular design*. Bruggs & S.Ealick, ed. (Springer, New York),)
- Jurutka, P.W., Hsieh, J.C., Remus, L.S., Whitfield, G.K., Thompson, P.D., Haussler, C.A., Blanco, J.C., Ozato, K., and Haussler, M.R. (1997). Mutations in the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor identifying C-terminal amino acids required for transcriptional activation that are functionally dissociated from hormone binding, heterodimeric DNA binding, and interaction with basal transcription factor IIB, in vitro. *J.Biol.Chem.* 272, 14592-14599.

K

- Kadonaga, J.T. (1998). Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell* 92, 307-313.
- Kalkhoven, E., Valentine, J.E., Heery, D.M., and Parker, M.G. (1998). Isoforms of steroid receptor co-activator 1 differ in their ability to potentiate transcription by the oestrogen receptor. *EMBO J* 17, 232-243.

- Kang, K.I., Meng, X., Devin-Leclerc, J., Bouhouche, I., Chadli, A., Cadepond, F., Baulieu, E.E., and Catelli, M.G. (1999). The molecular chaperone Hsp90 can negatively regulate the activity of a glucocorticosteroid-dependent promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 1439-1444.
- Katahira, M., Knegt, R.M., Boelens, R., Eib, D., Schilthuis, J.G., van der Saag, P.T., and Kaptein, R. (1992). Homo- and heteronuclear NMR studies of the human retinoic acid receptor beta DNA-binding domain : sequential assignments and identification of secondary structure elements. *Biochemistry* 31, 6474-6480.
- Katzenellenbogen, J.A. and Katzenellenbogen, B.S. (1996). Nuclear hormone receptors: ligand-activated regulators of transcription and diverse cell responses. *Chem Biol* 3, 529-536.
- Kipriyanov, S.M., Moldenhauer, G., and Little, M. (1997). High level production of soluble single chain antibodies in small-scale *Escherichia coli* cultures. *J.Immunol.Methods* 200, 69-77.
- Klaholz, B.P., Mitschler, A., Belema, M., Zusi, C., and Moras, D. (2000a). Enantiomer discrimination illustrated by high-resolution crystal structures of the human nuclear receptor hRARgamma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 6322-6327.
- Klaholz, B.P., Mitschler, A., and Moras, D. (2000b). Structural basis for isotype selectivity of the human retinoic acid nuclear receptor. *J.Mol.Biol.* 302, 155-170.
- Klaholz, B.P., Renaud, J.P., Mitschler, A., Zusi, C., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1998). Conformational adaptation of agonists to the human nuclear receptor RAR gamma. *Nat.Struct.Biol.* 5, 199-202.
- Klein-Hitpass, L., Schorpp, M., Wagner, U., and Ryffel, G.U. (1986). An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus* vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. *Cell* 46, 1053-1061.
- Kleywegt, G. J. and Jones, T. A. Detection, delineation, measurement and display of cavities in macromolecular structures. *Acta Crystallogr.D* 50, 178-185. 1994. (GENERIC)
Ref Type: Generic
- Klug, A. and Rhodes, D. (1987). Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 52, 473-482.
- Kobayashi,Y., Kitamoto,T., Masuhiro,Y., Watanabe,M., Kase,T., Metzger,D., Yanagisawa,J., and Kato,S. (2000). p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor alpha and beta by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J.Biol.Chem.* 275, 15645-15651.
- Kosano, H., Stensgard, B., Charlesworth, M.C., McMahon, N., and Toft, D. (1998). The assembly of progesterone receptor-hsp90 complexes using purified proteins. *J Biol Chem* 273, 32973-32979.
- Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornert, J.M., and Chambon, P. (1986). The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J* 5, 891-897.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 5925-5930.
- Kumar, V., Green, S., Staub, A., and Chambon, P. (1986). Localisation of the oestradiol-binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor. *EMBO J* 5, 2231-2236.

L

- Lanz, R.B., McKenna, N.J., Onate, S.A., Albrecht, U., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1999). A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* 97, 17-27.

- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structure coordinates. *J.Appl.Crystallogr.* 283-291.
- Laudet, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* 19, 207-226.
- Laudet, V., Hanni, C., Coll, J., Catzeflis, F., and Stehelin, D. (1992). Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J* 11, 1003-1013.
- LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F., and McCoy, J.M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology (N Y.)* 11, 187-193.
- Lavigne, A.C., Mengus, G., Gangloff, Y.G., Wurtz, J.M., and Davidson, I. (1999). Human TAF(II)55 interacts with the vitamin D(3) and thyroid hormone receptors and with derivatives of the retinoid X receptor that have altered transactivation properties. *Mol.Cell Biol.* 19, 5486-5494.
- Lavinsky, R.M., Jepsen, K., Heinzel, T., Torchia, J., Mullen, T.M., Schiff, R., Del-Rio, A.L., Ricote, M., Ngo, S., Gemsch, J., Hilsenbeck, S.G., Osborne, C.K., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., and Rose, D.W. (1998). Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95, 2920-2925.
- Le Douarin, B., vom, B.E., Zechel, C., Heery, D., Heine, M., Vivat, V., Gronemeyer, H., Losson, R., and Chambon, P. (1996). Ligand-dependent interaction of nuclear receptors with potential transcriptional intermediary factors (mediators). *Philos.Trans.R.Soc.Lond.B.Biol Sci.* 351, 569-578.
- Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M., and Kliewer, S.A. (1995). An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J.Biol.Chem.* 270, 12953-12956.
- Levenson, A.S. and Jordan, V.C. (1998). The key to the antiestrogenic mechanism of raloxifene is amino acid 351 (aspartate) in the estrogen receptor. *Cancer Res.* 58, 1872-1875.
- Li, H., Gomes, P.J., and Chen, J.D. (1997). RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 8479-8484.
- Lotan, R. (1996). Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J.* 10, 1031-1039.
- Lubahn, D.B., Moyer, J.S., Golding, T.S., Couse, J.F., Korach, K.S., and Smithies, O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90, 11162-11166.
- Luisi, B.F., Xu, W.X., Otwinowski, Z., Freedman, L.P., Yamamoto, K.R., and Sigler, P.B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA [see comments]. *Nature* 352, 497-505.

M

- MacGregor, J.I. and Jordan, V.C. (1998). Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol.Rev.* 50, 151-196.
- MacGregor, S.J., Liu, H., Bentrem, D.J., Zapf, J.W., and Jordan, V.C. (2000). Allosteric silencing of activating function 1 in the 4-hydroxytamoxifen estrogen receptor complex is induced by substituting glycine for aspartate at amino acid 351. *Cancer Res.* 60, 5097-5105.
- Mak, H.Y., Hoare, S., Henttu, P.M., and Parker, M.G. (1999). Molecular determinants of the estrogen receptor-coactivator interface. *Mol Cell Biol* 19, 3895-3903.

- Makino, Y., Okamoto, K., Yoshikawa, N., Aoshima, M., Hirota, K., Yodoi, J., Umesono, K., Makino, I., and Tanaka, H. (1996a). Thioredoxin: a redox-regulating cellular cofactor for glucocorticoid hormone action. Cross talk between endocrine control of stress response and cellular antioxidant defense system. *J.Clin.Invest* 98, 2469-2477.
- Makino, Y., Tanaka, H., Dahlman-Wright, K., and Makino, I. (1996b). Modulation of glucocorticoid-inducible gene expression by metal ions. *Mol.Pharmacol.* 49, 612-620.
- Makino, Y., Yoshikawa, N., Okamoto, K., Hirota, K., Yodoi, J., Makino, I., and Tanaka, H. (1999). Direct association with thioredoxin allows redox regulation of glucocorticoid receptor function. *J.Biol.Chem.* 274, 3182-3188.
- Mangelsdorf, D.J. and Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841-850.
- Mangelsdorf, D.J., Umesono, K., Kliewer, S.A., Borgmeyer, U., Ong, E.S., and Evans, R.M. (1991). A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* 66, 555-561.
- Martin, P.M., Berthois, Y., and Jensen, E.V. (1988). Binding of antiestrogens exposes an occult antigenic determinant in the human estrogen receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85, 2533-2537.
- May, M., Mengus, G., Lavigne, A.C., Chambon, P., and Davidson, I. (1996). Human TAF(II28) promotes transcriptional stimulation by activation function 2 of the retinoid X receptors. *EMBO J.* 15, 3093-3104.
- McDonnell, D.P. (1999). The Molecular Pharmacology of SERMs. *Trends Endocrinol.Metab* 10, 301-311.
- McDonnell, D.P., Clemm, D.L., Hermann, T., Goldman, M.E., and Pike, J.W. (1995). Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Mol.Endocrinol.* 9, 659-669.
- McInerney, E.M., Weis, K.E., Sun, J., Mosselman, S., and Katzenellenbogen, B.S. (1998). Transcription activation by the human estrogen receptor subtype beta (ER beta) studied with ER beta and ER alpha receptor chimeras. *Endocrinology* 139, 4513-4522.
- McKenna, N.J., Lanz, R.B., and O'Malley, B.W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology [In Process Citation]. *Endocr.Rev.* 20, 321-344.
- McKenna, N.J., Nawaz, Z., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1998). Distinct steady-state nuclear receptor coregulator complexes exist in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95, 11697-11702.
- McMahon, C., Suthiphongchai, T., DiRenzo, J., and Ewen, M.E. (1999). P/CAF associates with cyclin D1 and potentiates its activation of the estrogen receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 5382-5387.
- Meinke, G. and Sigler, P.B. (1999). DNA-binding mechanism of the monomeric orphan nuclear receptor NGFI-B. *Nat.Struct.Biol.* 6, 471-477.
- Mengus, G., May, M., Carre, L., Chambon, P., and Davidson, I. (1997). Human TAF(II)135 potentiates transcriptional activation by the AF-2s of the retinoic acid, vitamin D3, and thyroid hormone receptors in mammalian cells. *Genes Dev.* 11, 1381-1395.
- Metzger, D., Ali, S., Bornert, J.M., and Chambon, P. (1995). Characterization of the amino-terminal transcriptional activation function of the human estrogen receptor in animal and yeast cells. *J Biol Chem.* 270, 9535-9542.
- Meyer, M.E., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Bocquel, M.T., Tasset, D., and Chambon, P. (1989). Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell* 57, 433-442.
- Miller, J., McLachlan, A.D., and Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 4, 1609-1614.

- Mitchell, E., Kuhn, P., and Garman, E. (1999). Demystifying the synchrotron trip: a first time user's guide. *Structure.Fold.Des* 7, R111-R121
- Montano, M.M., Ekena, K., Delage-Mourroux, R., Chang, W., Martini, P., and Katzenellenbogen, B.S. (1999). An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96, 6947-6952.
- Montano, M.M., Ekena, K., Krueger, K.D., Keller, A.L., and Katzenellenbogen, B.S. (1996). Human estrogen receptor ligand activity inversion mutants: receptors that interpret antiestrogens as estrogens and estrogens as antiestrogens and discriminate among different antiestrogens. *Mol.Endocrinol.* 10, 230-242.
- Montano, M.M., Muller, V., Trobaugh, A., and Katzenellenbogen, B.S. (1995a). The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol.Endocrinol.* 9, 814-825.
- Montano, M.M., Muller, V., Trobaugh, A., and Katzenellenbogen, B.S. (1995b). The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol* 9, 814-825.
- Morel, Y. and Barouki, R. (1998). Down-regulation of cytochrome P450 1A1 gene promoter by oxidative stress. Critical contribution of nuclear factor 1. *J.Biol.Chem.* 273, 26969-26976.
- Morel, Y. and Barouki, R. (2000). The repression of nuclear factor I/CCAAT transcription factor (NFI/CTF) transactivating domain by oxidative stress is mediated by a critical cysteine (Cys-427). *Biochem.J.* 348 Pt 1, 235-240.
- Muramatsu, M. and Inoue, S. Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochem Biophys.Res.Commun.* 2000.Apr.2;270(1):1-10. 270, 1-10.
- Muscat, G.E., Burke, L.J., and Downes, M. (1998). The corepressor N-CoR and its variants RIP13a and RIP13Delta1 directly interact with the basal transcription factors TFIIB, TAFII32 and TAFII70. *Nucleic Acids Res.* 26, 2899-2907.
- N**
- Nagpal, S., Athanikar, J., and Chandraratna, R.A. (1995). Separation of transactivation and AP1 antagonism functions of retinoic acid receptor alpha. *J.Biol.Chem.* 270, 923-927.
- Nathan, D.F. and Lindquist, S. (1995). Mutational analysis of Hsp90 function: interactions with a steroid receptor and a protein kinase. *Mol Cell Biol* 15, 3917-3925.
- Navaza, J. (1994). Amore: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallographica A* 50, 157-163.
- Nawaz, Z., Lonard, D.M., Smith, C.L., Lev-Lehman, E., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1999). The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol.Cell Biol.* 19, 1182-1189.
- Neff, S., Sadowski, C., and Miksicek, R.J. (1994). Mutational analysis of cysteine residues within the hormone-binding domain of the human estrogen receptor identifies mutants that are defective in both DNA-binding and subcellular distribution. *Mol.Endocrinol.* 8, 1215-1223.
- Neuman, E., Ladha, M.H., Lin, N., Upton, T.M., Miller, S.J., DiRenzo, J., Pestell, R.G., Hinds, P.W., Dowdy, S.F., Brown, M., and Ewen, M.E. (1997). Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. *Mol.Cell Biol.* 17, 5338-5347.

Nichols, M., Rientjes, J.M., and Stewart, A.F. (1998). Different positioning of the ligand-binding domain helix 12 and the F domain of the estrogen receptor accounts for functional differences between agonists and antagonists. *EMBO J.* 17, 765-773.

Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K., and Milburn, M.V. (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 395, 137-143.

Nuclear Receptors Nomenclature Committee (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily [letter]. *Cell* 97, 161-163.

O

Oberfield, J.L., Collins, J.L., Holmes, C.P., Goreham, D.M., Cooper, J.P., Cobb, J.E., Lenhard, J.M., Hull-Ryde, E.A., Mohr, C.P., Blanchard, S.G., Parks, D.J., Moore, L.B., Lehmann, J.M., Plunket, K., Miller, A.B., Milburn, M.V., Kliewer, S.A., and Willson, T.M. (1999). A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 6102-6106.

Oesterreich, S., Zhang, Q., Hopp, T., Fuqua, S.A., Michaelis, M., Zhao, H.H., Davie, J.R., Osborne, C.K., and Lee, A.V. (2000). Tamoxifen-bound estrogen receptor (ER) strongly interacts with the nuclear matrix protein HET/SAF-B, a novel inhibitor of ER-mediated transactivation. *Mol.Endocrinol.* 14, 369-381.

Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., and Muramatsu, M. (1998). Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betax: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic.Acids.Res.* 26, 3505-3512.

Okamoto, K., Tanaka, H., Ogawa, H., Makino, Y., Eguchi, H., Hayashi, S., Yoshikawa, N., Poellinger, L., Umesono, K., and Makino, I. (1999a). Redox-dependent regulation of nuclear import of the glucocorticoid receptor. *J.Biol.Chem.* 274, 10363-10371.

Okamoto, K., Tanaka, H., Ogawa, H., Makino, Y., Eguchi, H., Hayashi, S., Yoshikawa, N., Poellinger, L., Umesono, K., and Makino, I. (1999b). Redox-dependent regulation of nuclear import of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem.* 274, 10363-10371.

Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270, 1354-1357.

Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997). Processing X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology* 307-326.

Owens-Grillo, J.K., Czar, M.J., Hutchison, K.A., Hoffmann, K., Perdew, G.H., and Pratt, W.B. (1996). A model of protein targeting mediated by immunophilins and other proteins that bind to hsp90 via tetratricopeptide repeat domains. *J.Biol.Chem.* 271, 13468-13475.

Owens-Grillo, J.K., Hoffmann, K., Hutchison, K.A., Yem, A.W., Deibel, M.R.J., Handschumacher, R.E., and Pratt, W.B. (1995). The cyclosporin A-binding immunophilin CyP-40 and the FK506-binding immunophilin hsp56 bind to a common site on hsp90 and exist in independent cytosolic heterocomplexes with the untransformed glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 270, 20479-20484.

P

Pace, P., Taylor, J., Suntharalingam, S., Coombes, R.C., and Ali, S. (1997). Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. *J Biol Chem.* 272, 25832-25838.

Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P.J., and Scanlan, T.S. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites [see comments]. *Science* 277, 1508-1510.

- Paige, L.A., Christensen, D.J., Gron, H., Norris, J.D., Gottlin, E.B., Padilla, K.M., Chang, C.Y., Ballas, L.M., Hamilton, P.T., McDonnell, D.P., and Fowlkes, D.M. (1999). Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ER alpha and ER beta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 3999-4004.
- Pennisi, E. (1997). Differing roles found for estrogen's two receptors [news; comment]. *Science* 277, 1439
- Perkins, N.D., Felzien, L.K., Betts, J.C., Leung, K., Beach, D.H., and Nabel, G.J. (1997). Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science* 275, 523-527.
- Peters, G.A. and Khan, S.A. (1999). Estrogen receptor domains E and F: role in dimerization and interaction with coactivator RIP-140. *Mol Endocrinol* 13, 286-296.
- Pettersson, K., Grandien, K., Kuiper, G.G., and Gustafsson, J.A. (1997). Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol.Endocrinol.* 11, 1486-1496.
- Picard, D., Khursheed, B., Garabedian, M.J., Fortin, M.G., Lindquist, S., and Yamamoto, K.R. (1990). Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature* 348, 166-168.
- Pierrat, B., Heery, D.M., Chambon, P., and Losson, R. (1994). A highly conserved region in the hormone-binding domain of the human estrogen receptor functions as an efficient transactivation domain in yeast. *Gene* 143, 193-200.
- Pike, A.C., Brzozowski, A.M., Hubbard, R.E., Bonn, T., Thorsell, A.G., Engstrom, O., Ljunggren, J., Gustafsson, J.A., and Carlquist, M. (1999). Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist [In Process Citation]. *EMBO J.* 18, 4608-4618.
- Porath, J. (1992). Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr.Purif.* 3, 263-281.
- Pratt, W.B. and Toft, D.O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr.Rev.* 18, 306-360.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829-839.

R

- Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R.M., and Sigler, P.B. (1995). Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats [see comments]. *Nature* 375, 203-211.
- Rastinejad, F., Wagner, T., Zhao, Q., and Khorasanizadeh, S. Structure of the RXR-RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. *EMBO J* 2000.Mar 1;19(5.):1045.-54. 19, 1045-1054.
- Ravelli, R.B.G., Sweet, R.M., Skinner, J.M., Duisenberg, A.J.M., and Kroon, J. (1997). STRATEGY: a program to optimise the starting spindle and scan range for X-ray data collection. *J.Appl.Crystallogr.* 30, 551-554.
- Reese, J.C., Wooge, C.H., and Katzenellenbogen, B.S. (1992). Identification of two cysteines closely positioned in the ligand-binding pocket of the human estrogen receptor: roles in ligand binding and transcriptional activation. *Mol Endocrinol* 6, 2160-2166.
- Renaud, J.P., Harris, J.M., Downes, M., Burke, L.J., and Muscat, G.E. (2000). Structure-function analysis of the Rev-erbA and RVR ligand-binding domains reveals a large hydrophobic surface that mediates corepressor binding and a ligand cavity occupied by side chains. *Mol.Endocrinol.* 14, 700-717.

- Renaud, J.P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995). Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all- trans retinoic acid. *Nature* 378, 681-689.
- Rochel, N., Wurtz, J.M., Mitschler, A., Klaholz, B., and Moras, D. (2000). The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Mol.Cell* 5, 173-179.
- Rochette-Egly, C., Adam, S., Rossignol, M., Egly, J.M., and Chambon, P. (1997). Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* 90, 97-107.
- Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D.S., Lin, S.W., Dunn, J.J., and Studier, F.W. (1987). Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 56, 125-135.
- Rossmann, M.G. (1990). The molecular replacement method. *Acta Crystallogr.A* 46 (Pt 2), 73-82.

S

- Sabbah, M., Radanyi, C., Redeuilh, G., and Baulieu, E.E. (1996). The 90 kDa heat-shock protein (hsp90) modulates the binding of the oestrogen receptor to its cognate DNA. *Biochem J* 314, 205-213.
- Santoro, C., Mermod, N., Andrews, P.C., and Tjian, R. (1988). A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. *Nature* 334, 218-224.
- Scheller, A., Hughes, E., Golden, K.L., and Robins, D.M. (1998). Multiple receptor domains interact to permit, or restrict, androgen- specific gene activation. *J.Biol.Chem.* 273, 24216-24222.
- Schenk, H., Klein, M., Erdbrugger, W., Droge, W., and Schulze-Osthoff, K. (1994). Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 1672-1676.
- Schmid, F.X., Mayr, L.M., Mucke, M., and Schonbrunner, E.R. (1993). Prolyl isomerases: role in protein folding. *Adv.Protein Chem* 44:25-66, 25-66.
- Schwabe, J.W., Chapman, L., Finch, J.T., and Rhodes, D. (1993a). The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell* 75, 567-578.
- Schwabe, J.W., Chapman, L., Finch, J.T., Rhodes, D., and Neuhaus, D. (1993b). DNA recognition by the oestrogen receptor: from solution to the crystal. *Current Biology* 1, 187-204.
- Schwabe, J.W., Chapman, L., and Rhodes, D. (1995). The oestrogen receptor recognizes an imperfectly palindromic response element through an alternative side-chain conformation. *Structure.* 3, 201-213.
- Schwabe, J.W., Neuhaus, D., and Rhodes, D. (1990). Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature* 348, 458-461.
- Seielstad, D.A., Carlson, K.E., Kushner, P.J., Greene, G.L., and Katzenellenbogen, J.A. (1995). Analysis of the structural core of the human estrogen receptor ligand binding domain by selective proteolysis/mass spectrometric analysis. *Biochemistry* 34, 12605-12615.
- Sem, D.S., Casimiro, D.R., Kliewer, S.A., Provencal, J., Evans, R.M., and Wright, P.E. (1997). NMR spectroscopic studies of the DNA-binding domain of the monomer- binding nuclear orphan receptor, human estrogen related receptor-2. The carboxyl-terminal extension to the zinc-finger region is unstructured in the free form of the protein. *J.Biol.Chem.* 272, 18038-18043.

- Sheppard, K.A., Phelps, K.M., Williams, A.J., Thanos, D., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., Gerritsen, M.E., and Collins, T. (1998). Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor- κ B signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1. *J.Biol.Chem.* 273, 29291-29294.
- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., and Greene, G.L. (1998). The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 95, 927-937.
- Smith, C.L. (1998). Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol.Reprod.* 58, 627-632.
- Smith, C.L., Nawaz, Z., and O'Malley, B.W. (1997a). Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol* 11, 657-666.
- Smith, C.L., Nawaz, Z., and O'Malley, B.W. (1997b). Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol* 11, 657-666.
- Smith, C.L., Onate, S.A., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1996). CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 8884-8888.
- Smith, D.F., Whitesell, L., Nair, S.C., Chen, S., Prapapanich, V., and Rimerman, R.A. (1995). Progesterone receptor structure and function altered by geldanamycin, an hsp90-binding agent. *Mol.Cell Biol.* 15, 6804-6812.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J.Mol.Biol.* 189, 113-130.
- Suen, C.S., Berrodin, T.J., Mastroeni, R., Cheskis, B.J., Lyttle, C.R., and Frail, D.E. (1998). A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity. *J.Biol.Chem.* 273, 27645-27653.
- Sun, J., Meyers, M.J., Fink, B.E., Rajendran, R., Katzenellenbogen, J.A., and Katzenellenbogen, B.S. (1999). Novel ligands that function as selective estrogens or antiestrogens for estrogen receptor- α or estrogen receptor- β [In Process Citation]. *Endocrinology* 140, 800-804.

T

- Takeshita, A., Cardona, G.R., Koibuchi, N., Suen, C.S., and Chin, W.W. (1997). TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem* 272, 27629-27634.
- Tanenbaum, D.M., Wang, Y., Williams, S.P., and Sigler, P.B. (1998). Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95, 5998-6003.
- Tcherepanova, I., Puigserver, P., Norris, J.D., Spiegelman, B.M., and McDonnell, D.P. (2000). Modulation of estrogen receptor- α transcriptional activity by the coactivator PGC-1. *J.Biol.Chem.* 275, 16302-16308.
- Tetel, M.J., Giangrande, P.H., Leonhardt, S.A., McDonnell, D.P., and Edwards, D.P. (1999). Hormone-dependent interaction between the amino- and carboxyl-terminal domains of progesterone receptor in vitro and in vivo. *Mol.Endocrinol.* 13, 910-924.

- Thompson, J.D., Plewniak, F., Thierry, J., and Poch, O. (2000). DbClustal: rapid and reliable global multiple alignments of protein sequences detected by database searches. *Nucleic Acids Res.* 28, 2919-2926.
- Tjian, R. and Maniatis, T. (1994). Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77, 5-8.
- Tonetti, D.A. and Jordan, V.C. (1999). The estrogen receptor: a logical target for the prevention of breast cancer with antiestrogens. *J.Mammary.Gland.Biol.Neoplasia.* 4, 401-413.
- Tong, W., Perkins, R., Xing, L., Welsh, W.J., and Sheehan, D.M. (1997). QSAR models for binding of estrogenic compounds to estrogen receptor alpha and beta subtypes. *Endocrinology* 138, 4022-4025.
- Tora, L., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Gaub, M.P., and Chambon, P. (1988). The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature* 333, 185-188.
- Tora, L., Mullick, A., Metzger, D., Ponglikitmongkol, M., Park, I., and Chambon, P. (1989). The cloned human oestrogen receptor contains a mutation which alters its hormone binding properties. *EMBO J* 8, 1981-1986.
- Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear- receptor function [see comments]. *Nature* 387, 677-684.
- Trapp, T. and Holsboer, F. (1996). Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptors increases the functional diversity of corticosteroid action. *Trends Pharmacol.Sci.* 17, 145-149.
- Tremblay, A., Tremblay, G.B., Labrie, F., and Giguere, V. (1999). Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol.Cell* 3, 513-519.
- Tremblay, G.B., Tremblay, A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Labrie, F., and Giguere, V. (1997). Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol.Endocrinol.* 11, 353-365.
- Tremblay, G.B., Tremblay, A., Labrie, F., and Giguere, V. (1999). Dominant activity of activation function 1 (AF-1) and differential stoichiometric requirements for AF-1 and -2 in the estrogen receptor alpha-beta heterodimeric complex. *Mol Cell Biol* 19, 1919-1927.
- Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu.Rev.Biochem.* 63, 451-486.
- Tzukerman, M.T., Esty, A., Santiso-Mere, D., Danielian, P., Parker, M.G., Stein, R.B., Pike, J.W., and McDonnell, D.P. (1994). Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol.Endocrinol.* 8, 21-30.

U

- Uppenberg, J., Svensson, C., Jaki, M., Bertilsson, G., Jendeberg, L., and Berkenstam, A. (1998). Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPARgamma. *J.Biol.Chem.* 273, 31108-31112.

V

- Vanacker, J.M., Delmarre, C., Guo, X., and Laudet, V. (1998). Activation of the osteopontin promoter by the orphan nuclear receptor estrogen receptor related alpha. *Cell Growth Differ.* 9, 1007-1014.
- Voegel, J.J., Heine, M.J., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1998). The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *EMBO J* 17, 507-519.

- Voegel, J.J., Heine, M.J., Zechel, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* 15, 3667-3675.
- Vosters, A.F., Evans, D.B., Tarpley, W.G., and Sharma, S.K. (1992). On the engineering of rDNA proteins for purification by immobilized metal affinity chromatography: applications to alternating histidine-containing chimeric proteins from recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expr.Purif.* 3, 18-26.
- W**
- Wagner, R.L., Apriletti, J.W., McGrath, M.E., West, B.L., Baxter, J.D., and Fletterick, R.J. (1995). A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* 378, 690-697.
- Wallberg, A.E., Neely, K.E., Gustafsson, J.A., Workman, J.L., Wright, A.P., and Grant, P.A. (1999). Histone acetyltransferase complexes can mediate transcriptional activation by the major glucocorticoid receptor activation domain. *Mol.Cell Biol.* 19, 5952-5959.
- Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J.M., Jeltsch, J.M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., and Waterfield, M. (1985). Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 82, 7889-7893.
- Webb, P., Lopez, G.N., Uht, R.M., and Kushner, P.J. (1995). Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol* 9, 443-456.
- Webb, P., Nguyen, P., Shinsako, J., Anderson, C., Feng, W., Nguyen, M.P., Chen, D., Huang, S.M., Subramanian, S., McKinerney, E., Katzenellenbogen, B.S., Stallcup, M.R., and Kushner, P.J. (1998). Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Mol Endocrinol* 12, 1605-1618.
- Webster, N., Jin, J.R., Green, S., Hollis, M., and Chambon, P. (1988). The yeast UASG is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 trans-activator. *Cell* 52, 169-178.
- Webster, N.J., Green, S., Jin, J.R., and Chambon, P. (1988). The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell* 54, 199-207.
- Webster, N.J., Green, S., Tasset, D., Ponglikitmongkol, M., and Chambon, P. (1989). The transcriptional activation function located in the hormone-binding domain of the human oestrogen receptor is not encoded in a single exon. *EMBO J* 8, 1441-1446.
- Wehling, M. (1997). Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu.Rev.Physiol* 59, 365-393.
- Williams, S.P. and Sigler, P.B. (1998). Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature* 393, 392-396.
- Willson, T.M., Norris, J.D., Wagner, B.L., Asplin, I., Baer, P., Brown, H.R., Jones, S.A., Henke, B., Sauls, H., Wolfe, S., Morris, D.C., and McDonnell, D.P. (1997). Dissection of the molecular mechanism of action of GW5638, a novel estrogen receptor ligand, provides insights into the role of estrogen receptor in bone. *Endocrinology* 138, 3901-3911.
- Wolf, D.M. and Jordan, V.C. (1994). The estrogen receptor from a tamoxifen stimulated MCF-7 tumor variant contains a point mutation in the ligand binding domain. *Breast Cancer Res.Treat.* 31, 129-138.
- Wu, X., Bishopric, N.H., Discher, D.J., Murphy, B.J., and Webster, K.A. (1996). Physical and functional sensitivity of zinc finger transcription factors to redox change. *Mol.Cell Biol.* 16, 1035-1046.
- Wurtz, J.M., Bourguet, W., Renaud, J.P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., and Gronemeyer, H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors [see comments] [published erratum appears in *Nat Struct Biol* 1996 Feb;3(2):206]. *Nat.Struct.Biol.* 3, 87-94.

X

Xu, H.E., Lambert, M.H., Montana, V.G., Parks, D.J., Blanchard, S.G., Brown, P.J., Sternbach, D.D., Lehmann, J.M., Wisely, G.B., Willson, T.M., Kliewer, S.A., and Milburn, M.V. (1999). Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator- activated receptors. *Mol.Cell* 3, 397-403.

Y

Yoshinaga, S.K., Peterson, C.L., Herskowitz, I., and Yamamoto, K.R. (1992). Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science* 258, 1598-1604.

Z

Zhang, Q.X., Borg, A., Wolf, D.M., Oesterreich, S., and Fuqua, S.A. (1997). An estrogen receptor mutant with strong hormone-independent activity from a metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 57, 1244-1249.

Zhang, X., Jeyakumar, M., Petukhov, S., and Bagchi, M.K. (1998). A nuclear receptor corepressor modulates transcriptional activity of antagonist-occupied steroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 12, 513-524.

Zhao, Q., Chasse, S.A., Devarakonda, S., Sierk, M.L., Ahvazi, B., and Rastinejad, F. (2000). Structural basis of RXR-DNA interactions. *J.Mol.Biol.* 296, 509-520.

Zhao, Q., Khorasanizadeh, S., Miyoshi, Y., Lazar, M.A., and Rastinejad, F. (1998). Structural elements of an orphan nuclear receptor-DNA complex. *Mol.Cell* 1, 849-861.

Zwijsen, R.M., Buckle, R.S., Hijmans, E.M., Loomans, C.J., and Bernards, R. (1998). Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1. *Genes Dev.* 12, 3488-3498.

Zwijsen, R.M., Wientjens, E., Klompmaker, R., van der, S.J., Bernards, R., and Michalides, R.J. (1997). CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* 88, 405-415.

XII. Liste des publications et communications

Publications

Publié dans *Breast Cancer Research* 2000, **2** : 353-359

Marc Ruff, Monique Gangloff, Jean-Marie Wurtz and Dino Moras. *Estrogen receptor transcription and transactivation structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors*

Soumis à *Journal of Medicinal Chemistry*

Ursula Egner, Nikolaus Heinrich, Marc Ruff, Monique Gangloff, Anke Mueller Fahrnow & Jean-Marie Wurtz. *Different ligands - different receptor conformations: Modelling of the hER α LBD in complex with agonists and antagonists.*

Soumis à *Journal of Biological Chemistry*

Monique Gangloff, Marc Ruff, Sylvia Eiler, Sylvie Duclaud, Jean-Marie Wurtz and Dino Moras. *Crystal structure of a mutant hER α LBD reveals key structural features for the mechanism of partial agonism*

Soumis à *Protein Expression and Purification*

Marc Ruff, Monique Gangloff, Sylvia Eiler, Sylvie Duclaud and Dino Moras. Overexpression, purification and crystal structure of native ER α LBD

Communication orale et Poster

13th X-ray crystallography REGIO meeting, Limpach (Germany), October 6-8, 1999.

« Crystal structure of a mutant Estrogen Receptor »

26th FEBS Congress, FEBS-99, Nice (France), June 19-24, 1999.

« The crystal structure of a mutant hER α provides evidence for the molecular mechanism of agonist/antagonist switch »

2nd Symposium on Protein Structure Analysis for Biomedical Research, Murnau (Germany), March 30 – April 1, 2000.

“Role of cysteine residues in the ligand-binding domain of Estrogen Receptor α ”

Prix Alexandre Joël

“Etude des relations structure-fonction dans le récepteur des œstrogènes”
remis par l’Association pour la Recherche sur le Cancer, Villejuif (France), lors de la *Journée des boursiers de l’ARC*, le 16 Novembre, 1999.

Étude de l'agonisme et de l'antagonisme dans le récepteur alpha des hormones œstrogènes par mutagenèse dirigée et cristallographie

Le récepteur des hormones œstrogènes (ER) est un régulateur transcriptionnel ligand-dépendant qui appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. Il constitue une cible pharmaceutique de premier ordre dans la thérapie de remplacement hormonale de la ménopause et le traitement du cancer du sein. Le domaine de liaison du ligand de ER α a été étudié par cristallographie et par mutagenèse dirigée. Les structures cristallographiques des domaines sauvage et mutant, dans lequel trois cystéines ont été changées en sérines, tous deux liés à un agoniste naturel, l'œstradiol-17 β , ont été résolues et comparées. Alors que la protéine sauvage présente une conformation agoniste typique, permettant le recrutement de coactivateurs, le triple mutant adopte une conformation antagoniste identique à celle du complexe lié à l'antagoniste tamoxifène (Shiau et al., 1998). Dans des cellules transfectées, ce mutant est toutefois capable d'induire une activité transcriptionnelle, quoique réduite par rapport à celle du récepteur sauvage, et fixe le ligand avec une haute affinité. L'effet additif des mutations simples, doubles et triple sur la diminution de l'activité transcriptionnelle du récepteur suggère un mécanisme pour l'agonisme partiel. D'autre part, la structure cristallographique d'un complexe lié à un antagoniste stéroïdien a été résolu, ce qui a permis d'élucider le mode de liaison de ce ligand. En dévoilant la flexibilité de la poche de fixation du ligand, ces résultats pourront être mis à profit dans la conception assistée de nouveaux ligands.

Agonism and antagonism in estrogen receptor alpha investigated by mutagenesis and crystallography

The estrogen receptor (ER) is a member of the nuclear receptor superfamily of ligand-regulated transcription factors. It is a major pharmaceutical target for hormone replacement therapy in menopausal women and for chemotherapeutic drugs in certain reproductive cancers. The ligand-binding domain of ER α has been analysed by means of crystallographic and mutagenesis studies. The crystal structures of wild type and a cysteine to serine triple mutant protein both bound to the natural agonist, estradiol, have been solved and compared. Whereas the wild type adopts a typical agonist conformation, allowing the recruitment of coactivators, the triple mutant protein adopts an alternative conformation, that is perfectly superimposed with an antagonist structure, such as the tamoxifen-bound complex (Shiau et al., 1998). When analysed in transfected cells, using either full length ER or chimeric GAL-ER receptor, this mutant displayed unexpected transcriptional activity and unaffected ligand-binding capacity. The additive effect of single, double and triple cysteine to serine mutations on the decrease of the receptor's activity suggests a mechanism for partial agonism. The crystal structure of a steroidal antagonist-bound ligand-binding domain is presented. The binding mode has been analysed in the light of other available ER structures. This results may be of use in the structure-based drug design by exploring the flexibility of the ligand-binding pocket.

Discipline : Biologie structurale, Biochimie, Biologie moléculaire

Mots-clefs : récepteur nucléaire, transcription, œstrogènes, cristallographie, mutagenèse, relation structure fonction, agonisme, antagonisme

Laboratoire : UPR 9004 de Biologie et Génomique Structurales

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

1, rue Laurent Fries, BP 163, F-67404 Illkirch CEDEX