

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THÈSE

Présentée pour l'obtention du titre de :

Docteur de l'Université de Strasbourg

Discipline : Sciences du vivant

Mention : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Par

Tiphaine HUET

**EXPLOITATION DE LA RELATION STRUCTURE-FONCTION
DU RÉCEPTEUR NUCLÉAIRE DE LA VITAMINE D POUR
L'ÉLUCIDATION DES MÉCANISMES DE LA SIGNALISATION
DE LA VITAMINE D**

Soutenue le 8 juin 2010 devant le jury :

| | |
|--------------------|--|
| Rapporteur externe | Professeur Vincent Laudet, Lyon, France |
| Rapporteur externe | Professeur Roger Bouillon, Louvain, Belgique |
| Rapporteur interne | Docteur Philippe Dumas, Strasbourg, France |
| Directeur de thèse | Docteur Dino Moras, Illkirch, France |

Thèse préparée au sein du Département de Biologie Structurale et Génomique
de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
UDS, CNRS UMR7104, INSERN U964, Illkirch, France

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Vincent Laudet, Roger Bouillon et Philippe Dumas pour avoir accepté de juger mon travail de thèse,

Je remercie vivement Dino Moras pour m'avoir fait confiance en m'accueillant dans son laboratoire et Natacha Rochel pour m'avoir encadré, pour sa disponibilité, ses conseils et son soutien.

Je remercie Fabrice Ciesielski qui a commencé le projet.

Mes remerciements vont aussi aux membres de l'équipe : Judith, Maria, Carole, Pierre pour leurs précieux conseils. Je remercie vivement les anciens membres Teru pour m'avoir aidé et conseillé en cristallisation et cristallographie, Nick pour m'avoir initiée à la polarisation de fluorescence. Je remercie également André pour son aide durant la congélation et l'acquisition des données.

J'adresse mes remerciements à tous les membres du Département de Biologie Structurale et Génomique, les membres de la plateforme LBGS Loubna, Edouard, Alastair, Pierre, Catherine et Didier pour leurs conseils en biologie moléculaire, purification de protéines, cristallisation et collecte des données synchrotron. Je remercie chaleureusement les personnes du module 1065 (Benoit, Nicolas, Yann, Sylvia, Julie), Isabelle et Alexandra mes anciennes voisines de paillasses et tous mes collègues du CEBGS, trop nombreux pour tous les citer.

Je remercie Noëlle, Hélène, Manuela, Cédric, Daniel, Adeline et Frank pour leur disponibilité dans les expériences de masse spectrométrie.

Je tiens à remercier également Anne, Laetitia et Armelle pour leur précieuse aide dans les tâches administratives.

Je remercie le Conseil Régional d'Alsace et la société Novalix pour avoir financé mes trois années de thèse et l'ARC pour m'avoir accordé un financement supplémentaire de six mois.

Enfin je tiens à remercier tout particulièrement mes parents, ma sœur et mon frère pour m'avoir soutenu et encouragé dans mes choix et dont l'affection a été précieuse durant le déroulement de ce travail.

Je remercie également Maria Gonzalez pour s'être si bien occupée de ma fille Hyaline ces trois dernières années.

SOMMAIRE.

| | |
|--|----|
| 1. SOMMAIRE..... | 3 |
| 2. ABRÉVIATIONS..... | 6 |
| 3. INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX..... | 9 |
| 4. I- INTRODUCTION..... | 13 |
| I.1. LE RECEPTEUR NUCLEAIRE DE LA VITAMINE D : VDR..... | 15 |
| I.1.1. Organisation modulaire du VDR..... | 15 |
| I.1.2. Mécanisme moléculaire de l'activation du VDR..... | 17 |
| I.1.3. Corépresseurs, coactivateurs et VDRE..... | 18 |
| I.2. LES EFFETS NON-GENOMIQUES DE LA VITAMINE D..... | 22 |
| I.2.1. Rôle du récepteur cytosolique 1,25D3-MARRS dans les fonctions non-génomiques..... | 25 |
| I.2.2. Outils d'étude in vivo..... | 28 |
| I.2.3. Inconvénients, limitations de ces outils..... | 31 |
| 5. II- OBJECTIF DE L'ÉTUDE..... | 32 |
| 6. III- MÉTHODES..... | 33 |
| III.1. MUTAGENÈSE DIRIGÉE..... | 33 |
| III.1.1. Protocole utilisé..... | 33 |
| III.1.2. Problèmes rencontrés..... | 34 |
| III.1.3. Protocole retenu..... | 35 |
| III.2. EXPRESSION ET PURIFICATION DU DOMAINE DE FIXATION DU LIGAND DU MUTANT zVDR _{L337H} | 36 |
| III.2.1. Production DU zVDR _{L337H} dans E. coli..... | 36 |
| III.2.2. Préparation de l'extrait brut..... | 37 |
| III.2.3. Étape de chromatographie d'affinité sur résine chélatant les ions cobalt..... | 37 |
| III.2.4. Étape de protéolyse du polypeptide de fusion N-terminal..... | 38 |
| III.2.5. Étape de chromatographie par exclusion de taille..... | 38 |
| III.2.6. Formation du complexe récepteur/ligand/peptide coactivateur..... | 39 |
| III.3. ÉTUDE CRISTALLOGRAPHIQUE DES COMPLEXES zVDR-LBD/LIGANDS/PEPTIDE COACTIVATEUR..... | 40 |
| III.3.1. Principe..... | 40 |
| III.3.2. Condition et technique de cristallisation utilisée..... | 40 |
| III.3.3. Optimisation des cristaux..... | 41 |
| III.3.4. Cristaux obtenus et problèmes rencontrés..... | 41 |
| III.3.5. Solutions..... | 42 |
| III.3.6. Traitement des données de diffraction..... | 43 |

| | |
|---|-----------|
| III.4. DETERMINATION DES AFFINITES RELATIVES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE..... | 46 |
| III.4.1. Méthode utilisée : ESI-TOF..... | 46 |
| III.4.2. Préparation de l'échantillon..... | 47 |
| III.5. EXPERIENCES DE TRANSACTIVATION PAR LA TECHNIQUE DU GENE-RAPPORTEUR..... | 47 |
| III.5.1. Culture des cellules MCF-7..... | 47 |
| III.5.2. Transfection des cellules..... | 48 |
| III.5.3. Traitement des cellules..... | 48 |
| III.5.4. Récolte et lyse des cellules..... | 48 |
| III.5.5. Test β -galactosidase..... | 49 |
| III.5.6. Test luciférase..... | 49 |
| III.6. MESURES D'ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE : ETUDE DU RECRUTEMENT DU PEPTIDE COACTIVATEUR SRC-1 PAR LE VDR SAUVAGE ET LE VDR MUTE..... | 50 |
| 7. IV- RÉSULTATS..... | 51 |
| IV.1. ÉTUDE DU MUTANT VDR LEU337HIS LIÉ A SON LIGAND NATUREL ET AU GEMINI..... | 51 |
| IV.1.1. Effet de la mutation Leu337His sur l'activité génomique du VDR en présence du Calcitriol ou du Gemini..... | 51 |
| IV.1.2. Détermination des affinités relatives du Calcitriol et du Gemini pour le mutant zVDR _{L337H} : expériences de spectrométrie de masse ESI-TOF..... | 53 |
| IV.1.3. Étude de l'effet de la mutation Leu337His sur le recrutement d'un peptide coactivateur en présence du Calcitriol ou du Gemini..... | 55 |
| IV.1.4. Analyse des modèles tridimensionnels obtenus par cristallographie..... | 58 |
| IV.1.4.1. Modèle tridimensionnel du mutant VDR _{L337H} de poisson-zèbre lié au Calcitriol..... | 58 |
| IV.1.4.1.1 Architecture globale du complexe zVDR-LBD _{L337H} /Calcitriol..... | 58 |
| IV.1.4.1.2. Cavité de fixation du ligand..... | 60 |
| IV.1.4.2. Modèle tridimensionnel du mutant VDR _{L337H} de poisson-zèbre lié au Gemini..... | 64 |
| IV.1.4.2.1. Structure globale du complexe zVDR-LBD _{L337H} /Gemini..... | 64 |
| IV.1.4.2.2. Cavité de fixation du ligand..... | 65 |
| IV.1.4.3. Mécanisme moléculaire de discrimination du ligand..... | 70 |
| IV.1.4.4. Conclusion..... | 71 |
| IV.2. ÉTUDE FONCTIONNELLE ET STRUCTURALE DE COMPLEXES zVDR-LBD/ANALOGUES DU GEMINI..... | 72 |
| IV.2.1. Étude de l'activité génomique du VDR en présence des ligands BXL-72 et BXL-97..... | 73 |
| IV.2.1.1. Effet de la mutation Leu337His sur le zVDR en présence des ligands BXL-72 et BXL-97..... | 73 |
| IV.2.1.2. Les ligands BXL-72 et BXL-97 sont de puissants superagonistes du VDR..... | 75 |
| IV.2.2. Détermination des affinités relatives des ligands BXL-72 et BXL-97 pour le zVDR sauvage..... | 76 |
| IV.2.3. Étude du recrutement du peptide coactivateur SRC-1 par le VDR en présence du BXL-72 ou du BXL- 97..... | 77 |
| IV.2.4. Étude structurale du VDR sauvage et muté lié à des analogues du Gemini..... | 78 |
| IV.2.4.1. Modèle tridimensionnel du VDR de poisson-zèbre lié au ligand BXL-72..... | 78 |

| | |
|--|------------|
| IV.2.4.1.1. Architecture globale du complexe zVDR-LBD/BXL-72. | 78 |
| IV.2.4.1.2. Cavité de fixation du ligand et mécanisme de reconnaissance du ligand. | 79 |
| IV.2.4.2. Modèle tridimensionnel du VDR de poisson-zèbre lié au ligand BXL-97. | 85 |
| IV.2.4.2.1. Architecture globale du complexe zVDR-LBD/BXL-97. | 85 |
| IV.2.4.2.2. Cavité de fixation du ligand et mécanisme de reconnaissance du ligand. | 86 |
| IV.2.4.3. Mécanisme moléculaire de reconnaissance des analogues du Gemini par le VDR sauvage. | 93 |
| IV.2.4.4. Modèle tridimensionnel du mutant VDR _{L337H} de poisson-zèbre lié au ligand BXL-72. | 94 |
| IV.2.4.4.1. Architecture globale du complexe zVDR-LBD _{L337H} /BXL-72. | 94 |
| IV.2.4.4.2. Cavité de fixation du ligand et mécanisme de reconnaissance du ligand. | 95 |
| IV.2.4.5. Modèle tridimensionnel du mutant VDR _{L337H} de poisson-zèbre lié au ligand BXL-97. | 98 |
| IV.2.4.5.1. Architecture globale du complexe zVDR-LBD _{L337H} /BXL-97. | 99 |
| IV.2.4.5.2. Cavité de fixation du ligand et mécanisme de reconnaissance du ligand. | 100 |
| IV.2.4.6. Mécanisme moléculaire de reconnaissance des analogues du Gemini par le mutant zVDR-LBD _{L337H} | 103 |
| 8. V- DISCUSSION ET PERSPECTIVES. | 104 |
| 9. VI- ANNEXES TECHNIQUES. | 108 |
| V.1. METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE. | 108 |
| V.1.1. Vecteurs de clonage et vecteurs d'expression utilisés. | 108 |
| V.1.2. Amplification des vecteurs et extraction d'ADN plasmidique. | 108 |
| V.1.3. Electrophorèse en gel d'agarose. | 108 |
| V.2. TECHNIQUES DE CULTURE BACTERIENNE ET PRODUCTION DE PROTEINES. | 109 |
| V.2.1. Souches bactériennes utilisées. | 109 |
| V.2.2. Milieux de culture. | 110 |
| V.2.3. Préparation des bactéries chimio-compétentes. | 111 |
| V.2.4. Transformation de bactéries chimio-compétentes. | 112 |
| V.2.5. Culture et production de protéines dans <i>Escherichia coli</i> | 112 |
| V.3. TECHNIQUES DE PURIFICATIONS DE PROTEINES. | 113 |
| V.3.1. Extraction de l'extrait soluble. | 113 |
| V.3.2. Chromatographies sur colonnes. | 114 |
| V.4. CARACTERISATION DES PROTEINES PURIFIEES. | 116 |
| V.4.1. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, SDS-PAGE. | 116 |
| V.4.2. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives gradient 8-25 %. | 119 |
| V.4.3. Dosage des protéines en solution. | 119 |
| V.4.4. Caractérisation par spectrométrie de masse. | 119 |
| 10. VII- COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES. | 120 |
| 11. VIII- BIBLIOGRAPHIE. | 121 |

ABRÉVIATIONS.

A : adénine

Å : angström

ADN : acide désoxyribonucléique

AMPc : adénosine mono-phosphate cyclique.

AF : activation function

AR : androgen receptor

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATP : adénosine tri-phosphate

C : cytosine

CBP : CREB binding protein

CREB : cyclic AMP response element-binding

Da : dalton

DBD : DNA binding domain.

DMSO: diméthylsulfoxyde

DRIP : vitamin D receptor interacting protein

DR : direct repeat

DTT : dithiothréitol

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

ER : estrogen receptor

ESI-TOF : electrospray ionization- time of fly

G : guanine

GR : glucocorticoid receptor

GRIP-1 : glucocorticoid receptor interacting protein 1

HDAC: histone deacetylation complexe.

HAT : histone acetyle transferase.

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

K : kelvin

KO : knock-out

l : litre
LBD : ligand binding domain
M : molaire
m : milli
mg : milligramme
 μ : micro
MAPK : mytogen activated protein kinase
NCoR : nuclear receptor co-repressor
NLS : nuclear localization signal
ONPG : orthonitrophényl- β -D-galactopyrannoside
PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis
PBAF : poly-bromo associated factor
PCR : polymerase chain reaction
PBS : phosphate buffered saline
PEG : polyéthylène glycol
PI3P : phosphatidylinositol-3-phosphate
PKA : protéine kinase A
PKC : protéine kinase C
PLC : phospholipase C
pH : potential Hydrogène
PR : progesterone receptor
PTH : para-thyroid hormone
RAR : retinoic acid receptor.
rmsd : root mean square deviation
rpm : révolution par minute
RXR : retinoid X receptor
SDS : sodium dodecyl sulfate
SRC : steroids receptor coactivator
SMRT : silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors
SWI/SNF : switch/sucrose non-fermentable
T : thymine
TAMRA : tétraméthylrhodamine

TCEP : tris(2-carboxyethyl)phosphine

TIF-2 : transcriptional mediators/intermediary factor 2

TRAP : thyroid hormone receptor-associated proteins

TR : thyroid receptor

V : volume

VDR : vitamin D receptor.

VDRE : vitamin D responsive element

WSTF : Williams syndrome transcription factor

WINAC : WSTF including nucleosome assembly complex

z : fait référence à l'espèce de poisson-zèbre

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX.

| | |
|---|----|
| <u>Figure 1</u> : Schématisation des voies de transduction du signal : la voie des récepteurs membranaires et celle des récepteurs nucléaires..... | 13 |
| <u>Figure 2</u> : Structure chimique du Calcitriol | 15 |
| <u>Figure 3</u> : Organisation modulaire conservée des récepteurs nucléaires..... | 16 |
| <u>Figure 4</u> : Les LBDs du VDR humain (en violet) et du VDR de poisson-zèbre (en orange) liés au Calcitriol adoptent la conformation agoniste canonique..... | 17 |
| <u>Figure 5</u> : Le mécanisme de la sourisère..... | 18 |
| <u>Figure 6</u> : Structure de l'hétérodimère des DBDs du VDR (en 5') et du RXR (en 3') en complexe avec un élément de réponse DR3 formé par deux demi-sites consensus..... | 19 |
| <u>Figure 7</u> : La régulation transcriptionnelle induite par le Calcitriol..... | 22 |
| <u>Figure 8</u> : Illustration de la flexibilité conformationnelle du Calcitriol en solution..... | 24 |
| <u>Figure 9</u> : Représentation schématique des voies de signalisation génomique et non génomique induites par le Calcitriol et ses analogues..... | 27 |
| <u>Figure 10</u> : Protocole et programme de PCR utilisés pour la mutagenèse dirigée..... | 33 |
| <u>Figure 11</u> : Séquences des oligonucléotides utilisés pour le séquençage des plasmides pET28b et pXJ440..... | 34 |
| <u>Figure 12</u> : Séquence obtenue après la mutation Leu337His sur le plasmide pET28b..... | 35 |
| <u>Figure 13</u> : Alignement de l'oligonucléotide de mutation avec une portion de la séquence du zVDR après mutation et la séquence du zVDR non muté en position 337..... | 35 |
| <u>Figure 14</u> : La protéine de fusion (His) ₆ -zVDR-LBD _{L337H} est sur-exprimée après induction à l'IPTG..... | 36 |
| <u>Figure 15</u> : Chromatogramme obtenu par étape de chromatographie d'affinité sur résine Talon® sur l'extrait soluble de zVDR-LBD _{L337H} | 37 |
| <u>Figure 16</u> : Chromatogramme obtenu après filtration sur gel sur colonne Superdex 75 16/60 de l'extrait protéique thrombiné..... | 38 |
| <u>Figure 17</u> : Après les deux chromatographies successives, la protéine d'intérêt présente un degré de pureté élevé..... | 39 |
| <u>Figure 18</u> : Représentation schématique de la technique de la diffusion de vapeur en goutte suspendue et en goutte assise..... | 41 |

| | |
|--|----|
| <u>Figure 19</u> : Cristaux obtenus par diffusion de vapeur en gouttes suspendues, à 24 °C..... | 42 |
| <u>Tableau 1</u> : Statistiques du traitement de données de diffraction et statistiques obtenues après affinement pour les complexes zVDR-LBD _{L337H} /Calcitriol et zVDR-LBD _{L337H} /Gemini..... | 44 |
| <u>Tableau 2</u> : Statistiques du traitement de données de diffraction et statistiques obtenues après affinement pour les complexes zVDR-LBD/BXL-72 et zVDR-LBD/BXL-97..... | 44 |
| <u>Tableau 3</u> : Statistiques du traitement de données de diffraction et statistiques obtenues après affinement pour les complexes zVDR-LBD _{L337H} /BXL-72 et zVDR-LBD _{L337H} /BXL-97..... | 45 |
| <u>Tableau 4</u> : Comparaison des statistiques obtenues avec les différents affinements testés pour le complexe zVDR-LBD _{L337H} /Gemini..... | 46 |
| <u>Figure 20</u> : La mutation Leu337His abolit l'activité génomique du VDR humain et de poisson-zèbre en présence du Calcitriol mais pas en présence du Gemini..... | 52 |
| <u>Figure 21</u> : La mutation Leu337His a un effet dramatique sur l'affinité de liaison du Calcitriol pour le VDR..... | 54 |
| <u>Tableau 5</u> : La mutation Leu337His n'a pas d'effet sur l'affinité de liaison du Gemini pour le VDR..... | 54 |
| <u>Figure 22</u> : Courbe de titration du peptide TAMRA-SRC-1 par le zVDR-LBD en absence de ligand..... | 56 |
| <u>Figure 23</u> : la mutation Leu337His affecte le recrutement du peptide SRC1 en présence du Calcitriol mais non en présence du Gemini..... | 56 |
| <u>Figure 24</u> : Le zVDR-LBD _{L337H} lié au Calcitriol adopte la conformation agoniste canonique..... | 59 |
| <u>Figure 25</u> : La densité électronique indique clairement que toutes les parties du Calcitriol sont présentes dans la poche du VDR..... | 60 |
| <u>Figure 26</u> : Les contacts sont conservés entre le Calcitriol et les résidus de la poche du zVDR-LBD _{L337H} | 61 |
| <u>Figure 27</u> : En présence du Calcitriol, l'histidine 337 pointe vers la poche de fixation du ligand et déplace la chaîne latérale de la glutamine 426..... | 63 |
| <u>Figure 28</u> : Le complexe zVDR-LBD _{L337H} /Gemini adopte la conformation agoniste..... | 65 |
| <u>Figure 29</u> : La densité électronique indique clairement que toutes les parties du Gemini sont présentes dans la poche du VDR..... | 66 |
| <u>Figure 30</u> : Les interactions entre le Gemini et les résidus de la poche du zVDR-LBD _{L337H} sont conservées..... | 67 |

| | |
|---|----|
| <u>Figure 31</u> : En présence du Gemini, l’histidine 337 pointe vers le solvant et ne perturbe pas le positionnement de la glutamine 426..... | 69 |
| <u>Figure 32</u> : L’accommodation de la deuxième chaîne latérale du Gemini par le déplacement de l’His337 vers le solvant permet de conserver l’interaction entre la Gln426 et l’His333..... | 70 |
| <u>Figure 33</u> : Formules chimiques développées des deux ligands analogues du Gemini choisis pour l’étude..... | 73 |
| <u>Figure 34</u> : La mutation Leu337His n’affecte pas l’activité transcriptionnelle du VDR en présence des deux ligands BXL-72 et BXL-97..... | 74 |
| <u>Figure 35</u> : Les ligands BXL-72 et BXL-97 sont deux puissants superagonistes du VDR..... | 76 |
| <u>Tableau 6</u> : Les ligands BXL-72 et BXL-97 se fixent sur le VDR avec une affinité comparable à celles du Gemini et du Calcitriol..... | 76 |
| <u>Figure 36</u> : Le recrutement du peptide coactivateur SRC-1 par VDR n’est pas amplifié en présence des ligands BXL-72 et BXL-97..... | 77 |
| <u>Figure 37</u> : Le complexe zVDR-LBD/BXL-72 adopte la conformation agoniste canonique..... | 79 |
| <u>Figure 38</u> : La densité électronique indique que toutes les parties du ligand BXL-72 sont présentes dans le zVDR sauvage..... | 80 |
| <u>Figure 39</u> : Quatre résidus hydrophobes supplémentaires sont impliqués dans des interactions entre le BXL-72 et le zVDR-LBD..... | 81 |
| <u>Figure 40</u> : Des résidus hydrophobes des hélices 3, 11 et 12 du zVDR-LBD sont impliqués dans la reconnaissance du ligand BXL-72..... | 82 |
| <u>Figure 41</u> : Un léger déplacement de la fin de la boucle 6-7 et du début de H7 entre le zVDR lié au ligand BXL-72 et le zVDR lié au Gemini est observé..... | 83 |
| <u>Figure 42</u> : Dans le complexe zVDR-LBD/BXL-72, la Leu337 induit une réorientation vers le solvant de la Gln426 qui n’interagit plus avec l’His333..... | 84 |
| <u>Figure 43</u> : Le complexe zVDR-LBD sauvage lié au ligand BXL-97 adopte la conformation agoniste canonique..... | 86 |
| <u>Figure 44</u> : La densité électronique indique que toutes les parties du ligand BXL-97 sont présentes dans le zVDR sauvage..... | 87 |
| <u>Figure 45</u> : Les interactions entre le ligand BXL-97 et les résidus de la poche sont conservées excepté pour l’His333 qui n’interagit plus qu’avec une seule chaîne latérale du ligand..... | 88 |
| <u>Figure 46</u> : Des résidus hydrophobes des hélices 3, 11 et 12 du zVDR-LBD sont impliqués dans la reconnaissance du ligand BXL-97..... | 89 |

| | |
|---|-----|
| <u>Figure 47</u> : La stéréochimie du carbone 20 explique les conformations différentes des ligands BXL-72 et BXL-97 dans la poche de fixation du zVDR-LBD sauvage..... | 90 |
| <u>Figure 48</u> : La stéréochimie R du C-20 entraîne une conformation différente du ligand BXL-97 et entraîne un déplacement de la fin de H6, du début de H7 et de la fin de H11 dans le complexe zVDR-LBD/BXL-97..... | 90 |
| <u>Figure 49</u> : La proximité d'un atome de fluor déstabilise la chaîne latérale de l'His333 dans le complexe zVDR-LBD/BXL-97..... | 91 |
| <u>Figure 50</u> : La carte de densité électronique pour le résidu His333 dans le complexe zVDR-LBD/BXL-97 indique la flexibilité de l'His333..... | 92 |
| <u>Figure 51</u> : Schéma des interactions électrostatiques et du réseau de charges partielles expliquant la répulsion entre le cycle de His333 et la tête fluorée du ligand BXL-97..... | 93 |
| <u>Figure 52</u> : Le complexe zVDR-LBD _{L337H} /BXL-72 adopte la conformation agoniste canonique..... | 95 |
| <u>Figure 53</u> : La densité électronique indique que toutes les parties du ligand BXL-72 sont présentes dans le zVDR-LBD _{L337H} | 96 |
| <u>Figure 54</u> : La superposition des complexes zVDR-LBD _{L337H} /BXL-72 et zVDR-LBD/BXL-72 montre que les interactions sont conservées entre le ligand BXL-72 et les résidus de la poche..... | 97 |
| <u>Figure 55</u> : L'histidine 333 est stabilisée à la fois par la Gln426 et par les groupements OH des deux chaînes latérales du BXL-72 dans zVDR-LBD _{L337H} /BXL-72 et uniquement par les groupements OH des chaînes aliphatiques du BXL-72 dans zVDR-LBD/BXL-72..... | 98 |
| <u>Figure 56</u> : le complexe du zVDR-LBD _{L337H} /BXL-97 adopte la conformation agoniste canonique..... | 99 |
| <u>Figure 57</u> : La densité électronique indique que toutes les parties du ligand BXL-97 sont présentes dans le zVDR-LBD _{L337H} | 100 |
| <u>Figure 58</u> : La superposition de zVDR-LBD _{L337H} /BXL-97 et zVDR-LBD/BXL-97 montre que les interactions sont conservées entre le ligand BXL-97 et les résidus de la poche..... | 101 |
| <u>Figure 59</u> : Un déplacement de la fin de H6, de la boucle 6-7, du début de H7 et de la fin de H11 permet la stabilisation de l'histidine 337 par les résidus Glu422 et Gln426 de H11..... | 102 |
| <u>Figure 60</u> : Dans le complexe zVDR-LBD _{L337H} /BXL-97, le cycle imidazole de l'histidine 333 est stabilisé par la Gln426 et par la chaîne latérale fluorée du ligand BXL-9..... | 102 |
| <u>Figure 61</u> : Modèle murin exprimant le VDR muté Leu304His..... | 105 |

I- INTRODUCTION.

Tout organisme perçoit des signaux externes ou internes et les intègre via des voies de signalisation permettant une réponse adaptée au stimulus. Cette communication entre l'environnement et l'organisme permet à celui-ci de maintenir son intégrité. Au niveau cellulaire, la cellule intègre constamment des signaux aussi bien intra-cellulaires qu'extra-cellulaires, permettant alors la régulation optimale de l'expression de l'information génétique qu'elle contient. Pour cela la cellule dispose de deux voies de signalisation (Figure 1) :

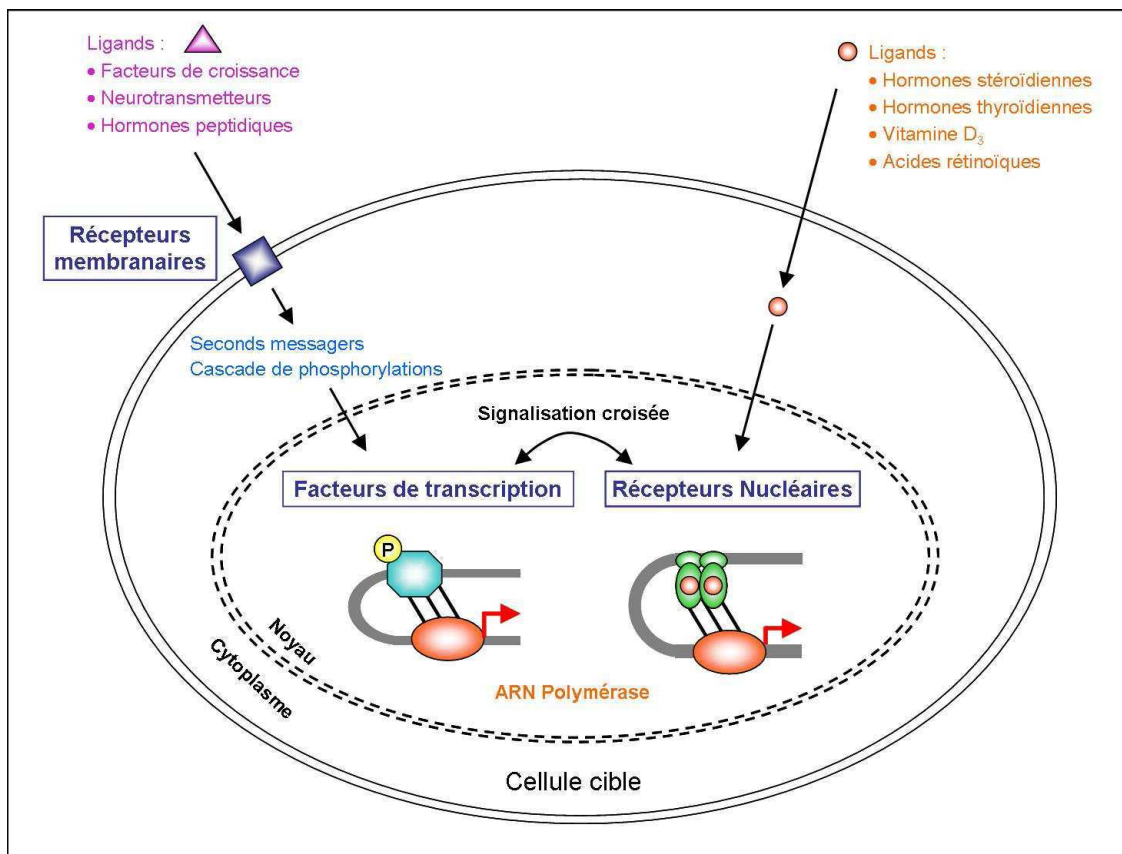


Figure 1 : Schématisation des voies de transduction du signal : la voie des récepteurs membranaires et celle des récepteurs nucléaires.

- La voie des récepteurs membranaires : dans ce cas un ligand (hormone peptidique, facteur de croissance, neurotransmetteur ...) situé dans le milieu extra-cellulaire se fixe à un récepteur situé

en surface de la membrane plasmique de la cellule. En réponse à la fixation du ligand, une série de messagers secondaires comme l'AMPc, ou les ions Ca^{2+} par exemple, permettent la transduction du signal grâce à une cascade de phosphorylations/déphosphorylations. Ceci conduit à la régulation de gènes placés sous la dépendance de facteurs de transcription. La transmission du signal extra-cellulaire par cette voie nécessite l'intervention de nombreuses protéines.

- Au contraire, la voie des récepteurs nucléaires (1), (2) est beaucoup plus directe puisque récepteur et facteur de transcription ne sont qu'une seule et même protéine. Dans ce cas, le ligand est une petite molécule liposoluble capable de pénétrer dans la cellule par simple diffusion au travers de la membrane plasmique. Le ligand se lie alors à son récepteur, et c'est directement dans le noyau que le complexe récepteur-ligand agit en se liant sous forme de dimère (homodimère ou hétérodimère) à des séquences spécifiques en amont de la région promotrice des gènes cibles. Ces complexes permettent ensuite le recrutement des facteurs de la machinerie de transcription.

La combinaison des deux types de transduction du signal existe, ce qui aboutit par exemple à la phosphorylation des récepteurs nucléaires par les kinases, en réponse à la cascade de réactions induite par des messagers secondaires.

Les récepteurs nucléaires forment la plus grande famille de facteurs de transcription avec notamment 48 membres chez l'Homme (3). Ils sont présents chez les vertébrés, les arthropodes et les nématodes. En régulant la transcription de nombreux gènes cibles, les récepteurs nucléaires contrôlent de nombreux processus physiologiques tels que l'embryogenèse, le maintien de l'homéostasie, la reproduction, le développement, le métabolisme, la prolifération et la différenciation cellulaires, ou encore l'apoptose (4). Parce que l'expression d'un grand nombre de gènes est régulée par les récepteurs nucléaires, les ligands qui activent ces récepteurs peuvent avoir d'importants effets sur l'organisme (5). De plus, certains de ces gènes sont associés à de nombreuses maladies, ce qui explique que les récepteurs nucléaires sont des cibles de choix pour les laboratoires pharmaceutiques.

1.1. Le récepteur nucléaire de la vitamine D : VDR.

La forme active de la vitamine D₃, le Calcitriol (figure 2), est une hormone stéroïde calciotropique qui interagit avec le récepteur nucléaire de la vitamine D, VDR (Vitamin D Receptor). Le récepteur adopte sa conformation active lors de la fixation du Calcitriol dans son domaine de fixation du ligand (LBD pour Ligand Binding Domain) et exerce son action sous forme d'un hétérodimère avec le récepteur de l'acide rétinoïde X (RXR).

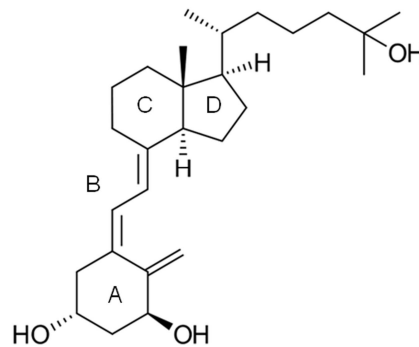


Figure 2 : Structure chimique du Calcitriol (conformation trans).

1.1.1. Organisation modulaire du VDR.

Le VDR, comme tous les récepteurs nucléaires, présente une organisation modulaire (figure 3) plus ou moins conservée (6). Le domaine N-terminal A/B est très court et dépourvu de la fonction de transactivation indépendante de la fixation du ligand dite AF-1, que l'on retrouve chez les autres récepteurs nucléaires. Le domaine de fixation à l'ADN (DBD pour DNA Binding Domain) ou domaine C, contient deux motifs en « doigt de zinc » qui permettent la reconnaissance entre le VDR et des éléments régulateurs de l'ADN (7). Ce domaine est également nécessaire pour la translocation du VDR dans le noyau (8). La région charnière ou domaine D, structurée en hélice α , permet l'orientation relative du DBD par rapport au LBD (Ligand Binding Domain) ou domaine E. Ce dernier contient la poche de fixation du ligand et la fonction de transactivation dépendante du ligand AF-2. Enfin, le domaine F est absent du VDR.

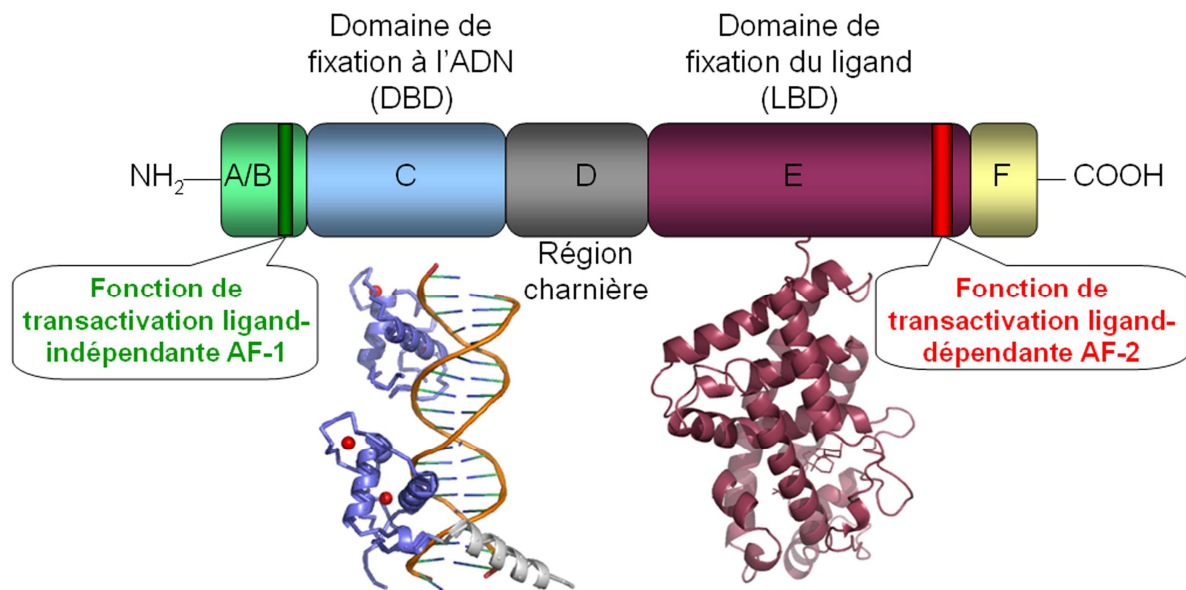


Figure 3 : Organisation modulaire conservée dans la superfamille des récepteurs nucléaires. Les différents modules sont représentés par des rectangles. Les structures cristallographiques du DBD (dimère des DBDs de VDR et RXR en présence d'ADN), de la région charnière et du LBD du VDR sont également représentées dans le même code couleur (PDB 1YNW et 1DB1). Les atomes de zinc sont indiqués par des sphères rouges.

Le LBD du VDR comprend 13 hélices α organisées en sandwich et trois feuillets β , structure canonique conservée dans la famille des récepteurs nucléaires. Le VDR présente une extension unique parmi les récepteurs nucléaires, localisée entre l'hélice 1 et l'hélice 3. Cette boucle flexible semble être fonctionnellement silencieuse car son absence dans la forme délétee du VDR ne perturbe pas la fonction du VDR (9). Dans la structure du complexe hVDR-LBD/Calcitriol, on observe une hélice additionnelle appelée H3n (figure 4). Cette hélice contient un motif LXXLL dégénéré et prend la place du coactivateur dans le packing cristallin. La seule différence notable entre les LBDs du VDR de poisson-zèbre et du VDR humain est un léger déplacement de la fin de l'hélice H11 et de la boucle L11-12 dû à l'absence d'hélice H3n dans le zVDR, et au remplacement de la cystéine 410 de la boucle L11-12 du VDR humain par une histidine dans le zVDR. L'extrémité C-terminale du LBD porte la fonction de transactivation dépendante du ligand (AF-2).

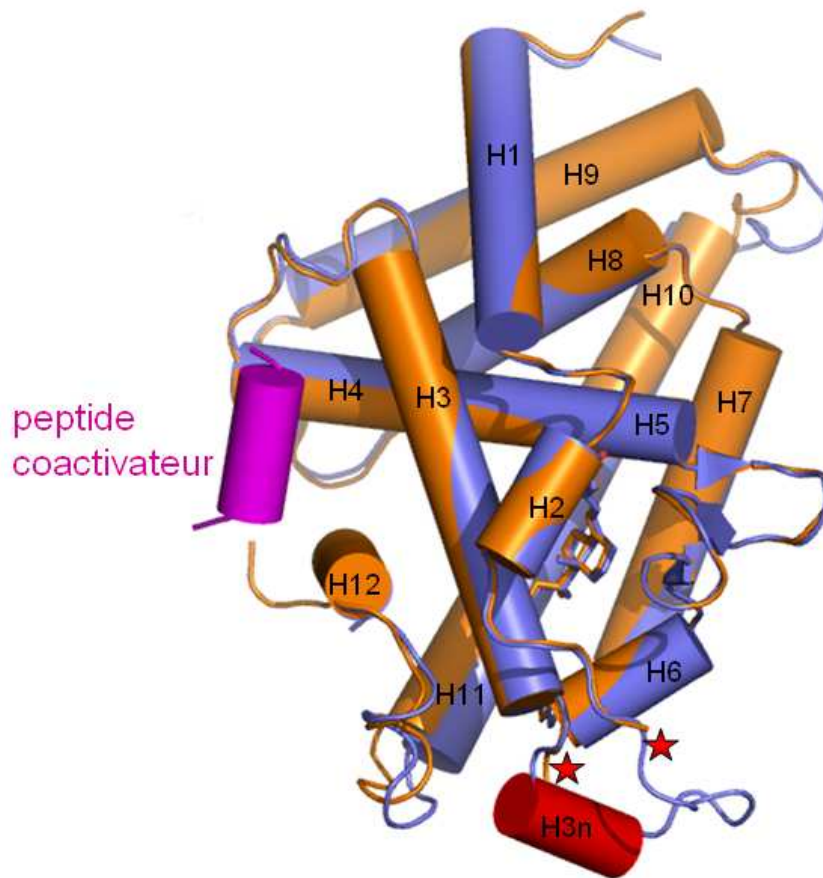


Figure 4 : Les LBDs du VDR humain (en violet) et du VDR de poisson-zèbre (en orange) liés au Calcitriol adoptent la conformation agoniste canonique. Le peptide coactivateur est coloré en magenta. Les étoiles rouges représentent la région flexible entre H2 et H3 non visible dans la structure du VDR de poisson-zèbre. L'hélice H3n additionnelle dans le VDR humain est représentée en rouge.

I.1.2. Mécanisme moléculaire de l'activation du VDR.

Le mécanisme moléculaire de l'activation du VDR par son ligand est basé sur le modèle d'autres récepteurs nucléaires, notamment sur les comparaisons de structures entre le LBD du RXR apo (10) et du RAR holo (11). La fixation du ligand entraîne une modification de la surface du LBD nécessaire pour une hétérodimérisation optimale avec son partenaire RXR. L'importance de l'hélice 12 s'explique par le mécanisme de la souris dans lequel la fixation du ligand induit une réorientation du domaine H12/AF-2 nécessaire à la création d'une plateforme de

reconnaissance pour les protéines coactivatrices. En effet la structure du RXR apo montre une partie C-terminale du récepteur dans une configuration étendue. L'hélice 12 est éloignée du cœur de la protéine et est totalement exposée au solvant. Par contre, dans la structure du LBD du RAR holo, l'hélice 12 est disposée contre le cœur de la protéine et ferme la cavité (figure 5). La fixation du ligand s'accompagne d'autres changements structuraux. Lorsque le ligand se fixe, la partie N-terminale de l'hélice 3 se déplace et interagit avec celui-ci, ce qui a pour conséquence de déplacer cette partie de l'hélice vers l'intérieur de la protéine. Au contraire, l'hélice 11 dont les résidus remplissent la poche laissée vide dans la forme apo, est repoussée vers l'extérieur de la protéine au moment de la fixation du ligand, créant une cavité hydrophobe formée par les hélices 3, 4 et 12. Le repositionnement de l'hélice 12 crée une interface d'interaction du récepteur avec le motif conservé LXXLL (L représente une leucine et X un acide aminé quelconque) des coactivateurs (12).

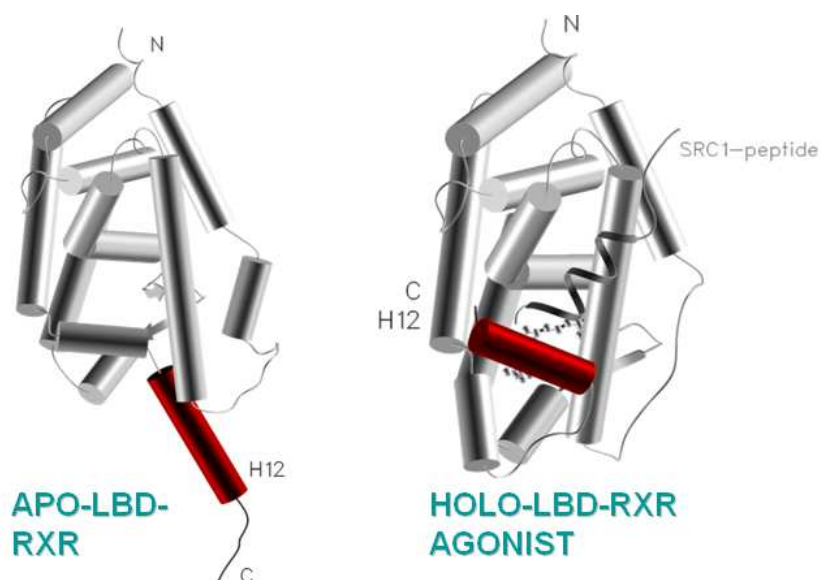


Figure 5 : Le mécanisme de la souricière. La comparaison entre les deux conformations du LBD illustre le changement de conformationnel induit par la fixation d'un ligand agoniste. L'hélice 12 est en rouge et le peptide SRC-1 est représenté par une hélice non cylindrique.

1.1.3. Corépresseurs, coactivateurs et VDRE.

En l'absence de son ligand naturel, un équilibre existe entre le VDR présent dans le cytosol et le VDR présent dans le noyau. En effet, le VDR présent dans le cytosol est capable de

traverser la membrane nucléaire grâce à des séquences de localisation nucléaire (NLS pour Nuclear Localization Signal) qui interagissent avec l'importine α . L'un de ces signaux est situé entre les deux doigts de zinc du DBD, entre les résidus 67 et 108 (8) et une autre séquence NLS est située dans la région charnière du VDR (13). Il a été démontré que la fixation du ligand sur le LBD induit une translocation nucléaire massive du VDR (14), déplaçant alors l'équilibre. La régulation de la transcription de gènes cibles du Calcitriol est modulée de manière synergique par la fixation du ligand et par l'hétérodimérisation du VDR avec son partenaire RXR. Le complexe VDR/RXR se fixe sur un site spécifique de l'ADN appelé élément de réponse (VDRE pour VDR Response Element) (figure 6). Ces éléments sont composés de deux demi-sites hexamériques organisés en répétition directe ou palindromique dont la séquence consensus est (A/G)G(G/T)TCA (15), (16). L'espace entre les demi-sites de l'élément de réponse détermine la sélectivité de la réponse hormonale en imposant préférentiellement un dimère donné. Pour le VDR, les éléments en répétition directe peuvent être séparés par un nombre variable de nucléotides (mais le plus souvent par trois nucléotides) et les éléments en palindrome inversé par neuf nucléotides (17). De nombreux gènes régulés par la vitamine D contiennent plusieurs VDRE dans leur région promotrice, parfois très éloignés de la région à transcrire (18).

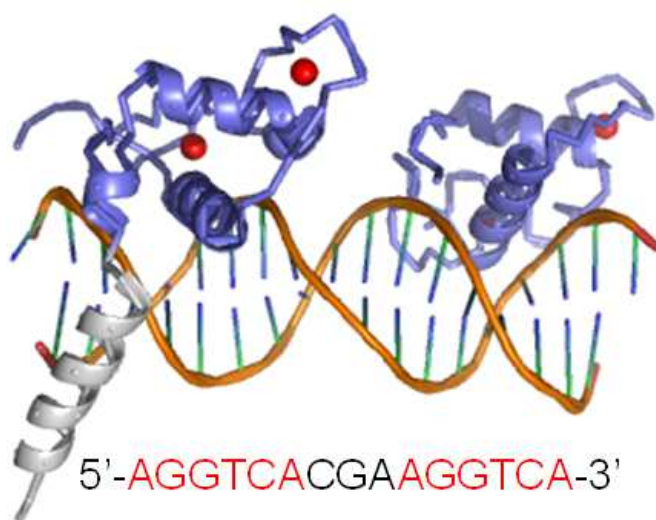


Figure 6 : Structure de l'hétérodimère des DBDs du VDR (en 5') et du RXR (en 3') en complexe avec un élément de réponse DR3 formé par deux demi-sites consensus (19), PDB 1YNW. Les atomes de zinc appartenant aux doigts de zinc sont représentés sous forme de sphères rouges. La

séquence consensus de l'élément de réponse en DR3 est présentée au dessous. La région charnière du VDR est représentée en gris.

En l'absence de ligand, le VDR présent dans le noyau interagit avec son partenaire RXR et le complexe VDR/RXR se fixe sur un élément de réponse mais il est maintenu dans un état « silencieux » (20) par un ou plusieurs corépresseurs tels que SMRT (21), NCoR (22), Alien (23), Sin3 (24) qui déacétylent les histones (25). Cela maintient la chromatine dans un état compacté qui la rend inaccessible à la machinerie transcriptionnelle. La fixation du ligand sur le complexe VDR/RXR induit un changement conformationnel, ce qui entraîne le départ des corépresseurs. Après la fixation du Calcitriol et le réarrangement de l'hélice 12, des protéines coactivatrices sont capables de se fixer au VDR (26). La fixation des différents coactivateurs se fait de manière séquentielle (27), (28). En premier lieu, les coactivateurs de la famille CBP/p300 et de la famille p160 (dont SRC pour Steroid Receptor Coactivator) interagissent avec les récepteurs nucléaires (figure 7 (a)) (29), (30). Le cofacteur PBAF (pour PolyBromo associated factor) associé au complexe SWI-SNF (famille de protéines switch/sucrose non-fermentable) intervient également dans le remodelage de la chromatine. Ces protéines possèdent une activité histone acétyltransférase (HAT) intrinsèque qui décondense la chromatine et rend ainsi la région promotrice du gène cible accessible à la machinerie transcriptionnelle (31), (32). Dans un deuxième temps (figure 7 (b)), le complexe multimérique DRIP/TRAP se lie à l'hétérodimère (33) via la sous-unité DRIP205 et forme un pont entre le récepteur nucléaire et la machinerie de la transcription (facteurs généraux de la transcription et ARN polymérase II). La transcription du gène cible est induite (34). Cependant, les mécanismes moléculaires qui contrôlent le recrutement séquentiel des cofacteurs ne sont pas connus et plusieurs études ont montré que des phosphorylations pourraient réguler la transactivation médiée par le VDR dans des ostéoblastes (35), (36). En effet, la phosphorylation par la caséine kinase II de la sérine 208, située dans la région charnière, n'est pas obligatoire pour l'activité du VDR mais permet d'améliorer son activité transcriptionnelle. Il a été montré que la phosphorylation de la sérine 208 module de manière positive l'interaction entre VDR et DRIP205 (35) mais non entre VDR et SRC-1 (37) et pourrait ainsi moduler la capacité du VDR à interagir alternativement avec les coactivateurs p160/SRC et DRIP lors de la régulation transcriptionnelle des gènes cibles du VDR.

Un autre site de phosphorylation du VDR a été identifié *in vitro* et *in vivo* au niveau de la sérine 51 située entre les deux doigts de zinc du DBD par la protéine kinase C- β dans les cellules CV-1 (38) et dans les cellules COS-7 (39). Cette phosphorylation n'est pas obligatoire pour la fixation du VDR sur son VDRE et pour l'activité transcriptionnelle du VDR et ne semble pas dépendre de la présence du Calcitriol. De plus, il a été démontré que la phosphorylation de la sérine 51 par la protéine kinase C- β a un effet inhibitoire dose-dépendant sur la capacité du VDR à se fixer sur son VDRE *in vitro* (39), suggérant que l'un des rôles possibles de cette phosphorylation serait d'atténuer l'interaction VDR/VDRE. Ces modifications post-traductionnelles des sérines 51 et 208 ne sont pas indispensables au fonctionnement du VDR mais permettraient plutôt une modulation positive (par la caséine kinase II) et négative (par la protéine kinase C- β) qui gouvernerait l'activité du récepteur dans des conditions cellulaires appropriées.

D'autre part, le VDR semble également jouer un rôle dans la répression de l'expression des gènes. Le gène CYP27B1 et de la l'hormone PTH (ParaThyroid Hormone) sont connus pour être négativement régulés par le Calcitriol via des éléments de réponse négatifs appelés nVDRE (40), (41), (42), (43). Le VDR lié au Calcitriol se fixe sur le demi-site situé en 5' du nVDRE (figure 7 (c)). Le complexe VDR/RXR interagit alors avec le corépresseur VDIR (pour VDR-interacting repressor) au niveau d'une boîte de type E comportant un motif de type CANNTG. Les interactions entre la boîte E et l'hétérodimère VDR/RXR entraîne la dissociation des coactivateurs à activité histone acétyltransférase et le recrutement de complexes à activité histone déacétylase. De plus, le facteur de transcription WSTF (pour Williams syndrome transcription factor) recrute WINAC, un complexe de remodelage de la chromatine ATP-dépendant (44) et amplifie alors la répression induite par le Calcitriol. Ce mécanisme de trans-répression permet une rétro-régulation de la biosynthèse du Calcitriol.

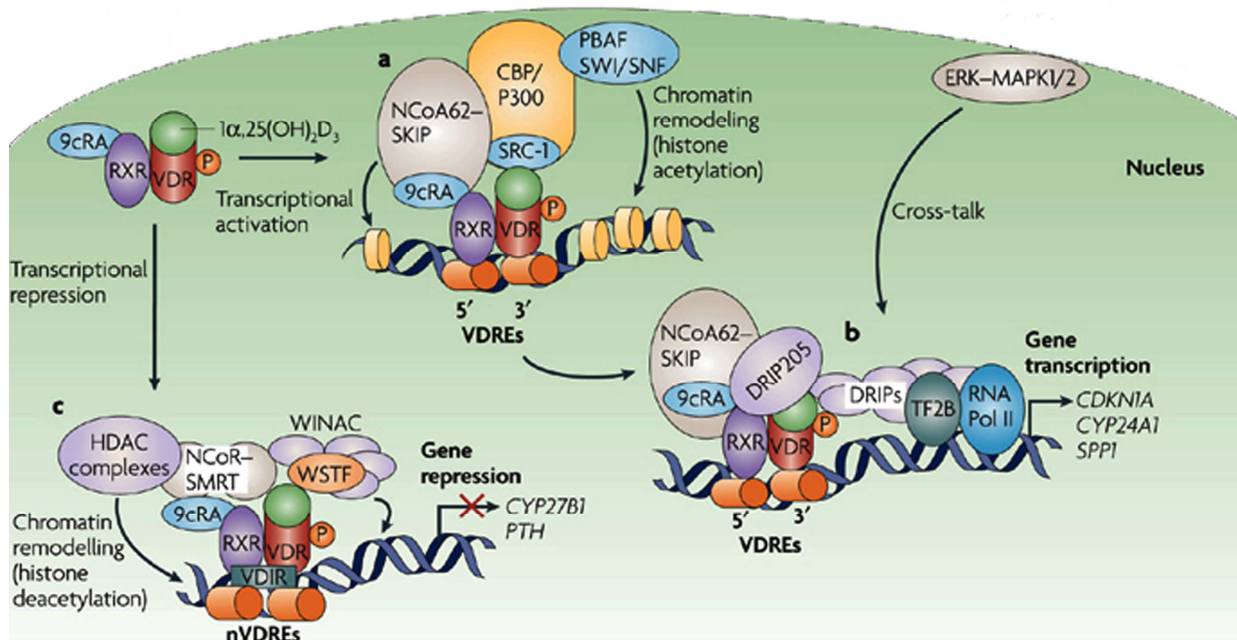


Figure 7 : La régulation transcriptionnelle induite par le Calcitriol ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$).

(a) L'activation de la transcription nécessite l'intervention de cofacteurs ayant une activité Histone acétyl-transférase. (b) La fixation de DRIP205 permet le recrutement du complexe médiateur qui établit un pont entre le complexe VDR/RXR et la machinerie transcriptionnelle. (c) Mécanisme de trans-répression induite par le Calcitriol et impliquant l'interaction entre VDR/RXR et le corépresseur VDIR. VDR/RXR interagit avec une boîte de type E d'un élément de réponse nVDRE. Figure adaptée de (45).

1.2. Les effets non-génomiques de la vitamine D.

Les hormones stéroïdes et de nombreux ligands des récepteurs nucléaires exercent en plus de leurs actions génomiques, une large panoplie d'effets rapides qualifiés de non-génomiques puisque prenant place dans le cytosol ou au niveau de la membrane plasmique (46). Ces effets incluent généralement des changements transitoires dans le transport trans-membranaire des ions (tels que Ca^{2+} et Cl^-), ou encore dans les voies de signalisation intracellulaires (tels que variation des activités AMPc, protéine kinase (PK) A, protéine kinase C, phospholipase C, phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) kinase et MAP kinases) (47). Le concept canonique des

récepteurs nucléaires en tant que facteurs de transcription exerçant leur activité dans le noyau cellulaire ne pouvait expliquer leur implication dans des réponses non-génomiques, n'impliquant pas de régulation transcriptionnelle de gènes cibles. Ainsi, deux hypothèses expliquant ces effets non-génomiques ont émergé : (a) l'existence d'autres récepteurs au niveau cytosolique ou membranaire ou (b) la présence de sous-population de récepteurs nucléaires à ces localisations (48), (49), (50), (51).

Le Calcitriol est aujourd'hui connu pour induire ses effets via deux voies de signalisation : la voie NISS (pour nuclear-initiated steroid signaling) et la voie MISS (pour membrane-initiated steroid signaling). Dans l'intestin, les actions NISS du Calcitriol sont responsables de la synthèse des composants cellulaires nécessaires au transport du calcium intercellulaire et du phosphate (7) alors que les actions MISS permettent de rapidement amorcer le transport du calcium et du phosphate (52). En effet, le Calcitriol est capable de stimuler l'ouverture de canaux Cl^- et Ca^{2+} dans les ostéoblastes (53) (54), (55), (56), d'activer la PKC et la PI3P kinase dans le cartilage (57) (58) et dans les cellules endothéliales ((59), de stimuler la sécrétion de l'insuline dans le pancréas (60), (61), et d'activer les MAP kinases liées à la différenciation cellulaire dans les cellules leucémiques (62), (63).

Plusieurs études ont mis en évidence que les actions rapides médiées par le Calcitriol et ses effets génomiques nécessitent des conformations de ligand différentes (64). En effet, la capacité du Calcitriol à générer des réponses biologiques rapides requiert la conformation planaire 6-*s-cis* du ligand (figure 8), qui reconnue par un récepteur membranaire putatif, induit la cascade de transduction du signal (65). Les ligands des récepteurs nucléaires TR, RAR et VDR sont des molécules très flexibles. Cependant, leurs structures résolues par diffraction aux rayons X montrent qu'un conformère unique est présent dans la poche du LBD (11), (66), (9). Cela montre que malgré le fait que le Calcitriol puisse adopter en solution un nombre de conformations infini, lorsque le Calcitriol est fixé sur son récepteur nucléaire, ses conformations sont plus limitées. Ainsi, le VDR est capable de capturer une conformation unique parmi le continuum de conformations possibles qu'offrent les ligands tels que le Calcitriol.

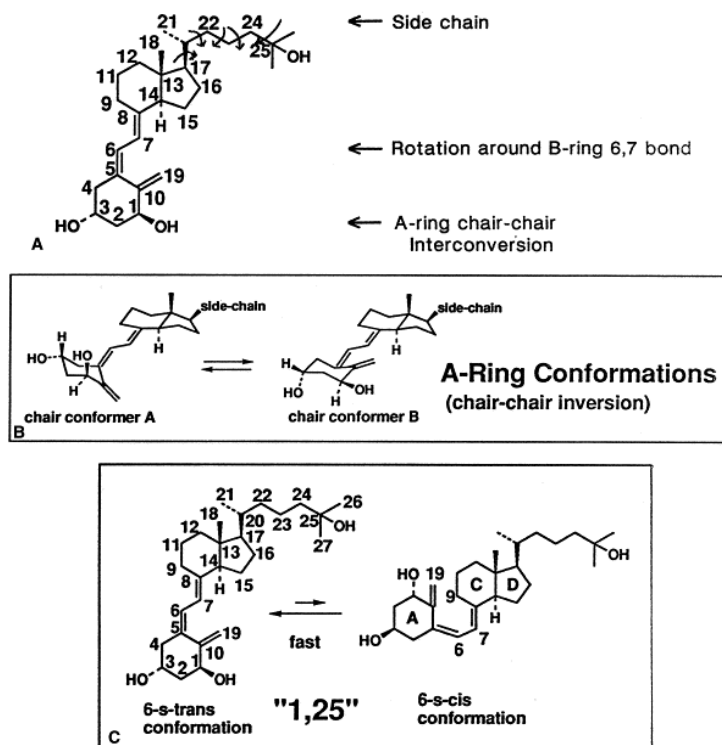


Figure 8 : Illustration de la flexibilité conformationnelle du Calcitriol (1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$) en solution. (A) Structure de la molécule 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ avec les caractéristiques structurales lui conférant la flexibilité de sa chaîne latérale. Les rotations de 360 ° autour des liaisons simples carbone-carbone sont représentées par des flèches incurvées. (B) La rapide inter-conversion chaise-chaise (milliers de fois par seconde) du cycle A du Calcitriol est responsable de l'équilibre des groupements 1 α - and 3 β -hydroxyyles entre les orientations axiales et équatoriales. (C) La rotation libre de 360 ° autour de la liaison simple 6,7 carbone-carbone du cycle seco-B génère un continuum de conformations allant de la conformation « stéroïde » (6-s-cis) à la conformation étendue (6-s-trans) du Calcitriol.

Dans la structure cristallographique du LBD de VDR lié au Calcitriol déterminée à 1,8 Å de résolution, le ligand adopte une conformation concave 6-s-trans, de manière à ce que la position du cycle A soit un conformère β tourné de 30 ° au dessus du plan du cycle C/D. Le cycle A adopte une conformation « chaise » (figure 8). En 2004, Norman et ses collègues ont montré que le conformère 6-s-cis est un agoniste fort pour les réponses non-génomiques mais un agoniste faible pour les actions génomiques, alors que le conformère concave 6-s-trans est un agoniste fort pour les réponses génomiques mais un agoniste faible pour les réponses rapides, et le Calcitriol

qui est naturellement flexible et peut adopter les deux conformations 6-*s-cis* et 6-*s-trans*, est un agoniste fort pour les réponses génomiques et non-génomiques (65), (51). De plus, le conformère $1\beta,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ est un puissant inhibiteur de transcaltachia (stimulation hormonale rapide du transport du calcium dans l'intestin) mais il n'est pas capable de bloquer les effets génomiques du Calcitriol (67). Ces données suggèrent que le VDR classique ne serait pas impliqué dans les réponses rapides induites par le Calcitriol.

1.2.1. Rôle du récepteur cytosolique 1,25D3-MARRS dans les fonctions non-génomiques.

En 1984, Nemere et ses collègues ont proposé que certains effets du Calcitriol pourraient être médiés par un récepteur membranaire (68). Concernant la réponse rapide de transcaltachia, un récepteur membranaire potentiel a été identifié et partiellement purifié (69). D'autres laboratoires ont également proposé l'existence d'un récepteur membranaire du Calcitriol dans les cellules leucémiques NB-4 (62), dans les entérocytes de l'intestin (70), dans les cellules ROS 24/1 (71), et dans les vésicules de chondrocytes ((72). Un récepteur candidat a été isolé à partir de la membrane baso-latérale d'épithélium intestinal de poulet (69), dans la lignée cellulaire IEC-6 chez le rat (73) et dans les cellules leucémiques NB-4 (74). En 2004, la séquence complète du récepteur 1,25D3-MARRS (pour membrane-associated, rapid-response steroid-binding) cloné a été reportée (75). Des similarités de séquences ont été reportées avec la PLC- α (76) et une protéine disulfide isomérase qui fixe l'hormone thyroïdienne (77). Ce récepteur est identique à la protéine ERp57/GRP58 (78), (79) et appartient à la superfamille des protéines multifonctionnelles régulées par le glucose et précédemment connues pour interagir avec les hormones thyroïdiennes et œstrogènes (77) (80). L'analyse de la région promotrice du gène codant pour le récepteur 1,25D3-MARRS a révélé l'absence d'élément VDRE et la présence un élément *cis* smad-3 (GTCTGGCCC) conservé en amont du site d'initiation de la transcription chez le rat, la souris et l'homme et d'un deuxième élément smad-3 en amont chez la souris et l'homme (73). La présence d'éléments smad-3 permet une régulation positive des taux d'ARNm de 1,25D3-MARRS et de protéine 1,25D3-MARRS par le facteur de croissance TGF- β 1 et il semble que cette régulation interagisse avec un mécanisme dépendant du Calcitriol (81). L'analyse bioinformatique a également détecté de nombreux sites potentiels de modifications

post-traductionnelles telles que des phosphorylations (82). La protéine 1,25D3-MARRS chez le rat et le poulet est composée de 505 acides aminés chez le rat et le poulet et 504 acides aminés chez la souris et l'homme. La présence d'un peptide-signal, de deux repliements thiorédoxine, d'une séquence de localisation nucléaire et d'une séquence de rétention dans le réticulum endoplasmique a été reportée. Le repliement thiorédoxine permet au récepteur 1,25D3-MARRS d'interagir avec une large variété de protéines via un mécanisme rédox très conservé chez les protéines multifonctionnelles comme par exemple la protéine disulfide isomérase (83). Les deux motifs thiorédoxine sont connus pour être impliqués dans des interactions protéiques permettant l'activation de NF- κ B dans le noyau (82), (74). Il a été montré que la protéine 1,25D3-MARRS fixe préférentiellement le Calcitriol plutôt que 25(OH)D₃ ou 24,25(OH)₂D₃ (69). Les complexes VDR/Calcitriol et 1,25D3-MARRS/Calcitriol possèdent une constante de dissociation similaire (84), (85). Cependant quelques paramètres diffèrent. La protéine 1,25D3-MARRS montre une coopération positive dans la fixation du Calcitriol et montre aussi une régulation sur le développement du poulet : chez le jeune poulet, qui connaît à ce stade une formation osseuse accrue, la stimulation rapide du transport de calcium et de phosphate est médiée par le Calcitriol tandis que chez le poulet adulte, cette stimulation rapide par le Calcitriol disparaît (84), (85). Ce rôle physiologique semble suivre la demande de croissance osseuse. La PKC et la PKA sont toutes les deux impliquées dans les réponses rapides médiées par les hormones stéroïdiennes (86). Il a été montré que le Calcitriol est capable de stimuler la protéine kinase C via le récepteur 1,25D3-MARRS dans l'intestin, suggérant que la protéine 1,25D3-MARRS joue un rôle critique dans la capture et le transport du phosphate (84). La protéine kinase A semblerait réguler le transport du calcium (84). Il est intéressant de noter que chez le rat, les actions MISS qui ont lieu dans les cellules intestinales reposent à la fois sur le VDR et sur le récepteur 1,25D3-MARRS tandis que chez le poulet, seule la protéine 1,25D3-MARRS est requise (87).

La complexité de l'interprétation des mécanismes responsables des réponses non-génomiques du Calcitriol réside dans la possible superposition avec les mécanismes régissant les effets génomiques et dans l'existence d'une communication entre les réponses génomiques et non-génomiques (88). Un modèle schématique a été proposé (figure 9).

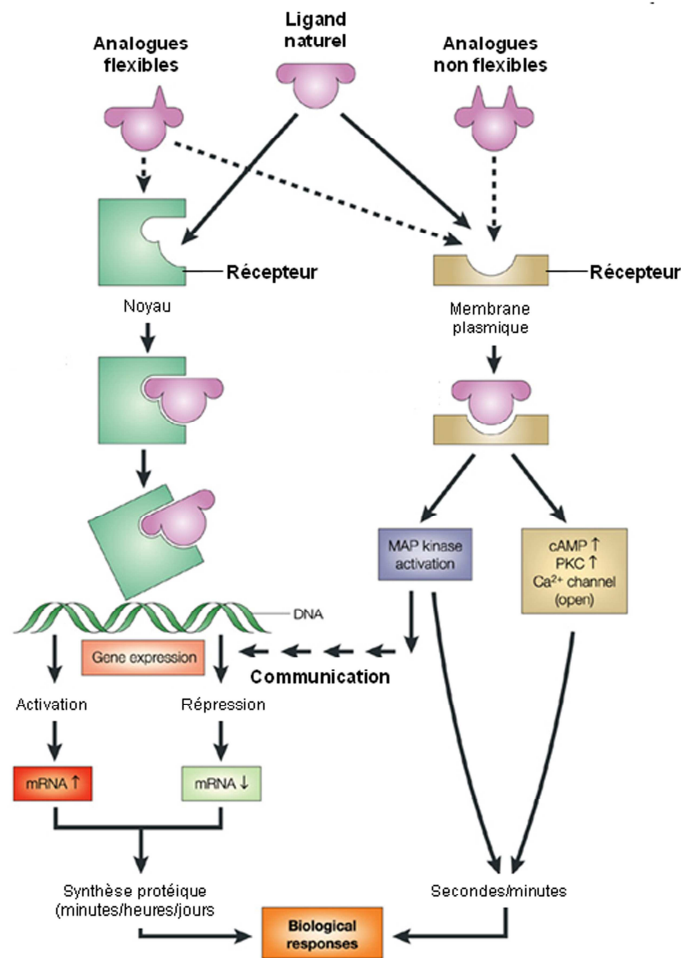


Figure 9 : Représentation schématique des voies de signalisation génomique et non génomique induites par le Calcitriol et ses analogues. Dans la voie génomique (panel de gauche), la fixation d'un ligand spécifique entraîne la régulation de l'expression des gènes cibles. Dans la voie non génomique (panel de droite), la fixation d'un ligand sur un putatif récepteur membranaire induit les réponses rapides via le messenger secondaire approprié. Cette voie entraîne des réponses biologiques soit directement ou soit indirectement en modulant la voie génomique. Figure adaptée de (51).

Les actions non-génomiques du Calcitriol semblent être en partie responsables des effets hypercalcémiques accompagnant les propriétés anti-tumorales du Calcitriol dans les traitements pharmaceutiques utilisant le Calcitriol et ses dérivés. Ainsi, l'élucidation précise de la voie de signalisation non-génomique du Calcitriol est cruciale pour le développement de nouveaux

traitements anti-cancer sans les effets hypercalcémiques du Calcitriol. Néanmoins, la voie de signalisation des effets non-génomiques apparaît difficile à étudier, et cela s'explique par le fait que certains de ces effets (tels que l'activation de kinases) ont une action amplificatrice sur les effets génomiques. Ainsi, plusieurs outils permettant des études *in vivo* des effets non-génomiques du Calcitriol ont été créés.

I.2.2. Outils d'étude *in vivo*.

Quatre souris génétiquement modifiées pour le gène *vdr* existent actuellement. Le gène codant pour la protéine VDR possède 9 exons. La première souris *vdr*-knock-out (*vdr*-KO) a été créée par l'équipe de Shigeaki Kato en 1997. Le gène *vdr* a été spécifiquement interrompu en remplaçant le fragment de l'exon 2 (1,1 Kb) codant pour le premier doigt de zinc du DBD, par une cassette *PGK-neo* (89). Cette souris est la souche « Tokyo ». Un mois après, une deuxième souris *vdr*-KO était disponible (90). Cette fois-ci, le gène *vdr* a été délété d'un fragment de 5 Kb de la partie codant pour le deuxième doigt de zinc du DBD. Dans ce cas, la mutation introduite induit un décalage du cadre de lecture avec l'apparition d'un codon stop situé 12 paires de bases en aval. C'est la souche « Boston ». En 2001, une troisième souris *vdr*-KO a été créée en utilisant cette fois le système cre-lox (91). L'exon 2 du gène *vdr* « floxé » est éliminé par cré-excision (92). En 2002, l'équipe de Rudi Balling met au point une souris *vdr*-knock-in dans laquelle l'exon 2 et une partie de l'intron 2 du gène *vdr* sont remplacés par une cassette gène-rapporteur *lacZ* et une cassette *neo* (93). Cette lignée permet d'étudier l'expression du gène *vdr* durant le développement en suivant l'expression du gène-rapporteur *lacZ*.

Le rachitisme résistant à la vitamine D de type II (VDDR II) (94) est une maladie génétique autosomale et récessive qui présente des caractéristiques cliniques telles qu'une faible quantité de calcium sérique, un hyperparathyroïdisme, une activité phosphatase alcaline élevée, un taux très élevé de Calcitriol, un retard de croissance, des malformations du squelette et une alopecie . Les quatre souris génétiquement modifiées pour le gène *vdr* présentent un phénotype similaire à celui de cette maladie. Bien que le VDR soit exprimé dans de nombreux tissus tout au long du développement embryonnaire (93), les souris génétiquement modifiées pour le gène *vdr* sont phénotypiquement normales à la naissance, comme pour les personnes atteintes de VDDR II,

suggérant que l'absence de VDR fonctionnel durant le développement pourrait être compensée par d'autres mécanismes. Cependant, après le sevrage, plusieurs anomalies apparaissent.

Une alopecie apparaît trois semaines après la naissance. Les souris développent un premier pelage normal mais la ré-initiation de la phase anagène suivant le premier cycle de la morphogenèse du follicule est déficiente (95). Le rôle de VDR dans le cycle du follicule du poil est indépendant du Calcitriol. Ceci est démontré par l'absence d'alopecie chez les souris délétées pour le gène codant pour l'enzyme nécessaire à la production de Calcitriol (96) et par la possibilité de restaurer un cycle du cheveu normal dans les souris *vdr*-KO par un transgène *vdr* portant une mutation empêchant la fixation du Calcitriol (97). De plus, il a été démontré dans les kératinocytes primaires, qu'une forte hétérodimérisation VDR/RXR en l'absence du Calcitriol suffit à induire une transactivation du gène codant pour l'enzyme 24-hydroxylase, gène cible connu du VDR dans les kératinocytes primaires (98). Ce résultat montre la possibilité du VDR d'induire la transactivation de manière indépendante de son ligand et est en accord avec le phénotype des souris délétées pour le gène codant pour l'enzyme 1 α -hydroxylase (CYP27B1) qui ne présentent pas de différences phénotypiques de peau par rapport aux souris sauvages (99).

À partir de trois semaines, un retard de croissance est observé chez les souris dépourvues de VDR fonctionnel. Une hypocalcémie et une hypophosphatémie sont aussi détectées à ce stade. Cette observation est en accord avec le fait que l'absorption de calcium dans l'intestin chez les rats implique un mécanisme indépendant du Calcitriol pendant les premiers 18 jours (100), (101). Ce mécanisme est progressivement remplacé par un mécanisme dépendant du Calcitriol détectable à 18 jours postpartum. Le manque de réponse de l'intestin au Calcitriol pourrait être expliqué par la faible présence du VDR dans l'intestin au cours du développement néonatal. Le VDR intestinal reste faible pendant l'allaitement et augmente progressivement à une semaine après le sevrage (102).

Un hyperparathyroïdisme (élévation du taux en hormone PTH) accompagné par une augmentation de la quantité d'ARNm codant pour la PTH est observé dès 21 jours après la naissance. Cependant, la délétion du gène *vdr* spécifiquement dans la parathyroïde n'entraîne qu'une augmentation modérée du taux en PTH (103) suggérant un rôle limité du VDR dans la physiologie de la parathyroïde et que le taux anormalement élevé en PTH dans les souris

génétiqnement modifiées pour le gène *vdr* serait une conséquence indirecte de l'absence de VDR fonctionnel.

Un rachitisme et une ostéomalacie sont observés à partir du 35^{ème} jour postpartum. Cependant, au quinzième jour, une expansion de la zone hypertrophique des chondrocytes de la plaque de croissance est déjà observée. Cela suggère un rôle du VDR dans le développement et la maturation des plaques de croissance. Cependant, une nourriture enrichie en calcium, phosphore et lactose permet de restaurer l'homéostasie du calcium chez les souris *vdr*-KO (104). Le maintien de l'homéostasie du calcium par ce régime alimentaire particulier immédiatement après le sevrage améliore la survie et les malformations squelettiques observées chez les souris *vdr*-KO, en particulier le retard de croissance et la minéralisation osseuse. Cependant, malgré ce régime alimentaire, des anomalies persistent, telles qu'une réduction de poids de 25 % par rapport aux souris sauvages, des déformations du cartilage et une formation accrue du tissu ostéoïde (105). Ces aberrations sont significativement inhibées par de très fortes doses (20 µg/kg trois fois par semaine) de Calcitriol ou de Maxacalcitol (105). Ces résultats suggèrent un rôle dans la modulation de l'absorption de calcium et dans le maintien du squelette par le Calcitriol et ses dérivés sans faire intervenir le domaine d'interaction à l'ADN du VDR. Il est intéressant de noter que le régime enrichi en calcium, phosphore et lactose permet de restaurer une calcémie normale chez les souris *vdr*-KO mais qu'il n'a pas d'effet sur la réabsorption de calcium par le rein (93), confirmant le fait que la réabsorption de calcium par le rein est défectueuse dans le cas de déficience en vitamine D (106). Ceci montre que le Calcitriol a un rôle physiologique important pour la réabsorption du calcium par le rein *in vivo*.

Une étude portant sur des cellules de tumeurs mammaires issues de souris sauvages ou de souris *vdr*-KO a examiné le rôle précis du VDR dans la croissance cellulaire, l'apoptose et la différenciation cellulaire (107). L'étude montre qu'à des concentrations de l'ordre du nM, le Calcitriol et quatre analogues inhibent la croissance des cellules cancéreuses exprimant le VDR mais non celle des cellules n'exprimant pas le VDR. Cependant, les cellules exprimant le VDR et celles n'exprimant pas le VDR répondent de manière similaires à des doses micromolaires de Calcitriol et de ses analogues, en induisant l'apoptose. Le Calcitriol peut donc induire des actions cellulaires en l'absence de VDR fonctionnel et que les effets observés à des doses de l'ordre du µM reflètent à la fois les mécanismes dépendants et indépendants du VDR.

I.2.3. Inconvénients, limitations de ces outils.

En 2005, une étude a révélé la présence d'un VDR tronqué capable de fixer le Calcitriol dans la souris de souche Tokyo (108). Ce VDR résulte d'une initiation de la transcription à partir de la méthionine 52, située au début de l'exon 3. De même, Reinhold Erben et ses collègues ont montré la présence d'un VDR tronqué, dont il manque les 51 premiers acides aminés, dans les cellules épithéliales du duodenum chez les souris de souche Munich (93). Les expériences réalisées montrent que le VDR tronqué contient un LBD capable de fixer son ligand naturel avec une constante de dissociation similaire à celle observée pour le VDR intact. Ce VDR tronqué pourrait aussi être présent dans la souche Leuven (103). En revanche, dans la souche de Boston, la délétion de l'exon 3 provoque l'apparition d'un codon stop précoce. Il est intéressant de noter que les quatre souris génétiquement modifiées pour le gène *vdr* montrent un phénotype très semblable pour les caractéristiques étudiées jusqu'à ce jour. Dans l'étude de la souris de souche Munich, l'équipe de Rudi Balling a étudié les effets rapides induits par le Calcitriol (93). Il a été démontré que de fortes doses de métabolites du Calcitriol provoquent une augmentation abrupte de la concentration intracellulaire en calcium dans les ostéoblastes (53), (109) en présence du VDR (cellules ROS 17/2.8) et dans les cellules ne possédant pas le VDR (ROS 24/1). Cependant, ces effets non-génomiques n'ont pas été observés dans les ostéoblastes des souris exprimant un VDR altéré au niveau de son DBD mais ayant un LBD fonctionnel, suggérant que le VDR induit à la fois les actions génomiques et non-génomiques du Calcitriol. Ces données ne permettent pas de savoir si l'absence de DBD fonctionnel, l'absence du site de phosphorylation (sérine 51), ou un changement conformationnel du LBD du VDR tronqué empêchent la fixation d'autres protéines sur le VDR. Afin de clairement élucider les voies de signalisation médiées par le Calcitriol, d'autres analyses et/ou le développement de nouvelles souris génétiquement modifiées sont requis.

II- OBJECTIF DE L'ÉTUDE.

La détermination de la structure cristallographique du VDR de poisson-zèbre en présence du Gemini a permis de mettre en évidence la plasticité de la poche de fixation du ligand du VDR (110). En effet, le Gemini a la particularité de présenter deux chaînes latérales branchées sur le carbone 20 et la reconnaissance de la deuxième chaîne latérale s'accompagne d'une réorientation de la chaîne latérale de la leucine 337. Basées sur cette observation, des mutations du résidu situé en position 337 ont été réalisées pour le zVDR et des expériences préliminaires ont suggéré une activité biologique tout à fait surprenante pour le mutant zVDR Leu337His (zVDR_{L337H}).

Mon travail de thèse combine une approche structurale, fonctionnelle et biophysique du mutant zVDR_{L337H} et consiste à déterminer l'activité biologique de ce mutant en présence du ligand naturel et de ligands de type Gemini. Pour cela, des expériences de spectrométrie de masse, de transactivation transitoire et d'anisotropie de fluorescence ont été réalisées. Afin d'élucider le mécanisme moléculaire expliquant l'activité du mutant zVDR_{L337H}, la détermination des structures cristallographiques des LBD portant la mutation Leu337His du VDR en présence du Calcitriol et du Gemini a été entreprise. Dans un second temps, l'étude fonctionnelle et structurale du mutant zVDR_{L337H} en présence de deux autres analogues du Gemini a été réalisée. Pour des raisons techniques de cristallisation du LBD du VDR humain, le VDR de poisson zèbre a été utilisé pour la détermination de la structure tridimensionnelle de ces complexes. Les deux protéines sont très similaires avec 69 % d'identité, et les acides aminés de la poche de fixation du ligand sont strictement conservés. La validation du modèle zVDR pour l'étude de la mutation Leu337His a également été effectuée.

Mon projet de thèse s'inscrit dans une approche intégrative allant de la structure à l'organisme et combinant biologie moléculaire, biologie structurale, biologie cellulaire, biochimie, biophysique et expérimentation animale. L'intégration de l'ensemble de ces données a pour objectif de permettre une meilleure compréhension de la signalisation induite par le Calcitriol, notamment en distinguant la voie des effets génomiques de celle des effets non-génomiques.

III- MÉTHODES.

III.1. Mutagenèse dirigée.

III.1.1. Protocole utilisé.

La mutation Leu337His a été introduite dans la protéine zVDR-LBD clonée dans les vecteurs pET28b et pXJ440 par PCR en utilisant des amorces 33mers encadrant le codon à muter. La séquence 5'→3' du nucléotide de mutation est GGT CAC ACT CTG GAG CAT CTG GAG CCG CTG GTC. Le protocole premièrement utilisé est celui donné pour une matrice riche en GC avec l'enzyme Phusion® High-Fidelity de *Finnzymes*. Le tampon « GC » permet d'améliorer la performance de l'enzyme Phusion® DNA Polymerase dans des cas difficiles tels que des matrices très longues, riches en GC ou formant des structures secondaires. Le protocole employé est détaillé en figure 10.

| <i>composé</i> | <i>volume (μl)</i> | <i>concentration finale</i> |
|---|--------------------|-----------------------------|
| H ₂ O | 12,8 | |
| tampon Phusion HF 5X | 4 | 1X |
| dNTP (2 mM) | 2 | 200 μM |
| amorce 1 (10 μM) | 0,25 | 0,125 μM |
| amorce 2 (10 μM) | 0,25 | 0,125 μM |
| vecteur matrice (20 ng.μl ⁻¹) | 0,5 | 0,5 ng.μl ⁻¹ |
| ADN polymérase Phusion HF (2U/μl) | 0,2 | 0,05 U/μl |

| <i>programme PCR</i> | <i>T (°C)</i> | <i>durée</i> | <i>nombre de cycles</i> |
|-----------------------|---------------|--------------|-------------------------|
| dénaturation initiale | 98 | 30" | 1 |
| dénaturation | 98 | 7" | 30 |
| hybridation | 55 | 20" | 30 |
| élongation | 72 | 15"/kb | 30 |
| élongation finale | 72 | 7' | 1 |

Figure 10 : Protocole et programme de PCR utilisés pour la mutagenèse dirigée.

Le plasmide entier est amplifié par PCR (« rolling-circle amplification »). La taille des plasmides pET28b-zVDR LBD et pXJ440-zVDR LBD est de 6300 et 8000 paires de bases, respectivement. Les produits PCR sont systématiquement déposés sur gel d'agarose 1 % (voir annexe). Afin

d'éliminer la matrice d'ADN non mutée, le produit PCR (20 µl) est ensuite digéré par 20 unités de l'enzyme de restriction DpnI pendant une heure à 37 °C et 10 µl du produit de la digestion sont utilisés pour transformer 50 µl de bactéries chimio-compétentes DH5α. Les plasmides des clones issus de la transformation sont extraits et amplifiés comme indiqué en annexe, puis envoyés à séquencer à l'entreprise GATC, basée à Konstanz. Les oligonucléotides utilisés pour le séquençage sont : MF269 et RV139 pour le plasmide pET28b, et T03 et T04 pour le plasmide pXJ440 (figure 11). Les séquences obtenues sont analysées avec les logiciels libres Jalview et BioEdit. Les alignements de séquences utilisent le programme ClustalW.

| | |
|-------|----------------------|
| MF269 | GCTAGTTATTGCTCAGCGG |
| RV139 | TAATACGACTCACTATAGGG |
| T03 | CCGTCACAGATAGATTGGCT |
| T04 | GTCGACCAGACATGATAAGA |

Figure 11 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour le séquençage des plasmides pET28b et pXJ440.

III.1.2. Problèmes rencontrés.

À plusieurs reprises, un phénomène de duplication de l'oligonucléotide de mutation a été observé. Ces duplications peuvent être dues à une hybridation non spécifique et s'expliquent par l'identité de séquence entre le début et la fin de l'oligonucléotide de mutation (figure 12).

```

5519725.seq/1-1149 309 TCAC TAATCT CCT AT AT AT CTATCAG ACAC TCC CA TCCACTCCACT CAGG ACATCA CACTCCCGCTCTCC 385
oligonucléotide_muta .....

5519725.seq/1-1149 386 AT CTCC CACCTC CACACCTC TCA GCTACG CATA CAGAA GTCATC GGCTTC CCAA GAT ATCCCC GGCTT 462
oligonucléotide_muta .....

5519725.seq/1-1149 463 CAG AACCTT ACCGCTT AAATCAG ATC CTCTCTT AAATCCAC CCCCATC AATCATCAT CTCA GGTCCA ACC 539
oligonucléotide_muta .....

5519725.seq/1-1149 540 AGCTCCTTCA TCTT GAGG ACATG AACTG GAGCTC CGAGG CACCA ACTTCAAATACT CATCAAC ACCTCACTAA G 616
oligonucléotide_muta .....

5519725.seq/1-1149 617 GCGG TCACACTCT GAGC ATCTG GAGCC CTG T T ACAC TCTG GACATCT GAGCC CTGG TCTCACACTCTGGA 693
oligonucléotide_muta .....

5519725.seq/1-1149 694 GCATCTGAGCCCTT GGT CACACTCT GAGCATCT GAGCCCTT GGTCA AGTTTCA GCTTGGCTT AAGAA ACTAA 770
oligonucléotide_muta .....
1 ..... GGTCACACTCTGAGCATCTGAGCCCTTGGTCA 33

5519725.seq/1-1149 771 GCTTCATG AAGAA AACACCTGCTCTCTATG CCACTCTCCTCTCTCTCCAGATC TCCGGCCTT CAGGACCCAC G 847
oligonucléotide_muta .....

5519725.seq/1-1149 848 TCCG CATAA AACCTT CAGAC CCGCTCTCTGCTACTT CAGCCCTATACCTC CATCCA CACC CCGCCG CAGCC 924
oligonucléotide_muta .....

5519725.seq/1-1149 925 CTCTCTAC CCAA GATG ATCCAGAACT GCGG ACCTG CCA GSCCTAAC GAGAC CACTCCA A CAGTACC GCTC 1001
oligonucléotide_muta .....

5519725.seq/1-1149 1002 CTGCTCCTCCAGCC CAGCACAGCATCAGCTG ACACCTCTGGCTCTGAGGCTTTCGGGAGTCA GNTGCTCT 1073
oligonucléotide_muta .....

```

Figure 12 : Séquence obtenue après la mutation Leu337His sur le plasmide pET28b. On remarque la richesse en G et en C. L’oligonucléotide se fixe quatre fois sur le plasmide. Le début et la fin de l’oligonucléotide possèdent le même motif GGTC.

III.1.3. Protocole retenu.

Afin d’éviter les duplications de l’oligonucléotide de mutation, cinq températures d’hybridation ont été testées dans le programme PCR (55 °C, 55,7 °C, 56,7 °C, 58,1 °C et 62,6 °C). Les résultats du séquençage des produits PCR indiquent que les températures 55,7 °C et 56,7 °C permettent d’obtenir la mutation désirée, sans duplications de l’oligonucléotide. La figure 2 montre le résultat du séquençage pour la réaction PCR comportant l’étape d’hybridation à 56,7 °C. L’alignement avec l’oligonucléotide de mutation et avec la séquence du zVDR non mutée permet de visualiser la mutation (AT au lieu de TG) (figure 13).

```

oligo_mutation/1-33 384 CCA T G C C C C C C C C C C C C A G A C C T C G T C A G C T A C A G C A T A C A G A A G G C A T C G G C T T C G C C A A G A 451
aor_56.7/1-1125 .....
ZVDRLBD_77/1-1169 409 CCA T G C C C C C C C C C C C C A G A C C T C G T C A G C T A C A G C A T A C A G A A G G C A T C G G C T T C G C C A A G A 476

oligo_mutation/1-33 452 G A T C C C C G G C T T C A G A G A C C T G A C G G C T G A A G A T C A G A T C G C T C T G C T G A A G T C C A G C G C C A T C G A G A 519
aor_56.7/1-1125 .....
ZVDRLBD_77/1-1169 477 G A T C C C C G G C T T C A G A G A C C T G A C G G C T G A A G A T C A G A T C G C T C T G C T G A A G T C C A G C G C C A T C G A G A 544

oligo_mutation/1-33 520 T C A T C A T G C T T G A G G T C C A A C C A G T C C T T C A G T C T G G A G G A C A T G A G C T G G A G C T C G G A G G A C C A G A C 587
aor_56.7/1-1125 .....
ZVDRLBD_77/1-1169 546 T C A T C A T G C T T G A G G T C C A A C C A G T C C T T C A G T C T G G A G G A C A T G A G C T G G A G C T C G G A G G A C C A G A C 612

oligo_mutation/1-33 1 G G T C A C A C T C T G G A G C A T C T G G A G C C C G C G G T C 33
aor_56.7/1-1125 .....
ZVDRLBD_77/1-1169 588 T T C A A A T A C T G C A T C A A C G A C G C A C T A A G G C G G G T C A C A C T C T G G A G C T G G A G C C C G C G G T C A A 655
613 T T C A A A T A C T G C A T C A A C G A C G C A C T A A G G C G G G T C A C A C T C T G G A G C T G G A G C C C G C G G T C A A 680

oligo_mutation/1-33 656 G T T T C A G G T T G G T C T G A A G A A G C T G A A G C T T C A T G A A G A A G A G C A C G T G C T G C T G A T G G C C A T C T G C C 723
aor_56.7/1-1125 .....
ZVDRLBD_77/1-1169 681 G T T T C A G G T T G G T C T G A A G A A G C T G A A G C T T C A T G A A G A A G A G C A C G T G C T G C T G A T G G C C A T C T G C C 748

```

Figure 13 : Alignement de l’oligonucléotide de mutation (1^{ère} ligne) avec une portion de la séquence du zVDR après mutation (2^{ème} ligne) et la séquence du zVDR non mutée en position 337 (3^{ème} ligne).

III.2. Expression et purification du domaine de fixation du ligand du mutant zVDR_{L337H}.

III.2.1. Production DU zVDR_{L337H} dans *E. coli*.

Le domaine de fixation du ligand (résidus Leu156-Ser453) est produit dans *Escherichia coli* BL21 (DE3) sous forme d'une protéine fusionnée en son extrémité N-terminale à un polypeptide hexahistidine (vecteur d'expression pET28b). La souche *Escherichia coli* BL21 (DE3) contient dans son génome le gène codant pour l'ARN polymérase du phage T7, sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG. La construction clonée dans le plasmide pET28b comprend un site de coupure à la thrombine situé entre l'étiquette poly-histidine et la protéine d'intérêt. Le VDR de poisson-zébre présente un site interne de clivage par une protéase après l'arginine 196, la mutation Arg196Gly permet d'éviter cette protéolyse. La glycine a été choisie pour remplacer l'arginine étant donné que dans les séquences des VDR de plusieurs espèces, la glycine est présente à cette position. L'expression, la purification et la cristallisation ont été réalisées avec le zVDR_{L337H} portant la mutation Arg196Gly. Les conditions de culture et de production en milieu LB à 37 °C et 25 °C sont détaillées en annexe. Le gel SDS-PAGE 12,5 % présenté en figure 14 montre la migration de l'extrait cellulaire avant et après induction à l'IPTG.

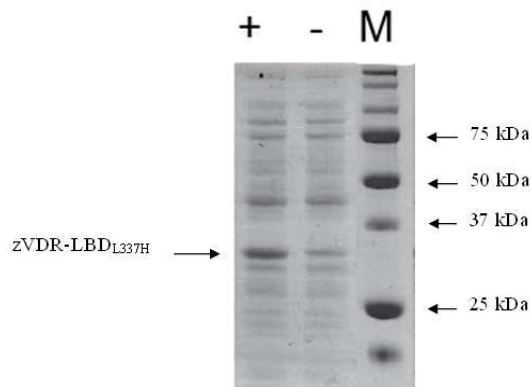


Figure 14 : La protéine de fusion (His)₆-zVDR-LBD_{L337H} est sur-exprimée après induction à l'IPTG. Gel SDS-PAGE 12,5 % indiquant la migration de la protéine d'intérêt dans l'extrait bactérien. Les signes + et - indiquent la présence ou l'absence de l'agent inducteur IPTG. M correspond au marqueur de poids moléculaire « All blue » de *Biorad*.

III.2.2. Préparation de l'extrait brut.

La procédure consiste à lyser les cellules provenant de deux litres de culture de zVDR-LBD_{L337H}. Les cellules sont reprises dans 50 ml de tampon de lyse et lysées par sonification (protocole décrit en annexe). Le lysat est ensuite ultra-centrifugé pendant deux heures à 45 000 rpm à 4 °C.

III.2.3. Étape de chromatographie d'affinité sur résine chélatant les ions cobalt.

Le principe et les conditions expérimentales de cette étape sont décrits dans l'annexe X. Le surnageant est chargé sur la résine contenant les ions cobalt (Talon[®] de Clontech). L'élution de la protéine portant l'étiquette poly-histidines se fait à 100 mM d'imidazole. Le chromatogramme obtenu est présenté en figure 15. Les fractions 20 et 21 correspondent au sommet du pic sur le chromatogramme. Elles sont rassemblées (volume de 9 ml) et déposées sur gel SDS-PAGE 12,5 % (figure 17).

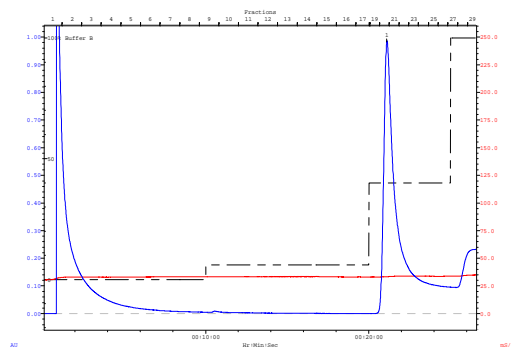


Figure 15: Chromatogramme obtenu par étape de chromatographie d'affinité sur résine Talon[®] sur l'extrait soluble de zVDR-LBD_{L337H}. La courbe bleue indique la densité optique à 280 nm en fonction du temps, la courbe rouge représente la conductivité en fonction du temps et le pourcentage en tampon B (composition décrite en annexe) est indiqué par la courbe en pointillés noirs. Le numéro des fractions collectées est indiqué au dessus du chromatogramme.

III.2.4. Étape de protéolyse du polypeptide de fusion N-terminal.

L'élimination du polypeptide de fusion s'effectue par ajout de thrombine bovine plasmatique (1 unité. μl^{-1}) suivi d'une incubation de 48 heures à 4 °C en présence d'1 mM de l'agent réducteur TCEP. Afin d'augmenter l'efficacité de la coupure, l'échantillon est concentré sur Amicon® Ultra ultracel-30 kD (*Millipore*) puis dilué dans le tampon C (composition détaillée en annexe). Cette étape permet de diminuer progressivement la concentration en imidazole. De plus, l'ajout de 5 mM de CaCl_2 au moment de la coupure contribue également à augmenter l'activité de la thrombine. La coupure de l'étiquette poly-histidines ainsi que l'absence de protéolyse secondaire sont systématiquement vérifiées par gel SDS-PAGE 12,5 % (figure 17).

III.2.5. Étape de chromatographie par exclusion de taille.

L'échantillon de zVDR-LBD_{L337H} dépourvu du polypeptide de fusion est concentré sur Amicon® Ultra ultracel-30 kD (*Millipore*) jusqu'à un volume final de 5 ml puis injecté sur une colonne Superdex 75 16/60 de *Pharmacia* préalablement équilibrée avec le tampon C. Le volume d'éluion correspond au LBD sous forme monomérique (figure 16). Les fractions contenant le LBD sont analysées sur gel SDS-PAGE 12,5 % (figure 17) avant d'être rassemblées. Les fractions 30 à 32 sont rassemblées (ce qui correspond à un volume de 6 ml) et concentrées sur Amicon® Ultra ultracel-30 kDa (*Millipore*), jusqu'à 6 mg. ml^{-1} . On obtient en moyenne 3 mg de protéine pure par litre de culture. À ce stade, afin d'éviter d'éventuelles oxydations de la protéine, 1 mM de l'agent réducteur TCEP est ajouté à l'échantillon.

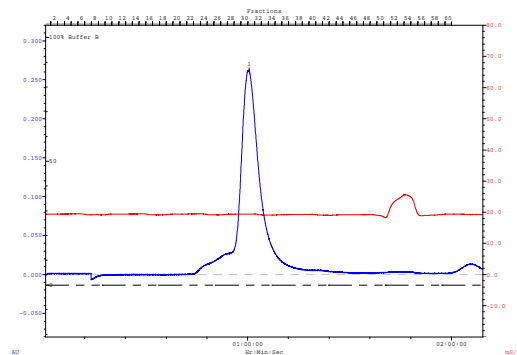


Figure 16 : Chromatogramme obtenu après filtration sur gel sur colonne Superdex 75 16/60 de l'extrait protéique thrombiné. L'épaulement du pic observé correspond à la protéine fusionnée à l'étiquette poly-histidines.

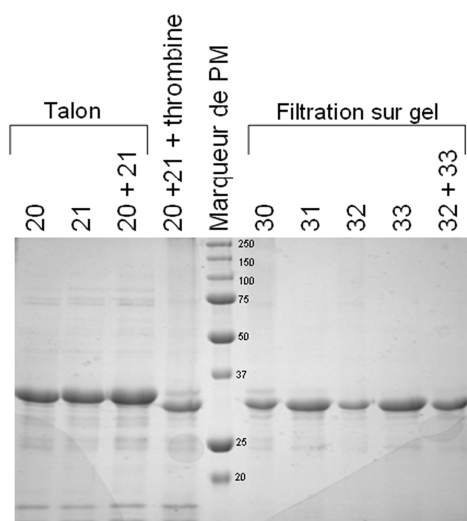


Figure 17 : Après les deux chromatographies successives, la protéine d'intérêt présente un degré de pureté élevé. Gel SDS-PAGE 12,5 % montrant la migration des fractions issues des deux chromatographies successives. Les fractions 20 et 21 correspondent au pic du chromatogramme obtenu après l'étape de chromatographie d'affinité. Les fractions 30 à 33 correspondent au pic du chromatogramme issu de la filtration sur gel. Les chiffres inscrits sur le gel indiquent la gamme du marqueur de poids moléculaire (PM).

L'analyse de la pureté de l'échantillon s'effectue par :

- électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes SDS-PAGE 12,5 % (voir annexe). La présence d'une seule bande à la taille attendue signifie absence de protéolyse.
- électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions natives (protocole détaillé en annexes).

III.2.6. Formation du complexe récepteur/ligand/peptide coactivateur.

La protéine est incubée 30 minutes en présence de deux équivalents de ligand et trois équivalents de peptide mimant le coactivateur SRC-2 (appelé TIF-2 ou GRIP-1) dont la séquence en acides aminés est KHKILHRLLDSS. La fixation du ligand dans la poche du récepteur entraîne un repositionnement de l'hélice 12. Ce changement de conformation permet la mise en place d'une interface d'interaction entre 12 et des facteurs de coactivation, impliquant les hélices H3 et H4 du récepteur. Cette interaction s'effectue via un motif conservé des coactivateurs : le motif LXXLL (avec L représente une leucine et X un acide aminé quelconque). Les résidus des hélices 3, 4 et

12 de l'interface d'interaction forment des liaisons électrostatiques avec les résidus de la chaîne principale du peptide coactivateur. La présence d'un peptide coactivateur stabilise la conformation agoniste du récepteur.

III.3. Étude cristallographique des complexes zVDR-LBD/ligands/peptide coactivateur.

La détermination de structure tridimensionnelle d'une macromolécule par diffraction des rayons X nécessite l'obtention de cristaux uniques de taille et de qualité suffisantes. Un cristal est constitué par l'agencement de molécules régulièrement empilées dans les trois directions de l'espace. La cohésion de l'édifice est assurée par de multiples interactions intermoléculaires non covalentes (interactions de Van der Waals, liaison hydrogènes et interactions ioniques). La pureté de l'échantillon est un paramètre essentiel pour la réussite de la cristallisation. Un autre point important pour la cristallisation d'une protéine concerne l'absence de régions flexibles. En effet, ces régions sont sources de désordre et peuvent nuire à la formation de l'édifice cristallin lorsqu'elles sont impliquées dans des interactions intermoléculaires.

III.3.1. Principe.

La cristallisation consiste à diminuer la solubilité d'un soluté (protéine) afin d'établir des interactions intermoléculaires spécifiques, pour former un cristal. Le caractère spécifique de ces interactions est fondamental car des interactions non spécifiques mènent à la précipitation du soluté. Au départ, la protéine est soluble, les molécules de protéine sont stabilisées par des interactions protéine/solvant. La déstabilisation des interactions protéines/solvant au profit d'interactions protéine/protéine se fait par ajout dans le milieu d'une molécule plus affine pour les molécules de solvant, par exemple, des sels.

III.3.2. Condition et technique de cristallisation utilisée.

Il existe plusieurs méthodes de cristallisations, la technique utilisée est celle de la diffusion de vapeur. Elle s'utilise en gouttes assises ou en gouttes suspendues (figure 18). Dans le cas de zVDR-LBD, la solution du réservoir contient 1,6 M de sulfate de lithium, 25 mM de sulfate de

magnésium et 50 mM de tampon Bis-Tris pH 6,5. La goutte est constituée d'un mélange protéine/solution réservoir (ratio 1:1), la solution réservoir dans la goutte est diluée par rapport à la solution dans le réservoir et il y a diffusion de vapeur de la goutte vers le réservoir jusqu'à l'obtention d'un équilibre. C'est au cours de ce processus que la protéine cristallise. Dans le cas de zVDR-LBD, les cristaux apparaissent le lendemain, à une température de 24 °C.

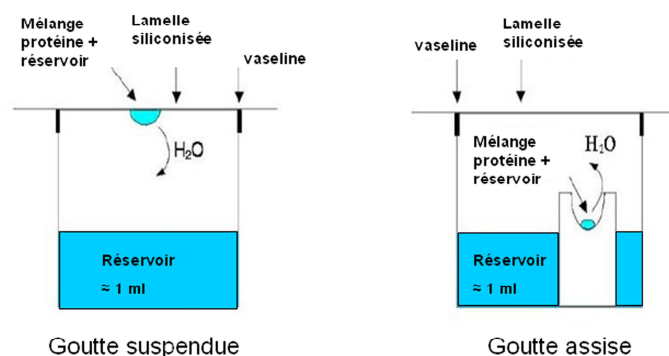


Figure 18 : Représentation schématique de la technique de la diffusion de vapeur en goutte suspendue et en goutte assise.

III.3.3. Optimisation des cristaux.

De nombreux cristaux apparaissent dès le lendemain. Les cristaux ont des tailles très variées selon la concentration en sulfate de lithium et en sulfate de magnésium. Les plus gros cristaux (200 μm de long) apparaissent dans la condition citée ci-dessus. Afin d'optimiser la qualité et la taille des cristaux obtenus, la technique de micro-ensemencement est appliquée. Pour cela une bille « seed bead » de *Hampton Research* est utilisée. Une goutte contenant des cristaux issus des premiers essais est reprise dans 30 μl de solution dite stabilisante (1,5 M de sulfate de lithium, 20 mM de sulfate de magnésium et 30 mM de tampon Bis-Tris pH 6,5). La solution est vortexée 90 secondes afin de broyer les cristaux. Des dilutions de 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} dans la solution stabilisante sont utilisées pour les essais de cristallisation.

III.3.4. Cristaux obtenus et problèmes rencontrés.

Les cristaux ont la forme de bipyramides hexagonales et sont de tailles variées (figure 19). Les clichés de diffraction obtenus ont montré que les plus gros cristaux ne donnaient pas les

meilleures données cristallographiques en termes de mosaïcité. Dans de nombreux cas, les plus gros cristaux étaient maclés ; leur partie centrale correspondait en fait à plusieurs cristaux. Pour les cristaux de petite taille (50 μm), la partie centrale était moins développée et aucun macle n'a été observé.

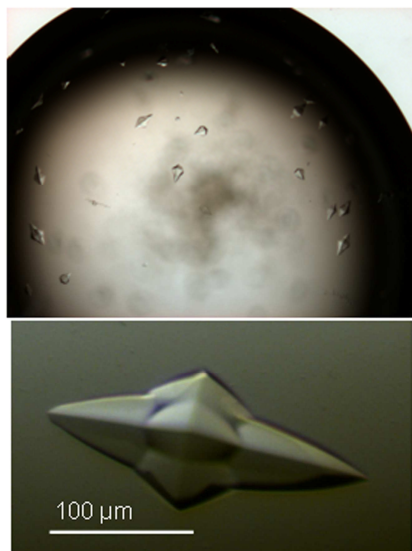


Figure 19 : Cristaux obtenus par diffusion de vapeur en gouttes suspendues, à 24 °C.

Un autre principal problème concerne la mosaïcité des cristaux. L'étape de refroidissement rapide est critique pour ce paramètre. La solution initialement utilisée contenait la solution de la condition de cristallisation avec 8 % de glycérol et 4 % de PEG 400. La présence d'une forte concentration en sulfate de lithium (1,6 M) exigeait que la manipulation du cristal soit la plus rapide possible afin d'éviter la formation de cristaux de sels.

III.3.5. Solutions.

Étant donné la mauvaise qualité des données de diffraction obtenues, j'ai effectué des essais de refroidissement rapide avec une huile cryo-protectrice de *Hampton Research*. Cette méthode a nettement contribué à l'amélioration de la mosaïcité (figure 9). Une fois trempé dans l'huile cryo-protectrice, le cristal est refroidi directement sous le flux d'azote à 100 K.

Afin d'éviter les problèmes dus au maillage des cristaux au niveau de leur zone centrale, des enregistrements ont été faits sur une ligne micro-foyer, ID23-2. En effet, il est alors possible de

déterminer précisément la zone du cristal à irradier. En irradiant la pointe du cristal, nous sommes alors sûrs de ne pas observer les effets du maillage de la zone centrale. Un inconvénient majeur des lignes micro-foyer est le dommage dû à l'irradiation. Dans le cas de ces cristaux, le groupe d'espace est P6₅22, l'angle de collecte $\Delta\Omega$ minimal est donc de 60 °. Toutefois, il est préférable d'enregistrer un maximum de données afin d'améliorer la multiplicité et donc le rapport signal/bruit. L'utilisation du mini-Kappa peut également améliorer la qualité des clichés de diffraction.

III.3.6. Traitement des données de diffraction.

Les enregistrements des données de diffraction ont été effectués à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility), à Grenoble, sur la ligne ID-29 pour le complexe zVDR-LBD_{L337H}/Calcitriol, et sur la ligne micro-focus ID23-2 pour le complexe zVDR-LBD_{L337H}/Gemini, sur la ligne ID14-1 pour les complexes zVDR-LBD/ligands BXL et zVDR-LBD_{L337H}/ligands BXL. Les cristaux appartiennent au groupe d'espace P6₅22 avec un monomère par unité asymétrique. Les données ont été indexées, intégrées et mises à l'échelle avec le programme HKL2000 (111) (tableaux 1,2 et 3). Les valeurs entre parenthèses correspondent aux statistiques obtenues dans la tranche de résolution la plus haute. Le paramètre R_{sym} est calculé selon l'expression : $R_{\text{sym}}(I) = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_{\text{hkl},i} - \langle I_{\text{hkl}} \rangle|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_{\text{hkl},i}|}$ avec $\langle I_{\text{hkl}} \rangle$ étant l'intensité moyenne des multiples observations $I_{\text{hkl},i}$ pour des réflexions reliées par symétrie. Les valeurs rmsd (root mean square deviation) sont données à partir de valeurs idéales. Le paramètre R_{cryst} est calculé selon l'expression : $R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|}$ avec F_{obs} et F_{calc} étant les amplitudes des facteurs de structures observées et calculées, respectivement. R_{free} est calculé en utilisant un échantillon aléatoire contenant 5 % des observations exclues tout au long de l'affinement.

| | zVDR-LBD _{L337H} /Calcitriol | zVDR-LBD _{L337H} /Gemini |
|--|---------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Traitement des données</i> | | |
| Résolution (Å) (dernière tranche) | 50-2,35 (2,43-2,35) | 50-2,8 (2,9-2,8) |
| Groupe d'espace du cristal | P 6522 | P 6522 |
| Paramètres de maille | a = b = 65,85; c = 264,37 | a = b = 66,09; c = 265,24 |
| Refléxions uniques (dernière tranche) | 13825 (819) | 9101 (876) |
| Multiplicité moyenne (dernière tranche) | 6,2 (4,8) | 6,2 (6,5) |
| R _{sym} (%) (dernière tranche) | 7,5 (32,5) | 8,2 (39,3) |
| Complétude (dernière tranche) | 91,2 (56,6) | 98,5 (99,4) |
| Moyenne de I/σ (%) (dernière tranche) | 21,9 (2,8) | 18,2 (3,1) |
| <i>Affinement</i> | | |
| Résolution (Å) | 24,8-2,35 | 15-2,8 |
| rmsd longueur de liaison (Å) | 0,003 | 0,002 |
| rmsd angles (°) | 0,742 | 0,7 |
| R _{cryst} (%) | 20,0 | 20,4 |
| R _{free} (%) | 25,5 | 25,4 |
| B _{av.} atomes de protéine (Å ²) | 66,4 | 71,0 |
| B _{av.} atomes du ligand (Å ²) | 49,6 | 60,0 |
| B _{av.} atomes du peptide (Å ²) | 60,6 | 62,3 |
| B _{av.} atomes de molécules d'eau (Å ²) | 58,8 | 60,5 |
| <i>procheck</i> | | |
| résidus dans régions préférées (%) | 97,5 | 96,3 |
| résidus dans régions autorisées (%) | 2,5 | 3,7 |

Tableau 1 : Statistiques du traitement de données de diffraction et statistiques obtenues après affinement pour les complexes zVDR-LBD_{L337H}/Calcitriol et zVDR-LBD_{L337H}/Gemini.

| | zVDR-LBD/BXL-0072 | zVDR-LBD/BXL-0097 |
|--|---------------------------|---------------------------|
| <i>Traitement des données</i> | | |
| Résolution (Å) (dernière tranche) | 50-2,40 (2,49-2,40) | 50-2,5 (2,59-2,5) |
| Groupe d'espace du cristal | P 6522 | P 6522 |
| Paramètres de maille | a = b = 66,11; c = 264,64 | a = b = 65,84; c = 263,72 |
| Refléxions uniques (dernière tranche) | 13853 (1378) | 12720 (1225) |
| Multiplicité moyenne (dernière tranche) | 2,8 (2,9) | 4,7 (4,0) |
| R _{sym} (%) (dernière tranche) | 5,8 (35,1) | 11,0 (25,6) |
| Complétude (dernière tranche) | 96,2 (99,0) | 98,7 (100) |
| Moyenne de I/σ (%) (dernière tranche) | 14,8 (2,3) | 18,1 (3,9) |
| <i>Affinement</i> | | |
| Résolution (Å) | 10-2,4 | 10-2,5 |
| rmsd longueur de liaison (Å) | 0,005 | 0,011 |
| rmsd angles (°) | 1,049 | 1,432 |
| R _{cryst} (%) | 19,8 | 20,0 |
| R _{free} (%) | 26,5 | 26,8 |
| B _{av.} atomes de protéine (Å ²) | 60,5 | 65,6 |
| B _{av.} atomes du ligand (Å ²) | 46,5 | 55,5 |
| B _{av.} atomes du peptide (Å ²) | 59,0 | 64,2 |
| B _{av.} atomes de molécules d'eau (Å ²) | 56,6 | 60,1 |
| <i>procheck</i> | | |
| résidus dans régions préférées (%) | 97,9 | 95,5 |
| résidus dans régions autorisées (%) | 2,1 | 4,5 |

Tableau 2 : Statistiques du traitement de données de diffraction et statistiques obtenues après affinement pour les complexes zVDR-LBD/BXL-72 et zVDR-LBD/BXL-97.

| | zVDR-LBD _{L337H} /BXL-0072 | zVDR-LBD _{L337H} /BXL-0097 |
|--|--|--|
| <i>Traitement des données</i> | | |
| Résolution (Å) (dernière tranche) | 50-2,7 (2,85-2,75) | 50-2,6 (2,69-2,6) |
| Groupe d'espace du cristal | P6 ₅ 22 | P6 ₅ 22 |
| Paramètres de maille | <i>a</i> = <i>b</i> = 65,74; <i>c</i> = 263,85 | <i>a</i> = <i>b</i> = 66,02; <i>c</i> = 264,56 |
| Refléxions uniques (dernière tranche) | 9462 (915) | 10603 (1080) |
| Multiplicité moyenne (dernière tranche) | 3,8 (4,0) | 3,4 (3,5) |
| R _{sym} (%) (dernière tranche) | 8,8 (40,7) | 5,9 (32,0) |
| Complétude (dernière tranche) | 98,3 (99,9) | 92,9 (99,7) |
| Moyenne de I/σ (%) (dernière tranche) | 11,7 (2,1) | 15,8 (2,3) |
| <i>Affinement</i> | | |
| Résolution (Å) | 15-2,75 | 10-2,6 |
| rmsd longueur de liaison (Å) | 0,002 | 0,002 |
| rmsd angles (°) | 0,648 | 0,749 |
| R _{cryst} (%) | 19,9 | 21,2 |
| R _{free} (%) | 24,6 | 28,7 |
| B _{av.} atomes de protéine (Å ²) | 54,5 | 67,4 |
| B _{av.} atomes du ligand (Å ²) | 42,9 | 56,6 |
| B _{av.} atomes du peptide (Å ²) | 53,4 | 62,8 |
| B _{av.} atomes de molécules d'eau (Å ²) | 49,5 | 67,6 |
| <i>procheck</i> | | |
| résidus dans régions préférées (%) | 96,3 | 94,6 |
| résidus dans régions autorisées (%) | 3,7 | 5,4 |

Tableau 3 : Statistiques du traitement de données de diffraction et statistiques obtenues après affinement pour les complexes zVDR-LBD_{L337H}/BXL-72 et zVDR-LBD_{L337H}/BXL-97.

Les phases ont été déterminées par différence de Fourier. Un premier cycle “rigid body” a été effectué en prenant comme modèle la structure zVDR-LBD/Calcitriol ou zVDR-LBD/Gemini. Puis des cycles alternatifs d’affinement de vraisemblance maximale et d’affinement dans l’espace réel ont été effectués avec les programmes REFMAC (112) et COOT (113). Les facteurs d’agitation thermiques ont été affinés de manière isotropique. Les statistiques obtenues alors assez moyennes et la densité électronique de l’histidine 337 n’est pas complète. Un affinement TLS a donc été entrepris. Le fichier tls a été généré par le serveur TLSMD (114) disponible sur internet à l’adresse <http://skuld.bmsc.washington.edu/~tlsmd/index.html>. Les statistiques obtenues après affinement sont présentées dans les tableaux 1, 2 et 3. L’affinement TLS a été effectué dans un premier temps avec le programme REFMAC puis avec PHENIX.REFINE (115). Les meilleures statistiques ont été obtenues en utilisant le programme PHENIX.REFINE (tableau 4). Les volumes des poches de fixation du ligand ont été calculés par le serveur CASTp (Computed Atlas of Surface Topography of proteins disponible à l’adresse <http://sts.bioengr.uic.edu/castp/calculation.php> (116).

| | | |
|------------------------------|--------|--------------|
| <i>Affinement</i> | REFMAC | REFMAC + TLS |
| rmsd longueur de liaison (Å) | 0,009 | 0,007 |
| rmsd angles (°) | 1,307 | 1,149 |
| Rcryst (%) | 23,1 | 21,1 |
| Rfree (%) | 29,9 | 27,2 |
| <i>Affinement</i> | PHENIX | PHENIX + TLS |
| rmsd longueur de liaison (Å) | 0,007 | 0,002 |
| rmsd angles (°) | 1,104 | 0,7 |
| Rcryst (%) | 21,1 | 20,4 |
| Rfree (%) | 28,8 | 25,4 |

Tableau 4 : Comparaison des statistiques obtenues avec les différents affinements testés pour le complexe zVDR-LBD_{L337H}/Gemini (résolution 2,8 Å).

III.4. Détermination des affinités relatives par spectrométrie de masse.

III.4.1. Méthode utilisée : ESI-TOF.

La spectrométrie de masse (ou MS) est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). La spectrométrie de masse dite supramoléculaire apporte des informations (stœchiométrie, oligomérisation, spécificité, affinités relatives) sur les édifices maintenus par des liaisons non-covalentes. Cette technique est largement utilisée pour l'étude de complexes protéine/ligand. En MS supramoléculaire, l'analyse de complexes non-covalents implique l'utilisation d'une source d'ionisation très douce : l'électronébuliseur (Electrospray, ES) et d'un analyseur à temps de vol (Time Of Flight, TOF). On parle de technique ESI-TOF. Afin de permettre une ionisation optimale de l'échantillon, il doit se trouver dans une solution d'acétate d'ammonium.

Les affinités de liaison peuvent être évaluées en déterminant les valeurs VC_{50} . Celles-ci correspondent au voltage pour lequel 50 % des complexes sont dissociés et elles sont obtenues en augmentant progressivement le voltage jusqu'à ce qu'on observe 50 % de complexes dissociés. Pour pouvoir calculer une valeur VC_{50} , il est nécessaire de saturer le récepteur avec le ligand. De plus, la spectrométrie de masse est une méthode très fine qui permet de calculer avec précision

des masses moléculaires, mais l'affinité obtenue pour un composé comme un ligand par exemple, en considérant la valeur VC_{50} , est à prendre avec précaution. En effet, cette méthode permet uniquement d'explorer la partie de l'affinité due aux liaisons électrostatiques, mais par contre la partie de l'affinité due aux contacts hydrophobes est totalement négligée.

III.4.2. Préparation de l'échantillon.

À l'issue de la purification des VDR muté et sauvage, le tampon dans lequel les protéines se trouvent est échangé contre une solution contenant 200 mM d'acétate d'ammonium pH 6,7 par passage sur une colonne Zeba 0,5 ml (*Pierce*). En utilisant le même type de colonne, les échantillons sont ensuite dessalés. L'étape de dessalage est très importante car la présence de sels entraîne la formation d'adduits de sels, responsables d'un élargissement des pics observés sur le spectre. Dans le cas de la présence de sels, plusieurs pics sont observés et cela nuit à un assignement correct des pics. Les spectres sont réalisés sur les échantillons dilués à 5 μ M dans une solution contenant 50 mM d'acétate d'ammonium.

III.5. Expériences de transactivation par la technique du gène-rapporteur.

Les tests fonctionnels sont effectués avec des cellules de la lignée tumorale mammaire humaine MCF-7. La technique du gène rapporteur permet d'étudier l'activité d'un promoteur et/ou l'efficacité de transfection. Chaque mesure est la moyenne de trois essais indépendants, réalisés en triplicata. L'activité luciférase permet de normaliser l'activité β -galactosidase.

III.5.1. Culture des cellules MCF-7.

Les cellules MCF-7 sont cultivées en plaque 24-puits (10^5 cellules par puits) dans du milieu Dulbecco (DMEM $1g.l^{-1}$ de glucose) contenant 10 % de sérum de veau fœtal, 5 % de gentamycine et 0,6 μ g/ml d'insuline. Les cellules sont laissées 24 heures dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide contenant 5 % de CO_2 , afin d'obtenir 50 % de confluence au moment de la transfection.

III.5.2. Transfection des cellules.

Les liposomes sont formés grâce à l'agent de transfection jetPEI™ de *Polyplus transfection*, conformément aux instructions du fabricant. Il s'agit d'un cation qui compacte l'ADN et forme des complexes chargés positivement. Ces complexes interagissent avec les protéoglycanes anioniques de la surface cellulaire et entrent par endocytose dans la cellule. Une fois dans l'endosome, le réactif retient les protons, ce qui a pour effet de tamponner le pH endosomal et évite la dégradation de l'ADN. L'influx de protons induit la rupture de l'endosome et l'ADN est libéré dans le cytoplasme. Les cellules sont transfectées par un mélange contenant 25 ng du vecteur pXJ440 exprimant la protéine de fusion Gal4DBD_VDR-LBD, 250 ng du plasmide rapporteur ptk-LUC, 50 ng du vecteur pCH110 portant le gène *LacZ* exprimant la β -galactosidase, sous le contrôle de l'opéron lactose, et 675 ng du plasmide porteur pBluescript. Ce mélange contenant 1 μ g d'ADN est dilué dans 50 μ l d'une solution de NaCl à 150 mM. A cette solution sont ajoutés 2 μ l de jet PEI™ dilué dans 50 μ l d'une solution de NaCl à 150 mM. La solution ADN/jetPEI™ est vortexée 10 secondes, brièvement centrifugée et laissée à incuber 30 minutes à température ambiante. Puis 100 μ l de ce mélange sont ajoutés à chaque puits contenant 500 μ l de milieu et les cellules à une confluence de 50 %. Les plaques sont mises à incuber à 37°C.

III.5.3. Traitement des cellules.

Dix heures après la transfection, les cellules sont lavées dans du tampon PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM sodium phosphate dibasique, 2 mM potassium phosphate monobasique, pH 7,4) frais et stérile puis les ligands à tester (ou le solvant seul) dilués dans 500 μ l de milieu frais, sont ajoutés aux cellules. Les expériences ont été réalisées avec une concentration en ligands de 10^{-7} M, concentration pour laquelle on observe une saturation du VDR. Les plaques sont remises dans l'incubateur. Les cellules sont récoltées 24 heures plus tard.

III.5.4. Récolte et lyse des cellules.

Le milieu de culture est aspiré et les cellules sont rincées avec du tampon PBS frais. Les cellules sont ensuite lysées avec 100 μ l/puits de tampon Reporter Gene Assay Lysis Buffer de *Roche* et mises sous agitation à température ambiante pendant 10 minutes. Les lysats sont alors transférés

en plaque 96 puits et centrifugés dix minutes à 500 g. Les lysats clarifiés sont transférés dans une nouvelle plaque 96 puits et conservés à -20 °C.

III.5.5. Test β -galactosidase.

Vingt microlitres de lysat sont transférés dans une plaque 96 puits costar 3599 de *Corning* auxquels sont ajoutés 180 μ l d'une solution ONPG (0,2 g d'ONPG pour 50 ml d'eau ultra-pure/tampon β -galactosidase dans un rapport 1/5). Le tampon β -galactosidase contient 60 mM de Na_2HPO_4 , 40 mM de $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, 10 mM de KCl, 50 mM de β -mercaptoéthanol et 1 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. La plaque est laissée à incuber à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une coloration jaune (environ 30 minutes). La réaction est stoppée par ajout de 75 μ l d'une solution de Na_2CO_3 à 1 M. La densité optique à 415 nm (DO_{415}) est ensuite mesurée par un spectrophotometer (*EL808 Ultra Microplate Reader; Bio-Tek Instruments Inc.*) et les unités galactosidase sont calculées selon la formule :

$$U_{\text{galactosidase}} = (100 \times V_{\text{lyse}} \times \text{DO}_{415}) / (V_{\text{test}} \times \text{Tps})$$

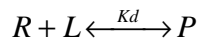
V_{lyse} étant le volume de tampon de lyse par puits (soit 100 μ l), V_{test} le volume de lysat utilisé pour le test (soit 20 μ l) et Tps le temps de réaction à 37 °C exprimé en heure.

III.5.6. Test luciférase.

Dix microlitres sont transférés en plaque luminomètre 96 puits auxquels sont ajoutés 50 μ l de réactif luciférine, préparé extemporanément. Ce réactif contient 530 μ M d'ATP, 470 μ M de luciférine, 270 μ M de coenzyme A et un demi-volume de tampon luciférase 2X. Ce dernier se compose de 40 mM de tampon TRIS-Phosphate pH 7,8, 2,14 mM de MgCl_2 , 5,4 mM de MgSO_4 , 0,2 mM d'EDTA et 66,6 mM de DTT. Les mesures des tests de l'activité luciférase sont réalisées sur un luminomètre LB96P de *Berthold Technologies*, avec un temps de lecture de 10 secondes.

III.6. Mesures d'anisotropie de fluorescence : étude du recrutement du peptide coactivateur SRC-1 par le VDR sauvage et le VDR muté.

Les mesures d'anisotropie de fluorescence ont été effectuées avec un spectrofluoromètre T-format SLM 8000. La titration a été réalisée en ajoutant des concentrations croissantes de complexes zVDR-LBD/ligand ou zVDR-LBD_{L337H} à 1 µM de peptide TAMRA-SRC-1 dans 20 mM TRIS-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl. La séquence du peptide SRC-1 est : RHKILHRLQLQEGSPS. L'affinité d'interaction du peptide SRC-1 pour le zVDR-LBD a été quantifiée en réponse aux ligands Calcitriol, Gemini, BXL-72 et BXL-97. La longueur d'onde d'excitation est de 550 nm et la lumière émise a été monitorée par des filtres « high-pass » (550 nm) (Kodak). Un système fait-maison assure la rotation automatique du polarisateur d'excitation. En considérant que le peptide TAMRA-SRC-1 se lie au zVDR-LBD avec une stœchiométrie 1:1, le modèle utilisé pour décrire l'expérience est le suivant :



L et R représentent le zVDR-LBD/ligand ou zVDR-LBD_{L337H}/ligand et le peptide TAMRA-SRC-1 respectivement, P désigne le complexe zVDR-LBD/ligand-TAMRA-SRC-1 ou zVDR-LBD_{L337H}/ligand-TAMRA-SRC-1.

L'équation Scatchard a été modifiée afin d'ajuster l'anisotropie, r, selon :

$$r = r_0 + (r_f - r_0) \left(\frac{(R_t + L_t + K_d) - \sqrt{(R_t + L_t + K_d)^2 - 4R_t L_t}}{2R_t} \right)$$

Lt et Rt sont les concentrations totales de zVDR-LBD et de peptide TAMRA-SRC-1, respectivement; rf représente l'anisotropie au plateau, lorsque tout le complexe est formé, tandis que r₀ et r correspondent aux valeurs d'anisotropie du peptide TAMRA-SRC-1 en l'absence et en présence de concentrations données de zVDR-LBD/ligand, respectivement. Kd correspond à la constante de dissociation. Toutes les mesures ont été effectuées à 20 °C et les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Les données d'anisotropie ont été traitées avec le logiciel Origin.

IV- RÉSULTATS.

IV.1. Étude du mutant VDR Leu337His lié à son ligand naturel et au Gemini.

IV.1.1. Effet de la mutation Leu337His sur l'activité génomique du VDR en présence du Calcitriol ou du Gemini.

Nous avons étudié la capacité du mutant de zVDR de poisson-zèbre Leu337His (Leu309His pour le VDR humain) à induire une activité transcriptionnelle à l'aide d'un système de gène-rapporteur. Le promoteur du gène codant pour la luciférase a été utilisé et placé sous le contrôle de quatre copies de l'élément de régulation Gal (GAL4), en amont du gène *luc*.

Dans le système utilisé, le LBD du zVDR sauvage ou muté est fusionné au domaine de fixation à l'ADN de l'élément Gal (DBD-GAL). Cette fusion permet de positionner le récepteur au niveau de la région promotrice du gène codant pour la luciférase via l'interaction GAL4/DBD-GAL. La fixation d'un ligand agoniste dans la poche hydrophobe du VDR entraîne un changement de conformation du VDR. Ce changement conformationnel permet au VDR d'interagir avec son partenaire RXR et des coactivateurs, naturellement présents dans les cellules MCF-7 (lignée de cellules tumorales mammaires). Le complexe VDR/RXR/coactivateurs permet le recrutement de la machinerie transcriptionnelle puis la transcription du gène *luc*. L'activité luciférase mesurée dans les cellules traduit l'activité transcriptionnelle du gène *luc* induite par le VDR. Elle dépend d'une part, de l'efficacité du ligand à se lier au LBD de VDR, et d'autre part, de l'efficacité du VDR à recruter des facteurs de transactivation. Précédemment, des expériences de transactivation déterminant l'activité transcriptionnelle du mutant VDR-LBD_{L309H} humain induite par une concentration de 10^{-7} M en Calcitriol ou en Gemini en cellules HEK 293 EBNA (lignée cellulaire dérivée de cellules embryonnaires humaines de rein contenant une copie du gène *EBNA-1*) avaient donné des résultats similaires.

Les résultats d'au moins trois expériences indépendantes sont présentés en figure 20. La première barre du diagramme montre que lorsque les cellules sont uniquement traitées avec le solvant organique (DMSO) dans lequel les ligands sont dissous, il n'y a pas de transcription du gène *luc*. Ces résultats de transactivation montrent que le mutant du zVDR_{L337H} et le mutant Leu309His du VDR humain (hVDR_{L309H}) se comportent de la même manière en présence du ligand Gemini et du Calcitriol. Le résultat le plus remarquable réside dans le fait qu'en présence du Calcitriol, le VDR muté (zVDR_{L337H} et hVDR_{L309H}) a une activité transcriptionnelle nulle par comparaison avec le VDR sauvage (zVDR wt et hVDR wt). En revanche, en présence du ligand Gemini, aucune différence en efficacité de transactivation n'est observée entre le zVDR sauvage et muté (zVDR wt et zVDR_{L337H}). Le même résultat a été obtenu avec le VDR humain sauvage et muté (hVDR wt et hVDR_{L309H}).

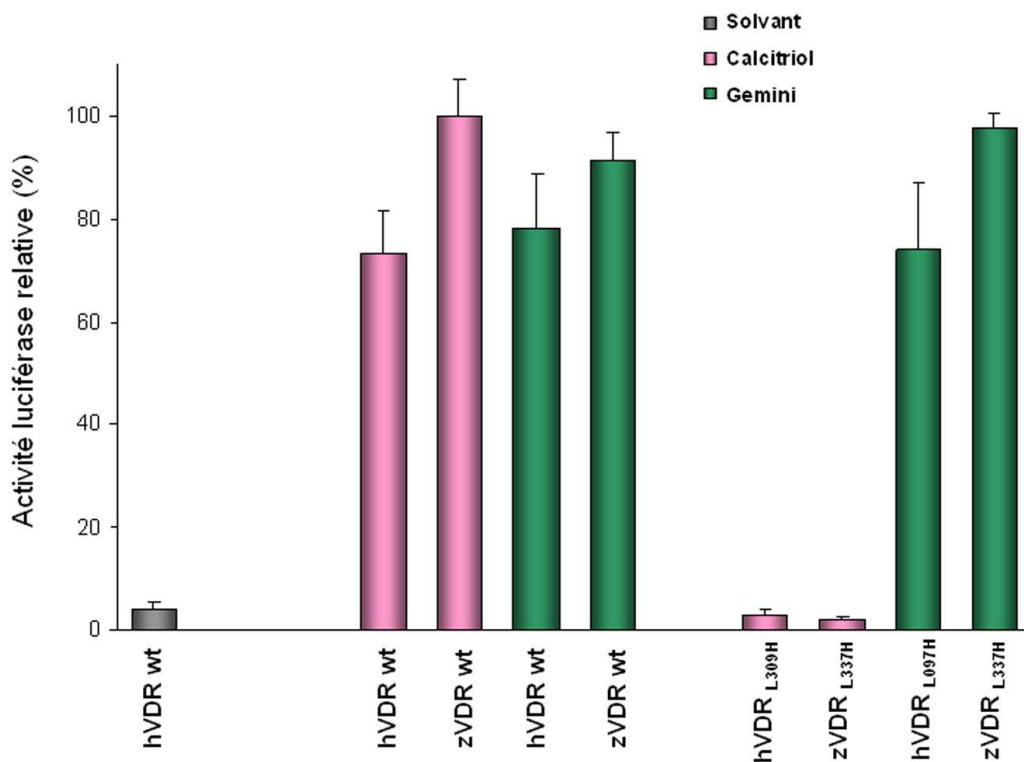


Figure 20 : La mutation Leu337His abolit l'activité génomique du VDR humain et de poisson-zèbre en présence du Calcitriol mais pas en présence du Gemini. Expériences de transactivation dans des cellules MCF7 induite par le VDR sauvage humain ou de poisson-zèbre (hVDR wt ou zVDR wt), et par le VDR muté (hVDR_{L309H} ou zVDR_{L337H}) en réponse à une stimulation des cellules avec 10^{-7} M de Calcitriol, de Gemini ou de DMSO (solvant).

Cette expérience met en évidence une caractéristique extrêmement intéressante avec ce mutant ponctuel zVDR_{L337H} (ou hVDR_{L309H}). En effet, en présence du ligand naturel, la mutation abolie l'activité transcriptionnelle du VDR tandis qu'en présence du ligand synthétique Gemini, la mutation n'affecte pas l'activité transcriptionnelle de VDR. Nous avons alors effectué des expériences en spectrométrie de masse ESI-TOF (Electrospray-Time of Flight) afin de déterminer les affinités relatives du Calcitriol et du Gemini pour le VDR muté.

Les LBDs des récepteurs de zVDR et de hVDR se comportant de manière similaire en transactivation, les expériences de spectrométrie de masse et d'anisotropie ont été réalisées avec le LBD du zVDR.

IV.1.2. Détermination des affinités relatives du Calcitriol et du Gemini pour le mutant zVDR_{L337H} : expériences de spectrométrie de masse ESI-TOF.

La spectrométrie de masse en mode non-covalent permet de déterminer les affinités relatives de complexes protéine/ligand. Cette méthode a déjà été utilisée pour caractériser des interactions ligands-récepteurs nucléaires (117), (118), (119). Des résultats semblables à ceux utilisant des ligands radioactifs ont permis d'asseoir la robustesse de la spectrométrie de masse pour l'étude de telles interactions. L'affinités relatives sont déterminées selon le voltage VC_{50} , voltage à partir duquel 50 % de complexes sont dissociés, est déterminé (120).

Dans le cas du complexe zVDR-LBD_{L337H}/Calcitriol, le spectre présenté dans la partie supérieure de la figure 21 indique que le zVDR-LBD_{L337H} est majoritairement sous forme non ligandé malgré le fort excès en Calcitriol. En revanche, dans les mêmes conditions expérimentales, le zVDR-LBD sauvage est majoritairement sous forme ligandé en présence du Calcitriol (spectre inférieur de la figure 21). Le voltage VC_{50} n'a donc pas pu être déterminé dans le cas du complexe zVDR-LBD_{L337H}/Calcitriol.

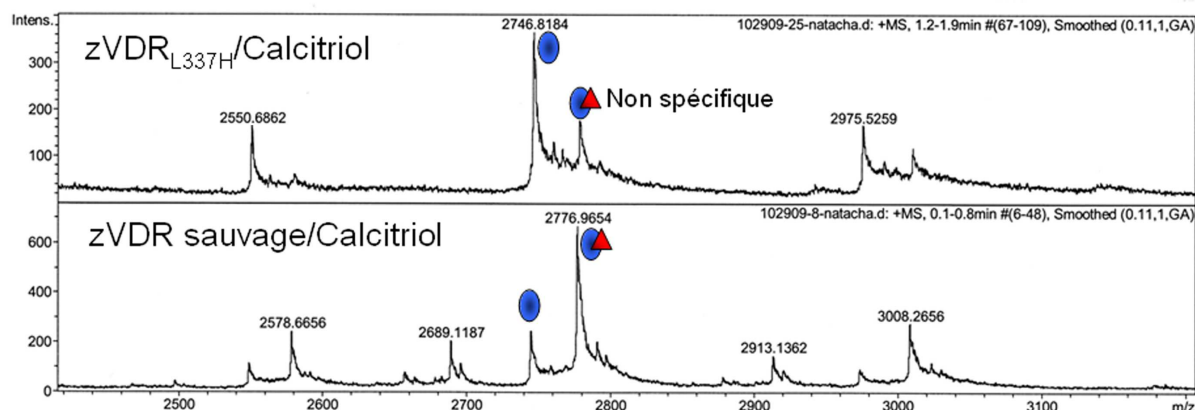


Figure 21 : La mutation Leu337His a un effet dramatique sur l’affinité de liaison du Calcitriol pour le VDR. Spectres de masse en mode natif (ESI-TOF) effectués sur le LBD mutant Leu337His et sur le LBD sauvage, réalisés après ajout de trois équivalents de Calcitriol et une incubation de 20 minutes. Le spectre du haut montre que le zVDR-LBD_{L337H} est majoritairement sous forme non-ligandée tandis que celui du bas indique que le zVDR-LBD est majoritairement sous forme ligandée.

Pour les autres complexes zVDR-LBD/ligand et zVDR-LBD_{L337H}/ligand, le voltage VC_{50} a pu être déterminé. Les valeurs VC_{50} sont rassemblées dans le tableau 5.

| Complexe | VC_{50} (V) |
|-----------------------------------|---------------|
| zVDR-LBD/Calcitriol | 149 |
| zVDR-LBD/Gemini | 153 |
| zVDR-LBD _{L337H} /Gemini | 152 |

Tableau 5 : La mutation Leu337His n’a pas d’effet sur l’affinité de liaison du Gemini pour le VDR. Valeurs VC_{50} pour les différents complexes zVDR-LBD/ligand et zVDR-LBD_{L337H}/Gemini obtenues par ESI-MS en augmentant progressivement le voltage jusqu’à obtenir 50 % de complexes dissociés. La déviation standard est de 3 V.

Pour les complexes zVDR-LBD/Calcitriol, zVDR-LBD/Gemini et zVDR-LBD_{L337H}/Gemini, la forme holo est majoritaire. Les valeurs VC_{50} obtenus pour les complexes

zVDR-LBD/Calcitriol, zVDR-LBD/Gemini et zVDR-LBD_{L337H}/Gemini ne présentent pas de différence significative (tableau 5). Par contre, dans le cas du complexe zVDR-LBD_{L337H}/Calcitriol, la forme apo du zVDR-LBD_{L337H} est majoritaire par rapport à la forme holo, ce qui traduit une fixation très faible du Calcitriol sur le zVDR-LBD_{L337H} (figure 21).

Ces résultats montrent qu'en présence du Calcitriol, le zVDR muté en position 337 est majoritairement sous forme non ligandé, malgré un excès molaire de trois en ligand, suggérant une affinité très faible du Calcitriol pour le zVDR_{L337H}. En revanche, en présence du Gemini, aucune différence n'est observée entre le zVDR sauvage et le zVDR muté. Cela indique que la mutation ponctuelle Leu337His a un effet sur la fixation du ligand naturel et non sur celle du Gemini. Ces données permettent de corrélérer l'absence de transactivation induite par le zVDR-LBD_{L337H} en présence du Calcitriol avec l'incapacité du Calcitriol à se fixer dans la poche du zVDR-LBD_{L337H}. De même, les affinités de liaison du Gemini pour le zVDR muté et pour le zVDR sauvage étant similaires, cela est en accord avec les données de transactivation obtenues.

Nous avons voulu évaluer l'effet de la mutation Leu337His du zVDR sur le recrutement du coactivateur en présence du Calcitriol et du Gemini. Pour cela, des expériences d'anisotropie de fluorescence permettant d'étudier le recrutement d'un peptide coactivateur marqué par une sonde fluorescente ont été réalisées.

IV.1.3. Étude de l'effet de la mutation Leu337His sur le recrutement d'un peptide coactivateur en présence du Calcitriol ou du Gemini.

Le recrutement du peptide coactivateur SRC-1 (RHKILHRLLLQEGSPS) marqué par un dérivé de la rhodamine, la tétraméthylrhodamine (TAMRA), a été étudié en anisotropie de fluorescence. L'augmentation de l'anisotropie associée à la formation du complexe zVDR-LBD (sauvage ou mutant Leu337His)/ligand/peptide TAMRA-SRC-1 a été mesurée. Les courbes obtenues après analyse avec le logiciel Origin sont présentées en figure 22 et 23.

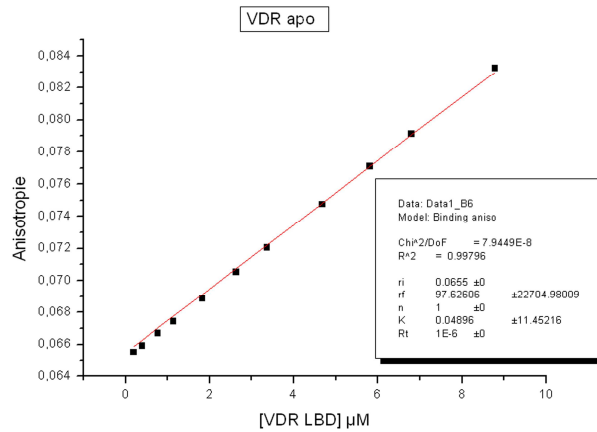


Figure 22 : Courbe de titration du peptide TAMRA-SRC-1 par le zVDR-LBD en absence de ligand. Le plateau n'a pas pu être atteint dans ces conditions, le K_D ne peut donc pas être déterminé par cette expérience.

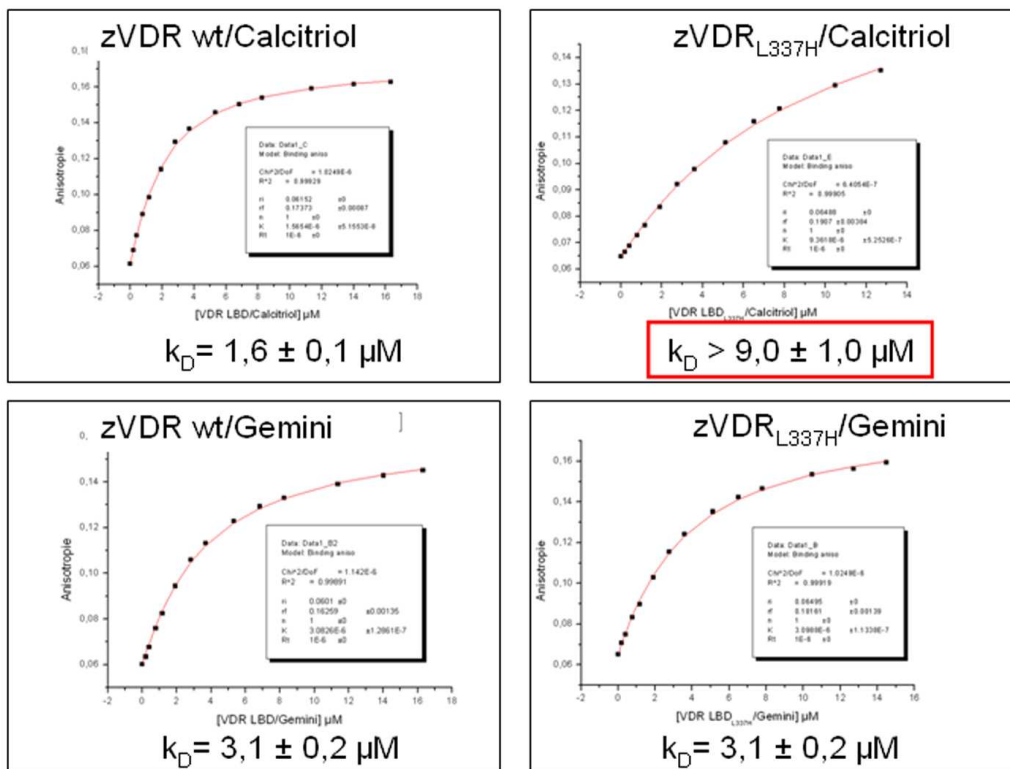


Figure 23 : la mutation Leu337His affecte le recrutement du peptide SRC1 en présence du Calcitriol mais non en présence du Gemini. Courbes de titration du peptide TAMRA-SRC-1 par les complexes zVDR-LBD/Calcitriol, zVDR LBD_{L337H}/Calcitriol, zVDR-LBD/Gemini et zVDR-LBD_{L337H}/Gemini.

En l'absence de ligand, on observe qu'il n'y a pas de recrutement du peptide TAMRA-SRC-1 sur le VDR (figure 22). Le changement de conformation induit par la fixation du ligand est nécessaire au recrutement du peptide coactivateur. Concernant le zVDR-LBD sauvage, les constantes de dissociation (K_d) obtenues pour les complexes TAMRA-SRC-1/zVDR-LBD/Calcitriol et TAMRA-SRC-1/zVDR-LBD/Gemini sont respectivement $1,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$ et $3,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (figure 23 panneaux de gauche). Ces valeurs traduisent une affinité du complexe zVDR-LBD/Calcitriol pour le peptide TAMRA-SRC-1 supérieure à celle mesurée dans le cas du complexe zVDR-LBD/Gemini dans ces conditions expérimentales. Dans le cas du zVDR-LBD muté en position 337, le K_d obtenu pour le complexe TAMRA-SRC-1/zVDR-LBD_{L337H}/Calcitriol est supérieur à $9,0 \pm 1 \mu\text{M}$ (figure 23 panneau en haut à droite), soit environ six fois supérieur au K_d mesuré pour le complexe sauvage TAMRA-SRC-1/zVDR-LBD/Calcitriol (figure 23 panneau en haut à gauche). Ainsi, le K_d obtenu pour le complexe TAMRA-SRC-1/zVDR-LBD_{L337H}/Calcitriol démontre un affaiblissement du recrutement du peptide TAMRA-SRC-1 sur le complexe zVDR-LBD_{L337H}/Calcitriol. La mutation Leu337His affecte la fixation du Calcitriol sur le zVDR, ce qui se traduit par un faible recrutement du peptide coactivateur. En revanche, le K_d obtenu pour le complexe TAMRA-SRC-1/zVDR-LBD_{L337H}/Gemini est de $3,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (figure 23 panneau en bas à droite) et est similaire à celui mesuré pour le complexe sauvage zVDR-LBD/Gemini (figure 23 panneau en bas à gauche). Ainsi, en présence du Gemini, le zVDR sauvage et le zVDR muté montrent la même capacité à recruter le peptide coactivateur SRC-1 ; la mutation Leu337His a un effet neutre sur l'activité du zVDR.

Les affinités des complexes VDR/ligand pour le peptide coactivateur SRC-1 reflètent celles des ligands pour le VDR. L'intégration de l'ensemble de ces données permet de corréler l'affinité du ligand pour le récepteur avec la capacité du VDR à recruter le peptide SRC-1 et avec l'efficacité de transcription. En présence du Calcitriol, la mutation Leu337His a un effet dramatique sur la fonction du zVDR. D'après les données de transactivation, de spectrométrie de masse et d'anisotropie, la fixation du Calcitriol dans la poche du zVDR est perturbée par la mutation ponctuelle Leu337His, alors que cette mutation n'affecte aucunement la fixation du Gemini. Il s'agit alors de déterminer le mécanisme moléculaire responsable de la discrimination du ligand naturel par la mutation ponctuelle Leu337His. Pour cela, la diffraction aux rayons X permettant la résolution de structures au niveau atomique a été utilisée.

IV.1.4. Analyse des modèles tridimensionnels obtenus par cristallographie.

Nous avons précédemment démontré que le VDR de poisson-zèbre (zVDR) permet de disposer d'un modèle d'étude alternatif au VDR humain, avec un assemblage cristallin différent qui étend les possibilités de cristallisation du LBD en complexe avec des ligands induisant de larges changements de conformation. La structure du complexe zVDR-LBD sauvage lié au ligand Gemini a été déterminée pour l'espèce poisson-zèbre (121). Ainsi, nous avons choisi d'utiliser le zVDR pour l'étude structurale du mutant Leu337His. Les complexes zVDR-LBD_{L337H}/Calcitriol et zVDR-LBD_{L337H}/Gemini ont été cristallisés dans les mêmes conditions que celle du zVDR-LBD sauvage lié au ligand naturel. Bien que le Calcitriol ne se fixe pas à des doses physiologiques dans la poche du VDR, les expériences d'anisotropie ont montré qu'en présence d'un large excès de Calcitriol, un faible recrutement du peptide coactivateur sur le zVDR-LBD_{L337H} est possible, ce qui traduit de manière indirecte une faible fixation du Calcitriol dans la poche du zVDR-LBD_{L337H}. La cristallisation du complexe zVDR-LBD_{L337H}/Calcitriol a donc été réalisée en présence d'un large excès de ligand et aussi en présence de deux équivalents du peptide du coactivateur TIF-2/GRIP-1 (KHKILHRLQLQDSS). L'enregistrement des données cristallographiques a été effectué à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility), Grenoble, sur la ligne ID-29 pour le complexe zVDR-LBD_{L337H}/Calcitriol et sur la ligne micro-focus ID23-2 pour zVDR-LBD_{L337H}/Gemini.

IV.1.4.1. Modèle tridimensionnel du mutant VDR_{L337H} de poisson-zèbre lié au Calcitriol.

IV.1.4.1.1 Architecture globale du complexe zVDR-LBD_{L337H}/Calcitriol.

Comme toutes les structures de LBD de récepteurs nucléaires déterminées en présence de ligands agonistes, le zVDR-LBD_{L337H}/Calcitriol adopte la structure canonique en sandwich composée de 12 hélices α organisées en trois couches, une première couche formée par les

hélices 1 et 3, la partie centrale composée des hélices 4, 5, 6, 8 et 9, et la dernière couche comprenant les hélices 7 et 10.

L'architecture générale du zVDR-LBD_{L337H} en complexe avec le Calcitriol (figure 24) est identique à celle du zVDR-LBD sauvage lié au Calcitriol. La valeur rmsd de la superposition de ces deux structures est de 0,30 Å sur l'ensemble de la chaîne polypeptidique. L'hélice 12 est dans la conformation agoniste. En effet, le ligand, présent dans la cavité hydrophobe, stabilise la conformation agoniste du récepteur. L'orientation et la position du peptide coactivateur sont identiques dans les deux structures. Comme dans la structure du zVDR-LBD sauvage lié au Calcitriol, aucune densité électronique n'est visible pour la boucle située entre H2 et H3, ce qui confirme son caractère flexible. Cette région, n'existant que pour le VDR et appelée région d'insertion, présente une séquence très variable entre les VDRs de différentes espèces.

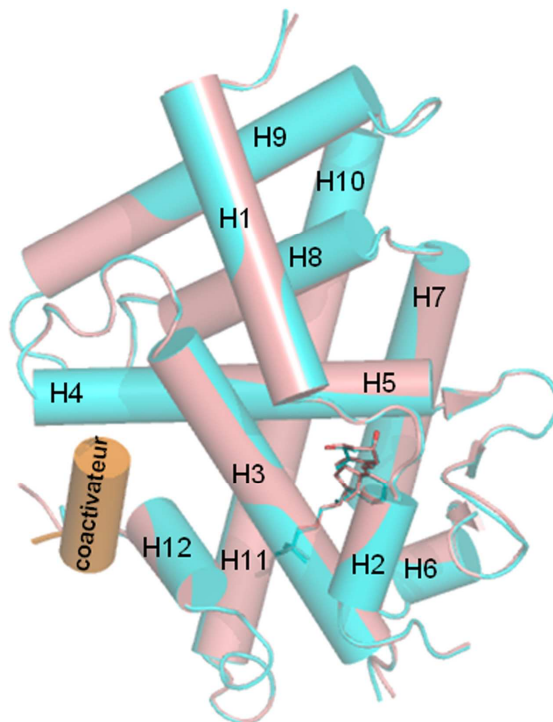


Figure 24 : Le zVDR-LBD_{L337H} lié au Calcitriol adopte la conformation agoniste canonique. La superposition de la vue d'ensemble du zVDR-LBD_{L337H} (rose) et du zVDR-LBD (cyan) en présence du Calcitriol est représentée. Les hélices α sont représentées par des cylindres et leurs numéros sont indiqués en noir. Le ligand est représenté en stick avec les atomes d'oxygène en

rouge et apparaît par transparence derrière H2 et H3. La même représentation sera utilisée pour les autres figures. Le peptide coactivateur est en orange.

IV.1.4.1.2. Cavité de fixation du ligand.

La densité électronique Fo-Fc indique que le ligand est bien présent dans la cavité de fixation du ligand (figure). La poche de fixation du ligand du zVDR-LBD_{L337H} est similaire à la poche du zVDR-LBD sauvage avec une conservation stricte de la nature des résidus impliqués (figure 25). Le volume de la poche est de 652 Å³ comparés aux 687 Å³ de la poche du zVDR sauvage.

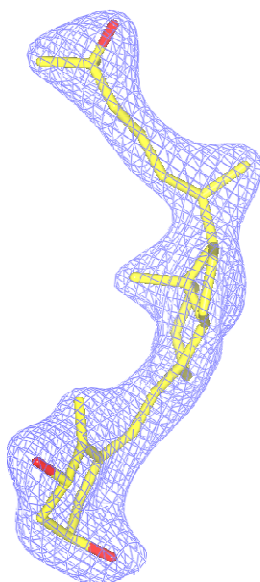


Figure 25 : La densité électronique indique clairement que toutes les parties du Calcitriol sont présentes dans la poche du VDR. La densité électronique Fo-Fc est calculée en l'absence du ligand et entourée à 3σ , à une résolution de 2,35 Å. Les atomes de carbone et d'oxygène sont colorés en jaune et rouge, respectivement.

Le Calcitriol adopte exactement la même conformation dans les deux structures (figure 26). Les contacts entre le Calcitriol et le LBD sont conservés de part et d'autre du ligand. On retrouve les interactions de nature hydrophobe, et les interactions électrostatiques entre les

groupements hydroxyles du Calcitriol et des résidus de la poche (figure 26). Ainsi le groupement 1-OH établit des liaisons hydrogène avec les résidus Ser265 et Arg302, le groupement 3-OH avec les résidus Tyr175 et Ser306 et le groupement 25-OH avec les résidus His333 et His423, qui sont des points d’ancrage importants du ligand.

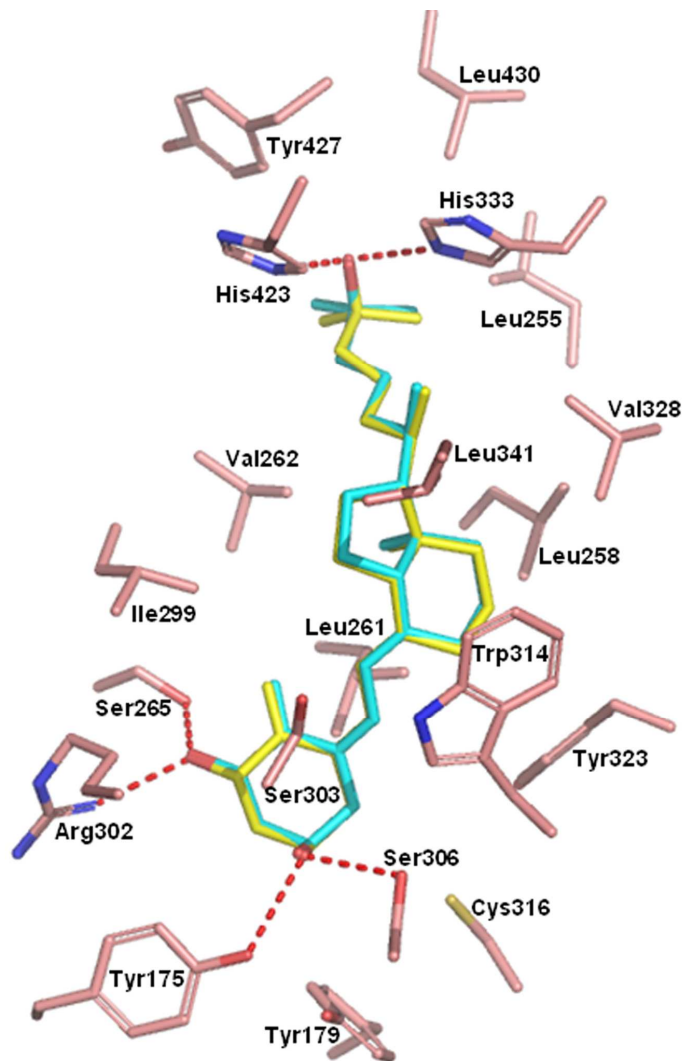


Figure 26 : Les contacts sont conservés entre le Calcitriol et les résidus de la poche du zVDR-LBD_{L337H}. Le Calcitriol dans la poche de fixation du zVDR-LBD_{L337H} (jaune) est superposé au Calcitriol présent dans le zVDR-LBD sauvage (cyan). Les résidus du zVDR-LBD_{L337H} situés à une distance de moins de 4 Å du Calcitriol sont représentés en rose. Les pointillés rouge représentent les liaisons hydrogène. Les autres résidus indiqués sont impliqués dans des contacts

de type van der Waals. Les atomes d'oxygène, d'azote et de soufre sont indiqués en rouge, bleu foncé et jaune, respectivement.

La mutation Leu337His se situe au début de l'hélice H7 et affecte la boucle 6-7 et la glutamine 426 l'hélice H11. Le cycle imidazole de l'histidine en position 337 pointe vers le ligand (figure 27-A). La chaîne latérale de l'histidine étant plus volumineuse que celle de la leucine, on observe un déplacement de du début de H7 (résidus 334 à 338 inclus) avec une valeur rmsd locale de 0,75 Å entre le zVDR-LBD sauvage et le zVDR-LBD_{L337H} en présence du Calcitriol. Le C α du résidu Glu336 est déplacé 1,27 Å et celui du résidu His337 est déplacé 0,95 Å. On remarque également que le cycle de l'histidine 337 perturbe la chaîne latérale du résidu Gln426 de H11 (figure 27-B). Or, dans le complexe zVDR-LBD/Calcitriol, ce résidu stabilise l'histidine 333 dans une position favorable à la formation de liaison hydrogène. Dans le complexe zVDR-LBD_{L337H}/Calcitriol, la Gln426 n'interagit plus avec le résidu His333 et par conséquence, la chaîne latérale du ligand est déstabilisée et les interactions entre le groupement 25-OH et les résidus His333 et His423 sont affaiblies (3,1 Å et 3,1 Å respectivement au lieu de 2,7 Å and 2,8 Å, respectivement pour le complexe zVDR-LBD/Calcitriol). De plus, la mutation Leu337His affecte la liaison van der Waals entre le N ϵ du résidu His337 et le C-21 du Calcitriol (4,2 Å au lieu de 3,9 Å pour l'interaction entre le C δ de la leucine 337 et le C-21). On remarque également que la réorientation du cycle imidazole de l'histidine 333 permet de conserver le contact van der Waals entre les résidus en position 337 et 333 (3,4 Å avec le C δ de l'histidine 337 et 3,53 Å avec le C δ 2 de la leucine 337).

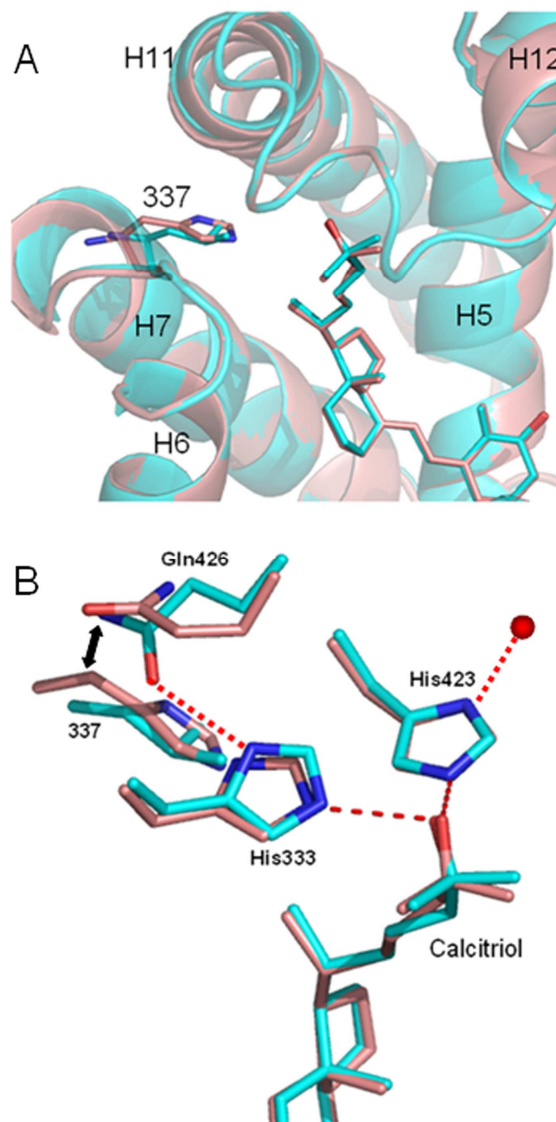


Figure 27 : En présence du Calcitriol, l’histidine 337 pointe vers la poche de fixation du ligand et déplace la chaîne latérale de la glutamine 426. **A.** Orientation du résidu 337 dans le zVDR-LBD_{L337H} (rose) et dans le zVDR-LBD sauvage (cyan). La leucine 337 et l’histidine 337 pointent vers la chaîne latérale du Calcitriol. **B.** Détail des chaînes latérales des résidus affectés par la mutation Leu337His. Les liaisons hydrogène sont représentées par des pointillés rouge. La molécule d’eau stabilisant le cycle imidazole de l’histidine 423 est représentée par une sphère rouge.

On remarque que le cycle imidazole de l’histidine 423 est stabilisé par une molécule d’eau conservée (figure 27-B). La stabilisation des cycles imidazoles des histidines 333 et 423 semble

être cruciale pour la stabilisation du ligand dans la poche. Or, la mutation Leu337His entraîne une déstabilisation du cycle imidazole de His333 via le déplacement de Gln426 et donc une perte d'ancrage du ligand du côté de la chaîne latérale et cette déstabilisation partielle du ligand peut être corrélée à la perte d'activité du zVDR-LBD_{L337H} en présence du Calcitriol.

IV.1.4.2. Modèle tridimensionnel du mutant VDR_{L337H} de poisson-zèbre lié au Gemini.

IV.1.4.2.1. Structure globale du complexe zVDR-LBD_{L337H}/Gemini.

L'architecture générale du zVDR-LBD_{L337H} en complexe avec le ligand Gemini est similaire à celle du complexe du zVDR-LBD sauvage lié au Gemini (figure 28). La valeur rmsd de la superposition des deux structures est de 0,25 Å sur l'ensemble de la chaîne polypeptidique. L'hélice H12 est dans la conformation agoniste, montrant que la mutation Leu337His n'affecte pas la conformation agoniste du VDR, comme dans la structure du zVDR-LBD sauvage lié au Gemini. L'orientation et la position du peptide coactivateur sont conservées dans la structure.

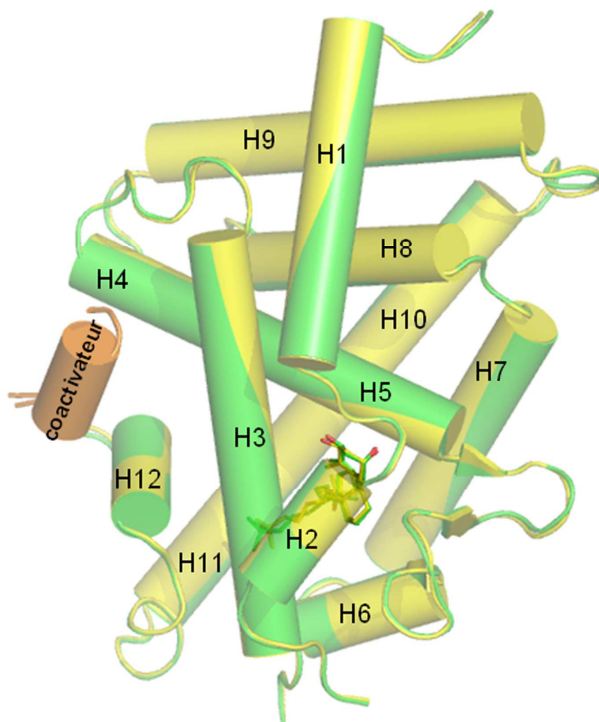


Figure 28 : Le complexe zVDR-LBD_{L337H}/Gemini adopte la conformation agoniste canonique. La superposition de la vue d'ensemble du zVDR-LBD_{L337H} (vert) et du zVDR-LBD (jaune) en présence du Gemini est représentée. Le peptide coactivateur est indiqué en orange. Le Gemini apparaît par transparence derrière H2 et H3.

IV.1.4.2.2. Cavité de fixation du ligand.

La densité électronique $F_o - F_c$ calculée en l'absence du ligand montre que le ligand peut être placé en densité de façon non ambiguë (figure 29). Le volume calculé pour la poche de fixation du ligand est de 834 \AA^3 (contre 847 \AA^3 dans le complexe zVDR-LBDsauvage/Gemini) et le volume du ligand Gemini est de 458 \AA^3 .

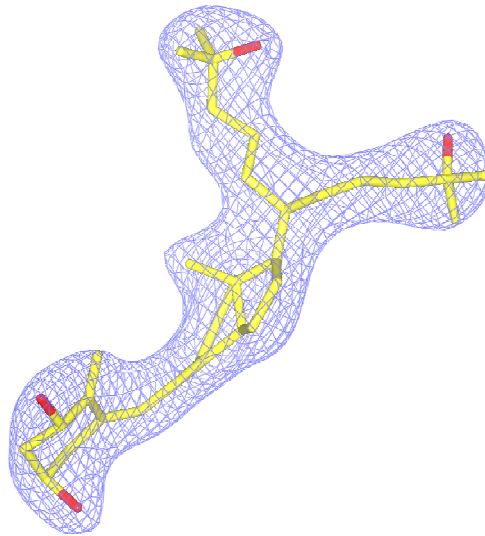


Figure 29 : La densité électronique indique clairement que toutes les parties du Gemini sont présentes dans la poche du VDR. La densité électronique Fo-Fc est calculée en l'absence du ligand et entourée à 3σ , à une résolution de 2,8 Å. Les atomes de carbone et d'oxygène sont colorés en jaune et rouge, respectivement.

On observe que le Gemini adopte la même conformation et se positionne de manière identique dans le zVDR-LBD sauvage et le zVDR-LBD_{L337H} (figure 30). Les interactions entre le Gemini et les résidus de la poche sont conservés de part et d'autre du ligand. Les mêmes résidus supplémentaires interagissent avec le Gemini par rapport au zVDR-LBD sauvage lié au Calcitriol. Il s'agit des chaînes latérales des résidus méthionine 300, leucine 338 et glutamine 426 (figure 30), ainsi que des chaînes principales de la leucine 419 et du résidu 337 (non représenté).

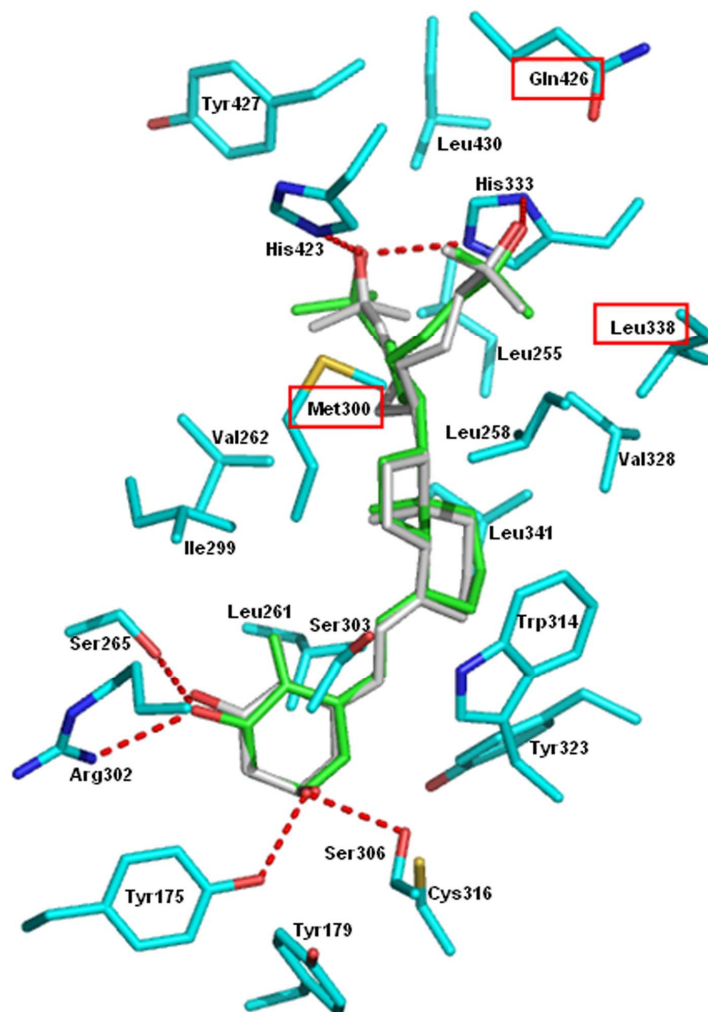


Figure 30 : Les interactions entre le Gemini et les résidus de la poche du zVDR-LBD_{L337H} sont conservées. Le Gemini dans la poche de fixation du zVDR-LBD_{L337H} (vert) est superposé au Gemini présent dans le zVDR-LBD sauvage (gris). Les résidus du zVDR-LBD_{L337H} situés à une distance de moins de 4 Å du Gemini sont représentés en cyan. Les pointillés rouge représentent les liaisons hydrogène. Les autres résidus indiqués sont impliqués dans des contacts de type van der Waals. Les atomes d'oxygène, d'azote et de soufre sont indiqués en rouge, bleu foncé et jaune, respectivement.

Comme dans le complexe du zVDR-LBD sauvage lié au Gemini, la réorientation du résidu en position 337 permet la reconnaissance du ligand Gemini. L'accommodation de la deuxième chaîne latérale du Gemini se fait par la formation d'une nouvelle cavité par rapport au LBD lié au ligand naturel (110). Par rapport à la structure du zVDR-LBD lié au Calcitriol, la

reconnaissance du Gemini affecte le positionnement de la boucle 6-7 et le début de l'hélice 7. Ainsi, en présence du Gemini, la chaîne latérale de la leucine 337 pointe vers l'extérieur de la poche et ouvre une nouvelle cavité permettant l'accommodation de la deuxième chaîne du Gemini. Dans le complexe zVDR-LBD_{L337H}/Gemini, la boucle 6-7 adopte la même orientation que celle observée pour le zVDR sauvage en présence du Gemini et la chaîne latérale de l'histidine 337 pointe également vers le solvant et adopte la même orientation que celle de la leucine 337 dans le complexe zVDR-LBD/Gemini (figure 31 A). Par conséquent, l'histidine 337 ne perturbe pas la position de la chaîne latérale du résidu Gln426, qui demeure similaire à celle observée pour le complexe zVDR-LBD sauvage/Calcitriol. La liaison hydrogène entre les résidus Gln426 et His333 est conservée, ce qui permet à l'histidine 333 de stabiliser le ligand. De plus, le cycle imidazole de l'histidine 337 est stabilisé vers l'extérieur par une liaison hydrogène entre le Nδ1 de l'histidine 337 et le Nε2 de la glutamine 426 (figure 31 B).

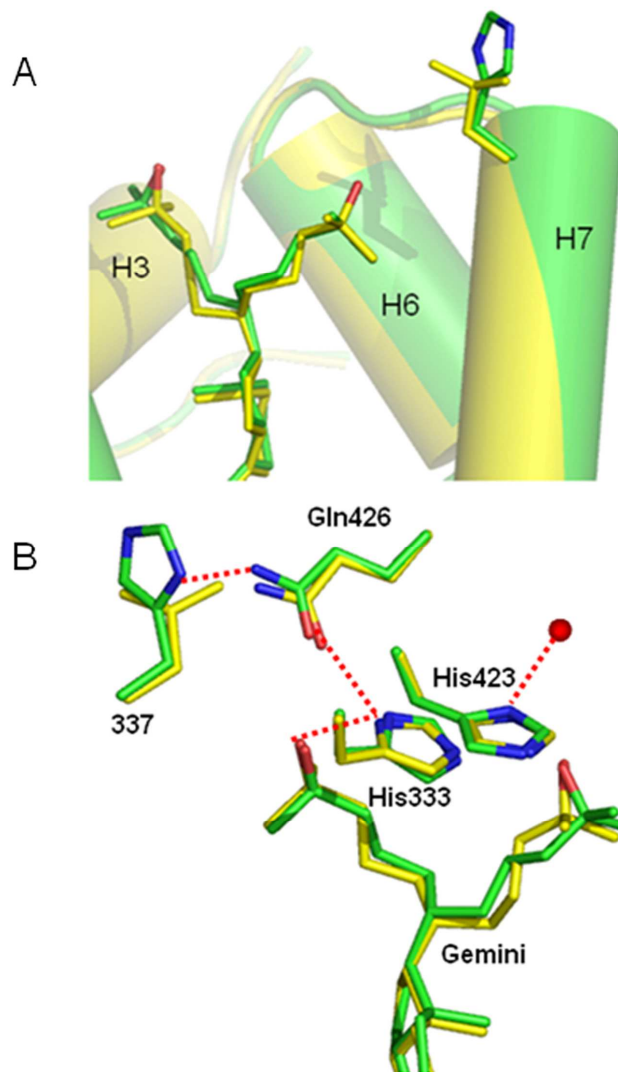


Figure 31 : En présence du Gemini, l’histidine 337 pointe vers le solvant et ne perturbe pas le positionnement de la glutamine 426. La superposition du complexe zVDR-LBD sauvage/Gemini (en jaune) avec le complexe zVDR-LBD_{L337H}/Gemini (en vert) est représentée. **A.** Le résidu en position 337, leucine dans le cas du zVDR-LBD sauvage lié au Gemini et histidine dans le cas du complexe zVDR-LBD_{L337H}/Gemini, pointe vers le solvant. **B.** Détail des chaînes latérales autour de la mutation Leu337His. Les liaisons d’hydrogène sont représentées par des pointillés rouge. La molécule d’eau stabilisant le cycle imidazole de l’histidine 423 est représentée par une sphère rouge.

La reconnaissance de la deuxième chaîne latérale du Gemini permet d’agrandir la poche de fixation du ligand en repoussant la chaîne latérale du résidu 337 vers le solvant. Cela permet

de ne pas modifier l'environnement chimique du ligand du point de vue des potentiels électrostatiques, contrairement au complexe zVDR-LBD_{L337H}/Calcitriol dans lequel une leucine qui pointe vers le ligand est mutée en histidine. Ainsi, en présence du Gemini, la mutation Leu337His ne modifie pas le réseau de liaisons hydrogène entre les résidus de la poche et le ligand. L'effet de cette mutation s'avère neutre quant à l'activité du VDR en présence du Gemini.

IV.1.4.3. Mécanisme moléculaire de discrimination du ligand.

Dans cette étude, nous confirmons que le résidu en position 337 joue un rôle majeur dans la reconnaissance du ligand. En présence du ligand naturel, la mutation ponctuelle Leu337His perturbe la conformation normale de l'histidine 333 via la réorientation de la chaîne latérale de la glutamine 426 (figure 32). Cette adaptation entraîne une déstabilisation partielle du Calcitriol, qui se traduit par une perte d'activité du VDR. En revanche, en présence du ligand Gemini, l'effet de la mutation est aboli par l'accommodation de la deuxième chaîne latérale du Gemini qui repousse le cycle imidazole de l'histidine 337 en dehors de la poche et empêche la réorientation des résidus Gln426 et His333. Ainsi le réseau d'interactions entre les résidus de la poche et le Gemini est conservé. Le Gemini n'étant pas déstabilisé, l'activité du VDR n'est pas affectée.

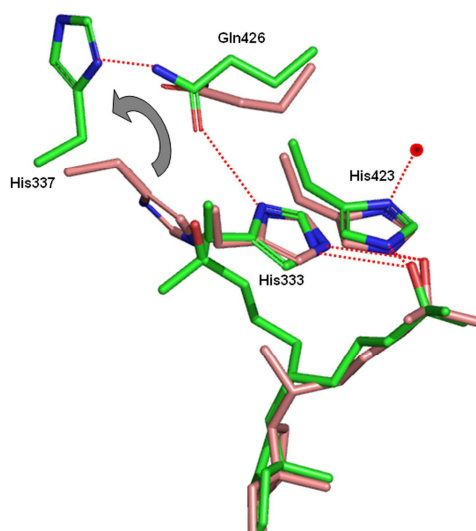


Figure 32 : L'accommodation de la deuxième chaîne latérale du Gemini par le déplacement de l'His337 vers le solvant permet de conserver l'interaction entre la Gln426 et l'His333. Le

complexe zVDR-LBD_{L337H}/Gemini est coloré en vert et le complexe zVDR-LBD_{L337H}/Calcitriol est en rose. Les liaisons d'hydrogène sont représentées par des pointillés rouge.

IV.1.4.4. Conclusion.

L'interaction entre la glutamine 426 et l'histidine 333 apparaît avoir un rôle primordial dans la stabilisation du Calcitriol via la stabilisation du cycle imidazole de l'histidine 333. D'autre part, le remplacement d'une leucine par une histidine dans une poche de nature majoritairement hydrophobe semble fortement perturber la fixation du Calcitriol. D'autres mutations précédemment étudiées au laboratoire (Leu337Phe et Leu337Met) n'ont pas montré de différence significative entre le zVDR sauvage et le zVDR muté (110). En effet, les résidus Phe et Met sont de natures hydrophobes et malgré l'encombrement stérique qu'ils peuvent engendrer, ces résidus ne perturbent pas la nature hydrophobe de la poche de fixation du ligand, contrairement à l'histidine.

L'effet de la mutation Leu337His sur la fixation du ligand naturel observé résulte sans doute d'une synergie entre les deux phénomènes ; d'une part, la déstabilisation de l'histidine 333 induite par une réorientation de la chaîne latérale de la Gln426 poussée par l'histidine 337, et d'autre part, l'introduction d'un résidu chargé dans la poche hydrophobe. Cela est corroboré par le fait qu'en présence du Gemini, le cycle de l'histidine 337 est orienté vers le solvant, donc ne perturbe pas la nature hydrophobe de la poche. De plus, l'histidine ainsi orientée stabilise la chaîne de la glutamine 426 qui interagit également avec l'histidine 333.

Il serait intéressant d'étudier plus précisément le rôle stabilisant de la Gln426. En effet, une étude portant sur une analyse de mutations des résidus impliqués dans la stabilisation du ligand (122) a montré que l'activité transcriptionnelle du mutant Gln400Ala du VDR humain (qui correspond à la mutation Gln426Ala dans le zVDR) en présence du Calcitriol est légèrement diminuée (80 % de celle du VDR sauvage). M. Choi et ses collègues avaient déjà suggéré un rôle pour le résidu Gln400 dans la stabilisation de la conformation agoniste du VDR. Il serait pertinent d'étudier les effets de mutations de ce résidu sur un plan structural et sur un plan fonctionnel afin d'évaluer précisément l'implication de ce résidu sur l'activité du VDR. Cela

apporterait de nouvelles pistes d'études permettant une meilleure compréhension de la reconnaissance du ligand par le VDR.

IV.2. Étude fonctionnelle et structurale de complexes zVDR-LBD/analogues du Gemini.

L'étude du complexe VDR-LBD_{L337H}/Gemini montre que la mutation Leu337His n'affecte pas l'activité génomique du VDR en présence du ligand Gemini. Nous avons voulu savoir si cette mutation a les mêmes effets en présence d'analogues du Gemini. Les deux analogues du Gemini étudiés dans cette partie sont les deux énantiomères BXL-72 et BXL-97 qui ont été sélectionnés parmi une soixantaine de ligands analogues au Gemini pour leur puissant caractère superagoniste (123), (124). Ces deux analogues du Gemini ont une très forte activité anti-tumorale sur les cancers du sein, du colon et de la prostate, et cependant, ils n'induisent pas d'effets hyper-calcémiques (123).

Ces deux analogues du Gemini possèdent deux chaînes asymétriques (figure 33) avec le remplacement des groupements méthyles de la chaîne naturelle du Calcitriol par deux groupements deutérométhyles et, sur l'autre chaîne, par l'incorporation de deux groupements trifluorométhyles et une insaturation 23-yne. Les analogues de type Gemini se lient au VDR avec une affinité similaire à celle du Calcitriol (125). Cependant, il semble que des modifications structurales ralentissent leur métabolisme, par exemple, la présence d'une double ou triple liaison en C23-C24 empêche l'hydroxylation qui s'opère normalement sur ces deux sites et ralentie l'inactivation de ces composés (126). De plus, l'incorporation d'atomes de fluor ou de deutérium sur la chaîne latérale du Calcitriol semble ralentir sa dégradation (127), (128). Il se peut également que la présence d'une seconde chaîne latérale affecte leur processus métabolique. De plus, les deux composés étudiés ont un cycle A de type 19-nor et plusieurs études portant sur le 19-nor-Calcitriol ont montré que cette modification chimique entraîne la suppression des effets hypercalcémiques et hyperphosphatémiques normalement induits par le Calcitriol (129), (130).

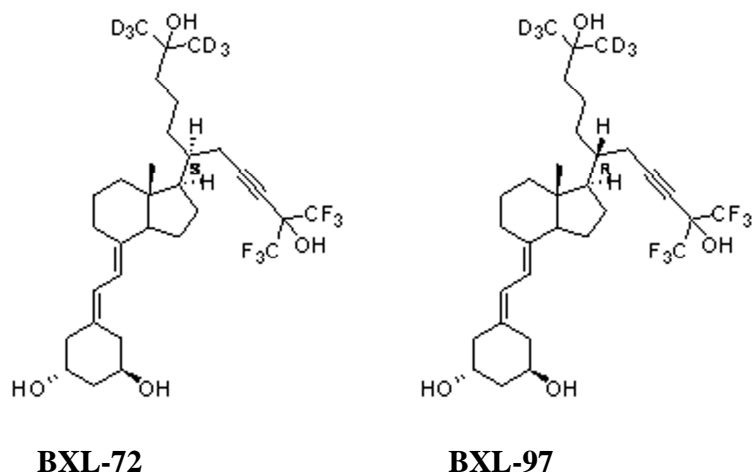


Figure 33 : Formules chimiques développées des deux ligands analogues du Gemini choisis pour l'étude. Ils diffèrent par la stéréochimie du carbone 20, comme indiqué par les lettres S et R.

IV.2.1. Étude de l'activité génomique du VDR en présence des ligands BXL-72 et BXL-97.

IV.2.1.1. Effet de la mutation *Leu337His* sur le zVDR en présence des ligands BXL-72 et BXL-97.

La capacité du zVDR-LBD sauvage et muté en position 337 à induire une activité transcriptionnelle en présence des analogues du Gemini a été étudiée à l'aide d'un système de gène-rapporteur. Le promoteur du gène codant pour la luciférase a été utilisé et placé sous le contrôle de quatre copies de l'élément de régulation Gal (GAL4), en amont du gène *luc*.

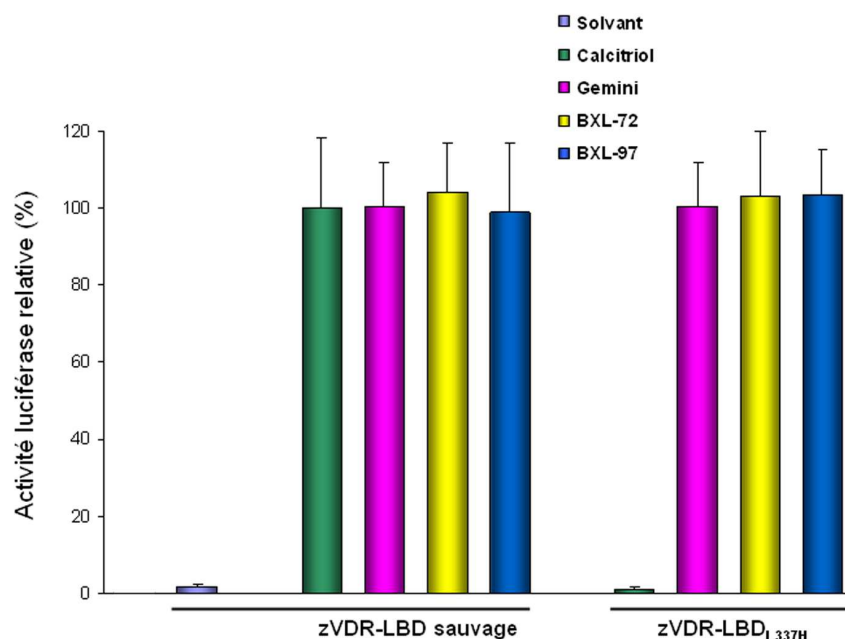


Figure 34 : La mutation Leu337His n’affecte pas l’activité transcriptionnelle du VDR en présence des deux ligands BXL-72 et BXL-97. Les activités de transactivation induites par le zVDR-LBD sauvage ou par le zVDR-LBD_{L337H} dans des cellules MCF7 ont été mesurées suite à une stimulation des cellules par 10^{-7} M de Calcitriol, de Gemini, du ligand BXL-72 ou du ligand BXL-97.

Les résultats d’au moins trois expériences indépendantes sont présentés en figure 34. La première barre du diagramme montre que lorsque les cellules sont uniquement traitées avec le solvant organique (DMSO) dans lequel les ligands sont dissous, il n’y a pas de transcription du gène *luc*. On observe que tout comme en présence du Gemini, aucune différence d’activité de transactivation n’est observée entre le zVDR-LBD sauvage et le zVDR-LBD_{L337H} en présence des deux analogues du Gemini. De plus, les deux stéréoisomères se comportent de manière identique. La configuration du carbone 20 des ligands BXL n’a pas d’effet sur la fonction du VDR (124).

Ces données montrent que la mutation Leu337His n’affecte pas l’activité transcriptionnelle du VDR en présence des ligands à deux chaînes latérales de type BXL.

IV.2.1.2. Les ligands BXL-72 et BXL-97 sont de puissants superagonistes du VDR.

Étant donné que les ligands BXL-72 et BXL-97 sont décrits comme de très puissants superagonistes mais qu'aucune donnée de transactivation n'est disponible dans la littérature, nous avons effectué des expériences de transactivation en utilisant des concentrations croissantes en ligand.

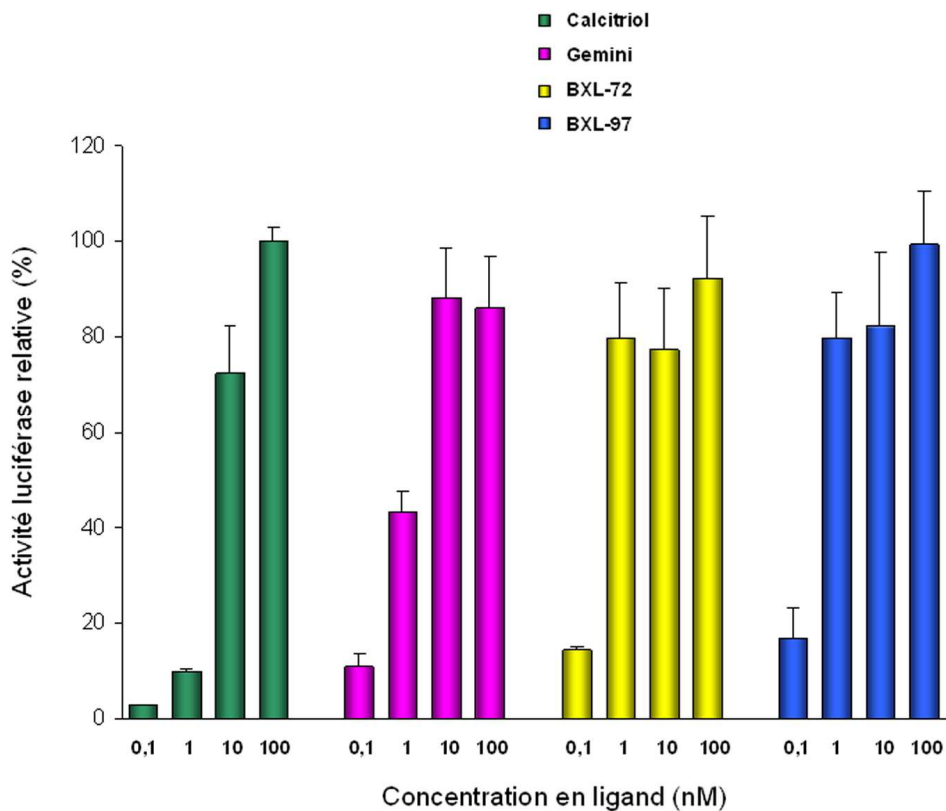


Figure 35 : Les ligands BXL-72 et BXL-97 sont deux puissants superagonistes du VDR. Les activités de transactivation induites par le zVDR-LBD dans des cellules MCF7 ont été déterminées en réponse à des concentrations croissantes en Calcitriol, Gemini, BXL-72 et BXL-97.

Les résultats présentés en figure 35 montrent qu'à 0,1 nM, l'activité transcriptionnelle induite par la stimulation des ligands BXL-72 et BXL-97 atteint 15 % de celle induite par le Calcitriol. De plus, 1 nM des ligands BXL suffit à saturer le système tandis que 100 nM de Calcitriol sont nécessaires. Par comparaison, une stimulation avec 1 nM de Gemini induit une

activité transcriptionnelle correspondant à 43 % de l'activité maximale et 10 nM de Gemini sont requis pour atteindre la saturation du système. Ces résultats confirment que les ligands BXL-72 et BXL-97 sont de puissants superagonistes. Leur efficacité est dix fois supérieure à celle du Gemini et 100 fois supérieure à celle du Calcitriol. Afin de déterminer si l'effet superagoniste des ligands BXL est en relation avec la capacité de ces ligands à lier le VDR, nous avons alors mesuré les affinités relatives entre les ligands BXL, le Gemini et le Calcitriol pour le zVDR-LBD.

IV.2.2. Détermination des affinités relatives des ligands BXL-72 et BXL-97 pour le zVDR sauvage.

La spectrométrie de masse en mode non-covalent permet de déterminer les affinités relatives de complexes protéine/ligand. Pour chaque complexe zVDR-LBD/ligand, le voltage VC_{50} est déterminé et leurs valeurs sont rassemblées dans le tableau 6.

| Complexes | VC_{50} (V) |
|---------------------|---------------|
| zVDR-LBD/Calcitriol | 149 |
| zVDR-LBD/Gemini | 153 |
| zVDR-LBD/BXL-72 | 148 |
| zVDR-LBD/BXL-97 | 150 |

Tableau 6 : Les ligands BXL-72 et BXL-97 se fixent sur le VDR avec une affinité comparable à celles du Gemini et du Calcitriol. Les valeurs VC_{50} pour les différents complexes VDR/ligand ont été obtenues par ESI-MS en augmentant progressivement le voltage jusqu'à obtenir 50 % de complexes dissociés. La déviation standard est de 3 V.

Les mesures obtenues par spectrométrie de masse montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les valeurs VC_{50} obtenues pour le VDR sauvage en présence des ligands Calcitriol, Gemini, BXL-72 et BXL-97. Les ligands BXL semblent se fixer sur le VDR sauvage avec la même efficacité que le ligand naturel et le Gemini. Le caractère superagoniste des ligands

BXL ne s'explique pas par une plus forte affinité de liaison pour le VDR mais peut être par une plus grande capacité de recrutement de coactivateurs.

IV.2.3. Étude du recrutement du peptide coactivateur SRC-1 par le VDR en présence du BXL-72 ou du BXL-97.

Dans le but de vérifier si le caractère superagoniste des ligands BXL est lié à une meilleure capacité du VDR à recruter un peptide coactivateur en présence de ces ligands, le recrutement du peptide SRC-1 (RHKILHRLQLQEGSPS) marqué par le TAMRA a été étudié en anisotropie de fluorescence. L'augmentation de l'anisotropie associée à la formation du complexe zVDR-LBD/ligand/peptide TAMRA-SRC-1 a été mesurée. Les courbes obtenues après analyse avec le logiciel Origin sont présentées ci-après.

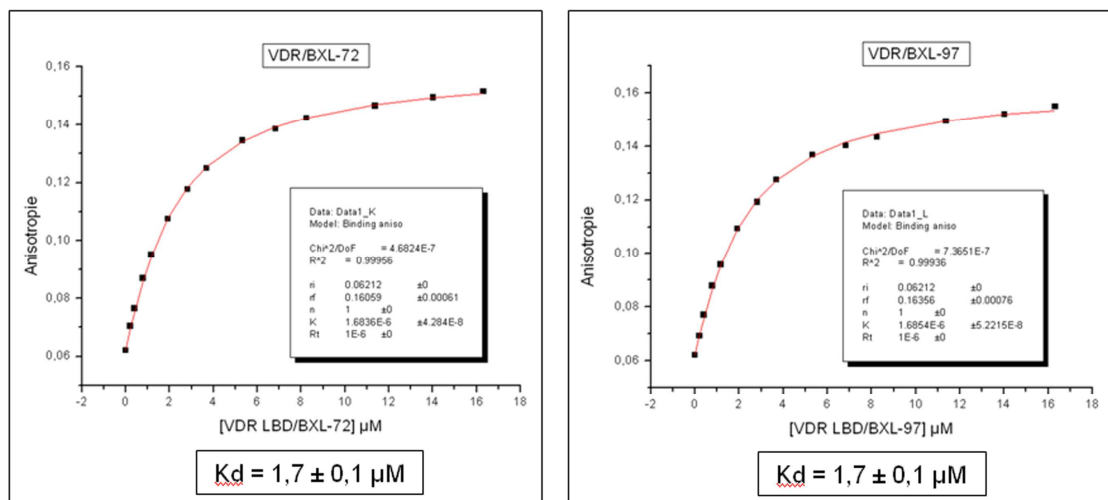


Figure 36 : Le recrutement du peptide coactivateur SRC-1 par VDR n'est pas amplifié en présence des ligands BXL-72 et BXL-97. Les courbes de titration du peptide TAMRA-SRC-1 par les complexes zVDR-LBD/BXL-72 et zVDR-LBD/BXL-97 donnent un Kd similaire à celui obtenu pour le complexe zVDR-LBD/Calcitriol.

On observe que pour les complexes TAMRA-SRC-1/zVDR-LBD/BXL-72 et TAMRA-SRC-1/zVDR-LBD/BXL-97, les constantes de dissociation (Kd) obtenues sont identiques ($1,7 \pm$

0,1 μM) (figures 36) et très proches de celle obtenue dans le cas du TAMRA-SRC-1/zVDR-LBD/Calcitriol ($1,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$) (figure 23) et inférieure à celle obtenue dans le cas du TAMRA-SRC-1/zVDR-LBD/Gemini ($3,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$) (figure 23). On en déduit que la capacité du zVDR-LBD à recruter le peptide SRC-1 en présence des ligands BXL est supérieure à celle obtenue en présence du Gemini et comparable à celle obtenue en présence du Calcitriol. Ces résultats ne permettent pas de corréler le caractère superagoniste des ligands BXL à un meilleur recrutement du peptide SRC-1 dans ces conditions expérimentales. Il serait pertinent d'évaluer le recrutement d'autres peptides coactivateurs par ces deux ligands et de réaliser les expériences d'anisotropie de fluorescence dans des conditions plus proches du *in vivo* : hétérodimère VDR/RXR, coactivateurs entiers (SRC-1, DRIP205). Il est également probable que le caractère superagoniste des ligands BXL soit dû à leur plus long temps de vie supposé par la présence d'atomes de deutérium et de fluor.

Les ligands BXL-72 et BXL-97 étant de très puissants superagonistes du VDR, nous avons voulu déterminer les bases structurales de la reconnaissance de ces deux puissants superagonistes par le VDR en utilisant la cristallographie. De plus, il a été démontré que ces deux ligands n'induisent pas d'effets hypercalcémiques, d'où l'importance d'étudier leur interaction avec leur récepteur VDR sur le plan structural (123).

IV.2.4. Étude structurale du VDR sauvage et muté lié à des analogues du Gemini.

IV.2.4.1. Modèle tridimensionnel du VDR de poisson-zèbre lié au ligand BXL-72.

IV.2.4.1.1. Architecture globale du complexe zVDR-LBD/BXL-72.

L'architecture générale du zVDR-LBD en complexe avec le ligand BXL-72 est similaire à celle du complexe du zVDR-LBD sauvage/Gemini (figure 37). La valeur rmsd moyennée sur l'ensemble de la chaîne polypeptidique après superposition de ces deux structures est de 0,21 Å. De même, la superposition entre le zVDR-LBD/BXL-72 et le zVDR-LBD/Calcitriol donne une

valeur rmsd de 0,20 Å. L'hélice H12 est dans la conformation agoniste. En effet, le ligand, présent dans la cavité hydrophobe, stabilise la conformation agoniste du récepteur. L'orientation et la position du peptide coactivateur sont identiques dans les trois structures zVDR-LBD/BXL-72, zVDR-LBD/Gemini et zVDR-LBD/Calcitriol. Comme dans les structures précédentes du zVDR-LBD, aucune densité électronique n'est visible pour la boucle située entre H2 et H3.

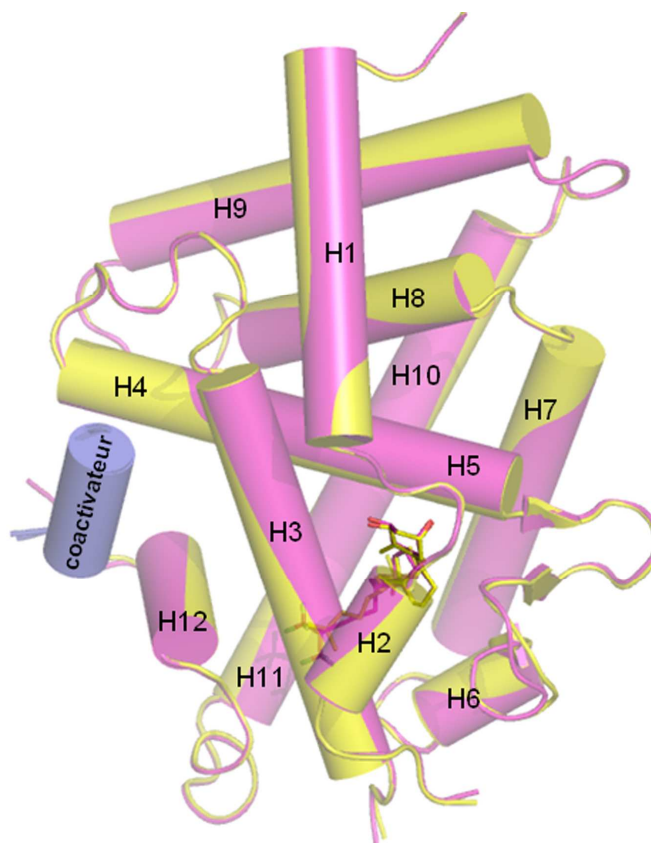


Figure 37 : Le complexe zVDR-LBD/BXL-72 adopte la conformation agoniste canonique. La superposition de la vue d'ensemble du zVDR-LBD sauvage en présence du ligand BXL-72 (magenta) et en présence du Gemini (jaune) est représentée. Le ligand apparaît par transparence derrière H2 et H3. Le peptide coactivateur est indiqué en bleu.

IV.2.4.1.2. Cavité de fixation du ligand et mécanisme de reconnaissance du ligand.

La densité électronique Fo-Fc permet de placer le ligand sans ambiguïté dans la cavité de fixation du LBD de VDR (figure 38). Le volume de la poche est de 769 Å³. Le volume calculé pour le ligand BXL-72 dans la poche est de 474 Å³ (contre 461 Å³ pour le Gemini).

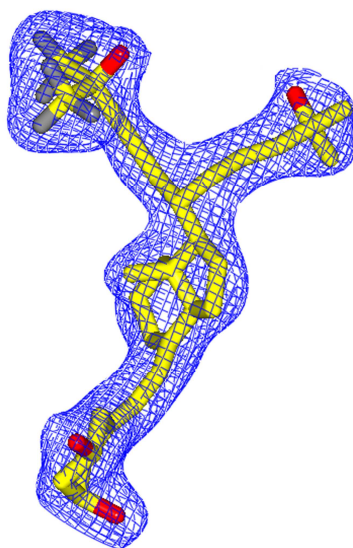


Figure 38 : La densité électronique indique que toutes les parties du ligand BXL-72 sont présentes dans le zVDR sauvage. La densité électronique Fo-Fc calculée en l'absence du ligand et entourée à 3σ , à une résolution de 2,4 Å permet de distinguer sans ambiguïté l'orientation des deux chaînes latérales. Les atomes de carbone, d'oxygène et de fluor sont indiqués en jaune, rouge et gris, respectivement.

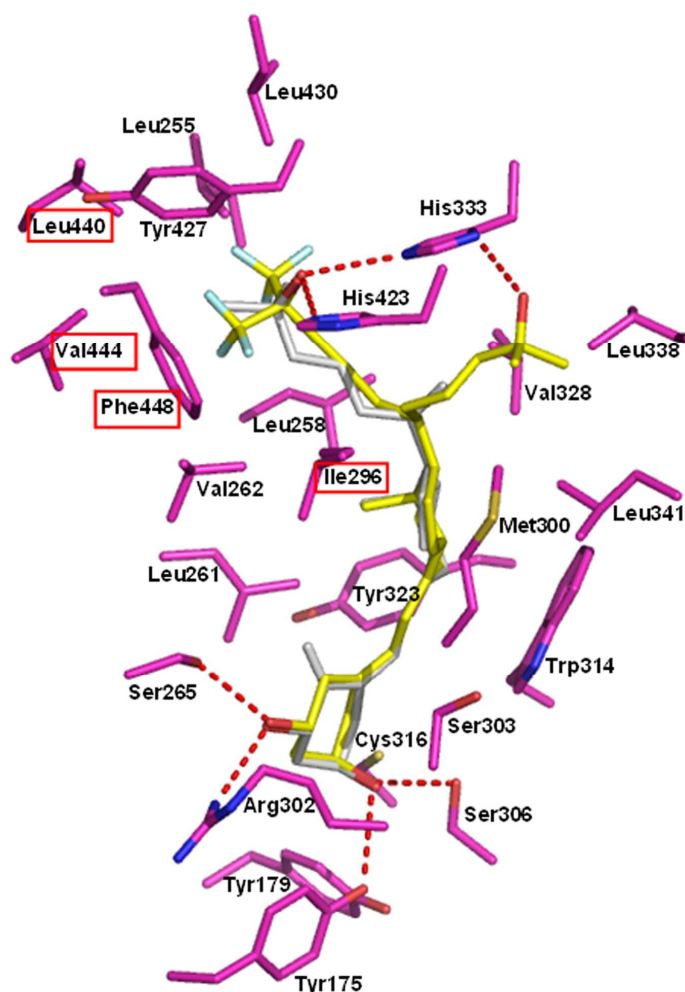


Figure 39 : Quatre résidus hydrophobes supplémentaires (encadrés en rouge) sont impliqués dans des interactions entre le BXL-72 et le zVDR-LBD. Les conformations des ligands BXL-72 (20-S) (jaune) et Calcitriol (gris) tels qu'ils sont positionnés dans la poche du zVDR-LBD sauvage sont superposées. Les résidus de la poche du zVDR sauvage situés à une distance de moins de 4 Å du BXL-72 sont représentés en magenta. Les pointillés rouge représentent les liaisons hydrogène. Les autres résidus indiqués sont impliqués dans des contacts de type van der Waals.

La chaîne fluorée du ligand BXL-72 est orientée de manière similaire à la chaîne « naturelle » du Calcitriol (figure 39). Les interactions entre le ligand et les résidus de la poche sont conservés de part et d'autre du ligand (figure 39) et des interactions supplémentaires sont observées, principalement avec les atomes de fluor. On remarque que le résidu His333 interagit avec les deux groupements hydroxyles du ligand, comme dans le cas du zVDR-LBD/Gemini.

Cependant, les liaisons hydrogène sont plus faibles entre le groupement hydroxyle OH-3 du ligand BXL-72 et les résidus His333 et His423. Le ligand est impliqué dans un plus grand nombre d'interactions de type van der Waals entre les six atomes de fluor et des résidus hydrophobes de la poche (Val262, Tyr427, Val444 et Phe448 pour les trois fluors branchés en C-26 et les résidus Leu255, Leu430 et Leu440 pour les trois fluors branchés en C-25) (figure 39). Les résidus Leu255, Val262 et Leu430 interagissent également avec le Gemini et le Calcitriol mais ces interactions sont renforcées en présence du ligand BXL-72. Ces interactions supplémentaires entre le ligand BXL-72 et des résidus hydrophobes des hélices 3, 11 et 12 semblent stabiliser davantage la conformation agoniste du LBD de VDR (figure 40) et pourraient contribuer au fort caractère superagoniste de ce ligand. De plus, la configuration S du carbone 20 du ligand BXL-72 induit une interaction entre le carbone 27 de la chaîne deutérée du ligand et le C δ 1 du résidu Ile296. D'autre part, comme dans le cas du complexe VDR-LBD/19-nor-Calcitriol, l'interaction entre le cycle A du ligand et l'isoleucine 299 disparaît.

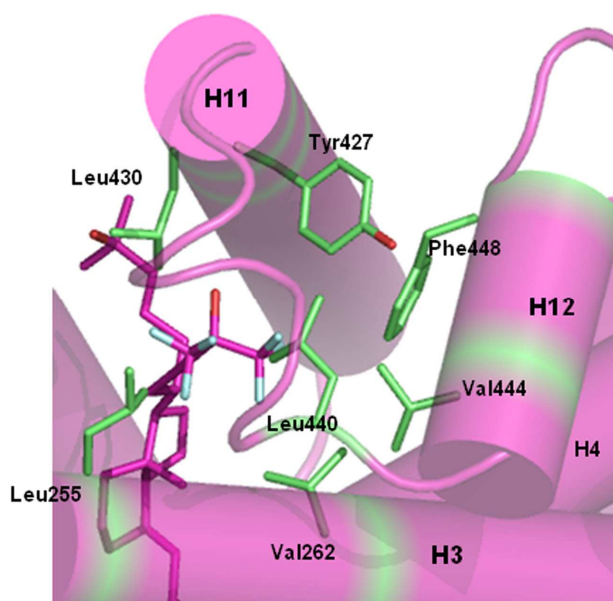


Figure 40 : Des résidus hydrophobes des hélices 3, 11 et 12 du zVDR-LBD sont impliqués dans la reconnaissance du ligand BXL-72. Les résidus interagissant avec les atomes de fluor du ligand sont colorés en vert. Les atomes d'oxygène, d'azote et de fluor sont colorés en rouge, bleu foncé et bleu clair, respectivement.

L'accommodation du ligand BXL-72, plus volumineux et moins flexible que le Gemini du fait de la fonction alcyne et des deux groupements fluorés branchés en C-25 et C-26, entraîne un léger déplacement de groupements hydroxyles des deux chaînes latérales. On observe un léger déplacement des histidines 333 et 423 vers les deux groupements hydroxyles du ligand (figure 41). Ce déplacement permet le maintien des liaisons hydrogènes entre ces deux histidines et les groupements OH du ligand (la distance entre l'atome N δ 1 de His333 et le groupement OH de la chaîne deutérée est de 2,87 Å, celle entre l'atome N ϵ 2 de his333 et le groupement OH de la chaîne fluorée du ligand est de 3,34 Å et celle entre l'atome N ϵ 2 de His423 et le groupement OH de la chaîne fluorée est de 3,02 Å). Le déplacement de His333 se répercute sur les résidus 334 à 337, soit au niveau de la boucle 6-7 et du début de H7, avec une valeur rmsd locale de 0,60 Å. Cependant, la densité électronique est faible pour les résidus 334 à 337 avec des facteurs d'agitation thermique élevés (supérieurs à 80 Å²), suggérant une grande flexibilité pour cette région exposée au solvant. On remarque que la leucine 337 pointe vers le solvant, comme dans la structure du zVDR-LBD sauvage lié au Gemini.

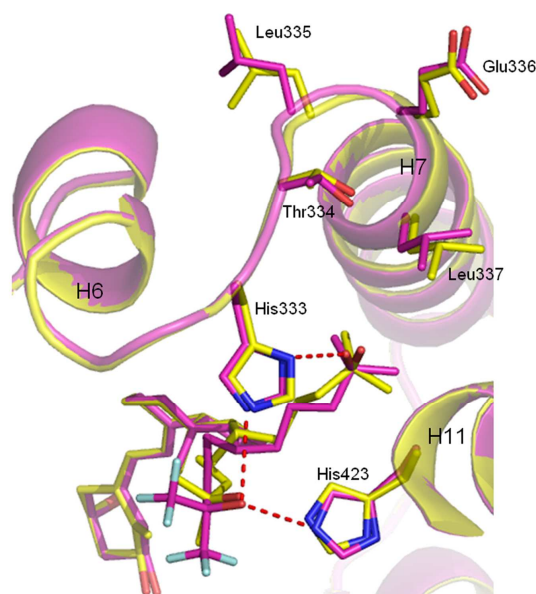


Figure 41 : Un léger déplacement de la fin de la boucle 6-7 et du début de H7 entre le zVDR sauvage lié au ligand BXL-72 (magenta) et le zVDR lié au Gemini (jaune) est observé. Les liaisons hydrogène entre le ligand BXL-72 et le zVDR sauvage sont représentées par des pointillés rouge.

D'autre part, on observe une conformation différente pour la chaîne latérale du résidu Gln426 qui semble dû au léger déplacement de la leucine 337 (figure 42). En effet, la réorientation de la chaîne latérale de la glutamine 426 induit une distance de 2,8 Å avec l'atome C δ 1 de la leucine 337 au lieu de 2,3 Å si la glutamine 426 n'était pas réorientée. Il en résulte qu'en présence du ligand BXL-72, la distance entre l'atome O ϵ 1 de Gln426 et l'atome N δ 1 de His333 est de 4,2 Å au lieu de 2,9 Å dans le cas du zVDR-LBD lié au Gemini. Cependant, cette perte d'interaction entre le cycle imidazole de l'histidine 333 et l'atome O ϵ 1 de Gln426 est compensée par une interaction plus forte avec le groupement hydroxyle de la deuxième chaîne latérale du ligand distance de 2,85 Å (au lieu de 3,2 Å dans le cas du complexe zVDR-LBD/Gemini). Ainsi, les deux atomes d'azote du cycle imidazole de l'histidine 333 sont stabilisés par des liaisons hydrogènes avec les deux groupements hydroxyles du ligand BXL-72 et l'interaction entre l'histidine 333 et la glutamine 426 ne semble plus nécessaire à la stabilisation du cycle de l'histidine 333.

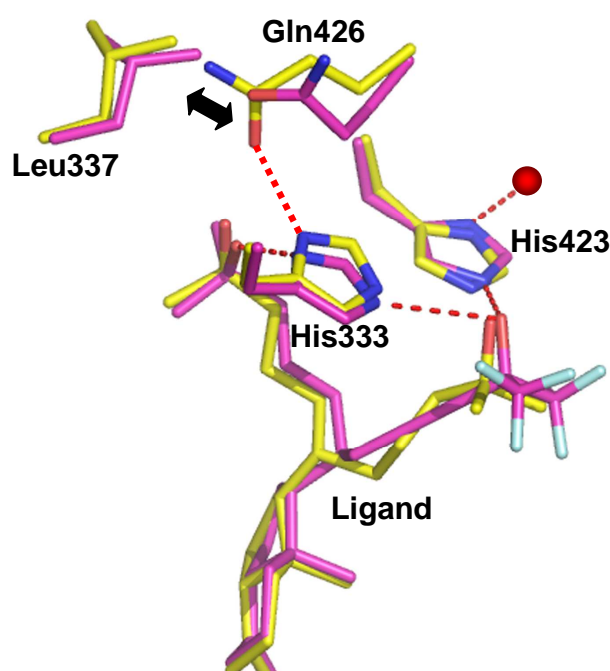


Figure 42 : Dans le complexe zVDR-LBD/BXL-72, la Leu337 induit une réorientation vers le solvant de la Gln426 qui n'interagit plus avec l'His333. Les interactions de type hydrogène observées dans les complexes zVDR-LBD/BXL-72 (en magenta) et zVDR-LBD/Gemini (en jaune) sont indiquées par des pointillés rouge. La flèche noire schématise la gêne stérique entre la Leu337 et la Gln426. La sphère rouge représente la molécule d'eau stabilisant le cycle imidazole de l'histidine 423.

La reconnaissance du ligand BXL-72 par le zVDR-LBD se traduit par des interactions polaires plus faibles entre les deux groupements hydroxyles du ligand et les résidus His333 et His423, mais la stabilisation des deux chaînes latérales du ligand semblent être compensée par de nouvelles interactions entre la chaîne fluorée du ligand et des résidus du début de H3, des hélices 11 et 12, suggérant une meilleure stabilisation de la conformation agoniste du LBD de VDR.

IV.2.4.2. Modèle tridimensionnel du VDR de poisson-zèbre lié au ligand BXL-97.

IV.2.4.2.1. Architecture globale du complexe zVDR-LBD/BXL-97.

Le ligand BXL-97 diffère du ligand BXL-72 par la stéréochimie du carbone 20 : S pour BXL-72 et R pour BXL-97.

L'architecture générale du LBD en complexe avec le ligand BXL-97 est très proche de celle du complexe du LBD sauvage avec le ligand BXL-72 (figure 43). La valeur rmsd de la superposition de ces deux structures est de 0,25 Å sur l'ensemble de la chaîne polypeptidique. Cependant, la comparaison des structures zVDR-LBD/BXL-97 et zVDR-LBD/Gemini donne une valeur rmsd de 0,38 Å sur l'ensemble de la chaîne polypeptidique. La structure du complexe zVDR-LBD/Gemini est plus proche de celle du complexe zVDR-LBD/BXL-72 que de celle du complexe zVDR-LBD/BXL-97. Comme pour les structures présentées précédemment, le ligand est présent dans la cavité hydrophobe et stabilise la conformation agoniste du récepteur. L'orientation et la position du peptide coactivateur sont identiques aux structures décrites précédemment. Comme dans les structures connues de zVDR-LBD, aucune densité électronique n'est visible pour la boucle située entre H2 et H3.

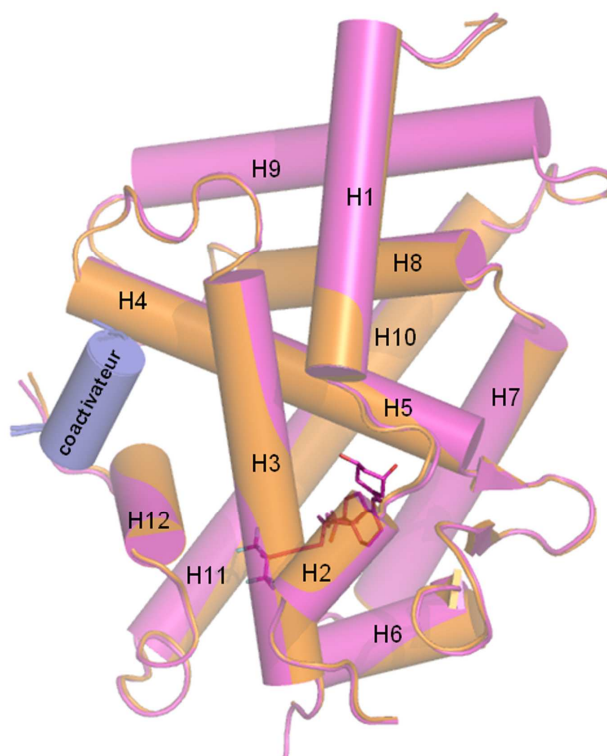


Figure 43 : Le complexe zVDR-LBD sauvage lié au ligand BXL-97 adopte la conformation agoniste canonique. zVDR-LBD/BXL-97 est représenté en orange et zVDR-LBD/BXL-72 en magenta. Le ligand apparaît par transparence derrière H2 et H3. Le peptide coactivateur est indiqué en bleu.

IV.2.4.2.2. Cavité de fixation du ligand et mécanisme de reconnaissance du ligand.

La densité électronique $F_o - F_c$ permet de placer sans ambiguïté le ligand dans la cavité de fixation (figure 44). Tout comme le ligand BXL-72, la chaîne fluorée se positionne du côté de la chaîne du Calcitriol. Le volume de la poche est de 784 \AA^3 . Le volume calculé pour le ligand BXL-97 dans la poche est de 474 \AA^3 .

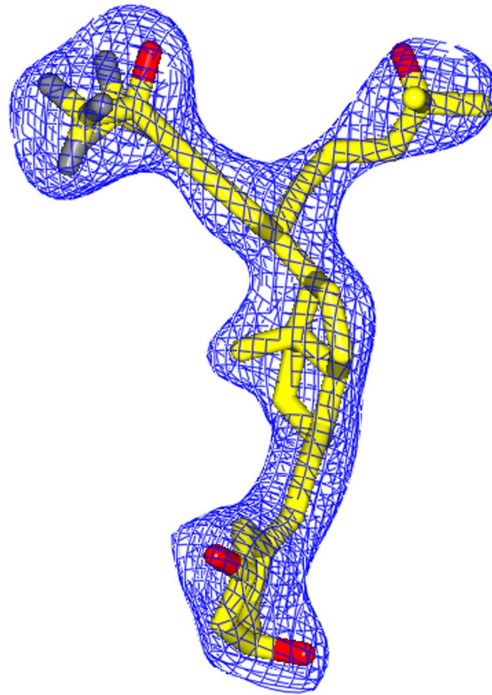


Figure 44 : La densité électronique indique que toutes les parties du ligand BXL-97 sont présentes dans le zVDR sauvage. La densité électronique Fo-Fc calculée en l'absence du ligand et entourée à 3σ , à une résolution de 2,5 Å permet de distinguer sans ambiguïté l'orientation des deux chaînes latérales. Les atomes de carbone, d'oxygène et de fluor sont indiqués en jaune, rouge et gris, respectivement.

Les interactions sont conservées de part et d'autre du ligand, par rapport au complexe zVDR-LBD/BXL-72 excepté pour l'histidine 333 qui n'interagit plus qu'avec un seul groupement hydroxyle du ligand BXL-97 (figure 45). Le cas de l'histidine 333 sera détaillé par la suite.

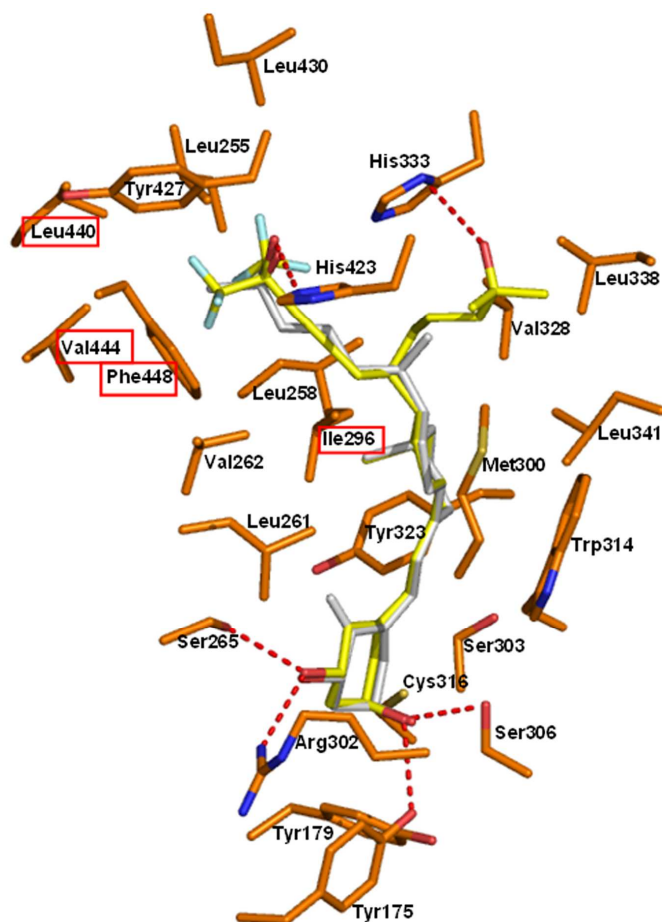


Figure 45 : Les interactions entre le ligand BXL-97 et les résidus de la poche sont conservées excepté pour l'His333 qui n'interagit plus qu'avec une seule chaîne latérale du ligand. Les conformations des ligands BXL-97 (20-R) (jaune) et Calcitriol (gris) tels qu'ils sont positionnés dans dans la poche du zVDR-LBD sauvage sont superposées. Les résidus de la poche du zVDR sauvage situés à une distance de moins de 4 Å du BXL-97 sont représentés en orange. Les résidus encadrés en rouge sont ceux impliqués dans les interactions supplémentaires observées dans le complexe zVDR/BXL-72.

Tout comme pour le ligand BXL-72, des interactions de type van der Waals entre les atomes de fluor et certains résidus hydrophobes de la poche (début de H3, H11 et H12) stabilisent la chaîne latérale fluorée du ligand (figure 46). En effet, les résidus Val262, Tyr427, Leu430, Val444 et Phe448 stabilisent les trois atomes de fluor branchés en C-25 et les résidus Leu440 et Leu255, les trois fluors branchés en C-26. Le C δ 1 du résidu Ile296 interagit également avec le

ligand BXL-97, comme dans le cas du complexe zVDR-LBD, mais cette fois c'est avec l'atome C-21 de la chaîne fluorée du ligand, du fait du changement de stéréochimie du carbone 20.

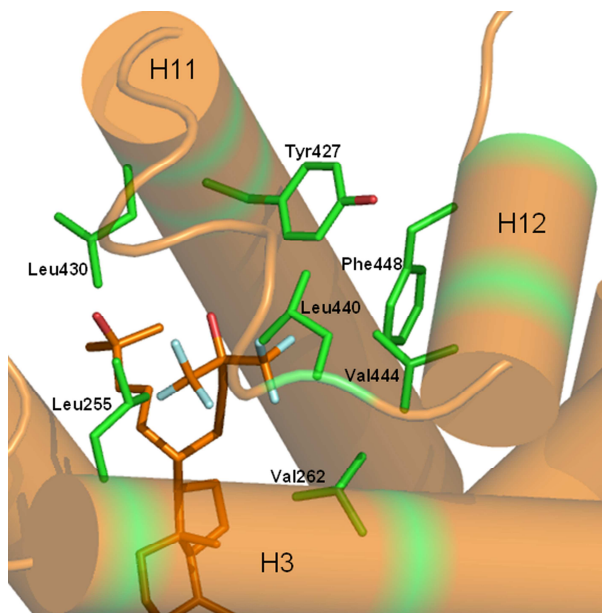


Figure 46 : Des résidus hydrophobes des hélices 3, 11 et 12 du zVDR-LBD sont impliqués dans la reconnaissance du ligand BXL-97. Les résidus qui interagissent avec les atomes de fluor du ligand sont colorés en vert. Les atomes d'oxygène, d'azote et de fluor sont colorés en rouge, bleu foncé et bleu clair, respectivement.

Le ligand BXL-97 s'oriente de manière similaire au ligand BXL-72 dans la poche de fixation du ligand, la chaîne fluorée adoptant l'orientation de la chaîne latérale du Calcitriol. Cependant, la stéréochimie du carbone 20 du ligand BXL-97 ne permet pas à la chaîne non fluorée de se positionner exactement comme celle du BXL-72 (figure 47). Le cycle C/D du ligand BXL-97 est légèrement déplacé par rapport au ligand BXL-72, afin de conserver les positions des groupements hydroxyles des deux chaînes latérales. On observe également que les atomes de fluor sont positionnés différemment par rapport au complexe zVDR-LBD/BXL-72.

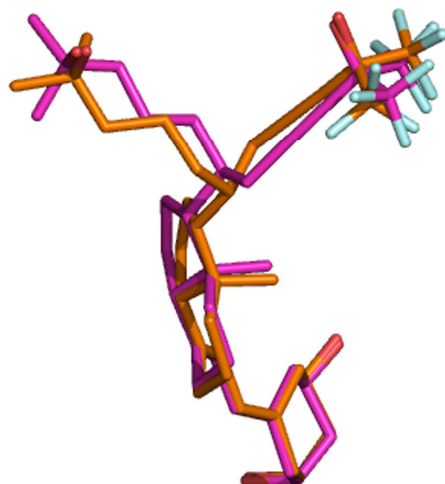


Figure 47 : La stéréochimie du carbone 20 explique les conformations différentes des ligands BXL-72 (magenta) et BXL-97 (orange) dans la poche de fixation du zVDR-LBD sauvage.

Le léger décalage du cycle C/D du ligand et les positions différentes des deux chaînes latérales du ligand BXL-97 engendrées par la stéréochimie R du C-20 entraînent un léger déplacement de la fin de H6, du début de H7 et de la fin de H11 (figure 48). Les valeurs rmsd au niveau de ces trois régions sont respectivement 0,65 Å (résidus 324 à 329), 0,50 Å (résidus 332 à 338) et 0,31 Å (résidus 429 à 433).

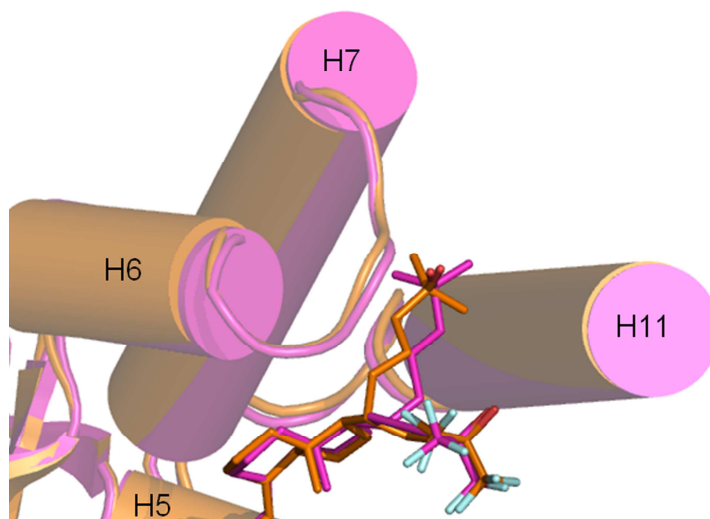


Figure 48 : La stéréochimie R du C-20 entraîne une conformation différente du ligand BXL-97 et entraîne un déplacement de la fin de H6, du début de H7 et de la fin de H11 dans le complexe

zVDR-LBD/BXL-97. Les complexes zVDR-LBD/BXL-97 et zVDR-LBD/BXL-72 apparaissent respectivement en orange et magenta. Les atomes d'oxygène sont en rouge et les atomes de fluor en bleu clair.

La comparaison avec le complexe zVDR-LBD/BXL-72 indique une orientation différente pour le cycle imidazole de l'histidine 333 et un léger décalage de l'histidine 423 (figure 49). On observe que l'histidine 333 n'interagit plus avec le groupement hydroxyle de la chaîne fluorée du ligand BXL-97. Cette perte d'interaction semble résulter d'une gêne stérique entre l'atome N ϵ 2 du cycle de l'histidine 333 et l'atome F-2 du ligand BXL-97. Cependant, l'interaction entre le groupement OH de la chaîne fluorée et l'azote N ϵ 2 de l'histidine 423 est renforcée (distance de 2,7 Å contre 3,0 Å en présence du ligand BXL-72). De plus, dans les deux complexes, la glutamine 426 ne participe pas à la stabilisation du cycle imidazole de His333. Dans le cas du complexe zVDR-LBD/BXL-72, cette perte d'interaction est compensée par une interaction plus forte avec le groupement OH de la chaîne fluorée du ligand BXL-72. En revanche, cette interaction n'est pas compensée dans le cas du complexe zVDR-LBD/BXL-97.

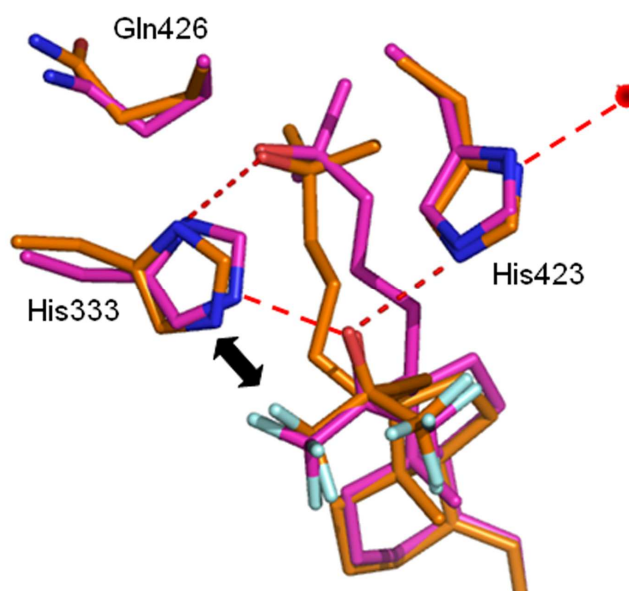


Figure 49 : La proximité d'un atome de fluor déstabilise la chaîne latérale de l'His333 dans le complexe zVDR-LBD/BXL-97. Les complexes zVDR-LBD/BXL-97 et zVDR-LBD/BXL-72 sont colorés en orange et magenta, respectivement. Les pointillés rouge représentent les

interactions de type hydrogène. La flèche noire schématise la gêne stérique entre le cycle imidazole de his333 et l'atome F-2 du ligand BXL-97. La sphère rouge représente la molécule d'eau stabilisant le cycle imidazole de l'histidine 423.

La densité électronique et les facteurs d'agitation thermique très élevés de l'histidine 333 indiquent une grande flexibilité de ce résidu. Dans la conformation majoritaire de l'histidine 333 (figure 50), on remarque que le Nε2 du cycle imidazole est à 2,5 Å de l'atome F-2 du ligand. Le réseau de charges partielles supposé (figure 51) suggère une répulsion de charges entre le fluor chargé négativement et le Nε2 également chargé négativement. Cependant, l'hydrogène de l'oxygène O-3 porte une charge δ+, ce qui est favorable à l'établissement d'une interaction électrostatique avec le Nε2 de l'histidine 333. On peut donc supposer que le cycle imidazole oscille entre une position proche du groupement hydroxyle de la chaîne fluorée et une position plus éloignée du fait de la répulsion électrostatique entre le Nε2 et l'atome F-2.

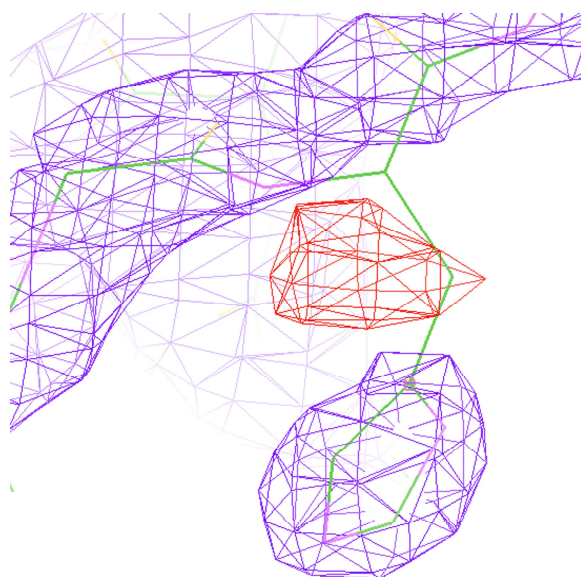


Figure 50 : La carte de densité électronique pour le résidu His333 dans le complexe zVDR-LBD/BXL-97 indique la flexibilité de l'His333. La carte 2Fo-Fc entourée à 1 σ est en violet et la carte Fo-Fc (négative) entourée à 3 σ est en rouge. La chaîne protéique est en vert, les atomes d'azote sont en rose et les atomes d'oxygène en jaune.

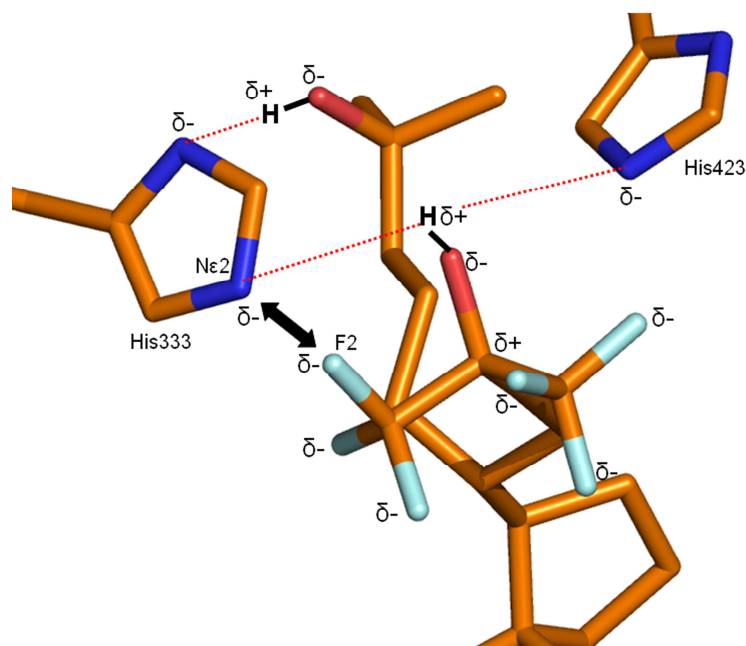


Figure 51 : Schéma des interactions électrostatiques et du réseau de charges partielles expliquant la répulsion entre le cycle de His333 et la tête fluorée du ligand BXL-97.

Cette observation implique qu'en présence du ligand BXL-97, le résidu His333 ne forme plus un point d'ancrage important pour la stabilisation du ligand. Cependant, l'activité génomique du VDR en présence du ligand BXL-97 est similaire à celle obtenue en présence du ligand BXL-72, suggérant que la perte d'ancrage du ligand BXL-97 par l'histidine 333 est compensée par les interactions additionnelles entre la chaîne latérale fluorée et des résidus de H3, H11 et H12 hydrophobes de la poche.

IV.2.4.3. Mécanisme moléculaire de reconnaissance des analogues du Gemini par le VDR sauvage.

L'architecture globale du LBD de VDR lié à un ligand à deux chaînes latérales est identique à celle du complexe VDR-LBD/Calcitriol. La flexibilité de la poche de fixation du ligand permet la reconnaissance de ligand beaucoup plus volumineux (25 à 30 %) que l'hormone

naturelle. La reconnaissance se fait par un léger déplacement des hélices H6, H7 et H11, sans affecter l'hélice H12 qui porte la fonction de transactivation dépendante du ligand.

Le résidu en position 337, situé au début de H7, joue un rôle majeur dans la plasticité de la poche de fixation du VDR. Nous avons montré que la mutation Leu337His n'affecte pas l'activité du VDR en présence de ligands de type Gemini. Nous sommes intéressés à la détermination des structures cristallographiques du mutant zVDR-LBD_{L337H} en complexe avec les ligands BXL-72 et BXL-97.

IV.2.4.4. Modèle tridimensionnel du mutant VDR_{L337H} de poisson-zèbre lié au ligand BXL-72.

IV.2.4.4.1. Architecture globale du complexe zVDR-LBD_{L337H}/BXL-72.

L'architecture générale du LBD du zVDR portant la mutation Leu337His en complexe avec le ligand BXL-72 est identique à celle du complexe du LBD sauvage avec le ligand BXL-72 (figure 52). La valeur rmsd de la superposition de ces deux structures est de 0,22 Å sur l'ensemble de la chaîne polypeptidique. La superposition des complexes zVDR-LBD_{L337H}/BXL-72 et zVDR-LBD_{L337H}/Gemini donne une valeur rmsd de 0,25 Å sur l'ensemble de la chaîne polypeptidique. Comme pour les structures présentées précédemment, le ligand est présent dans la cavité hydrophobe et stabilise la conformation agoniste du récepteur. L'orientation et la position du peptide coactivateur sont identiques aux structures décrites précédemment. Comme dans les structures connues de zVDR-LBD, aucune densité électronique n'est visible pour la boucle située entre H2 et H3.

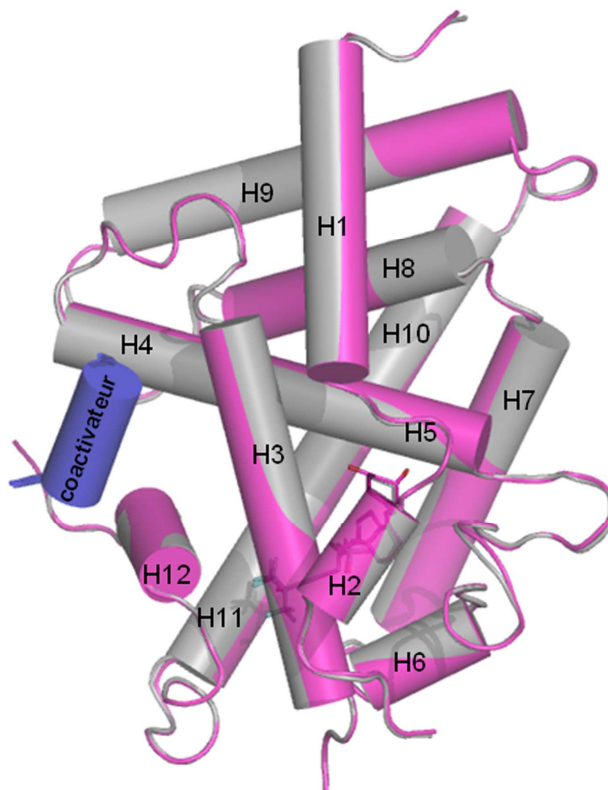


Figure 52 : Le complexe zVDR-LBD_{L337H}/BXL-72 adopte la conformation agoniste canonique. Les structures globales des complexes zVDR-LBD sauvage/BXL-72 (magenta) et zVDR-LBD_{L337H}/BXL-72 (gris) sont superposées. Le ligand apparaît par transparence derrière H2 et H3. Le peptide coactivateur est indiqué en bleu.

IV.2.4.4.2. Cavité de fixation du ligand et mécanisme de reconnaissance du ligand.

La densité électronique Fo-Fc permet de positionner sans ambiguïté le ligand dans la cavité de fixation (figure 53). Le volume de la poche est de 874 Å³.

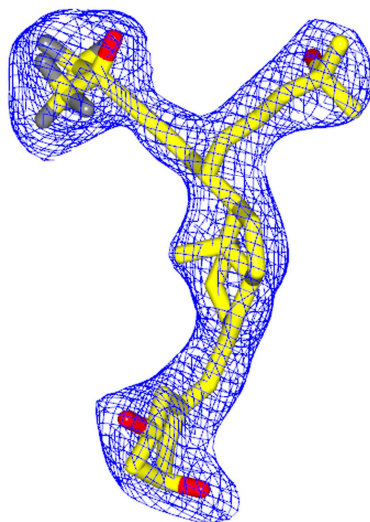


Figure 53 : La densité électronique indique que toutes les parties du ligand BXL-72 sont présentes dans le zVDR-LBD_{L337H}. La densité électronique Fo-Fc calculée en l'absence du ligand et entourée à 3σ , à une résolution de 2,75 Å permet de distinguer sans ambiguïté l'orientation des deux chaînes latérales. Les atomes de carbone, d'oxygène et de fluor sont indiqués en jaune, rouge et gris, respectivement.

La superposition des structures cristallographiques des complexes zVDR-LBD_{L337H}/BXL-72 et zVDR-LBD/BXL-72 montre que les interactions sont conservées entre les résidus de la poche de fixation du ligand et le ligand (figure 54). Les liaisons hydrogène sont conservées de part et d'autre du ligand. Les mêmes interactions supplémentaires entre le ligand et les résidus Ile296, Leu440, Val444 et Phe448 sont observées. La conservation de ces interactions est en accord avec les résultats de transactivation montrant que le zVDR sauvage et mutant Leu337His induisent une activité transcriptionnelle similaire en présence du ligand BXL-72.

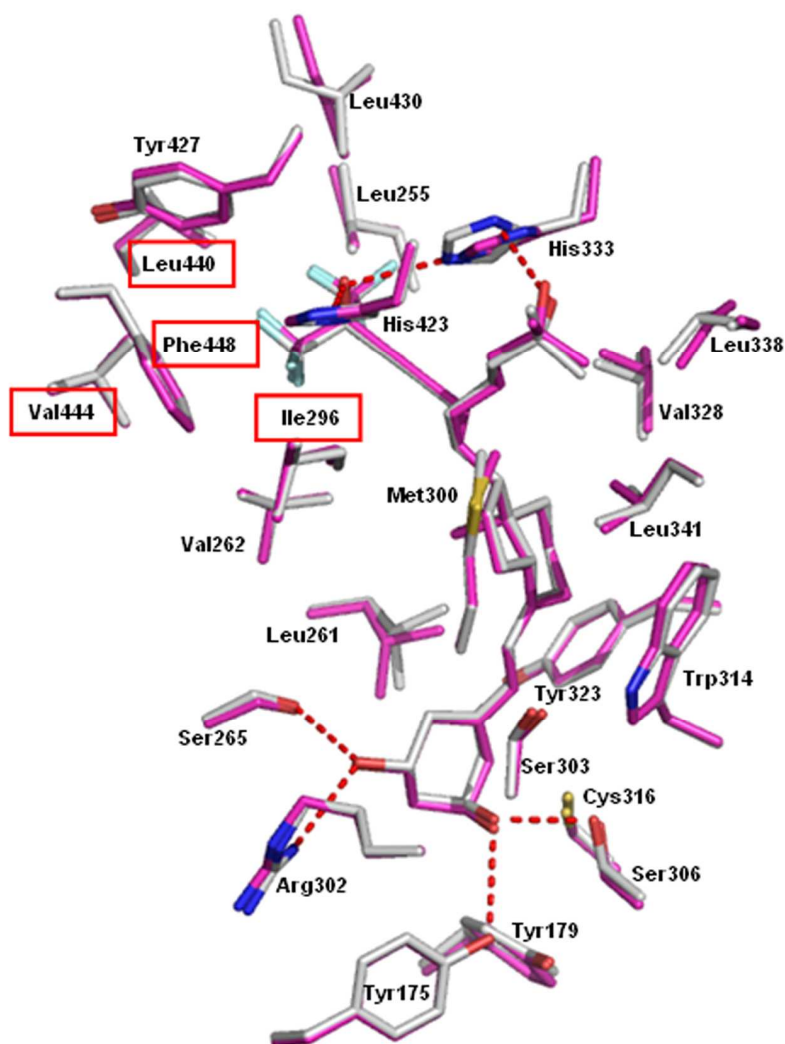


Figure 54 : La superposition des complexes zVDR-LBD_{L337H}/BXL-72 (gris) et zVDR-LBD/BXL-72 (magenta) montre que les interactions sont conservées entre le ligand BXL-72 et les résidus de la poche. Les résidus situés à une distance de moins de 4 Å du BXL-72 sont représentés.

Une différence de positionnement de la chaîne latérale de l’histidine 333 est observée entre ces deux structures (figure 55). En effet, dans la structure du complexe zVDR-LBD_{L337H}/BXL-72, l’histidine 333 est déplacée de 0,50 Å vers le groupement hydroxyle de la chaîne fluorée du ligand. Il en résulte un renforcement de la liaison hydrogène entre l’atome Ne2 de His333 et ce groupement OH du ligand. Cependant, l’interaction entre l’atome Nd1 de His333 et le groupement OH de la chaîne deutérée du ligand est affaiblie (distance de 3,21 Å). De plus,

l'histidine 337 est stabilisée par le résidu Glu422 (la distance entre N ϵ 2 de His337 et O ϵ 1 de Glu422 est de 2,92 Å) et par le résidu Gln426 (la distance entre N δ 1 de His337 et N ϵ 2 de Glu426 est de 3,26 Å), qui interagit également avec His333 (la distance entre N δ 1 de His333 et O ϵ 1 de Glu426 est de 3,0 Å).

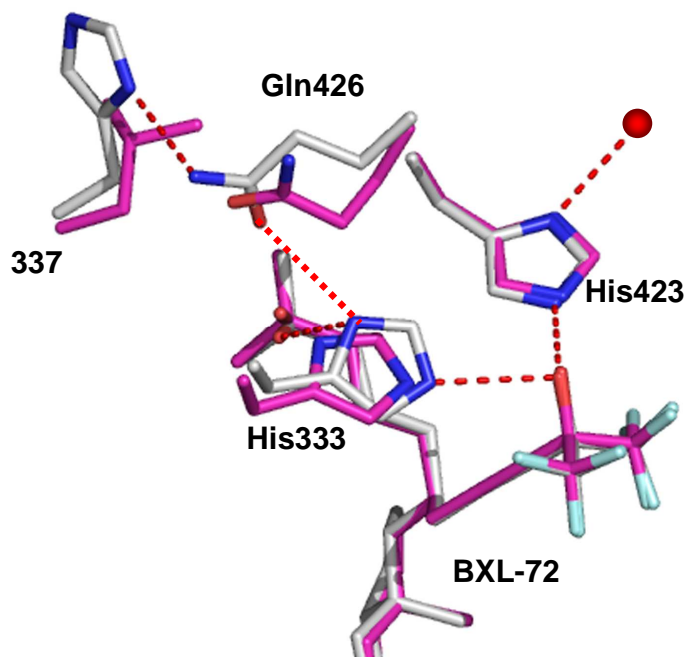


Figure 55 : L'histidine 333 est stabilisée à la fois par la Gln426 et par les groupements OH des deux chaînes latérales du BXL-72 dans zVDR-LBD_{L337H}/BXL-72 (gris) et uniquement par les groupements OH des chaînes aliphatiques du BXL-72 dans zVDR-LBD/BXL-72 (magenta).

Dans le complexe zVDR-LBD_{L337H}/BXL-72, l'histidine 333 est stabilisée d'une part par le groupement hydroxyle de la chaîne deutérée du ligand et d'autre part, par la glutamine 426. Regardons à présent le cas du complexe zVDR-LBD_{L337H}/BXL-97.

IV.2.4.5. Modèle tridimensionnel du mutant VDR_{L337H} de poisson-zèbre lié au ligand BXL-97.

IV.2.4.5.1. Architecture globale du complexe $zVDR-LBD_{L337H}/BXL-97$.

L'architecture générale du LBD du $zVDR$ portant la mutation Leu337His en complexe avec le ligand BXL-97 est identique à celle du complexe du LBD sauvage avec le ligand BXL-97 (figure 56). La valeur rmsd de la superposition de ces deux structures est de 0,25 Å sur l'ensemble de la chaîne polypeptidique. La superposition des complexes $zVDR-LBD_{L337H}/BXL-97$ et $zVDR-LBD_{L337H}/Gemini$ donne une valeur rmsd de 0,25 Å sur l'ensemble de la chaîne polypeptidique. Comme pour les structures présentées précédemment, le ligand est présent dans la cavité hydrophobe et stabilise la conformation agoniste du récepteur. L'orientation et la position du peptide coactivateur sont identiques aux structures décrites précédemment. Comme dans les structures connues de $zVDR-LBD$, aucune densité électronique n'est visible pour la boucle située entre H2 et H3.

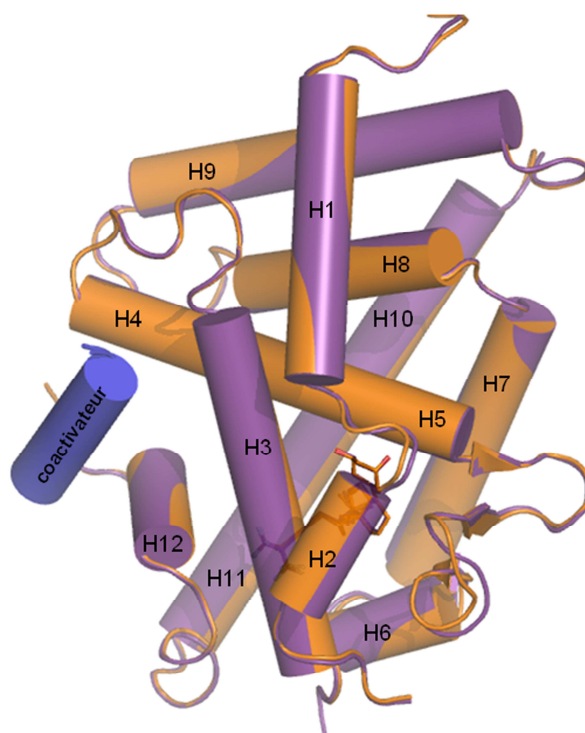


Figure 56 : le complexe du $zVDR-LBD_{L337H}/BXL-97$ adopte la conformation agoniste canonique. La superposition de la vue d'ensemble du $zVDR-LBD$ sauvage en présence du ligand BXL-97 (orange) et du $zVDR-LBD_{L337H}$ en présence du ligand BXL-97 (violet) est représentée. Le ligand apparaît par transparence derrière H2 et H3. Le peptide coactivateur est indiqué en bleu.

IV.2.4.5.2. Cavité de fixation du ligand et mécanisme de reconnaissance du ligand.

La densité électronique Fo-Fc permet de positionner sans ambiguïté le ligand dans la cavité de fixation (figure 57). Le volume de la poche est de 881 Å³.

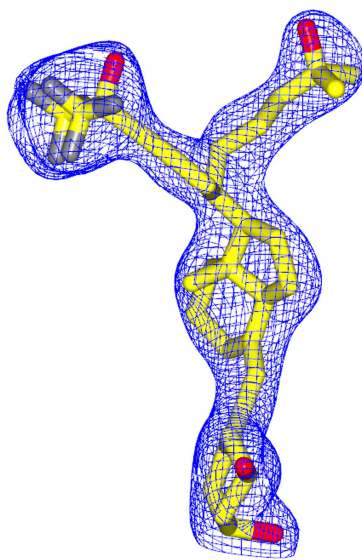


Figure 57 : La densité électronique indique que toutes les parties du ligand BXL-97 sont présentes dans le zVDR-LBD_{L337H}. La densité électronique Fo-Fc calculée en l'absence du ligand et entourée à 3 σ , à une résolution de 2,6 Å permet de distinguer sans ambiguïté l'orientation des deux chaînes latérales. La densité électronique Fo-Fc est calculée en l'absence du ligand et entourée à 3 σ , à une résolution maximale de 2,6 Å. Les atomes de carbone, d'oxygène et de fluor sont indiqués en jaune, rouge et gris, respectivement.

La superposition des structures cristallographiques des complexes zVDR-LBD_{L337H}/BXL-97 et zVDR-LBD/BXL-97 montrent que les interactions sont conservées entre les résidus de la poche de fixation du ligand et le ligand (figure 58). Les liaisons hydrogènes sont conservées de part et d'autre du ligand. Les interactions supplémentaires entre le ligand et les résidus Ile296, Leu440, Val444 et Phe448 sont également observées. Dans le cas des complexes VDR/BXL-72, l'interaction supplémentaire avec Ile296 implique l'atome C-27 de la chaîne latérale deutérée alors que dans les complexes VDR/BXL-97, cette interaction implique l'atome C-21 de la chaîne fluorée. Cette différence s'explique par la stéréochimie du carbone 20.

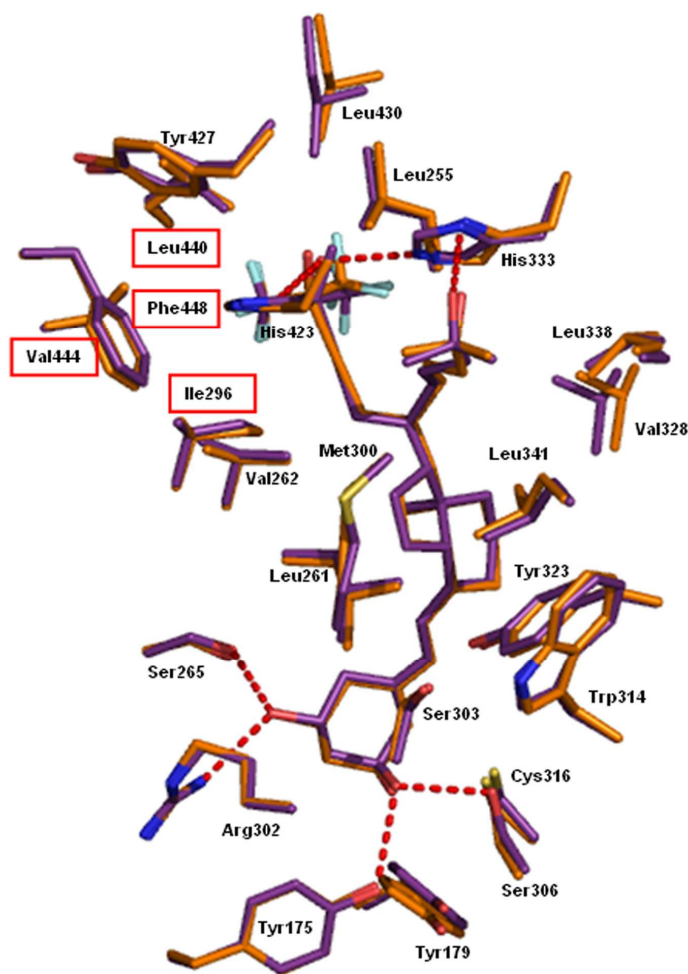


Figure 58 : La superposition des complexes zVDR-LBD_{L337H}/BXL-97 (violet) et zVDR-LBD/BXL-97 (orange) montre que les interactions sont conservées entre le ligand BXL-97 et les résidus de la poche. Les résidus situés à une distance de moins de 4 Å du BXL-97 sont représentés.

Un point important concerne le résidu His333. En effet, dans le complexe zVDR-LBD/BXL-97, ce résidu est déstabilisé par la présence d'un atome de fluor proximal. En revanche, dans le cas du complexe zVDR-LBD_{L337H}/BXL-97, la densité électronique de His333 est très claire et les facteurs d'agitation thermique pour ce résidu ne montrent pas d'écart par rapport aux résidus voisins. On observe une légère différence de positionnement de la tête fluorée du ligand BXL-97 entre ces deux structures. Cela s'explique par un déplacement de la fin de H6, de la boucle 6-7, du début de H7 et de la fin de H11 qui permet la stabilisation de l'histidine 337 par les résidus Glu422 et Gln426 de H11 (figure 59). Cependant, dans le cas de cette structure

cristallographique, la densité électronique des chaînes latérales des résidus His337 et Gln426 n'est pas complète. L'orientation du cycle imidazole de His333 est également différente entre ces deux complexes. Dans le cas du complexe zVDR-LBD_{L337H}/BXL-97, l'atome Nδ1 de l'histidine 333 interagit avec le groupement hydroxyle de la chaîne deutérée du ligand et avec l'atome Oε1 de la Gln426 (distances 3,30 Å et 3,48 Å, respectivement) et l'atome Nε2 de His333 interagit avec le groupement hydroxyle de la chaîne fluorée du ligand (distance 2,95 Å) (figure 60).

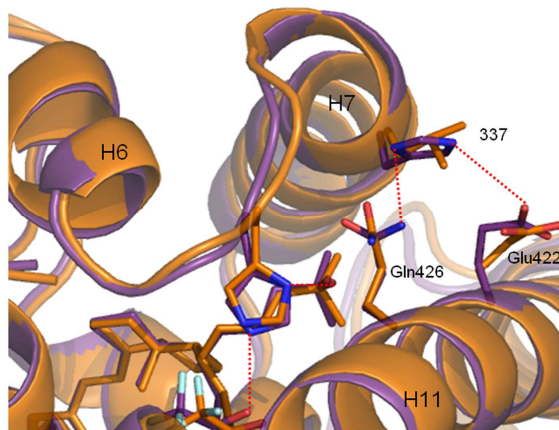


Figure 59 : Un déplacement de la fin de H6, de la boucle 6-7, du début de H7 et de la fin de H11 permet la stabilisation de l'histidine 337 par les résidus Glu422 et Gln426 de H11. La superposition des complexes zVDR-LBD_{L337H}/BXL-97 (en violet) et zVDR-LBD/BXL-97 (en orange) est représentée.

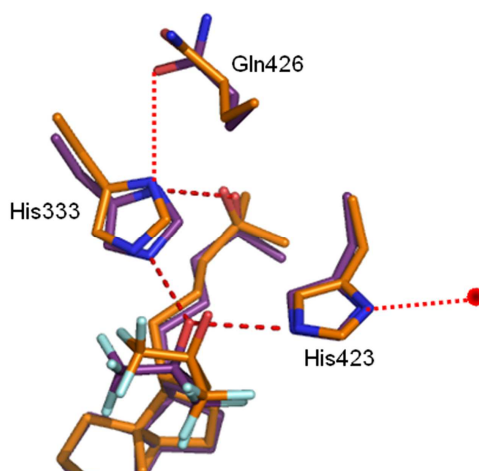


Figure 60 : Dans le complexe zVDR-LBD_{L337H}/BXL-97, le cycle imidazole de l'histidine 333 est stabilisé par la Gln426 et par la chaîne latérale fluorée du ligand BXL-97. Les complexes zVDR-LBD_{L337H}/BXL-97 et zVDR-LBD/BXL-97 sont représentés en violet et orange, respectivement.

Dans le cas du complexe zVDR-LBD_{L337H}/BXL-97, tout comme dans le cas du complexe zVDR-LBD_{L337H}/BXL-72, l'histidine 333 est stabilisée fortement par le groupement hydroxyle de la chaîne deutérée du ligand et faiblement par la glutamine 426, au niveau de l'atome Nδ1.

IV.2.4.6. Mécanisme moléculaire de reconnaissance des analogues du Gemini par le mutant zVDR-LBD_{L337H}.

En présence des dérivés Gemini BXL-72 et BXL-97, l'histidine 337 pointe vers l'extérieur et est stabilisée par les résidus Gln422 et Gln426. Lorsque His337 pointe en dehors de la poche de fixation du ligand, l'orientation de la chaîne latérale de la Gln426 n'est pas perturbée et peut interagir avec le cycle imidazole de l'histidine 333. Par contre, dans le cas où le résidu 337 est une leucine, le résidu Gln426 adopte une conformation différente qui ne lui permet pas de stabiliser le cycle imidazole de l'histidine 333 (qui est alors stabilisé par les deux groupements OH du ligand). Ainsi, en présence des ligands Gemini, la mutation Leu337His ne semble pas perturber l'orientation de la chaîne latérale de Gln426. Au contraire, une interaction supplémentaire entre l'atome Nδ1 de His337 qui pointe vers le solvant, et l'atome Nε2 de Gln426 stabilise davantage la chaîne latérale de la Gln426. le cycle imidazole de His333 est dans ce cas stabilisé à la fois par la chaîne latérale de la Gln426 et par le groupement OH de la deuxième chaîne latérale du ligand.

V- DISCUSSION ET PERSPECTIVES.

La forme active de la vitamine D₃, le Calcitriol, joue un rôle important dans l'homéostasie du calcium et du phosphate, dans la différenciation et prolifération cellulaires et dans l'immunité. Une compréhension exhaustive des propriétés physiologiques et pharmacologiques du Calcitriol indique que le VDR est une cible pharmaceutique prometteuse dans le traitement de cancers, de maladies auto-immunes, de maladies infectieuses et cardio-vasculaires, et également de désordres de la minéralisation osseuse. Cependant, l'utilisation thérapeutique du Calcitriol et de ses analogues est limitée par leurs effets hypercalcémiques intrinsèques. Ainsi, dans le but ultime de dissocier l'activité anti-tumorale du Calcitriol de ses propriétés hypercalcémiques, deux stratégies de recherche ont été adoptées : d'une part, synthétiser des dérivés du Calcitriol actifs à de très faibles doses et ne présentant pas d'effets hypercalcémiques, et d'autre part, identifier les mécanismes précis responsables des effets hypercalcémiques induits par le Calcitriol, pour mieux les contrer. La première stratégie s'avère plutôt hasardeuse et peu de composés rassemblant ces propriétés existe parmi les 3000 analogues du Calcitriol (131), (132). La seconde stratégie repose sur une meilleure compréhension des voies de signalisation de la vitamine D₃. Il est aujourd'hui admis que le Calcitriol, comme d'autres ligands de récepteurs nucléaires, induit des réponses rapides et distinctes des réponses génomiques classiquement connues. Ces effets dits non-génomiques concernent, entre autres, l'ouverture de canaux ioniques situés dans les membranes cellulaires. Actuellement, deux récepteurs sont susceptibles de jouer un rôle majeur dans la signalisation non-génomique de la vitamine D₃ : 1,25D₃-MARRS (protéine ERp57/GRp58) et le récepteur nucléaire VDR. Les études réalisées à ce jour n'ont pas permis d'élucider clairement les mécanismes des effets non-génomiques de la vitamine D₃, d'où l'importance de développer des outils performants permettant l'étude fine des effets non-génomiques du Calcitriol.

L'étude présentée dans cette thèse combine ces deux stratégies : l'élaboration d'un outil *in vivo* original permettant l'élucidation de la voie de signalisation des effets non-génomiques du Calcitriol et l'utilisation de très puissants superagonistes du VDR ne présentant pas de propriétés hypercalcémiques.

Le point de départ de cette étude a été l'identification du résidu Leu337 du VDR du poisson-zèbre (Leu309 du VDR humain) comme étant un résidu clé intervenant dans la plasticité

de la poche de fixation du ligand. L'exploitation de cette découverte par des techniques d'ingénierie protéique et de biologie cellulaire a donné un résultat fondamental : la mutation Leu337His du VDR du poisson-zèbre, tout comme la mutation Leu309His du VDR humain, permet d'éteindre l'activité génomique du VDR en présence de son ligand naturel alors qu'en présence du ligand synthétique Gemini, l'activité génomique du VDR n'est pas altérée. Ainsi, le mutant Leu337His du VDR de poisson-zèbre (ou Leu309His du VDR humain) représente un outil magnifique pour différencier les effets génomiques des effets non-génomiques induits par le Calcitriol et ses dérivés. Un modèle murin *knock-in* exprimant le VDR muté Leu304His (correspondant à la mutation Leu337His du VDR de poisson-zèbre) a été généré en collaboration avec l'Institut de la Clinique de la Souris basé à Illkirch. Ce modèle permet d'étudier les effets de la mutation Leu304His à l'échelle de l'organisme. Dans le modèle murin créé, la protéine VDR_{L304H} exprimée n'est plus capable de fixer son ligand naturel, donc se trouve sous forme non ligandée et ne peut exercer ses fonctions génomiques. En revanche, en présence du ligand Gemini, la protéine VDR_{L304H} redevient active. C'est le premier modèle *in vivo* pour lequel l'inactivation générée génétiquement est réversible par simple apport d'une molécule (figure 61). En effet, par la seule introduction d'une mutation ponctuelle au sein du récepteur et l'utilisation de deux types de ligands bien distincts, on dispose alors d'un outil *in vivo* permettant une étude fine des voies non-génomiques induites par la forme active de la vitamine D₃. En effet, en bloquant la voie génomique du VDR, on peut alors étudier précisément la voie non-génomique induite par le Calcitriol. De plus, plusieurs ligands de type Gemini sont disponibles et parmi eux, les ligands BXL-72 et BXL-97 sont particulièrement intéressants. En effet, ils permettent d'une part de restaurer l'action génomique du VDR de la même façon que leur dérivé parental Gemini et d'autre part, ce sont de puissants superagonistes du VDR n'ayant pas les propriétés hypercalcémiques classiquement reconnues du Calcitriol. Ainsi, nous avons à notre disposition le Calcitriol qui n'induit pas d'effets génomiques en présence du mutant VDR Leu304His mais peut induire des effets non-génomiques, le Gemini qui peut induire les deux types d'effets et les ligands BXL qui induisent la voie génomique mais sans les effets hypercalcémiques.

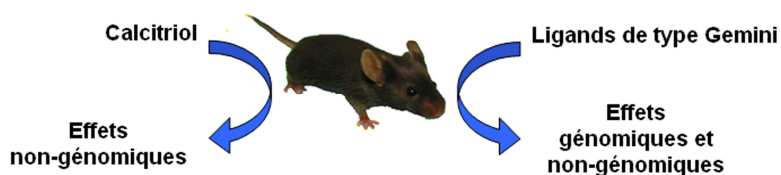


Figure 61 : Modèle murin exprimant le VDR muté Leu304His.

Une étude générale phénotypique de la souris *vdr*-knock-in est en cours (courbes de croissance, observation du pelage, analyses histomorphométriques des os, analyses histologiques, mesures des taux de calcium, phosphate et hormone PTH dans le sang, etc...). Puis une étude plus détaillée sur l'expression de certains gènes (par exemple les gènes codant pour les protéines de fixation du calcium intracellulaire : calbindin D_{9K} et calbindin D_{28K}, pour les canaux calciques ECaC1, ECaC2) sera entreprise en isolant et quantifiant les ARN présents dans certains tissus. Une caractérisation plus précise de l'activité biologique du mutant murin VDR_{L304H} sera également réalisée, telle que la détermination des capacités du VDR muté à former un hétérodimère avec son partenaire RXR, et à être phosphorylé par la protéine kinase C (sur la sérine 51) et par la caséine kinase II (sur la sérine 208), en l'absence ou en présence du Calcitriol ou du Gemini. Une grande différence par rapport aux autres souris génétiquement modifiée pour le gène *vdr* concerne le DBD. En effet, le gène *vdr* des autres souris a été inactivé au niveau des exons 2 ou 3 codant pour le DBD et code ou non pour un LBD capable de fixer le ligand (VDR tronqué commençant à la Met52 et ne possédant par le site de phosphorylation Ser51). Ainsi, le modèle murin VDR_{L304H} constitue la première souris inactivée pour le gène *vdr* qui présente un DBD fonctionnel et un LBD « intact » incapable de fixer le Calcitriol. L'avantage de cette souris génétiquement modifiée est qu'elle exprime un récepteur très proche du VDR naturel mais que son activité biologique est altérée en présence du Calcitriol. Les premiers résultats obtenus à partir de ces souris montrent un phénotype rachitique et l'absence d'alopécie. Ces résultats préliminaires suggèrent que la minéralisation osseuse nécessite à un certain égard, une activité génomique intacte du VDR. Par contre, le phénotype d'absence d'alopécie confirme que le maintien du cycle du poil requiert la présence du VDR mais pas son activité génomique. Des analyses biochimiques sont en cours et l'intégration de l'ensemble des résultats ainsi que la comparaison avec les données déjà disponibles permettront une compréhension détaillée de la voie de signalisation de la vitamine D₃. En effet, les données devraient permettre de différencier les récepteurs 1,25D3-MARRS ou VDR en tant que transducteur du signal conduisant aux effets non-génomiques de la vitamine D₃, ou alors d'identifier des mécanismes tissu-spécifiques impliquant l'un ou l'autre de ces deux récepteurs ou une interaction croisée entre les deux récepteurs en fonction du contexte cellulaire. Il convient parallèlement d'étudier attentivement la régulation de ces deux récepteurs. En effet, le VDR et 1,25D3-MARRS représentent deux cibles de plusieurs kinases (tyrosine kinase, caséine kinase II, PKC, AMPc-dépendante kinase pour

1,25D3-MARRS et PKC et protéine kinase II pour VDR). La phosphorylation peut jouer un rôle majeur dans la régulation de l'activité du VDR. Par exemple, une étude menée par Franck Barletta en 2002 a montré qu'en présence d'acide okadaïque, un inhibiteur de phosphatase, le VDR portant la mutation Leu417Ser (conférant une incapacité à interagir avec le coactivateur DRIP205 en présence du Calcitriol) était capable d'activer la transcription des gènes codant la 24-hydroxylase et l'ostéopontine indépendamment de la présence du Calcitriol (35). Ces données soulignent la complexité de la régulation du VDR et confirment l'importance d'étudier tous les aspects de régulation y compris celui de la dimension spatio-temporelle possible par l'utilisation de la microscopie confocale. L'intégration de l'ensemble de toutes ces données apportera de nombreuses réponses dans la compréhension de la signalisation du VDR dans sa globalité.

La détermination des modèles tridimensionnels du LBD du VDR_{L337H} de poisson-zèbre par la technique de cristallographie aux rayons X a permis d'identifier le mécanisme moléculaire de discrimination du ligand naturel induit par la mutation Leu309His et de comprendre l'effet neutre de cette même mutation observé en présence de ligands à double chaînes latérales. Ainsi, un criblage à deux étapes pourrait être envisagé afin d'exporter ce mécanisme de discrimination à d'autres récepteurs nucléaires. Il s'agirait dans un premier temps de trouver une mutation ponctuelle qui affecte l'activité génomique du récepteur, puis dans un second temps de cribler des ligands afin d'identifier un ligand capable de restaurer l'activité génomique du récepteur étudié. La mise au point de tels systèmes pour d'autres récepteurs nucléaires connus pour induire des réponses rapides (PR, AR, ER,TR,...) (133) permettrait d'élucider la voie de signalisation responsable de ces effets et permettrait à long terme l'utilisation massive de ligands des récepteurs nucléaires dans les traitements de nombreuses pathologies, tout en contrôlant ou supprimant les effets secondaires qui limitent aujourd'hui leurs utilisations pharmaceutiques.

VI- ANNEXES TECHNIQUES.

V.1. Méthodes de biologie moléculaire.

Les protocoles de biologie moléculaire proviennent de l'ouvrage suivant :

Molecular Cloning : A laboratory manual. J. Sambrook, E.F. Fritsch et T. Maniatis.
(2nd edition 1989 Cold Spring Harbor Laboratory Press).

V.1.1. Vecteurs de clonage et vecteurs d'expression utilisés.

Les vecteurs pET28b (*kan^R*) et pET15b (*amp^R*) (*Novagen*) permettent la production de protéines fusionnées à un polypeptide hexahistidine à leur extrémité N-terminal suivi d'un site de clivage par la thrombine. Le vecteur pXJ440 permettant la production d'une protéine fusionnée à l'élément GAL-DBD est utilisé pour les expériences de transactivation.

V.1.2. Amplification des vecteurs et extraction d'ADN plasmidique.

Les différents vecteurs utilisés sont amplifiés dans la souche bactérienne DH5 α cultivée en milieu LB 1X supplémenté en antibiotique pour lequel le plasmide porte le gène de résistance. Les plasmides sont ensuite extraits et purifiés en utilisant le kit de purification sur colonne Nucleospin® Plasmid de *Macherey-Nagel*. L'élution finale est effectuée dans un volume de 30 μ l de tampon AE fourni dans le kit. Leur concentration est déterminée par spectrométrie d'absorption à 260 nm (NanoDrop™ de *Thermo Fisher Scientific*). Les plasmides purifiés sont conservés à -20 °C ou préparés pour le séquençage réalisé par la société GATC basée à Constance, Allemagne (<http://www.gatc-biotech.com/en/index.html>).

V.1.3. Electrophorèse en gel d'agarose.

Composition du tampon de dépôt sur gel d'agarose (6X DNA Loading Dye de Fermentas) :

| <i>composition</i> | <i>quantité</i> |
|--------------------------|-----------------|
| TRIS-HCl (pH 7.6) | 10 mM |
| bleu de bromophénol | 0,03% m/v |
| bleu de xylène cyanol FF | 0,03% m/v |
| glycérol | 60% v/v |
| EDTA | 60 mM |

Composition du tampon TAE 50X :

| <i>composition</i> | <i>quantité</i> |
|------------------------|-----------------|
| TRIS-base | 242 g |
| acide acétique glacial | 57,1 ml |
| EDTA 0,5 M pH 8,0 | 100 ml |
| H ₂ O | qsp 1 l |

Une solution d'agarose à $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ est préparée en dissolvant un gramme d'agarose dans 100 ml de tampon TAE 1X par action de la chaleur. Le bromure d'éthidium (stock de $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) est ensuite ajouté à la solution d'agarose de manière à obtenir une concentration finale de $0,4 \mu\text{g}/\text{ml}$. Le gel polymérise par refroidissement. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est GeneRuler™ DNA Ladder Mix de *Fermentas*.

V.2. Techniques de culture bactérienne et production de protéines.

V.2.1. Souches bactériennes utilisées.

-DH5 α (*Invitrogen*™) : F⁻ Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ . Cette souche a été utilisée lors des étapes de clonage et d'amplification de vecteurs.

-BL21 (DE3) (*Novagen*) : F⁻ *ompT hsdS_B*(r_B⁻ m_B⁻) *gal dcm* (λ *CIts857, ind1, Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1*). Cette souche a été utilisée lors des étapes de production. Son génome est lysogénisé par le phage DE3 et comporte notamment le gène codant pour l'ARN polymérase du phage T7 sous contrôle de l'opéron lactose inductible à l'IPTG.

2.2 Milieux de culture.

Composition des milieux de culture LB liquide et solide :

| <i>composition</i> | <i>milieu liquide LB 1X</i> | <i>milieu liquide LB 2X</i> | <i>milieu LB solide (LB Agar)</i> |
|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| bacto-tryptone | 10 g | 20 g | 10 g |
| extrait de levure | 5 g | 10 g | 5 g |
| NaCl | 5 g | 10 g | 5 g |
| bacto-agar | | | 15 g |
| H ₂ O distillée | qsp 1 litre | qsp 1 litre | qsp 1 litre |

Les milieux sont stérilisés par autoclavage deux heures à 110 °C en atmosphère liquide et sous pression d'une atmosphère. Après refroidissement, les suppléments nécessaires (antibiotiques ou inducteurs) sont ajoutés stérilement. Ampicilline à 100 µg.ml⁻¹ ou kanamycine à 50 µg.ml⁻¹. IPTG à 0,8 mMol⁻¹.

Composition de milieu SOB :

| <i>composition</i> | <i>concentration</i> |
|--------------------|-------------------------------------|
| bacto-tryptone | 2 % m/v |
| extrait de levure | 0,5 % m/v |
| NaCl | 10 mM |
| KCl | 2,5 mM |
| MgCl ₂ | 10 mM |
| MgSO ₄ | 10 mM |
| NaOH | pour ajuster le pH entre 6,7 et 7,0 |

Le milieu est autoclavé avant l'ajout des sels. Ces derniers sont ajoutés stérilement.

Composition de milieu TB :

| <i>composition</i> | <i>concentration</i> |
|--------------------|--------------------------|
| PIPES pH 7,0 | 10 mM |
| CaCl ₂ | 15 mM |
| MnCl ₂ | 55 mM |
| KCl | 250 mM |
| KOH | pour ajuster le pH à 7,0 |

Le pH est ajusté à 7,0 avant d'ajouter le $MnCl_2$. le milieu est filtré sur membrane de porosité 0,22 μm .

V.2.3. Préparation des bactéries chimio-compétentes.

Toutes les étapes sont réalisées dans des conditions stériles. Des tests ont été effectués afin de vérifier la compétence des différentes souches en fonction des méthodes de préparation et une meilleure efficacité de transformation a été constaté pour les bactéries DH5 α préparées selon la méthode Inoue (134) et pour les bactéries BL21(DE3) selon la méthode au $CaCl_2$ (135).

- Méthode Inoue : bactéries chimio-compétentes DH5 α .

Une pré-culture de 100 ml de milieu LB est inoculée à partir d' un stock glycérol et incubée à 37 °C sous agitation constante pendant la nuit. La pré-culture est refroidie pendant 8 heures à 4 °C. Une culture de 250 ml de milieu SOB estensemencée par 4 ml de la pré-culture (afin d'avoir une densité optique à 600 nm initiale 0,1) puis incubée à 18 °C sous agitation constante (190 rpm) jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0,4. La culture est ensuite refroidie 10 minutes sur la glace, puis centrifugée pendant 15 minutes à 2500 g à 4 °C. Le culot est resuspendu dans 40 ml de milieu TB froid. Ce mélange est incubé 10 minutes sur glace puis centrifugé pendant 15 minutes à 2500 g à 4 °C. Le culot est resuspendu dans 10 ml de tampon TB froid. Du DMSO est ajouté goutte à goutte à une concentration finale de 7 % (V/V). Ce mélange est laissé 10 minutes sur glace, puis aliquoté en fractions de 50 μl . Les fractions aliquotes sont finalement congelées dans l'azote liquide et conservées a -80 °C.

- Méthode au $CaCl_2$: bactérie chimio-compétentes BL21.

Une pré-culture de 100 ml de milieu LB est inoculée à partir d'un stock glycérol et incubée à 37 °C sous agitation constante pendant la nuit. Le lendemain, une culture d'un litre de milieu LB estensemencée avec 20 à 25 ml de cette pré-culture (afin d'avoir une DO à 600 nm initiale comprise entre 0,05 et 0,1), incubée à 37 °C sous agitation constante (190 rpm) jusqu'à atteindre une DO à 600 nm de 0,4. La culture est ensuite refroidie 20 minutes sur glace puis centrifugée pendant 15 minutes à 2500 g à 4 °C. Le culot est resuspendu dans 250 ml d'une solution de NaCl à 10 mM. Ce mélange est incubé 10 minutes sur glace puis recentrifugé pendant 15 minutes à 2500 g à 4

°C. Le culot est repris dans 250 ml de CaCl₂ 75 mM et incubé sur glace pendant 35 minutes. Le mélange est centrifugé 15 minutes à 2500 g à 4 °C, le culot est repris dans 15 ml de CaCl₂ 75 mM. Après ajout de trois ml de glycérol 87 %, la solution est homogénéisée, incubée 20 minutes dans la glace puis dispensée en fractions aliquotes de 50 et 100 µl. Les fractions aliquotes sont finalement congelées à -80 °C.

V.2.4. Transformation de bactéries chimio-compétentes.

Un aliquot de 50 ng de plasmide est ajouté de manière stérile à 50 µl de bactéries chimio-compétentes préalablement décongelées sur glace. Les bactéries sont laissées cinq minutes sur glace, puis un choc thermique de 60 secondes à 42 °C permet l'ouverture des pores bactériens et l'entrée des plasmides dans les bactéries. La fermeture des pores se fait par une incubation de cinq minutes sur glace, puis les bactéries sont régénérées par ajout de 200 µl de milieu LB 2X. Une sélection sur milieu solide est ensuite réalisée. Pour cela, entre 100 et 200 µl du mélange sont étalés sur boîte de Pétri contenant du milieu LB agar avec l'antibiotique adéquat. La boîte de Pétri est mise à 37 °C pendant une nuit.

V.2.5. Culture et production de protéines dans *Escherichia coli*.

Les conditions d'expression sont identiques quelque soit la protéine considérée. La production des protéines est réalisée dans des bactéries *Escherichia coli* souche BL21 (DE3) (*Novagen*) préalablement transformées avec le plasmide adéquat :

- pET28b-zVDR-LBD Arg196Gly codant pour le domaine LBD du VDR de poisson-zèbre (à partir de la leucine 156 à la sérine 453), muté en position 196 afin d'éviter une protéolyse du LBD après le résidu Arg196.
- pET28b-zVDR-LBD Arg196Gly/Leu337His codant pour le domaine LBD du VDR de poisson-zèbre (à partir de la leucine 156 à la sérine 453), muté en position 196 afin d'éviter une protéolyse du LBD après le résidu Arg196 et portant la mutation étudiée Leu337His.

- Pré-culture.

Une culture de 200 ml de milieu LB 1X supplémenté en antibiotique (ampicilline ou kanamycine selon le plasmide présent dans la bactérie) estensemencée avec une colonie issue de la sélection sur milieu solide après transformation. La pré-culture est mise à incuber sur une nuit à 37 °C.

- Culture.

Le lendemain, 20 ml de cette pré-culture sont utilisés pour inoculer un litre de milieu LB 1X/antibiotique puis la culture est mise à 37 °C pendant environ deux heures. La densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) est régulièrement mesurée et lorsqu'elle atteint la valeur de 0,5, la température de l'incubateur est abaissée à 25 °C. Quand la DO_{600nm} atteint la valeur de 0.6, l'induction à l'IPTG est réalisée. Après une incubation de trois heures à 25 °C, la culture est récoltée. Les culots bactériens sont stockés à -20 °C.

V.3. Techniques de purifications de protéines.

Tout au long du processus de purification, l'échantillon protéique est conservé dans la glace.

V.3.1. Extraction de l'extrait soluble.

- Lyse des bactéries.

Les culots bactériens sont repris dans le volume adéquat de tampon de lyse (25 ml par litre de culture).

Composition de tampon de lyse :

| <i>composition</i> | <i>concentration</i> |
|--------------------|----------------------|
| TRIS-base pH 8,0 | 20 mM |
| NaCl | 500 mM |
| glycérol | 5 % v/v |
| CHAPS | 2 mM |

Des comprimés du cocktail d'inhibiteurs Complete, EDTA-free (*Roche*) sont ajoutés au lysat à raison d'un comprimé pour 50 ml. Après broyage des culots bactériens à l'aide de l'appareil IKA[®] T-25 ultra-turrax, la lyse se fait par sonification. On utilise un sonificateur Labsonic[®] P (*Sartorius*) avec une sonde de 14 mm de diamètre. La sonification s'effectue avec 30 %

d'intensité et des impulsions de 0,5 secondes pour 0,5 secondes de repos pour une durée totale de deux minutes. Après deux minutes de pause, cette étape est répétée.

- Ultracentrifugation.

Les débris bactériens sont culotés par ultracentrifugation deux heures à 45 000 g à 4 °C. Le surnageant contenant l'extrait soluble est récupéré, filtré sur une membrane de porosité 40 µm et immédiatement utilisé.

V.3.2.Chromatographies sur colonnes.

Toutes les étapes de chromatographie sont réalisées sur un système FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) soit BioLogic Workstation (*BioRad*), soit ÄKTA Purifier (*GE Healthcare*).

- Première étape : chromatographie d'affinité sur résine de chélation de cations métalliques.

Principe.

Cette technique de chromatographie dite IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) est basée sur l'emploi de cations métalliques divalents (Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}) chélatés par des groupements de type imido-acétate greffés sur une matrice de type sépharose. Cette méthode est utilisée pour séparer des protéines portant des étiquettes poly-histidines. Les cations immobilisés interagissent avec l'étiquette poly-histidines de la protéine d'intérêt et la retiennent sur la matrice tandis que les autres protéines passent à travers la colonne sans être retenues. L'élution se fait par compétition avec une solution d'imidazole (136).

La résine Talon[®] (*Clontech*) est conditionnée avec des ions Co^{2+} préalablement fixés sur la matrice. L'avantage de cette résine consiste en la nature du cation fixé et dans le type de groupement chélatant. Le cobalt interagit moins fortement avec les protéines à étiquettes poly-histidines, la fixation est moins forte mais plus spécifique. Cette résine confère d'avantage de spécificité et permet d'éliminer des contaminants. De plus, l'élution se fait à moindres concentrations en imidazole, ce qui évite une potentielle agrégation et précipitation de la protéine d'intérêt. Enfin, le type de groupement chélatant de cette résine réduit le risque de co-élution du cation métallique avec la protéine.

Mode opératoire.

Cette résine ne nécessite pas d'être régénérée. Étant conditionnée dans l'éthanol, elle est simplement lavée dans l'eau ultra-pure. On utilise une colonne de volume effectif 2,5 à 5 ml (diamètre = 16 mm x hauteur = 50 mm). La colonne est d'abord équilibrée avec 5 volumes colonne de tampon de lyse décrit précédemment (tampon A). Le tampon d'élution (tampon B) a la même composition que le tampon A mais contient en plus 250 mM d'imidazole. Le débit de charge et d'élution est de 5 ml.min⁻¹. Après la charge de l'extrait soluble, on procède comme suit :

- lavage de la colonne avec 15 volumes de tampon A
- élution aspécifique avec un mélange 94 % A / 6 % B sur 15 volumes colonne
- élution sélective de la protéine de fusion poly-histidines avec un mélange 60 % A / 40 % B, soit 100 mM d'imidazole, sur 5 volumes colonne
- nettoyage de la colonne avec 100 % de tampon B puis avec de l'eau ultra-pure. La résine peut être utilisée trois fois.

Les fractions correspondant au pic du chromatogramme sont rassemblées. Afin de protéger la protéine de l'oxydation, 1 mM de l'agent réducteur TCEP est ajouté.

- Protéolyse ménagée de l'étiquette poly-histidines par la thrombine.

L'étiquette poly-histidines portée en N-terminal des protéines produites à partir du vecteur pET28b est éliminée par la thrombine bovine plasmatique (*Sigma Biochemicals*). Cette protéase à serine requiert la présence de cations divalents calcium, 2 mM d'une solution de CaCl₂ sont donc ajoutés. La présence d'imidazole à une concentration supérieure à 50 mM inhibe l'action de la thrombine. Le mélange protéique est donc concentré sur une unité Amicon®Ultra 30 kDa (*Millipore*) puis dilué dans le tampon C de manière à réduire la concentration en imidazole. Une unité de thrombine par mg de protéine est ajoutée à l'échantillon. La protéolyse se fait à 4 °C sous agitation pendant 12 heures. Les étapes ultérieures de purification permettent d'éliminer la thrombine et les peptides poly-histidines.

Composition du tampon C :

| <i>composition</i> | <i>concentration</i> |
|--------------------|----------------------|
| TRIS-base pH 7,5 | 20 mM |
| NaCl | 200 mM |
| DTT | 5 mM |

- Chromatographie d'exclusion de taille.

Cette technique permet de séparer les protéines selon leur taille et leur forme. Plusieurs types de résine Superdex HT (*Amersham Pharmacia*) ont été utilisés et leurs caractéristiques d'utilisation figurent dans le tableau suivant :

| <i>colonne</i> | <i>diamètre</i> | <i>hauteur</i> | <i>volume total</i> | <i>volume exclu</i> | <i>débit</i> |
|-----------------------|-----------------|----------------|---------------------|---------------------|--------------------------|
| Superdex 75 HR 16/60 | 16 mm | 600 mm | 120 ml | 40 ml | 1 ml.min ⁻¹ |
| Superdex 200 HR 16/60 | 16 mm | 600 mm | 120 ml | 40 ml | 1 ml.min ⁻¹ |
| Superdex 75 HR 10/30 | 10 mm | 300 mm | 24 ml | 8 ml | 0,5 ml.min ⁻¹ |
| Superdex 200 HR 10/30 | 10 mm | 300 mm | 24 ml | 8 ml | 0,5 ml.min ⁻¹ |

Pour les colonnes 16/60 et 10/30, les volumes des fractions collectées sont de 2 ml et 0,5 ml respectivement.

V.4. Caractérisation des protéines purifiées.

V.4.1. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, SDS-PAGE.

- Tampons et solutions.

Composition du gel de séparation à 10 %, 12,5 % et 15 % (pour 3 gels) :

| <i>composition</i> | <i>volume pour gel 10 %</i> | <i>volume pour gel 12,5 %</i> | <i>volume pour gel 15 %</i> |
|---|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| H ₂ O distillée | 6,1 ml | 5,4 ml | 4,1 ml |
| TRIS-HCl 1,5 mM pH 8,8 SDS 0,4 % m/v | 3,15 ml | 3,15 ml | 3,15 ml |
| acrylamide-bisacrylamide 29/1 à 40 % | 3,1 ml | 3,9 ml | 4,7 ml |
| persulfate d'ammonium 10 % | 125 µl | 125 µl | 125 µl |
| TEMED | 12 µl | 12 µl | 12 µl |

Pré-gel de résolution à 5 % (pour 3 gels) :

| <i>composition</i> | <i>volume</i> |
|---|---------------|
| H ₂ O distillée | 3,8 ml |
| TRIS-HCl 0,5 mM pH 6,8 SDS 0,4 % m/v | 1,6 ml |
| acrylamide-bisacrylamide 29/1 à 40 % | 0,8 ml |
| persulfate d'ammonium 10 % | 125 µl |
| TEMED | 12 µl |

Tampon de dénaturation des protéines :

| <i>composition</i> | <i>concentration</i> |
|---------------------|----------------------|
| TRIS-HCl pH 6,8 | 100 mM |
| SDS | 4 % v/v |
| glycérol | 25 % v/v |
| bleu de bromophénol | 0,2 % m/v |

La dénaturation des échantillons se fait en ajoutant 2 µl de tampon de dénaturation supplémenté avec 10 % v/v de β-mercaptoéthanol. La dénaturation des protéines est complétée par chauffage 5 minutes à 100 °C. La migration s'effectue à une intensité constante de 80 mA.

Tampon de migration concentré 5X :

| <i>composition</i> | <i>quantité pour un litre</i> |
|----------------------------|-------------------------------|
| TRIS-base | 15 g |
| glycine | 72 g |
| SDS | 0,5 % v/v |
| H ₂ O distillée | qsp 1 litre |

Le gel est démoulé de son support puis coloré par immersion dans une solution de coloration au bleu de Coomassie pendant 20 minutes, à température ambiante et sous agitation. Le colorant bleu de Coomassie G250 s'adsorbe sur les protéines (acides aminés aromatiques) en milieu acide, ce qui permet de visualiser les protéines sur le gel.

- Révélation au bleu de Coomassie.

Solution de fixation et coloration au bleu de Coomassie :

| <i>composition</i> | <i>quantité pour 200 ml</i> |
|----------------------------|-----------------------------|
| éthanol | 60 ml |
| acide acétique | 40 ml |
| bleu de Coomassie G250 | 2 g |
| H ₂ O distillée | qsp 200 ml |

Après fixation et coloration des protéines, le gel est décoloré par immersion dans une solution de décoloration pendant 20 minutes, à température ambiante et sous agitation.

Solution de décoloration :

| <i>composition</i> | <i>quantité pour 2 litres</i> |
|----------------------------|-------------------------------|
| éthanol | 600 ml |
| acide acétique | 400 ml |
| H ₂ O distillée | qsp 2 litres |

- Révélation au nitrate d'argent.

Cette méthode de révélation est mille fois plus sensible que celle au bleu de Coomassie.

Les groupes sulfhydryle et carboxylique des chaînes latérales des protéines peuvent réduire l'ion argent. L'ion argent réduit est sensible à la lumière (principe du film photographique). La réaction est stoppée en milieu acide. Cette technique est réalisée avec le kit PageSilver™ de *Fermentas*.

V.4.2. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives gradient 8-25 %.

Le système PhastSystem™ de *GE Healthcare* est utilisé.

V.4.3. Dosage des protéines en solution.

La concentration en protéines des échantillons est estimée par la méthode de Bradford en dosage spectro-photométrique à une longueur d'onde de 595 nm. La protéine utilisée pour l'étalonnage est l'albumine bovine.

V.4.4. Caractérisation par spectrométrie de masse.

La caractérisation de l'échantillon peut se faire par MALDI (désorption laser assistée par matrice) ou par ESI (électro-nébulisation). Dans le cas où la protéine est connue, l'usage de la spectrométrie de masse permet de vérifier la masse moléculaire par rapport à ce qui était attendu à la suite du séquençage. Ces méthodes permettent également de détecter des modifications post-traductionnelles d'acides aminés : N-acylations, O-phosphorylations, sulfatations, O- et N-glycosylations se traduisent par un accroissement mesurable et connu du poids moléculaire. On peut aussi vérifier la formation de ponts disulfure : chaque pont S-S formé se traduit par la perte de deux unités de masse par rapport à la valeur attendue. Ces méthodes permettent aussi d'identifier une perte d'un ou plusieurs acides aminés : cette modification post-traductionnelle fréquente (protéolyse) abaisse le poids moléculaire du composé. La spectrométrie de masse est une technique fiable et robuste pour l'étude de complexes non-covalents (137), (138).

VII- COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.

Article paru en janvier 2010 dans Journal of Medicinal Chemistry :

”Structure–Function Relationships and Crystal Structures of the Vitamin D Receptor Bound 2 α -Methyl-(20S,23S)- and 2 α -Methyl-(20S,23R)-epoxymethano-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃”. Pierre Antony, Rita Sigeiro, Tiphaine Huet, Yoshiteru Sato, Nick Ramalanjaona, Luis Cezar Rodrigues, Antonio Mouriño, Dino Moras and Natacha Rochel.

Articles en préparation :

“Structure-based design of a mutant mouse model”. Tiphaine Huet, Natacha Rochel and Dino Moras.

“Structure-function relationships of two highly potent VDR superagonists that do not induce hypercalcemic effects: BXL-72 and BXL-97”. Tiphaine Huet, Nanjoo Suh, Luciano Adorini, Milan Uskokovic, Hubert Maehr, Dino Moras and Natacha Rochel.

Affiches :

”Structure-Function study of a couple of high superagonist calcitriol derivatives with two different side chains at C20”. Tiphaine Huet, Natacha Rochel et Dino Moras. GTBIO 2009, Institut Pasteur Paris, France. Décembre 2009.

“Structural and function study of a vitamin D receptor mutant that responds selectively to Gemini ligands”. Tiphaine Huet, Natacha Rochel et Dino Moras. 3rd International symposium on diffraction structural biology, Orsay, France. Mai 2010.

Présentations orales :

“Structural investigations of the ligand binding domain of the vitamin D nuclear receptor.” Conférence IGBMC-IBMC. Mont Ste Odile, France. Février 2009.

“Structural and function study of a vitamin D receptor mutant that responds selectively to Gemini ligands”. Tiphaine Huet, Natacha Rochel et Dino Moras. Journées Campus d’Illkirch, Illkirch, France. Mai 2010.

VIII- BIBLIOGRAPHIE.

- 1 Gronemeyer, H. & Laudet, V. (1995). *Protein Profile* 2, 1173-1308.
- 2 Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. et al. (1995). *Cell* 83, 835-839.
- 3 Evans, R.M. (1988). *Science* 240, 889-895.
- 4 Ribeiro, R.C., Kushner, P.J. & Baxter, J.D. (1995). *Annu Rev Med* 46, 443-453.
- 5 Jurutka, P.W., Whitfield, G.K., Hsieh, J.C., Thompson, P.D., Haussler, C.A. & Haussler, M.R. (2001). *Rev Endocr Metab Disord* 2, 203-216.
- 6 Gronemeyer, H., Gustafsson, J. & Laudet, V. (2004). *Nat Rev Drug Discov* 3, 950-964.
- 7 Haussler, M.R., Whitfield, G.K., Haussler, C.A., Hsieh, J.C., Thompson, P.D., Selznick, S.H., Dominguez, C.E. & Jurutka, P.W. (1998). *J Bone Miner Res* 13, 325-349.
- 8 Hsieh, J.C., Shimizu, Y., Minoshima, S., Shimizu, N., Haussler, C.A., Jurutka, P.W. & Haussler, M.R. (1998). *J Cell Biochem* 70, 94-109.
- 9 Rochel, N., Wurtz, J.M., Mitschler, A., Klaholz, B. & Moras, D. (2000). *Mol Cell* 5, 173-179.
- 10 Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. & Moras, D. (1995). *Nature* 375, 377-382.
- 11 Renaud, J.P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H. & Moras, D. (1995). *Nature* 378, 681-689.
- 12 Feng, W., Ribeiro, R.C., Wagner, R.L., Nguyen, H., Apriletti, J.W., Fletterick, R.J., Baxter, J.D., Kushner, P.J. & West, B.L. (1998). *Science* 280, 1747-1749.
- 13 Michigami, T., Suga, A., Yamazaki, M., Shimizu, C., Cai, G., Okada, S. & Ozono, K. (1999). *J Biol Chem* 274, 33531-33538.
- 14 Yasmin, R., Williams, R.M., Xu, M. & Noy, N. (2005). *J Biol Chem* 280, 40152-40160.
- 15 Kurokawa, R., DiRenzo, J., Boehm, M., Sugarman, J., Gloss, B., Rosenfeld, M.G., Heyman, R.A. & Glass, C.K. (1994). *Nature* 371, 528-531.
- 16 Gronemeyer, H. & Moras, D. (1995). *Nature* 375, 190-191.
- 17 Schröder, M., Kahlen, J.P. & Carlberg, C. (1997). *Biochem Biophys Res Commun* 230, 646-651.

- 18 Meyer, M.B., Watanuki, M., Kim, S., Shevde, N.K. & Pike, J.W. (2006). *Mol Endocrinol* 20, 1447-1461.
- 19 Shaffer, P.L. & Gewirth, D.T. (2004). *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90, 215-219.
- 20 Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G. (2000). *Genes Dev* 14, 121-141.
- 21 Chen, J.D. & Evans, R.M. (1995). *Nature* 377, 454-457.
- 22 Hörlein, A.J., Näär, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Söderström, M., Glass, C.K. et al. (1995). *Nature* 377, 397-404.
- 23 Polly, P., Herdick, M., Moehren, U., Baniahmad, A., Heinzl, T. & Carlberg, C. (2000). *FASEB J* 14, 1455-1463.
- 24 Urnov, F.D., Wolffe, A.P. & Guschin, D. (2001). *Curr Top Microbiol Immunol* 254, 1-33.
- 25 Nagy, L., Kao, H.Y., Love, J.D., Li, C., Banayo, E., Gooch, J.T., Krishna, V., Chatterjee, K., Evans, R.M. & Schwabe, J.W. (1999). *Genes Dev* 13, 3209-3216.
- 26 Tagami, T., Lutz, W.H., Kumar, R. & Jameson, J.L. (1998). *Biochem Biophys Res Commun* 253, 358-363.
- 27 Smith, C.L. & O'Malley, B.W. (2004). *Endocr Rev* 25, 45-71.
- 28 Kim, S., Shevde, N.K. & Pike, J.W. (2005). *J Bone Miner Res* 20, 305-317.
- 29 Chakravarti, D., LaMorte, V.J., Nelson, M.C., Nakajima, T., Schulman, I.G., Juguilon, H., Montminy, M. & Evans, R.M. (1996). *Nature* 383, 99-103.
- 30 Rachez, C. & Freedman, L.P. (2000). *Gene* 246, 9-21.
- 31 Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. et al. (1997). *Nature* 389, 194-198.
- 32 Collingwood, T.N., Urnov, F.D. & Wolffe, A.P. (1999). *J Mol Endocrinol* 23, 255-275.
- 33 Sharma, D. & Fondell, J.D. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7934-7939.
- 34 Rosenfeld, M.G., Lunyak, V.V. & Glass, C.K. (2006). *Genes Dev* 20, 1405-1428.
- 35 Barletta, F., Freedman, L.P. & Christakos, S. (2002). *Mol Endocrinol* 16, 301-314.
- 36 Jurutka, P.W., Hsieh, J.C., Nakajima, S., Haussler, C.A., Whitfield, G.K. & Haussler, M.R. (1996). *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3519-3524.
- 37 Arriagada, G., Paredes, R., Olate, J., van Wijnen, A., Lian, J.B., Stein, G.S., Stein, J.L., Onate, S. & Montecino, M. (2007). *J Steroid Biochem Mol Biol* 103, 425-429.
- 38 Hsieh, J.C., Jurutka, P.W., Galligan, M.A., Terpening, C.M., Haussler, C.A., Samuels, D.S., Shimizu, Y., Shimizu, N. & Haussler, M.R. (1991). *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9315-9319.

- 39 Hsieh, J.C., Jurutka, P.W., Nakajima, S., Galligan, M.A., Haussler, C.A., Shimizu, Y., Shimizu, N., Whitfield, G.K. & Haussler, M.R. (1993). *J Biol Chem* 268, 15118-15126.
- 40 Demay, M.B., Kiernan, M.S., DeLuca, H.F. & Kronenberg, H.M. (1992). *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8097-8101.
- 41 Murayama, A., Kim, M., Yanagisawa, J., Takeyama, K. & Kato, S. (2004). *EMBO J* 23, 1598-1608.
- 42 Kim, M., Fujiki, R., Murayama, A., Kitagawa, H., Yamaoka, K., Yamamoto, Y., Mihara, M., Takeyama, K. & Kato, S. (2007). *Mol Endocrinol* 21, 334-342.
- 43 Kato, S., Fujiki, R., Kim, M. & Kitagawa, H. (2007). *J Steroid Biochem Mol Biol* 103, 372-380.
- 44 Fujiki, R., Kim, M., Sasaki, Y., Yoshimura, K., Kitagawa, H. & Kato, S. (2005). *EMBO J* 24, 3881-3894.
- 45 Deeb, K.K., Trump, D.L. & Johnson, C.S. (2007). *Nat Rev Cancer* 7, 684-700.
- 46 Wehling, M. (1997). *Annu Rev Physiol* 59, 365-393.
- 47 Falkenstein, E., Tillmann, H.C., Christ, M., Feuring, M. & Wehling, M. (2000). *Pharmacol Rev* 52, 513-556.
- 48 Hammes, S.R. & Levin, E.R. (2007). *Endocr Rev* 28, 726-741.
- 49 Fleet, J.C. (2004). *J Nutr* 134, 3215-3218.
- 50 Walters, M.R. & Nemere, I. (2004). *Cell Mol Life Sci* 61, 2309-2321.
- 51 Norman, A.W., Mizwicki, M.T. & Norman, D.P.G. (2004). *Nat Rev Drug Discov* 3, 27-41.
- 52 Cancela, L., Nemere, I. & Norman, A.W. (1988). *J Steroid Biochem* 30, 33-39.
- 53 Civitelli, R., Kim, Y.S., Gunsten, S.L., Fujimori, A., Huskey, M., Avioli, L.V. & Hruska, K.A. (1990). *Endocrinology* 127, 2253-2262.
- 54 Zanello, L.P. & Norman, A.W. (1997). *J Biol Chem* 272, 22617-22622.
- 55 Caffrey, J.M. & Farach-Carson, M.C. (1989). *J Biol Chem* 264, 20265-20274.
- 56 Zanello, L.P. & Norman, A. (2006). *Steroids* 71, 291-297.
- 57 Schwartz, Z., Sylvia, V.L., Larsson, D., Nemere, I., Casasola, D., Dean, D.D. & Boyan, B.D. (2002). *J Biol Chem* 277, 11828-11837.
- 58 Boyan, B.D., Sylvia, V.L., Curry, D., Chang, Z., Dean, D.D. & Schwartz, Z. (1998). *J Cell Physiol* 176, 516-524.
- 59 Rebsamen, M.C., Sun, J., Norman, A.W. & Liao, J.K. (2002). *Circ Res* 91, 17-24.

- 60 Kajikawa, M., Ishida, H., Fujimoto, S., Mukai, E., Nishimura, M., Fujita, J., Tsuru, Y., Okamoto, Y., Norman, A.W. & Seino, Y. (1999). *Endocrinology* 140, 4706-4712.
- 61 Zeitz, U., Weber, K., Soegiarto, D.W., Wolf, E., Balling, R. & Erben, R.G. (2003). *FASEB J* 17, 509-511.
- 62 Bhatia, M., Kirkland, J.B. & Meckling-Gill, K.A. (1995). *J Biol Chem* 270, 15962-15965.
- 63 Song, X., Bishop, J.E., Okamura, W.H. & Norman, A.W. (1998). *Endocrinology* 139, 457-465.
- 64 Norman, A.W., Okamura, W.H., Hammond, M.W., Bishop, J.E., Dormanen, M.C., Bouillon, R., van Baelen, H., Ridall, A.L., Daane, E., Khoury, R. et al. (1997). *Mol Endocrinol* 11, 1518-1531.
- 65 Norman, A.W., Henry, H.L., Bishop, J.E., Song, X.D., Bula, C. & Okamura, W.H. (2001). *Steroids* 66, 147-158.
- 66 Wagner, R.L., Apriletti, J.W., McGrath, M.E., West, B.L., Baxter, J.D. & Fletterick, R.J. (1995). *Nature* 378, 690-697.
- 67 Norman, A.W., Bouillon, R., Farach-Carson, M.C., Bishop, J.E., Zhou, L.X., Nemere, I., Zhao, J., Muralidharan, K.R. & Okamura, W.H. (1993). *J Biol Chem* 268, 20022-20030.
- 68 Nemere, I., Yoshimoto, Y. & Norman, A.W. (1984). *Endocrinology* 115, 1476-1483.
- 69 Nemere, I., Dormanen, M.C., Hammond, M.W., Okamura, W.H. & Norman, A.W. (1994). *J Biol Chem* 269, 23750-23756.
- 70 Lieberherr, M., Grosse, B., Duchambon, P. & DrÄ¼eke, T. (1989). *J Biol Chem* 264, 20403-20406.
- 71 Baran, D.T., Ray, R., Sorensen, A.M., Honeyman, T. & Holick, M.F. (1994). *J Cell Biochem* 56, 510-517.
- 72 Pedrozo, H.A., Schwartz, Z., Mokeyev, T., Ornoy, A., Xin-Sheng, W., Bonewald, L.F., Dean, D.D. & Boyan, B.D. (1999). *J Cell Biochem* 72, 151-165.
- 73 Rohe, B., Safford, S.E., Nemere, I. & Farach-Carson, M.C. (2005). *Steroids* 70, 458-463.
- 74 Wu, W., Beilhartz, G., Roy, Y., Richard, C.L., Curtin, M., Brown, L., Cadieux, D., Coppolino, M., Farach-Carson, M.C., Nemere, I. et al. (2010). *Exp Cell Res* , .
- 75 Nemere, I., Farach-Carson, M.C., Rohe, B., Sterling, T.M., Norman, A.W., Boyan, B.D. & Safford, S.E. (2004). *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7392-7397.
- 76 Hirano, N., Shibasaki, F., Kato, H., Sakai, R., Tanaka, T., Nishida, J., Yazaki, Y., Takenawa, T. & Hirai, H. (1994). *Biochem Biophys Res Commun* 204, 375-382.

- 77 Primm, T.P. & Gilbert, H.F. (2001). *J Biol Chem* 276, 281-286.
- 78 Maattanen, P., Kozlov, G., Gehring, K. & Thomas, D.Y. (2006). *Biochem Cell Biol* 84, 881-889.
- 79 Khanal, R.C. & Nemere, I. (2007). *Curr Med Chem* 14, 1087-1093.
- 80 Mobbs, C.V., Kaplitt, M., Kow, L.M. & Pfaff, D.W. (1991). *Mol Cell Endocrinol* 80, C187-91.
- 81 Rohe, B., Safford, S.E., Nemere, I. & Farach-Carson, M.C. (2007). *Steroids* 72, 144-150.
- 82 Nemere, I., Safford, S.E., Rohe, B., DeSouza, M.M. & Farach-Carson, M.C. (2004). *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90, 281-285.
- 83 Gruber, C.W., Cemazar, M., Heras, B., Martin, J.L. & Craik, D.J. (2006). *Trends Biochem Sci* 31, 455-464.
- 84 Larsson, B. & Nemere, I. (2003). *J Cell Biochem* 90, 901-913.
- 85 Larsson, B. & Nemere, I. (2003). *Endocrinology* 144, 1726-1735.
- 86 de Boland, A.R. & Norman, A. (1990). *Endocrinology* 127, 39-45.
- 87 Nemere, I. (2005). *Steroids* 70, 455-457.
- 88 Farach-Carson, M.C. & Davis, P.J. (2003). *J Pharmacol Exp Ther* 307, 839-845.
- 89 Yoshizawa, T., Handa, Y., Uematsu, Y., Takeda, S., Sekine, K., Yoshihara, Y., Kawakami, T., Arioka, K., Sato, H., Uchiyama, Y. et al. (1997). *Nat Genet* 16, 391-396.
- 90 Li, Y.C., Pirro, A.E., Amling, M., Delling, G., Baron, R., Bronson, R. & Demay, M.B. (1997). *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9831-9835.
- 91 Van Cromphaut, S.J., Dewerchin, M., Hoenderop, J.G., Stockmans, I., Van Herck, E., Kato, S., Bindels, R.J., Collen, D., Carmeliet, P., Bouillon, R. et al. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13324-13329.
- 92 Lallemand, Y., Luria, V., Haffner-Krausz, R. & Lonai, P. (1998). *Transgenic Res* 7, 105-112.
- 93 Erben, R.G., Soegiarto, D.W., Weber, K., Zeitz, U., Lieberherr, M., Gniadecki, R., Möller, G., Adamski, J. & Balling, R. (2002). *Mol Endocrinol* 16, 1524-1537.
- 94 Malloy, P.J., Pike, J.W. & Feldman, D. (1999). *Endocr Rev* 20, 156-188.
- 95 Sakai, Y. & Demay, M.B. (2000). *Endocrinology* 141, 2043-2049.
- 96 Bikle, D.D., Chang, S., Crumrine, D., Elalieh, H., Man, M., Choi, E.H., Dardenne, O., Xie, Z., Arnaud, R.S., Feingold, K. et al. (2004). *J Invest Dermatol* 122, 984-992.

- 97 Skorija, K., Cox, M., Sisk, J.M., Dowd, D.R., MacDonald, P.N., Thompson, C.C. & Demay, M.B. (2005). *Mol Endocrinol* 19, 855-862.
- 98 Ellison, T.I., Eckert, R.L. & MacDonald, P.N. (2007). *J Biol Chem* 282, 10953-10962.
- 99 Panda, D.K., Miao, D., Tremblay, M.L., Sirois, J., Farookhi, R., Hendy, G.N. & Goltzman, D. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7498-7503.
- 100 Dostal, L.A. & Toverud, S.U. (1984). *Am J Physiol* 246, G528-34.
- 101 Halloran, B.P. & DeLuca, H.F. (1980). *Am J Physiol* 239, G473-9.
- 102 Halloran, B.P. & DeLuca, H.F. (1981). *J Biol Chem* 256, 7338-7342.
- 103 Meir, T., Levi, R., Lieben, L., Libutti, S., Carmeliet, G., Bouillon, R., Silver, J. & Naveh-Manly, T. (2009). *Am J Physiol Renal Physiol* 297, F1192-8.
- 104 Amling, M., Priemel, M., Holzmann, T., Chapin, K., Rueger, J.M., Baron, R. & Demay, M.B. (1999). *Endocrinology* 140, 4982-4987.
- 105 Shiizaki, K., Hatamura, I., Imazeki, I., Moriguchi, Y., Sakaguchi, T., Saji, F., Nakazawa, E., Kato, S., Akizawa, T. & Kusano, E. (2009). *Bone* 45, 964-971.
- 106 Yamamoto, M., Kawanobe, Y., Takahashi, H., Shimazawa, E., Kimura, S. & Ogata, E. (1984). *J Clin Invest* 74, 507-513.
- 107 Zinser, G.M., McEleney, K. & Welsh, J. (2003). *Mol Cell Endocrinol* 200, 67-80.
- 108 Bula, C.M., Huhtakangas, J., Olivera, C., Bishop, J.E., Norman, A.W. & Henry, H.L. (2005). *Endocrinology* 146, 5581-5586.
- 109 Revelli, A., Massobrio, M. & Tesarik, J. (1998). *Trends Endocrinol Metab* 9, 419-427.
- 110 Ciesielski, F., Rochel, N. & Moras, D. (2007). *J Steroid Biochem Mol Biol* 103, 235-242.
- 111 Otwinowski, Z Minor, W (1997). *methods in enzymology* 276, 307-326.
- 112 Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J. (1997). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53, 240-255.
- 113 Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132.
- 114 Painter, J. & Merritt, E.A. (2006). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62, 439-450.
- 115 Afonine, P.V., Grosse-Kunstleve, R.W. & Adams, P.D. (2005). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 61, 850-855.
- 116 Kleywegt, G.J. & Jones, T.A. (1994). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50, 178-185.
- 117 Rochel, N., Tocchini-Valentini, G., Egea, P.F., Juntunen, K., Garnier, J.M., Vihko, P. & Moras, D. (2001). *Eur J Biochem* 268, 971-979.

- 118 Tocchini-Valentini, G.D., Rochel, N., Escriva, H., Germain, P., Peluso-Iltis, C., Paris, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselaer, A., Moras, D. & Laudet, V. (2009). *J Biol Chem* 284, 1938-1948.
- 119 Bich, C., Bovet, C., Rochel, N., Peluso-Iltis, C., Panagiotidis, A., Nazabal, A., Moras, D. & Zenobi, R. (2010). *J Am Soc Mass Spectrom* 21, 635-645.
- 120 Potier, N., Billas, I.M.L., Steinmetz, A., Schaeffer, C., van Dorsselaer, A., Moras, D. & Renaud, J. (2003). *Protein Sci* 12, 725-733.
- 121 Ciesielski, F., Rochel, N., Mitschler, A., Kouzmenko, A. & Moras, D. (2004). *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90, 55-59.
- 122 Choi, M., Yamamoto, K., Itoh, T., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J., Moras, D., DeLuca, H.F. & Yamada, S. (2003). *Chem Biol* 10, 261-270.
- 123 Lee, H.J., Paul, S., Atalla, N., Thomas, P.E., Lin, X., Yang, I., Buckley, B., Lu, G., Zheng, X., Lou, Y. et al. (2008). *Cancer Prev Res (Phila Pa)* 1, 476-484.
- 124 Maehr, H., Lee, H.J., Perry, B., Suh, N. & Uskokovic, M.R. (2009). *J Med Chem* 52, 5505-5519.
- 125 Norman, A.W., Manchand, P.S., Uskokovic, M.R., Okamura, W.H., Takeuchi, J.A., Bishop, J.E., Hisatake, J.I., Koeffler, H.P. & Peleg, S. (2000). *J Med Chem* 43, 2719-2730.
- 126 Uskokovic, M.R., Norman, A.W., Manchand, P.S., Studzinski, G.P., Campbell, M.J., Koeffler, H.P., Takeuchi, A., Siu-Caldera, M.L., Rao, D.S. & Reddy, G.S. (2001). *Steroids* 66, 463-471.
- 127 Inaba, M., Okuno, S., Nishizawa, Y., Imanishi, Y., Katsumata, T., Sugata, I. & Morii, H. (1993). *Biochem Pharmacol* 45, 2331-2336.
- 128 Halloran, B.P., Bikle, D.D., Castro, M.E. & Gee, E. (1989). *Biochemistry* 28, 1278-1281.
- 129 Slatopolsky, E., Finch, J., Ritter, C., Denda, M., Morrissey, J., Brown, A. & DeLuca, H. (1995). *Am J Kidney Dis* 26, 852-860.
- 130 Finch, J.L., Brown, A.J. & Slatopolsky, E. (1999). *J Am Soc Nephrol* 10, 980-985.
- 131 Choi, M. & Makishima, M. (2009). *Expert Opin Ther Pat* 19, 593-606.
- 132 Daniel, C., Radeke, H.H., Sartory, N.A., Zahn, N., Zuegel, U., Steinmeyer, A. & Stein, J. (2006). *J Pharmacol Exp Ther* 319, 622-631.
- 133 Wendler, A., Baldi, E., Harvey, B., Nadal, A., Norman, A. & Wehling, M. (2010). *Eur J Endocrinol* , .

- 134 Inoue, K., Akita, N., Yamashita, S., Shiba, T. & Fujita, T. (1990). *Biochem Biophys Res Commun* 173, 1311-1316.
- 135 Dagert, M. & Ehrlich, S.D. (1979). *Gene* 6, 23-28.
- 136 Porath, J. (1992). *Protein Expr Purif* 3, 263-281.
- 137 Ganem, B. (1993). *Am Biotechnol Lab* 11, 32-34.
- 138 Sanglier, S., Bourguet, W., Germain, P., Chavant, V., Moras, D., Gronemeyer, H., Potier, N. & Van Dorsselaer, A. (2004). *Eur J Biochem* 271, 4958-4967.

Résumé :

L'expression de l'information génétique est régulée par des facteurs de transcription. Parmi ces facteurs, le récepteur de la vitamine D (VDR) appartient à la famille des récepteurs nucléaires, activables par la fixation d'un ligand. La forme active de la vitamine D, le Calcitriol, est le ligand naturel du VDR et est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques telles que l'homéostasie du calcium et du phosphate, l'inflammation, la différenciation et la prolifération cellulaires et l'apoptose. Cependant, ses actions intrinsèques génomiques s'accompagnent d'effets hypercalcémiques non-génomiques qui limitent ses applications thérapeutiques. Dans l'objectif de dissocier les actions anti-tumorales du Calcitriol de ses effets hypercalcémiques pour des applications thérapeutiques, le challenge consiste à différencier précisément les acteurs de la voie non-génomique de ceux de la voie génomique. Précédemment, le résidu Leu337 du VDR de poisson-zèbre a été identifié comme jouant un rôle majeur dans l'adaptabilité du domaine de fixation du ligand. Une étude classique de mutagenèse a mis en évidence un résultat surprenant : le mutant VDR Leu337His abolit l'activité génomique du VDR en présence du Calcitriol mais présente une activité transcriptionnelle identique au récepteur sauvage en présence du ligand synthétique à double chaîne latérale Gemini. Mon travail de thèse a consisté à comprendre les bases structurales de cette sélectivité. Les résultats présentés montrent que tout comme les VDR sauvages humain et du poisson-zèbre, les VDR mutés de ces deux espèces se comportent de manière similaire en présence des ligands Calcitriol et Gemini en termes d'affinités de liaison et de transactivation. L'étude structurale a mis en évidence une interaction cruciale pour la stabilisation du ligand naturel. En revanche, la mutation Leu337His a un effet silencieux en présence du Gemini et de deux analogues du Gemini que nous avons étudiés. De plus, les résultats structuraux révèlent que les ligands à deux chaînes latérales sont moins sensibles aux modifications affectant le réseau de contacts entre les résidus de la poche et le ligand. Mes travaux de thèse ont permis d'établir les bases structurales et moléculaires pour la création d'un modèle animal *in vivo* original (souris génétiquement modifiée exprimant le VDR muté) qui permettra d'éteindre ou d'allumer le VDR nucléaire selon la présence de Calcitriol ou de Gemini, et ainsi de dissocier la voie génomique de la voie non-génomique induite par le Calcitriol. Ce travail de thèse s'inscrit dans une approche pluridisciplinaire, allant de l'atome à l'organisme et l'intégration de l'ensemble des données *in vivo* permettra une meilleure compréhension de la signalisation induite par l'hormone Calcitriol et le développement de nouveaux traitements hautement spécifiques.

Genetic expression is regulated by transcriptional factors. Among them, the Vitamin D receptor (VDR) belongs to the superfamily of nuclear receptors which adopt their active conformation upon ligand binding. The active form of Vitamin D, Calcitriol is the natural ligand of VDR and plays important roles in several biological functions such as calcium and phosphate homeostasis, inflammation, cell differentiation and proliferation and apoptosis. However, its intrinsic genomic actions are accompanied by hypercalcemic non-genomic effects which limit the use of Calcitriol in therapeutic treatments. To further dissociate the anti-tumor actions of Calcitriol from its hypercalcemic effects, the challenge is to decipher the mechanisms involved in the non-genomic pathway from those involved in the genomic one. Previously, we identified the Leu337 of zebrafish VDR as a key residue in the adaptability of the ligand binding domain. Then, a classical mutagenesis study stressed a surprising finding: the VDR Leu337His abolishes the genomic activity of VDR in presence of Calcitriol but not in presence of the synthetic double-chained Gemini ligand. The results of my thesis confirm that as for the wild-type human and zebrafish VDRs, both zebrafish VDR Leu337His and human VDR Leu309His behave similarly in presence of Calcitriol and Gemini in terms of ligand binding and transactivation. The structural study conducted in parallel emphasizes a crucial interaction for the stabilization of Calcitriol. In sharp contrast, the mutation Leu337His has a neutral incidence on the stabilization of Gemini and the two Gemini derivatives studied. Moreover, the structural findings reveal that double-chained ligands are less sensitive to structural modifications targeting the network of ligand/residues interactions. This study relates the structural and molecular basis for the design of an original *in vivo* animal model (knock-in-mice expressing the corresponding mutation Leu337His) which will allow us to switch on/off the nuclear VDR following the presence of Calcitriol or Gemini, and to gain insight into the non-genomic pathway induced by Calcitriol. My work enrolls a multi-disciplinary approach, from atomic structure to the organism and the integration of the *in vivo* data will provide us with a better understanding of the Calcitriol signalization and with the development of highly specific new treatments.