



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

IGBMC- CNRS UMR 7104 – Inserm U 1258

THÈSE

présentée par :

Syrine BEJI

soutenue le 16 décembre 2020, IGBMC, Illkirch, France

pour obtenir le grade de **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline : **Sciences du Vivant**

Spécialité : **Biophysique et Biologie Structurale**

Mécanismes moléculaires du rôle protumorigénique de PPARgamma et RXRalpha dans les cancers de vessie

THÈSE dirigée par :

Docteur Natacha Rochel

DR CNRS, IGBMC, Strasbourg

RAPPORTEURS :

Docteur Sébastien Fribourg

DR Inserm, IECB, Université de Bordeaux

Docteur Frédérique Favier

MCF FST, Université de Lorraine, Nancy

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Docteur Marc Ruff

DR CNRS, IGBMC, Strasbourg

« Je ne perds jamais, soit je gagne, soit j'apprends », Nelson Mandela

Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit de thèse n'aurait pas été possible sans l'aide, la contribution et le soutien de nombreuses personnes :

Tout d'abord, j'aimerais remercier les membres de mon jury de thèse, Dr Sébastien Fribourg, Dr Frédérique Favier et le Dr Marc Ruff, qui ont accepté d'évaluer mon travail. Je leur suis reconnaissante pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce manuscrit ainsi que pour leur présence à la soutenance orale malgré les conditions de crise sanitaire liée à la Covid-19.

Je tiens à remercier le docteur Natacha Rochel, ma directrice de thèse de m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir permis de travailler sur ce projet lié aux récepteurs nucléaires et leurs implications dans certaines pathologies tel que le cancer de la vessie. Je lui suis également reconnaissante de m'avoir permis de participer à des workshops qui ont contribué à renforcer mes compétences et mon intérêt pour la biologie structurale.

Je remercie également notre cheffe d'équipe Annick Dejaegere pour son accueil et sa gentillesse. Je remercie tous les membres passés et actuels de l'équipe Dejaegere pour ces mois et/ou années passées ensemble. Un merci particulier aux personnes qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à rendre ce travail possible, plus particulièrement Quentin Pippo, le stagiaire de Master 2 que j'ai eu la chance d'encadrer lors de ma thèse pour son travail assidu, sa motivation, son dynamisme et son implication dans le projet. Un merci particulier à Sandra Chalhoub, récemment docteur, anciennement étudiante en thèse dans notre équipe, qui, au fil des années, est devenue, en plus d'être une super collègue une véritable amie qui a toujours été d'un soutien sans précédent.

Je tiens également à remercier nos collaborateurs de l'Institut Curie à Paris pour ce projet qui a été mené en étroite collaboration, notamment François Radvanyi, Isabelle Bernard-Pierrot, Laure Coutos-Thévenot et tous les autres membres de l'équipe pour leur travail et leur investissement.

Merci à toutes les équipes de notre département de biologie structurale intégrative pour les échanges scientifiques et les nombreuses discussions passées, notamment lors des séminaires que j'ai eu plaisir à organiser aux côtés de plusieurs personnes qui ont rendu ces événements possibles. Une pensée particulière à mes anciennes collègues et amies Irina et Yasmine pour avoir initié cela ensemble. Ces séminaires permettaient de créer des moments de convivialité importants à la vie du département, aboutissant ainsi à des discussions fort enrichissantes et à des collaborations entre équipes. Je suis particulièrement fière d'avoir pu participer à cela, et espère que cela pourra perdurer malgré le départ des membres initiaux des Happy Hours.

Je tiens à remercier les membres de la plateforme de Biologie Structurale & Génomique fonctionnelle et tout particulièrement Alastair G. McEwen et Pierre Poussin-Courmontagne pour leur aide précieuse, leurs conseils, leur patience et leur soutien tout au long de ma thèse. En plus d'être des collègues brillants, c'est aussi des amis qui feront, je l'espère, partie de cette future vie et de cette nouvelle page qui s'ouvre.

Un grand merci à une personne spéciale, que j'ai toujours considéré comme un véritable mentor dès le début de ma thèse, et qui a quitté l'IGBMC beaucoup trop tôt : Julio Ortiz Espinosa. Merci d'avoir été une personne incroyablement humaine et d'avoir transmis cette passion pour la cryo-microscopie électronique, merci de m'avoir enseigné l'utilisation du Titan Krios et d'avoir été un fervent combattant pour la transmission du savoir scientifique aux nouvelles générations de chercheurs. Merci pour ton soutien et ta confiance qui ont été pour moi une des plus grandes motivations lors de ma thèse. Je regrette sincèrement ton absence dans notre institut.

Merci à tous les membres de la plateforme de cryo-microscopie qui ont été présents lors de ma thèse, pour leur aide, leur soutien et leur accompagnement, notamment Corinne Crucifix et Jean-François Ménétret qui m'ont beaucoup appris.

Un grand merci aux services Baculovirus et Biologie Moléculaire de l'IGBMC, sans qui mon travail de thèse n'aurait pas été possible. Qui dit biologie structurale, dit protéines. Qui dit protéines dit clonages. Alors, oui, un grand merci à Thierry Lerouge pour son travail précis et appliqué lors d'innombrables clonages réalisés pour mon projet. Un merci particulier à ma

chère collègue et amie Paola Rossollilo pour son expertise et ses compétences hors-pair qui ont permis de réfléchir à des stratégies de clonages précises et efficaces lors de ma thèse. En plus de tes compétences scientifiques, je tiens à remercier l'amie que tu as été tout au long de ces années, ton soutien inconditionnel et tous les moments de rires et de discussions révolutionnant le monde qui nous ont animés. Je compte bien en partager de nombreux autres avec toi. Tu as toujours été présente pour les bons et les mauvais moments, c'est pourquoi je tiens à te rendre cet hommage particulier aujourd'hui.

Je remercie également tous les membres du département de Biologie Structurale de l'IGBMC et son directeur Marc Ruff pour leur soutien, leur aide et pour cet environnement de travail. Un grand merci à toi, Marc, pour ton implication à tous les niveaux, ton humanisme à toute épreuve et ton ENERGIE communicative tout au long de ces années. « ENERGIE » restera toujours dans un petit coin de ma tête !

Je voudrais également remercier les financeurs de ma thèse : Le LabEx INRT du PhD Programme de l'IGBMC pour mes trois années de thèse, ainsi que le département de biologie structurale pour l'extension de 3 mois accordée. Ces trois mois ont été primordiaux pour finaliser mes travaux de thèse suite au retard accumulé lors du confinement lié à la crise sanitaire.

Je voudrais chaleureusement remercier tous mes amis de Nancy et de Strasbourg qui m'ont accompagnée et supportée tout au long de ma thèse. Grâce à eux, j'ai passé des moments inoubliables qui m'ont permis de venir à bout de ce projet !

La team Nancy avec l'incontournable Camille H. qui a déjà partagé la moitié de ma vie à ce jour, Juju et Jojo (accompagnés de Kiwi #Eustache et notre petit Framboise en cours de fabrication), mes morues Paupau et Tan, ma team gypsophiles, ma petite Gülselin exilée en Suisse mais d'une amitié inconditionnelle, mon petit Johny et son soutien sans failles malgré la distance, Jean et Félicie et mes 3 petits monstres préférés, Hélène, Valentin & Clodrey, Géraud pour son soutien pendant de nombreuses années inoubliables ! Plusieurs de ces personnes ont été des piliers dans ma vie et dans toutes les aventures vécues, ils se

reconnaitrons et je tenais à vous remercier d'avoir été présents et d'être ce que vous êtes chaque jour pour moi tout simplement.

La team Strasbourg avec pour commencer mes doudous Camille & Anna les choubis de l'amour qui ont été d'un grand soutien au niveau professionnel (vive le Biacore et la thèse) et sur le plan personnel. Elles ont toujours su me rendre le sourire quand il le fallait, sans oublier choubichat dans l'aventure ! Puis l'incontournable Auguste alias Augustidou pour nos discussions interminables sur la politique et d'autres sujets révolutionnaires, Cricri pour ses cricrises et son rire atypique, Pernelle et ses licorneries, Helgo pour son soutien depuis le début de l'aventure IGBMC, Alastair alias Mister Grumpy déjà cité précédemment, ma petite Paola d'amour et ses incroyables tiramisu et panna cotta (et Gnocchi et tant d'autres), Goran et son incroyable ProFeMap, Pauline et ses bons choix de rouges à lèvres, Céline K., Jérémy, Aline, Mélody, et tous ceux qui ont quitté l'IGBMC : Yasmine pour sa joie de vivre et son soutien, Irina, Eduardo, Arnaud VDB et les heures passées à choisir les bonnes couleurs de figures et de structures 3D, pour son aide pour la cryo-EM mais aussi pour son soutien à distance de NYC.

Je suis extrêmement reconnaissante envers mes parents, ma famille et ma sœur Linda qui m'ont toujours soutenue dans tous mes projets et qui ont toujours cru en moi, je ne vous remercierai jamais assez.

Merci à toi mon petit chat, pour avoir su me redonner le sourire quand je pensais l'avoir perdu. Tu as été un véritable petit rayon de soleil quand tout semblait obscur. Tu as été d'un soutien incommensurable, et j'ai redécouvert le monde différemment, à travers toi et à travers nous, merci pour tout ce que tu m'as apportée et ce que tu m'apportes chaque jour.

Enfin, je tiens à remercier tous mes professeurs à l'Université de Lorraine, à commencer par Arnaud Gruez, Kira Weissman, Athanas Visvikis, Bruno Charpentier, Benjamin Chagot, au feu Professeur Nadir Mrabet et tant d'autres qui m'ont donné le goût de la science et de la recherche, et tout particulièrement à la biologie structurale avec une pensée sincère à Frédérique Favier qui a animé mes envies d'approfondir cette discipline que j'affectionne. C'est en partie grâce à cette expérience trop brève au CRM2 à Nancy lors d'un stage volontaire

de Master 1 supervisé par Frédérique que j'ai découvert une personne passionnée et passionnante qui a su transmettre son goût pour la belle science, tu as réussi à me donner envie de poursuivre cette carrière scientifique et voilà qu'aujourd'hui je prétends au titre de docteur. Merci à toi, avec qui cette aventure trop courte a merveilleusement bien commencé.

Table des matières

Table des matières

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	1
PREAMBULE	7
ABREVIATIONS	9
RESUME DE LA THESE	14
LISTE DES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES.....	19
AUTRES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	20
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE	22
1. FACTEURS DE TRANSCRIPTION	22
2. LES RECEPTEURS NUCLEAIRES (RNS).....	27
3. LES RECEPTEURS ACTIVES PAR LES PROLIFERATEURS DE PEROXYSONES : PPARS.....	32
a. Les différents isotypes de PPARs et leur répartition tissulaire	33
i. PPAR α	33
ii. PPAR β/δ	34
iii. PPAR γ	35
b. Organisation modulaire des PPARs	37
c. Mécanisme de liaison à l'ADN : Les DBDs	39
i. Généralités	40
ii. Le DBD de PPAR γ	41
d. Mécanisme d'activation ligand-dépendant de PPARγ: les LBDs	44
i. Structures cristallographiques du domaine LBD de PPAR	44
ii. Poche de fixation du ligand (LBP)	45
e. Les ligands naturels et pharmacologiques de PPARγ.....	49
i. Ligands naturels.....	49
ii. Ligands synthétiques	50
f. Hétérodimérisation de PPAR avec RXR	53

i.	Le récepteur nucléaire X des rétinoïdes RXR : Généralités	53
ii.	Le complexe PPAR γ -RXR α : Généralités et état des lieux	56
4.	PPAR ET LA REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE GENES CIBLES	58
a.	<i>Les corégulateurs de PPARγ: Généralités</i>	58
b.	<i>Répression de la transcription par PPARγ-RXRα: Structure-Fonction</i>	60
i.	Répression de la transcription : Généralités	60
ii.	Les corépresseurs de PPAR γ -RXR α	61
c.	<i>Activation de la transcription par PPARγ-RXRα: Structure-Fonction</i>	62
i.	Activation de la transcription : Généralités	62
ii.	Les coactivateurs de PPAR γ -RXR α	64
iii.	MED1 : le coactivateur des récepteurs nucléaires	68
5.	PPAR-RXR ET LE CANCER DE LA VESSIE	70
a.	<i>Structure-Fonction du complexe : état des lieux</i>	70
b.	<i>La tumorigenèse urothéliale</i>	73
i.	Le cancer de la vessie : Généralités	73
ii.	Les différents types de tumeurs urothéliales	74
c.	<i>PPARγ-RXRα et les tumeurs urothéliales</i>	77
i.	Rôle de PPAR γ comme potentiel suppresseur de tumeurs	77
ii.	Rôle protumorigénique de PPAR γ dans les tumeurs luminales de vessie	77
6.	OBJECTIFS DE THESE	80
CHAPITRE 2 : ÉTUDES STRUCTURALES ET BIOPHYSIQUES DE MUTANTS DE PPAR IMPLIQUES DANS LE CANCER DE LA VESSIE		83
1.	INTRODUCTION ET OBJECTIFS	83
2.	CARACTERISATION DES MUTATIONS INACTIVATRICES DE PPAR : MANUSCRIT DEPOSE DANS BIORXIV	88
3.	MANUSCRIT EN PREPARATION	152
4.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	184
CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DU COMPLEXE PPAR/RXR ET LE COACTIVATEUR MED1 PAR CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE (CRYO-ME)		187
1.	INTRODUCTION ET OBJECTIFS	187
2.	CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DU COMPLEXE PPAR-RXR : RESULTATS ET DISCUSSION	192
a.	<i>Expression et purification du complexe PPARγ-RXRα-MED1</i>	192

i.	Le système d'expression BEVS ou Baculovirus	192
ii.	Tests qualitatifs de l'échantillon protéique	199
iii.	Système d'expression de la vaccine en cellules de mammifères BHK21.....	200
3.	CARACTERISATION STRUCTURALE D'UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	206
A.	LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION (MET) : GENERALITES ET PRINCIPES	206
i.	Progrès scientifique au cours du XX ^{ème} siècle.....	206
ii.	Introduction à la technique de MET : Principes physiques	207
B.	L'ÉTUDE D'UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE PAR MET	211
i.	Par coloration négative	211
ii.	Par cryo-microscopie électronique (Cryo-ME)	213
4.	CARACTERISATION STRUCTURALE DU COMPLEXE ENTIER PPAR-RXR-MED1 : RESULTATS ET	
	DISCUSSION.....	218
A.	LA COLORATION NEGATIVE	218
B.	LA CRYO-ME	219
i.	Les grilles :	219
ii.	La cryogénéisation du complexe purifié.....	220
iii.	L'acquisition des images de microscopie électronique du complexe étudié	223
C.	TRAITEMENT DES IMAGES ET RECONSTRUCTION 2D/3D	226
i.	Tri des micrographes et sélection des particules	226
ii.	La classification 2D et modèle 3D initial.....	229
iii.	Limites de l'étude par cryo-microscopie électronique du complexe	232
5.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	232
A.	CARACTERISATION BIOCHIMIQUE	232
i.	Conclusions.....	232
ii.	Perspectives	234
B.	CARACTERISATION STRUCTURALE.....	234
i.	Conclusions.....	234
ii.	Perspectives	235
	CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	238
	BIBLIOGRAPHIE.....	243
	ANNEXE 1.....	256

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Schéma général de l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II et le complexe de pré-initiation (PIC),

Figure 2 : Schéma général de l'organisation d'un gène de classe II,

Figure 3 : Rôles fonctionnels du médiateur et des facteurs de transcription généraux (GTFs) dans l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II,

Figure 4 : Schéma général de l'activation des gènes et formation du complexe de pré-initiation (PIC) de la transcription par l'ARN Polymérase II et le complexe médiateur,

Tableau 1 : Les récepteurs nucléaires chez les Mammifères classés selon leur nomenclature, leurs ligands naturels et leurs états fonctionnels,

Figure 5 : Alignement des sous-familles de récepteurs nucléaires en fonction des domaines connus dans la littérature, des régions désordonnées ainsi que le nombre de structures disponibles sur les bases de données (PDB, IUPred2a, Uniprot), ProFeMap (Goran Bich 2020),

Figure 6 : Liaisons spécifiques des RNs à l'ADN exploitant des séquences multiples aux fonctions structurales diverses et variées,

Figure 7 : Mécanisme d'action général du récepteur nucléaire PPAR γ , sa distribution tissulaire et les voies métaboliques qu'il régule,

Figure 8 : Homéostasie métabolique et répartition tissulaire entre les différents isotypes des PPARs,

Figure 9 : Les différents transcrits et les isoformes du gène *PPARG*,

Figure 10 : Structure modulaire de PPAR γ 1 et PPAR γ 2 et les fonctions des domaines qui les composent,

Figure 11 : Transactivation de gènes cibles en partie dépendante du domaine N-terminal NTD flexible grâce à l'interaction et à l'action des différents protagonistes,

Figure 12 : Structure conservée en doigts de zinc du domaine de liaison à l'ADN (DBD) des récepteurs nucléaires,

Figure 13 : Trois modes de liaison possibles à l'ADN des différentes classes de récepteurs nucléaires,

Figure 14 : Première structure du complexe entier PPAR γ -RXR α -Corégulateur lié à son élément de réponse à l'ADN (PPRE) de type DR1 (*Direct Repeat 1*),

Figure 15 : Mode de liaison « tête-bêche » du complexe PPAR γ -RXR α à l'élément de réponse DR1 et son site d'extension spécifique en 5',

Figure 16 : Structure tridimensionnelle du domaine de liaison au ligand (LBD) de PPAR γ et les sites de fixation du ligand (rosiglitazone) et du corégulateur (CoR) au niveau de l'hélice H12,

Figure 17 : Les ligands naturels des différents récepteurs nucléaires,

Figure 18 : Le mécanisme d'action de l'hélice- α H12 est un modèle conformationnel commun à la superfamille des récepteurs nucléaires : conformation active et inactive de H12,

Figure 19 : Les changements conformationnels observés après fixation des corégulateurs dans la cavité hydrophobe du LBD de PPAR,

Tableau 2 : Les spécialités commercialisées des Thiazolidinediones (TZD),

Figure 20 : L'effet pharmacologique des différents types de ligands en fonction de l'activité transcriptionnelle basale du récepteur nucléaire étudié,

Figure 21 : Structure chimique de l'acide 9-*cis* rétinolique,

Figure 22 : Théorie du « *Big Bang* de RXR » décrivant l'habilité de RXR à se lier à différents partenaires et d'intervenir dans la régulation de plusieurs voies métaboliques,

Figure 23 : Caractéristiques des éléments de réponse à l'ADN de RXR et ses partenaires RNs de type « *Direct Repeat* » DR1 à DR5,

Figure 24 : Changements conformationnels du LBD de RXR induits par la liaison d'un ligand naturel ou synthétique ainsi que du corégulateur permettant le passage de l'état inactif « *apo* » à actif « *holo* » de l'hélice H12,

Figure 25 : Mode d'activation des hétérodimères de récepteurs nucléaires avec RXR selon leur permissivité,

Figure 26 : L'expression des gènes cibles sous le contrôle du complexe PPAR-RXR modulée par les cofacteurs sélectifs de PPAR,

Figure 27 : Vue d'ensemble des coactivateurs et des corépresseurs de PPAR γ impliqués dans l'adipogenèse,

Figure 28 : Composition modulaire du complexe médiateur des levures et des mammifères, dont plusieurs sous-unités sont identifiées comme coactivateurs de PPAR γ ,

Figure 29 : Les différentes voies métaboliques de la répression transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires et les complexes corépresseurs associés,

Figure 30 : Schéma global du mode d'action des récepteurs nucléaires,

Figure 31 : Les différentes voies métaboliques de l'activation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires et les complexes coactivateurs associés,

Figure 32 : Surface électrostatique de PPAR γ LBD formant une pince « chargée » entre les résidus conservés K301 et E471 permettant d'accommoder le peptide coactivateur contenant le motif LxxLL dans la poche de fixation du corégulateur,

Figure 33 : La surface d'interaction des peptides corépresseurs et coactivateurs diffère,

Figure 34 : Modèle du mécanisme d'interaction entre l'hétérodimère PPAR-RXR et le complexe médiateur via TRAP220/Med1 jouant un rôle de « pont » pour la liaison à la machinerie transcriptionnelle,

Figure 35 : Modèle du complexe d'initiation de la transcription cPIC-cMed où seule la sous-unité MED1 est manquante dans le complexe cMed résolu par cristallographie aux rayons-X à 3,4 Å,

Figure 36 : Structure du complexe PPAR-RXR en interaction « tête-bêche » avec son élément de réponse PPRE à l'ADN de type DR1,

Figure 37 : Analyses et comparaisons des données structurales par cristallographie aux rayons-X (PDB 3DZY) et en solution par SAXS des complexes RAR-RXR et PPAR-RXR liés à leur élément de réponse à l'ADN de type DR1,

Figure 38 : Représentation schématique de la classification de la progression tumorale des cancers de vessie,

Figure 39 : Schéma global des deux principales voies de la tumorigenèse urothéliale, les différents types de tumeurs et les altérations génomiques associées,

Figure 40 : Représentation schématique des mutations récurrentes activatrices ou inactivatrices identifiées de PPAR γ (A) et RXR α (B) dans des tumeurs de vessie,

Figure 41 : Représentation graphique des cellules tumorales et leurs microenvironnements classées selon le pourcentage de chaque type de tumeurs envahissant le muscle urothélial (MIBC),

Figure 42 : Les mutations de PPAR γ et de RXR α identifiées dans les cancers de vessie,

Figure 43 : Analyses et comparaisons des données structurales par cristallographie aux rayons-X (PDB 3DZY) et en solution par SAXS du complexe PPAR-RXR lié à son élément de réponse à l'ADN de type DR1,

Figure 44 : Structures de complexes de récepteurs nucléaires résolues par cryo-microscopie électronique (Cryo-ME) : VDR/RXR/ADN, USP/EcR/ADN, ER α /SRC-3/p300 et AR/SRC-3/p300

Figure 45 : Récapitulatif des différentes étapes de purification du complexe PPAR γ 2-RXR α humain exprimé avec la construction 1 (N-Ter-Twin-Strep-PPAR γ 2),

Figure 46 : Récapitulatif des différentes étapes de purification du complexe PPAR γ 2-RXR α humain exprimé avec la construction 1 en présence du coactivateur MED1_50-660,

Figure 47 : Récapitulatif des deux étapes de purification du complexe PPAR γ 2-RXR α humain co-exprimé avec le coactivateur MED1_50-660 en cellules d'insectes SF21,

Figure 48 : Récapitulatif des deux étapes de purification du complexe PPAR γ 2-RXR α exprimé avec la construction 2,

Figure 49 : Formation du complexe stœchiométrique PPAR γ 2-RXR α humain exprimé dans la nouvelle construction n°2 et co-purifié en présence du coactivateur MED1_50-660 en cellules d'insectes dans le système Baculovirus,

Figure 50 : Récapitulatif des expériences de SEC-MALS réalisées sur un échantillon protéique du complexe entier purifié hPPAR γ 2-RXR α -MED1 d'après la stratégie n°3,

Figure 51 : Carte génomique du virus modifié de la vaccine (MVA) contenant les régions modifiées,

Figure 52 : Schéma récapitulatif de la stratégie de clonage d'une cassette polycistronique dans le génome viral de MVA afin d'exprimer un complexe multi-protéique d'intérêt,

Figure 53 : Schéma récapitulatif de l'étape de sélection du/des gène(s) d'intérêt(s) et de son intégration dans le virus MVA qui permettra la surexpression du gène d'intérêt dans les cellules BHK21,

Figure 54 : Schémas récapitulatifs des différentes constructions générées pour l'expression protéique du complexe hPPAR γ 2-RXR α et leur coactivateur MED1 dans le système MVA,

Figure 55 : Récapitulatif des étapes préliminaires des essais de purifications à micro-échelle du complexe hPPAR γ 2-RXR α et leur coactivateur MED1 dans le système MVA de deux constructions différentes (Constructions 1 et 2),

Figure 56 : Récapitulatif des étapes préliminaires des essais de purifications à micro-échelle du complexe hPPAR γ 2-RXR α et le coactivateur MED1 dans le système MVA de deux constructions distinctes (Constructions 3 et 4),

Figure 57 : Représentation schématique simplifiée d'un microscope électronique,

Figure 58 : Représentation schématique simplifiée des différentes sources d'électrons utilisées au cours du temps pour les microscopes électroniques à transmission (MET),

Figure 59 : Schéma des interactions observées entre les électrons émis et l'échantillon biologique étudié par MET,

Figure 60 : Schéma décrivant la variation de la fonction de transfert de contraste (FTC) dépendante de la fréquence d'oscillation,

Figure 61 : Schéma global décrivant le principe et le contraste obtenu pour l'étude d'un échantillon biologique par la technique de coloration négative,

Figure 62 : Les différents états de glace obtenus suite à la cryo-congélation d'un échantillon biologique,

Figure 63 : Exemple d'appareil de décharge lumineuse ou « *Glow Discharge* » permettant l'ionisation de la surface des grilles de microscopie (Appareil ELMOTM Cordouan), présent à l'IGBMC/CBI,

Figure 64 : Deux types de plongeurs semi-automatiques utilisés actuellement pour la cryo-congélation des échantillons biologiques,

Figure 65 : Schéma global décrivant le principe et le contraste obtenu pour l'étude d'un échantillon biologique par la technique de cryo-microscopie électronique,

Figure 66 : Schéma du processus de projections des classes 2D dans différentes orientations de l'espace permettant de générer un modèle 3D contenant des détails structuraux dans les 3 directions de l'espace,

Figure 67 : Différents micrographes obtenus du complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660 dans des conditions variables par la méthode de coloration négative à l'acétate d'uranyle par le microscope de coloration négative CM120 de l'IGBMC,

Figure 68 : Schéma en coupe de l'organisation générale d'une grille de microscopie à maille métallique et quadrillée servant de support à l'échantillon étudié,

Figure 69 : Effet de multiples étapes de dépôt de l'échantillon protéique sur les grilles et les micrographes obtenus de l'échantillon concentré à 0,1 mg/mL,

Figure 70 : Cryo-microscopes électroniques disponibles à l'IGBMC/CBI,

Tableau 3 : Paramètres des données enregistrées au microscope Titan Krios pour le complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660, ses ligands (GW1929 et 9*cis*-RA) et son élément de réponse à l'ADN (*FABP4*),

Figure 71 : Exemples de micrographes obtenus après la première session d'acquisition de données pour le complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660 par le cryo-microscope électronique Titan Krios,

Figure 72 : Exemple d'un micrographe obtenu après la deuxième session d'acquisition de données pour le complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660 par le cryo-microscope électronique Titan Krios,

Figure 73 : *Pipeline* utilisé pour le traitement de données de microscopie de l'étape d'acquisition au Titan Krios jusqu'à l'étape de reconstruction de la structure 3D de l'objet étudié,

Figure 74 : Exemples de classes 2D obtenues par le logiciel cisTEM à partir de 94 021 particules sélectionnées au départ pour générer 100 classes 2D, Relion2.0.3,

Figure 75 : Traitement des données après la deuxième acquisition au cryo-microscope électronique Titan Krios parallèlement par deux logiciels : Relion 2.0.3 et cisTEM pour générer des classes 2D du complexe étudié,

Figure 76 : Schéma récapitulatif de la stratégie choisie pour les études structurales du complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660.

Préambule

Cette thèse de doctorat effectuée au sein de l'École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé (ED414) s'intègre dans le cadre de l'obtention du titre de Docteur en Sciences de l'Université de Strasbourg. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont porté sur l'étude des mécanismes moléculaires du rôle protumorigénique des récepteurs nucléaires PPAR γ et RXR α dans le cancer de la vessie.

Ce travail a été réalisé au sein du département de Biologie Structurale Intégrative (CBI) de l'Institut de Génétique, de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) à Illkirch, sous la supervision du Dr Natacha Rochel de Septembre 2017 à Décembre 2020.

Durant ma thèse de doctorat, j'ai conduit un projet de recherche multidisciplinaire portant principalement sur l'étude du récepteur nucléaire PPAR γ humain, les mutations découvertes chez les patients atteints de tumeurs basales de la vessie ainsi que l'impact de ces mutations sur l'hétérodimérisation au partenaire RXR α , le recrutement des ligands et des corégulateurs spécifiques. Ce projet m'a permis de développer des compétences pluridisciplinaires allant de la biologie moléculaire à la cryo-microscopie électronique (Cryo-ME), en passant par la biochimie des protéines, la biophysique et la cristallographie aux rayons-X.

Ce manuscrit de thèse d'article en 3 chapitres. Le **chapitre 1** introduit la superfamille des récepteurs nucléaires, leur rôle de régulateurs transcriptionnels, et plus particulièrement l'hétérodimère PPAR γ /RXR α . Ce chapitre permet de faire un état des lieux des connaissances biologiques et structurales actuelles de récepteurs nucléaires ayant un rôle de facteurs de transcription. L'introduction se termine par la description du rôle de PPAR γ /RXR α dans les cancers de vessie et par les objectifs de la thèse.

Le **chapitre 2** concerne les études structurales par cristallographie aux rayons-X et biophysiques des mutations de PPAR γ impliquées dans le cancer basal de la vessie (F310S et H494Y). Un premier manuscrit soumis décrit ces mutations inactivatrices spécifiques au sous-type basal des tumeurs de vessie et leurs impacts sur le recrutement des corégulateurs et sur la régulation de gènes cibles. Ensuite, un deuxième manuscrit en cours de préparation est présenté dans ce chapitre. L'impact des mutations perte de fonction (F310S et H494Y) sur le recrutement de corépresseurs (NCoR et SMRT) médié par un ligand inverse agoniste (T0070907) est alors étudié. Ce chapitre se termine par une conclusion et des perspectives.

Le **chapitre 3** de ce manuscrit de thèse porte sur l'optimisation de l'expression protéique et sur l'étude structurale du complexe humain entier PPAR γ /RXR α lié à son coactivateur MED1 et à son élément de réponse à l'ADN PPRE de type DR1 par cryo-microscopie électronique (Cryo-ME). Le chapitre se termine par une conclusion et des perspectives.

Le manuscrit de thèse se termine par des conclusions générales et perspectives, par la bibliographie ainsi que par l'**Annexe 1** détaillant le protocole de la purification du complexe entier PPAR γ /RXR α /MED1_50-660 (**Annexe 1, p.265**) ayant été utilisé pour les études de cryo-microscopie électronique.

Abréviations

ACOX1 : *Peroxisomal Acyl-Coenzyme A Oxidase 1*

ADN : Acide Desoxyribonucléique

AF-1/2 : *Activation Function 1/2*

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AR: *Androgen Receptor*

ARN: Acide RiboNucléique

ARNm: ARN messager

ARNt : ARN de transfert

ATP: Adénosine Tri-Phosphate

BHK21: *Baby Hamster Kidney cells*

BSA : *Bovin serum albumin*

CAR : *Constitutive Androstane Receptor*

CBP : *CREB-Binding Protein*

CIS : *Carcinoma in situ*

CIT : Carte d'Identité des Tumeurs

CM5 : *Carboxymethylated dextran*

CoA : *Coactivateur*

CoR : Corégulateur

CPT1 : *Carnitine palmitoyltransferase I*

Cryo-ME : Cryo-microscopie électronique

CTD : *C-terminal domain*

CTE: *C-terminal Extension*

CTF : *Contrast Transfert Function*

Cu : Cuivre

Da : Dalton

DBD : *DNA Binding Domain*

DDM : Dodécyl- β -D-Maltoside

DHA: Acide docosahéaénoïque

DLS: *Dynamic Light Scattering*

DO : Densité Optique

DR: *Direct Repeat*

DTT: DL-DiThiolThreitol

E. coli: *Escherichia coli*

ER: *Estrogen Receptor*

ERR: *Estrogen Receptor Related*

FEG: *Field Emission Gun*

FTC: Fonction de Transfert de Contraste

FPLC: *Fast Protein Liquid Chromatography*

FXR: *Farnesoid X Receptor*

GF: *Gel Filtration*

GR: *Glucocorticoid Receptor*

GTF: *General Transcription Factor*

GW 1929: Ligand agoniste de PPAR γ LBD

HAT: *Histone AcetylTransferase*

HD: *Helicoidal Domain*

HDAC: *Histone DeAcetylase*

HEK: *Human Embryonic Kidney*

HODE: Hydroxyoctadécadiénoïque

IARC : Agence internationale de la recherche contre le cancer

ID : *Interaction Domain*

IPTG: Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside

IR: *Inverse Repeat*

K_D: Constante de Dissociation

kV : kiloVolt

LB: *Lysogeny Broth*

LBD: Ligand Binding Domain

LBP: *Ligand Binding Pocket*

LCoR: *Ligand-dependant Nuclear CoRepressor*

LDL: *Low Density Lipoprotein*

LXR: *Liver X Receptor*

mA: Milliampère

MDa: Méga-Daltons

MED: Médiateur

MED1: *Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1*

MET: Microscope Électronique à Transmission

MIBC: *Muscle Invasive Bladder Cancer*

MR: *Mineralocorticoid Receptor*

MS: *Mass Spectrometry*

MST: *MicroScale Thermophoresis*

MSA: *Multivariate Statistical Analysis*

MVA: *Modified Vaccinia Ankara*

Nano DSF: *Nano Differential Scanning Fluorescence*

NCoR: Nuclear Corepressor 1

NF- κ B : *Nuclear Factor κ B*

NGF1-B: *Nerve Growth Factor IB*

NHR: *Nuclear Hormone Receptor*

NLS: *Nuclear Localization Sequence*

NMIBC: *Non-Muscle Invasive Bladder Cancer*

NTD: *N-Terminal Domain*

pb: Paire de base

PDB: *Protein Data Base*

PDK4: *Pyruvate Dehydrogenase lipoamide Kinase isozyme 4*

PG-12: *15-deoxy-D-12,14-prostaglandine J2*

PGC1- α : *PPAR-gamma coactivator 1-alpha*

PEG: PolyÉthylène Glycol

PIC: *Protease Inhibitor Cocktail*

PIC: Complexe de Pré-Initiation

PMSF: *PhenylMethylSulfonyl Fluoride*

Pol II: ARN polymérase II

PPAR: *Peroxisome Proliferator Activated Receptor*

PPRE : *PPAR Response Element*

PR : *Progesterone Receptor*

PTM : *Post-translational Modification*

RAR: *Retinoid Acid Receptor*

RB1 : *Retinoblastoma-associated Protein 1*

RE : *Response Element*

Rh : Rhodium

RN: Récepteurs Nucléaires

RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire

RMSD: *Root-Mean-Square Deviation*

RXR: *Retinoid X Receptor*

RXRE: *RXR Response Element*

SAXS: *Small Angle X-ray Scattering*

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate–
Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SF-1: *Steroidogenic Factor 1*

SMRT: *Silencing Mediator for Retinoid and
Thyroid receptor*

SNR: *Signal to Noise Ratio*

SRC-1: *Steroid receptor coactivator 1*

SWI/SNF: *SWItch/Sucrose Non-
Fermentable*

TAF: *TBP-Associated Factor*

TBP: *Tata-box Binding Protein*

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

TF: *Transcription Factor*

TIF2/SRC-2 = *Transcriptional intermediary
factor 2*

Tm : *Melting Temperature* (Température
de fusion)

TR α : Récepteur des hormones
thyroïdiennes- α

TSS: *Transcription Start Site*

TZD: Thiazolidones

UCP-1 : *Uncoupling Protein-1* ou
Thermogénine

UV: Ultra-violet

VDR: *Vitamin-D Receptor*

VPP: *Volta Phase Plate*

WT: *Wild Type*

9cis-RA: Acide 9-cis rétinoïque

Résumé de la thèse

Titre du projet : Mécanismes moléculaires du rôle protumorigénique de PPARgamma et RXRalpha dans les cancers de vessie.

Introduction et mise en contexte :

Ce projet de thèse en collaboration entre l'équipe de N. Rochel (Département de Biologie Structurale Intégrative, UMR 7104-IGBMC) et l'équipe de F. Radvanyi (UMR144, CNRS-Institut Curie), équipe labélisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, a pour sujet d'étude, les récepteurs nucléaires **PPARgamma** (PPAR γ) et **RXRalpha** (RXR α) et leurs mécanismes d'action à la base de l'activité protumorigénique dans les cancers de vessie.

Le récepteur gamma activé par les proliférateurs des peroxysomes, PPAR γ , un membre de la famille des récepteurs nucléaires, agit sous forme d'hétérodimère avec le récepteur des rétinoïdes X, RXR. Ce sont des facteurs de transcription, et leur activité transcriptionnelle est régulée par l'interaction avec des corégulateurs (corépresseurs ou coactivateurs). L'hétérodimère PPAR-RXR reconnaît des séquences d'ADN spécifiques et pour être actif, doit être associé à des coactivateurs. Il peut interagir avec différents corépresseurs et coactivateurs selon le ligand, le type cellulaire, le promoteur et les diverses voies de signalisation. C'est un régulateur clé de la différenciation des adipocytes ; il est impliqué dans l'homéostasie du glucose, mais aussi dans la différenciation des cellules urothéliales. Le rôle de PPAR γ dans la progression tumorale est complexe. PPAR γ a historiquement été considéré comme un suppresseur de tumeur dans les cancers du côlon, du sein ou de la prostate. Des données récentes suggèrent qu'il présente un rôle protumorigénique dans les cancers de vessie, un des cancers les plus fréquents en Amérique du Nord et en Europe.

Le séquençage de *PPARG* dans des tumeurs de cancers de vessie de différents grades et stades de tumeurs (tumeurs invasives et non invasives) a révélé plusieurs mutations somatiques. Par conséquent, *PPARG* peut être affecté par des amplifications dans les cancers de vessie (environ 30 % des cas) mais aussi par des mutations (3 % des cas). De plus, le séquençage de RXR α dans 403 tumeurs, montre la présence de deux mutations récurrentes, (TCGA, 2014) dans les tumeurs envahissant le muscle (5 % des cas). Globalement, il a été trouvé des altérations génétiques de PPAR γ ou RXR α (amplifications ou mutations) dans 50 % des cas de cancers de vessie. En ce qui concerne les mutations de *PPARG*, elles sont trouvées dans différents domaines structuraux de PPAR γ dont la majorité dans le domaine de liaison au ligand/LBD (**Figure 1**).

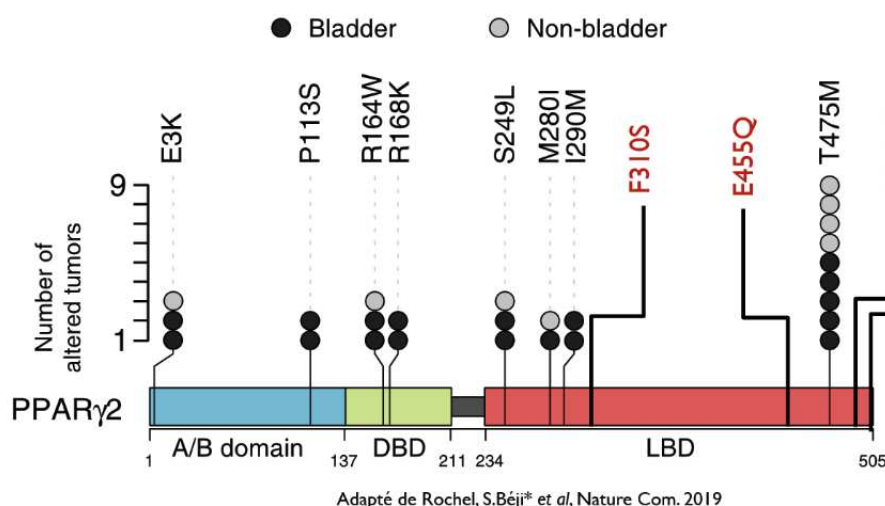


Figure 1 : Représentation des mutations activatrices (noir) et inactivatrices (rouge) de PPAR γ 2 identifiées chez des patients de cancers de vessie.

Un premier travail concernant les mutations activatrices (M280I, I290M, T475M) a déjà été publié par l'équipe (Rochel *et al*, Nat Comm, 2019). Une seconde partie concernant les mutants inactivateurs (F310S et H494Y) a été déposée dans BioRxiv (Laure Coutos-Thévenot, **Syrine Beji**, *et al*, 2020).

Les objectifs de mon projet de thèse sont de :

(I) Caractériser les changements de structure et d'activité induits par des mutations inactivatrices de PPAR γ (**Figure 1**), sa liaison à des corégulateurs, et identifier des ligands qui modulent cette structure/activité. Au cours de mon projet de thèse, j'ai mené une étude de caractérisation de complexes formés par PPAR γ et des peptides corégulateurs en utilisant des méthodes biochimiques et biophysiques. L'impact de mutations somatiques inactivatrices, identifiées auparavant sur des tumeurs de patients atteints de cancers de vessie, a été étudié par des approches biophysiques et structurales afin de comprendre leurs mécanismes d'action et leurs impacts dans le recrutement de ligands et de corégulateurs essentiels à la transcription de gènes cibles. Plusieurs structures tridimensionnelles ont déjà été obtenues par cristallographie aux rayons-X. L'impact des mutations inactivatrices sur l'affinité de recrutement de ligands et de corépresseurs par des approches biophysiques a aussi été étudié, et ces données font l'objet de la préparation d'une publication scientifique (**Syrine Beji et al**, *In preparation*).

(II) Caractériser l'interaction de PPAR γ -RXR α avec des séquences ADN (élément de réponse de PPAR γ) et le coactivateur MED1. L'optimisation biochimique de l'étude du complexe a été réalisée durant les deux premières années de thèse. L'optimisation de l'étude structurale du macro-complexe protéique PPAR γ -RXR α et leur coactivateur MED1 par cryo-microscopie électronique (Cryo-ME) a été réalisée et des résultats préliminaires ont été obtenus.

Résultats obtenus

Pour répondre aux objectifs suivants définis au début de ma thèse :

(I) Caractériser les changements de structure et d'activité induits par des mutations de PPAR γ , sa liaison à des corégulateurs, et identifier des ligands qui modulent cette structure/activité.

(II) Caractériser le macro-complexe protéique PPAR γ -RXR α et son coactivateur MED1.

Plusieurs techniques de biophysique mais aussi de biologie structurale ont été abordées lors de ma thèse, la cryo-microscopie électronique et la cristallographie aux rayons-X principalement pour l'étude structurale de complexes de PPAR γ .

Afin de répondre au premier objectif de ma thèse **(I)**, mon travail a consisté en l'étude de mutants de PPAR γ 2, des mutations somatiques, localisées dans le domaine de liaison au ligand (LBD) identifiées dans des tumeurs de cancers de vessie. Ces mutations ont été identifiées sur une cohorte de patients atteints d'un cancer de vessie en collaboration avec l'équipe de F.Radanyi à l'Institut Curie à Paris. Les structures cristallographiques des différents mutants ont été obtenues : F310S, H494Y, et E455Q. Des études biophysiques complètent les études structurales de ces mutants : l'analyse Différentielle de Fluorescence (*nanoDSF*) afin d'apprécier la stabilité des mutants en solution par rapport à PPAR γ 2 LBD sauvage, la Résonance Plasmon de Surface pour l'étude de l'hétérodimérisation des mutants de PPAR γ 2 à RXR (SPR ou Biacore), la Thermophorèse à Microéchelle (MST) afin de déterminer des paramètres tels que des constantes d'affinité (K_D). Ces études font l'objet d'une publication déposée dans BioRxiv pour les mutants inactivateurs F310S et H494Y (L. Coutos-Thévenot, **Syrine Beji** *et al*, *Submitted*) et d'une autre publication scientifique en cours de rédaction qui consiste à montrer l'effet des mutants F310S et H494Y sur le recrutement de corépresseurs (NCoR et SMRT) et leur liaison à un ligand inverse agoniste (**Syrine Beji** *et al*, *In preparation*).

Pour répondre au deuxième objectif de ma thèse (II), qui est la caractérisation biochimique et structurale du macro-complexe protéique PPAR γ -RXR α et son coactivateur MED1 en présence de l'élément de réponse à l'ADN, des optimisations biochimiques ont été réalisées. L'optimisation biochimique de la purification pour des études structurales du macro-complexe protéique PPAR γ -RXR α et leur coactivateur MED1 a été réalisée par cryo-microscopie électronique (Cryo-ME), des résultats préliminaires ont été obtenus (**Figure 2**).

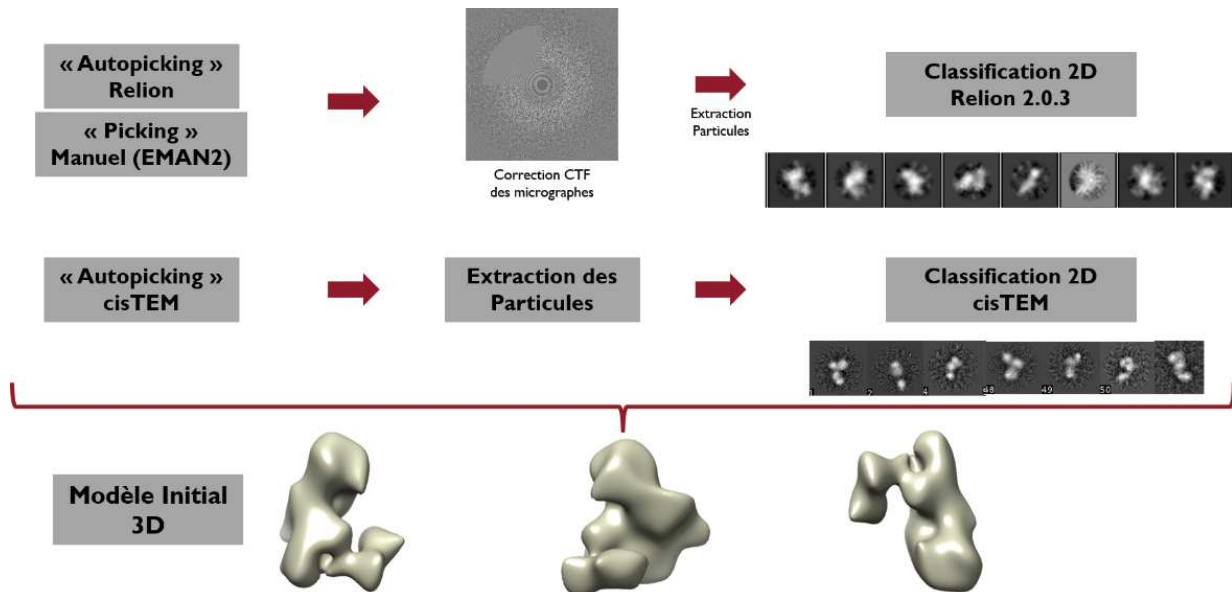


Figure 2 : Résultats préliminaires obtenus du complexe PPAR γ -RXR α et le coactivateur MED1 par cryo-microscopie électronique.

Plusieurs formations (Workshops) en microscopie m'ont permis d'avancer de manière considérable dans mon projet de thèse, notamment l'aspect de l'étude structurale du complexe entier hPPAR γ /RXR α avec son corégulateur (coactivateur) MED1 et l'analyse des données préliminaires de microscopie déjà obtenues. Durant cette période (une partie des deux premières années de thèse), l'étude biochimique du complexe a nécessité plusieurs optimisations, notamment pour la partie production et purification. Une première stratégie a été adoptée dès le début de la thèse : l'expression du complexe dans les cellules d'insectes (système Baculovirus). Cependant, des problèmes de stabilité et d'homogénéité du complexe ont été observés lors de cette phase d'optimisation de purification du complexe.

Pour répondre à ce problème de stabilité en solution, une nouvelle stratégie d'expression du complexe a été amorcée : le système d'expression eucaryote en cellules de mammifères BHK21 (système Vaccinia) développé dans l'équipe de Marc Ruff à l'IGBMC. Différentes constructions

protéiques ont été clonées pour des tests de purification à petite échelle afin d'optimiser la purification du complexe : co-expression de hPPAR γ -RXR α et MED1 et la co-purification de ces derniers. En effet, des modifications post-traductionnelles supplémentaires pouvant stabiliser le complexe sont possibles dans le système d'expression mammifères, ce qui permettrait une expression d'un complexe stœchiométrique et plus stable en solution. Les premiers tests à petite échelle ont été très encourageants mais des essais à grande échelle seront à prévoir.

Conclusions

Lors de ma thèse, un premier volet consistait en l'étude et la caractérisation structurale des mutants inactivateurs identifiés dans des tumeurs de patients atteints d'un cancer de vessie (F310S, E455Q, H494Y) en présence d'un ligand agoniste ou inverse agoniste et leurs corégulateurs (Corépresseurs NCoR/SMRT ou encore coactivateur PGC1 α) afin de comprendre leur mécanisme de recrutement. Ce travail a abouti dans un premier temps à une première publication scientifique (L. Coutos-Thévenot, **Syrine Beji** *et al*, *Submitted*) concernant les mutants F310S et H494Y, complexés avec un coactivateur (PGC1 α) et un ligand agoniste (GW1929). En parallèle, les mêmes études structurales et biophysiques ont été menées pour les mêmes mutants, afin d'étudier le mécanisme de recrutement d'un ligand agoniste inverse (T0070907) en présence du corépresseur NCoR. Des données ont été obtenues pour les mutants F310S et H494Y (**Syrine Beji** *et al*, *In preparation*).

Un deuxième volet de la thèse a porté sur la caractérisation du complexe PPAR γ -RXR α entier, dans l'objectif d'une étude structurale par cryo-ME. Des étapes d'optimisations de production et de purification ont été nécessaires. En vue du challenge de ce projet, des résultats préliminaires encourageants ont été acquis mais aucune structure à haute résolution n'a pu être obtenue à l'heure actuelle.

Liste des publications scientifiques

Recurrent activating mutations of PPAR γ associated with luminal bladder tumors: Natacha Rochel, Clémentine Krucker, Laure Coutos-Thévenot, Judit Osz, Ruiyun Zhang, Elodie Guyon, Wayne Zita, Séverin Vanthong, Oscar Alba Hernandez, Maxime Bourguet, Kays Al Badawy, Florent Dufour, Carole Peluso-Iltis, **Syrine Beji**, Annick Dejaegere, Aurélie Kamoun , Aurélien de Reyniès, Yann Neuzillet, Sandra Rebouissou, Claire Béraud, Hervé Lang, Thierry Massfelder, Yves Allory, Sarah Cianférani, Roland H. Stote, François Radvanyi & Isabelle Bernard-Pierrot, *Nat Com*, 2019

Basal subtype-specific tumor suppressor role for PPAR γ in bladder cancer : Laure Coutos-Thévenot, **Syrine Beji**, Hélène Neyret-Kahn, Quentin Pippo, Jacqueline Fontugne, Judit Osz, Clémentine Krucker, Clarice Dos Santos Groeneveld, Florent Dufour, Aurélie Kamoun, Marie Ley, Elodie Chapeaublanc, Aurélien de Reynies, Thierry Le Bret, Yves Allory, Sarah Cianférani, François Radvanyi, Natacha Rochel and Isabelle Bernard-Pierrot, *Submitted, BioRxiv*

Structural basis for inverse agonist-mediated recruitment of NCoR corepressor by PPAR γ F310S inactivating mutant: **Syrine Beji**, Quentin Pippo, Marie Ley, Alastair McEwen, Sarah Cianferani, Natacha Rochel, *In preparation*

Autres communications scientifiques

Présentation orale (Septembre 2018) : EMBO Practical Course « Cryo-Electron Microscopy and 3D Image Processing 2018 » Formation théorique et pratique. EMBL Advanced Training Center (Heidelberg, Allemagne),

Poster Scientifique (Octobre 2019) : « Inactivating mutations of PPARgamma associated with basal bladder tumors », **Syrine Beji**, Quentin Pippo, Natacha Rochel, Congrès BSI 2019, Biologie Structurale Intégrative, (Toulouse, France),

Présentation orale (Octobre 2020), Séminaire interne IGBMC : « Structure-function studies of PPAR γ mutants identified in basal bladder cancer, IGBMC, (Illkirch, France).

Chapitre 1

Introduction

Chapitre 1 : Introduction Générale

1. Facteurs de transcription

Chez les **Eucaryotes**, trois ARN polymérases nucléaires différentes permettent la transcription des différents types d'ARNs. L'ARN polymérase I (Pol I) transcrit les ARN ribosomiques (ARNr), l'ARN Pol II permet la transcription des ARN messagers (ARNm), et enfin, l'ARN Pol III permet celle des ARNs de transferts et les petits ARNs (ARNt). Toutes les protéines ayant un rôle dans l'initiation de la transcription sont caractérisées comme appartenant à la classe des **facteurs de transcription**. Plusieurs facteurs de transcription sont connus et agissent à travers la reconnaissance de séquences cibles régulatrices au niveau des régions promotrices des gènes. Il existe aujourd'hui plus de 2000 facteurs de transcription identifiés, codés par le génome humain. Ces protéines possèdent deux domaines caractéristiques : un domaine d'activation ou de répression permettant aux facteurs de transcription d'interagir avec des cofacteurs afin de contrôler l'activation ou la répression de la machinerie basale de transcription, et un second domaine qui est un site de liaison direct à une séquence spécifique de l'ADN. Cependant, l'interaction d'un facteur de transcription avec une séquence ADN n'est pas toujours requise. En effet, un facteur de transcription peut reconnaître un autre qui lui, est lié à l'ADN, ou bien interagir directement avec l'ARN polymérase. Les facteurs de transcription reconnaissent pour la plupart des petites séquences d'ADN conservées au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles. Il faut noter que certaines de ces séquences sont communes à plusieurs gènes, et utilisées de manière constitutive, et certaines autres sont spécifiques à certains gènes et leurs activités nécessitent une régulation particulière.

L'**ARN polymérase II** nécessite d'interagir avec une machinerie transcriptionnelle constituée de plusieurs facteurs auxiliaires appelés **TFIIX** (où X est une lettre d'identification d'un facteur individuel) (**Figure 1**). En effet, elle ne peut pas initier la transcription sans la formation d'un complexe multi-protéique ciblant une séquence d'ADN spécifique. Ce complexe est appelé **complexe basal de transcription**. Des motifs nucléotidiques spécifiques sont reconnus dans les régions *cis*-régulatrices des gènes cibles. Ce complexe est nécessaire à la transcription de tous les gènes de **classe II** (**Figure 2**). Les promoteurs contiennent des séquences d'ADN spécifiques et des éléments de réponses qui constituent des sites de fixation de l'ARN polymérase et des facteurs généraux de transcription (GTFs) qui la recrutent.

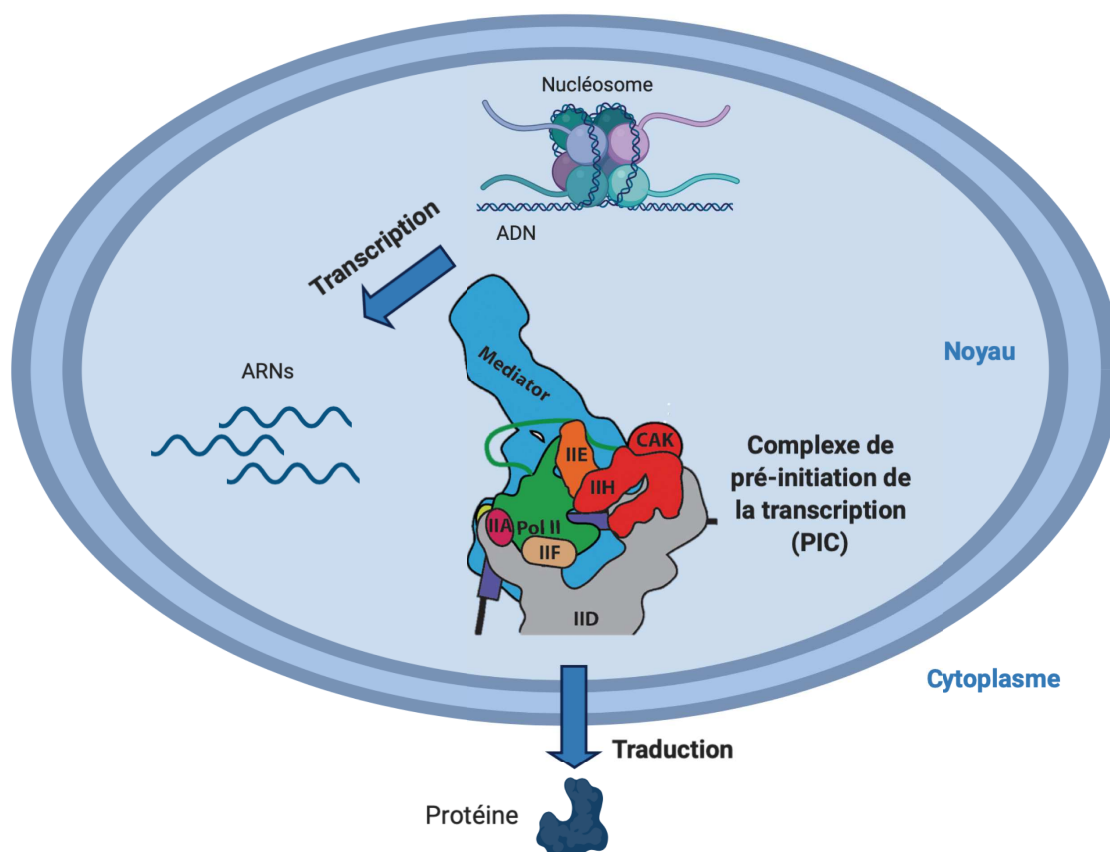


Figure 1 : Schéma général de l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II et le complexe de pré-initiation (PIC), <https://app.biorender.com>.



Figure 2 : Schéma général de l'organisation d'un gène de classe II.

Ces éléments de réponse sont localisés en amont des promoteurs, constituant ainsi le site d'initiation de la transcription ou TSS (*Transcription Start Site*). D'autres facteurs peuvent interagir avec des séquences cibles en aval des séquences promotrices pouvant être situées à des milliers de paires de bases (pb) du site TSS, et ces séquences sont soit amplificatrices ou « *enhancers* » soit des séquences de répression ou « *silencers* » aboutissant respectivement à la transcription ou à la répression d'un gène cible (Spitz and Furlong, 2012) ; (Lenhard et al., 2012).

Les **facteurs généraux de transcription** constituent un macro-complexe protéique jouant un rôle indispensable à l'initiation de la transcription. Les différents acteurs impliqués ainsi que les étapes clés sont les suivants : les séquences d'ADN promotrices, le recrutement de l'ARN polymérase II permettant la formation du **complexe de pré-initiation** (PIC), l'ouverture de la double hélice d'ADN

au niveau du site de fixation formant une bulle transcriptionnelle aboutissant à la formation de la première liaison phospho-diester dans le site actif de la Pol II, puis, l'activation de la Pol II et sa libération du complexe PIC permettent la formation du complexe d'élongation (**Figure 3**). Les facteurs généraux de transcription ou GTFs (TF pour *Transcription Factor*) sont les suivants : TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF, et TFIIH (Sainsbury et al., 2015). Le facteur TFIID permet la fixation sur la boîte TATA puisqu'il contient la protéine TBP (pour *TATA-Box binding protein*) qui reconnaît la séquence consensus du promoteur « TATAAT » chez les Eucaryotes, ainsi que des facteurs associés à la TBP (TAFs, *TBP-Associated Factors*) (Burke and Kadonaga, 1997). La protéine TBP est donc responsable de l'initiation générale de la transcription, et les TAFs ont un rôle clé pour l'association entre la machinerie transcriptionnelle et les promoteurs cibles (Plaschka et al., 2015). En plus du complexe de pré-initiation, l'activation de la transcription est aussi dépendante d'un complexe coactivateur multi-protéique : le **médiateur**. Le médiateur est constitué de 20 sous-unités protéiques d'un poids moléculaire total de 1,2 MDa. Le médiateur intègre des signaux des différentes protéines régulatrices, de nature activatrices ou répressives pour réguler l'initiation de la transcription (Borggreffe and Yue, 2011) (**Figure 4**).

En outre les facteurs généraux de transcription indispensables à l'initiation de la transcription Eucaryote décrite précédemment, d'autres facteurs régulent l'expression des gènes sous des conditions variables. Ces régulations sont impliquées dans divers processus biologiques tels que les différentes étapes du développement, la différenciation cellulaire, la modification des réponses cellulaires à différents stimuli internes ou externes (facteurs de transcription signal-dépendants). Les différentes voies de signalisations, les mécanismes d'épissage de l'ARN, les ARNs non codants, les modifications épigénétiques, le remodelage de la chromatine et les facteurs de transcription jouent un rôle primordial dans la régulation de l'expression génique. À ce jour, plus de 2000 facteurs de transcription sont répertoriés dans les banques de données. Tous ces facteurs ciblent des éléments de réponse sur l'ADN et interagissent avec plusieurs cofacteurs.

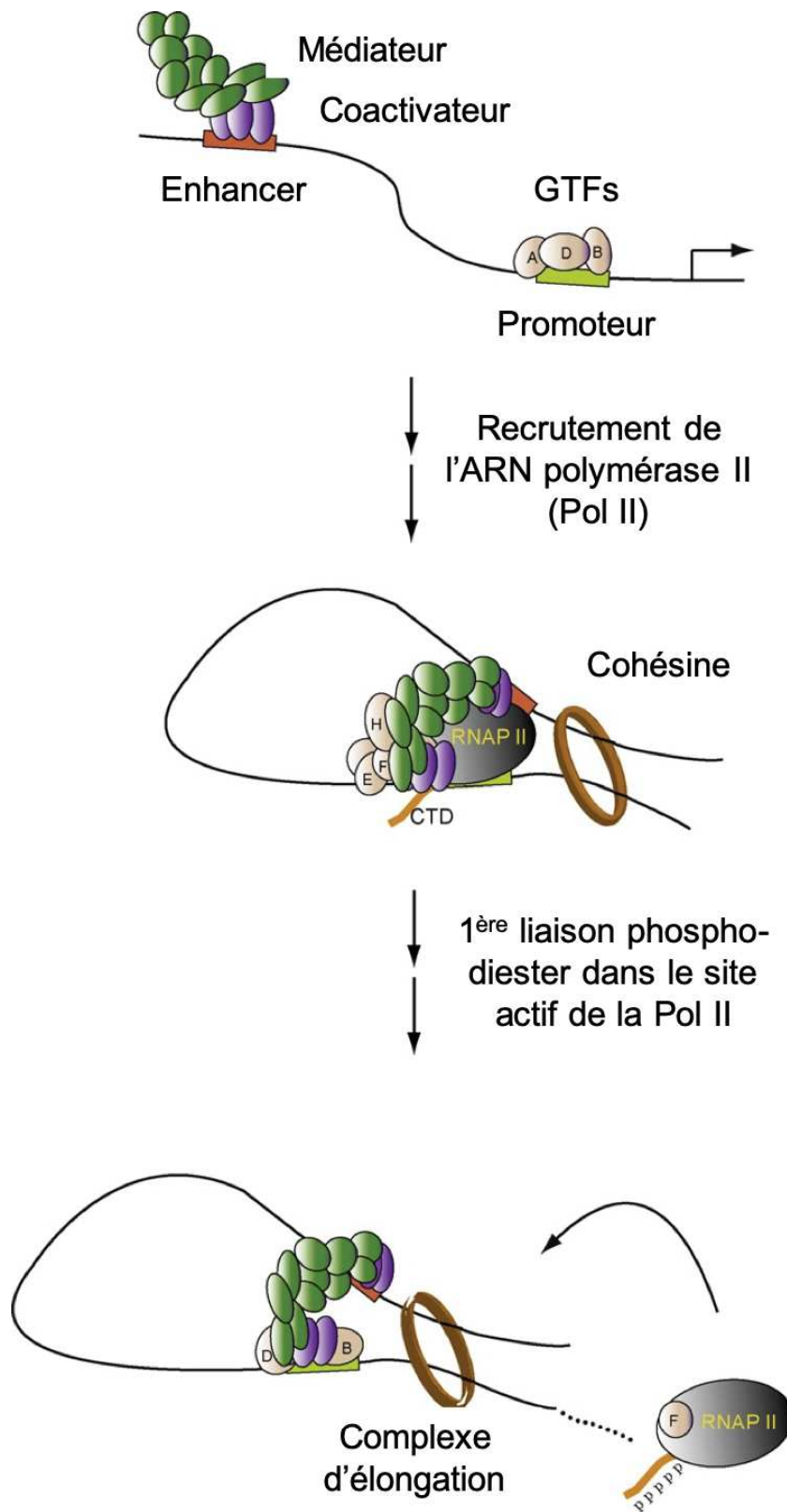


Figure 3 : Rôles fonctionnels du médiateur et des facteurs de transcription généraux (GTFs) dans l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II

Adaptée de Borggreffe and Yue, 2011.

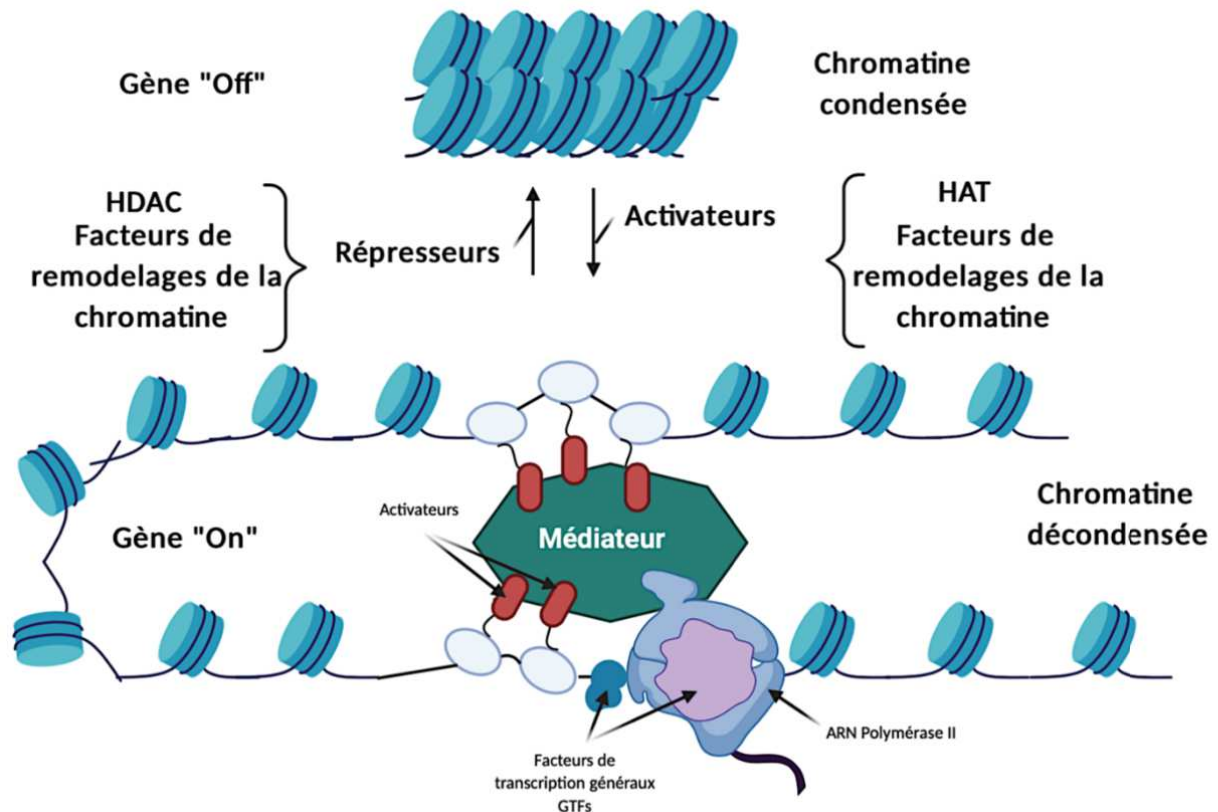


Figure 4 : Schéma général de l'activation des gènes et formation du complexe de pré-initiation (PIC) de la transcription par l'ARN Polymérase II et le complexe médiateur, <https://app.biorender.com>.

Des domaines d'interactions particuliers tels que les domaines de liaisons à l'ADN ou DBD (*DNA Binding Domain*), ou encore des domaines d'activation (ou AF pour *Activation-Function*) caractérisent ces facteurs. Ces fonctions d'activations sont une interface d'interaction importante pour le recrutement des **corégulateurs**. Ces corégulateurs peuvent avoir plusieurs rôles physiologiques tels que la modification de la chromatine ou encore permettre la liaison des facteurs de transcription à la machinerie transcriptionnelle, modulant les différentes voies de régulation de la transcription. Ces facteurs possèdent des structures modulaires et sont déterminants dans l'état épigénétique des cellules. En plus des domaines de liaison à l'ADN (DBD), certains possèdent des domaines de régulation supplémentaires signal-dépendants comme des domaines de liaison aux ligands ou LBD (*Ligand Binding Domain*) ou encore des domaines de *trans*-activation ou de *trans*-répression. C'est notamment le cas des facteurs de transcription de la famille NF- κ B ou encore les facteurs de type **récepteurs nucléaires**.

2. Les récepteurs nucléaires (RNs)

Les **récepteurs nucléaires** (RNs) sont l'une des classes les plus abondantes de régulateurs de la transcription chez les animaux, notamment les vertébrés, les nématodes ainsi que les arthropodes (Escriva et al, 2002). Une caractéristique commune les définit : la régulation de la transcription à travers divers mécanismes, principalement par l'habilité d'activer ou de réprimer la transcription des gènes qu'ils contrôlent en réponse à l'interaction avec des **ligands** spécifiques. Parmi les petites molécules servant de ligands aux RNs, on peut identifier des hormones endogènes (thyroïdiennes et stéroïdiennes), des molécules lipophiles telles que des vitamines, ou encore différents métabolites du cholestérol (**Tableau 1**).

Ces récepteurs régulent diverses fonctions au sein de l'organisme telles que l'homéostasie du glucose, la reproduction, le développement ainsi que le métabolisme des acides gras. Plus de 150 RNs sont répertoriés à ce jour, et ils forment une **superfamille** de protéines apparentées phylogénétiquement, dont 48 gènes identifiés chez l'homme (Robinson-Rechavi et al., 2001).

Ces protéines agissent dans le noyau relayant des signaux hormonaux et permettent la modulation de l'expression des gènes. Ils agissent de manière *trans*, c'est-à-dire qu'ils induisent l'expression de gènes codant des protéines qui, à leur tour, activent de nombreux autres gènes.

Les récepteurs nucléaires peuvent être classés en deux grandes classes (Brelivet et al., 2004), les récepteurs de **classe I** agissant sous forme d'homodimères et sont situés dans le cytosol, puis délocalisés dans le noyau tels que les récepteurs stéroïdiens ; et les récepteurs nucléaires de **classe II**, quant à eux sont toujours maintenus dans le noyau et agissent sous forme d'hétérodimères avec le **récepteur des rétinoïdes X, RXR** (Rastinejad, 2001). Parmi ces récepteurs :

- Le récepteur à la vitamine D (VDR) ayant pour ligand naturel la dihydroxyvitamine D3, dérivé du cholestérol,
- Les récepteurs des rétinoïdes (RAR et RXR) ayant pour ligands les acides rétinoïques,
- Les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR) liant l'hormone triiodothyronine,
- Les récepteurs stéroïdiens (MR, AR, GR, ER, PR) dont les ligands dérivent du cholestérol,
- Les récepteurs aux eicosanoïdes (**PPARs**) : **Peroxisome Proliferator Activated Receptor** liant les leucotriènes, les prostaglandines ainsi que les acides gras. Ces RNs feront l'objet principal de cette étude.

Subfamily	Receptor	Symbol	Ligand Type	Functional Association
1	TR α	NR1A1	Thyroid hormone	Heterodimer/monomer
	TR β	NR1A2		
	RAR α	NR1B1	All- <i>trans</i> -Retinoic acid	Heterodimer
	RAR β	NR1B2		
	RAR γ	NR1B3		
	PPAR α	NR1C1	Polyunsaturated fatty acids, prostaglandins	Heterodimer
	PPAR β/δ	NR1C2		
	PPAR γ	NR1C3		
	Rev-Erb α	NR1D1	Heme	Monomer/homodimer
	Rev-Erb β	NR1D2		
	ROR α	NR1F1	Oxysterols, cholesterol intermediate products, all- <i>trans</i> -retinoic acid	Monomer
	ROR β	NR1F2		
	ROR γ	NR1F3		
	LXR β	NR1H2	Oxysterols	Heterodimer
	LXR α	NR1H3		
	FXR	NR1H4	Bile acids	Heterodimer
	VDR	NR1I1	1,25-dihydroxy vitamin D3	Heterodimer
PXR	NR1I2	Xenobiotics	Heterodimer	
CAR	NR1I3	Androstenol	Heterodimer	
2	HNF-4 α	NR2A1	Fatty acids	Homodimer
	HNF-4 γ	NR2A2		
	RXR α	NR2B1	9- <i>cis</i> -retinoic acid	Heterodimer
	RXR β	NR2B2		
	RXR γ	NR2B3		
	TR2	NR2C1	Unknown	Homodimer/heterodimer
	TR4	NR2C2		
	TLX	NR2E1	Unknown	Monomer/homodimer
	PNR	NR2E3		
	COUP-TF I	NR2F1	Unknown	Homodimer/heterodimer
	COUP-TF II	NR2F2		
	EAR2	NR2F6		
	3	ER α	NR3A1	17 β -estradiol
ER β		NR3A2		
ERR α		NR3B1	Unknown	Monomer/homodimer
ERR β		NR3B2		
ERR γ		NR3B3		
GR		NR3C1	Glucocorticoid	Homodimer
MR		NR3C2	Aldosterone	Homodimer
PR		NR3C3	Progesterone	Homodimer
4	AR	NR3C4	Testosterone	Homodimer
	NGFIB	NR4A1	Unknown	Monomer/homodimer/heterodimer
5	NURR1	NR4A2		
	NOR1	NR4A3		
	SF-1	NR5A1	Phosphatidylinositols	Monomer
6	LRH-1	NR5A2	Phosphatidylinositols	Monomer
	GCNF	NR6A1	Unknown	Homodimer
0	DAX-1	NR0B1	Unknown	Heterodimer
	SHP	NR0B2	Unknown	Heterodimer

Tableau 1 : Les récepteurs nucléaires chez les Mammifères classés selon leur nomenclature, leurs ligands naturels et leurs états fonctionnels, **Khorasanizadeh and Rastinejad, 2016.**

Plusieurs classifications des récepteurs nucléaires existent, en fonction des similitudes des domaines connus tels que les DBDs et LBDs (Aranda and Pascual, 2001 ; Burris et al., 2013). Néanmoins, la classification phylogénique n'est pas la seule classification possible des récepteurs nucléaires. Dans la littérature, les RNs sont décrits en fonction de plusieurs paramètres tels que les alignements de séquences, les domaines connus et décrits à ce jour (NTD, DBD, Région charnière, LBD...), les structures tridimensionnelles présentes dans la banque de données protéiques PDB, ainsi que les régions désordonnées. Pour regrouper plusieurs de ces paramètres et permettre une

visualisation globale de ce qui est décrit à ce jour dans la littérature, les sous-familles les plus connues ont été regroupées et alignées en fonction des données connues d'après Uniprot, IUPred2a, la taille des domaines visuellement proportionnelle au nombre d'acides aminés ainsi que le nombre de structures connues en fonction des domaines dans la PDB (**Figure 5**). Cet alignement a été réalisé grâce à un programme (**ProFeMap**) développé par Goran Bich, un doctorant de l'IGBMC dans l'équipe de Gilles Travé.

Les RNs de **classe I** interagissent sous forme d'**homodimères** au niveau des éléments de réponses sur l'ADN, et leurs *Response Element* (RE) sont organisés sous forme de séquences répétées héxanucléotidiques palindromiques inversées (*Inverted Repeat IR*) formés de deux hexamères de nucléotides répétés en tête-à-tête, et ces répétitions sont séparées entre elles par 3 paires de bases (IR3). Cette classe I inclue les récepteurs stéroïdiens tels que les récepteurs aux œstrogènes (ER), aux androgènes (AR), aux progestérones (PR), ou encore aux glucocorticoïdes (GR). Ces RNs sont spécifiquement activés par la liaison de forte affinité à différentes hormones (Aagaard et al., 2011). Dans la majorité des cas, cet hexamère correspond au motif 5'-AGAACA-3', à l'exception de ER qui reconnaît l'hexamère 5'-AGGTCA-3' (**Figure 6**).

Pour être actifs, les RNs de **classe II** forment obligatoirement des **hétérodimères** avec un membre particulier de cette superfamille de RNs : le récepteur X des rétinoïdes **RXR** (*Retinoid X Receptor*). Cette classe II de RNs contient les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes (PPARs) ou encore les récepteurs nucléaires des oxystérols (LXR pour *Liver X Receptor*). Ces récepteurs sont principalement localisés dans le noyau (Bugge et al., 2009). Les RNs se lient à la **séquence hexamérique** 5'-AGGTCA-3' répétée en tandems directes ou *Direct Repeat* (DR), espacée d'un nombre variable de 0 à 5 paires de bases (pb) (notée DR0 à DR5) (**Figure 6**). Chacun de ces hétérodimères se fixe préférentiellement à une séquence DR particulière. La variabilité des motifs DRs, ainsi que les séquences adjacentes permettent d'augmenter le degré de spécificité entre les différents récepteurs nucléaires, permettant la liaison des hétérodimères aux promoteurs des différents gènes cibles possédant chacun leur motif préférentiel (Mangelsdorf and Evans, 1995). Il a récemment été montré que la spécificité de liaison à l'ADN des RNs de type II est entièrement définie par des préférences à certains espaceurs entre les séquences DR.

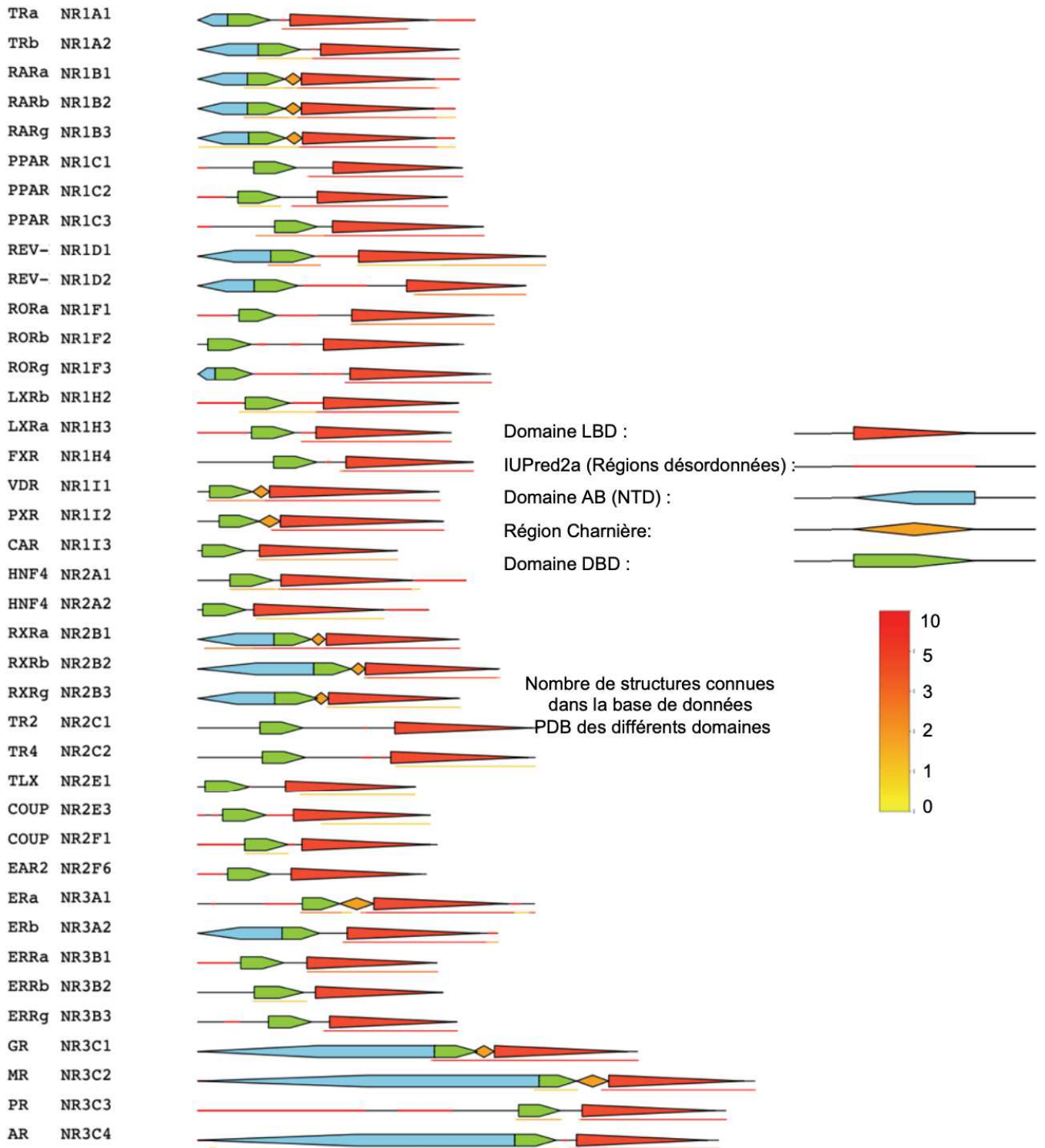


Figure 5 : Alignement des sous-familles de récepteurs nucléaires en fonction des domaines connus dans la littérature, des régions désordonnées ainsi que le nombre de structures disponibles sur les bases de données (PDB, IUPred2a, Uniprot), **ProFeMap (Goran Bich 2020)**.

Il a été mis en évidence deux modes d'interactions : l'interaction avec le site de liaison entier ou la moitié du site de liaison, correspondant aux séquences de longueurs variables qui espacent les hexanucléotides de chaque élément de réponse DR (Penvose et al., 2019). Cependant, la compréhension de la spécificité de reconnaissance des éléments de réponse à l'ADN par les différents RNs reste insuffisante à ce jour.

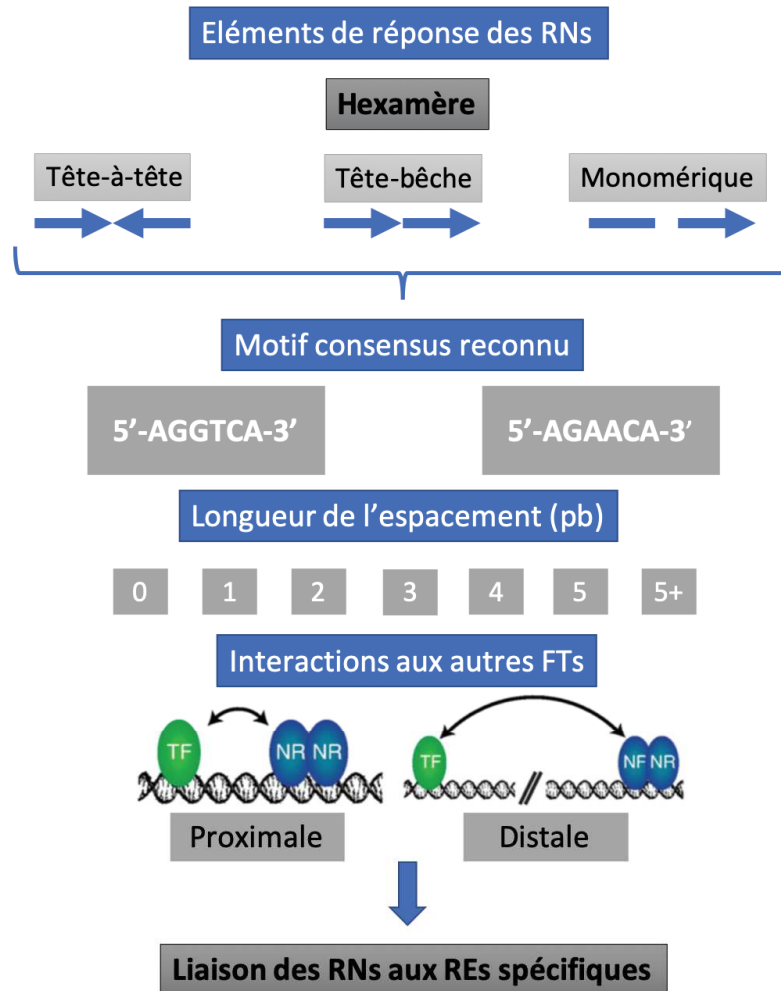


Figure 6 : Liaisons spécifiques des RNs à l'ADN exploitant des séquences multiples aux fonctions structurales diverses et variées.

Certains récepteurs forment une classe mal définie à ce jour (**classe III**) et ont une forte homologie avec les récepteurs aux œstrogènes, appelés ERR (pour *Estrogen Receptor Related*). Ils sont capables de se lier sous forme d'homodimères ou de monomères à l'ADN. Ces récepteurs ne lient cependant pas des ligands de type œstrogènes, et sont donc considérés actuellement comme des récepteurs « orphelins » (Deblois and Giguère, 2013). Comme vu précédemment, les RNs

possèdent trois modalités d'actions distinctes : ils agissent sous forme d'**homodimères**, d'**hétérodimères** ou encore de **monomères** (**Tableau 1**). En effet, presque tous les RNs agissent sous forme dimérique, à l'exception de certains tels que SF-1 ou encore NGFI-B, qui se fixent sous forme monomérique sur des demi-sites formés d'un unique hexamère (Wilson et al., 1993).

Les RNs sont impliqués dans de nombreuses pathologies ayant pour conséquence le dérèglement de l'expression des gènes cibles, et engendrent plusieurs types de cancers comme le cancer de la prostate, du rectum, du colon, du sein ou encore de la vessie. Étudier leurs mécanismes d'action et comprendre leurs fonctions permettrait à terme de développer des ligands synthétiques pour cibler thérapeutiquement ces récepteurs nucléaires. Dans cette étude, le **récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes** (PPARs) et son rôle dans le **cancer de la vessie** sera particulièrement étudié.

3. Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes : PPARs

Parmi la superfamille des RNs, les **récepteurs nucléaires activés par les proliférateurs de peroxyosomes** « *Peroxisome Proliferator Activated Receptor* » ou PPAR jouent un rôle important dans la régulation de gènes. Ils sont impliqués dans plusieurs voies métaboliques telles que le contrôle du cycle cellulaire, dans la pathogenèse du diabète de type 2, l'obésité, la carcinogenèse ou encore l'inflammation et l'athérosclérose (Barish, 2006) (Lefterova et al., 2010) . Les PPARs contrôlent plus particulièrement l'expression de réseaux de gènes impliqués dans l'**adipogenèse**, le métabolisme des lipides, l'inflammation et le maintien de l'homéostasie métabolique. Il existe trois isotypes de PPAR : **PPAR α** (NR1C1), **PPAR β/δ** (NR1C2) et **PPAR γ** (NR1C3) exprimés dans divers tissus (Ahmadian et al., 2013a). Pour être actifs, ils forment un hétérodimère avec le récepteur RXR afin de réguler les gènes cibles en se liant sur leurs éléments de réponses à l'ADN ou **PPRE** (pour *PPAR Response Element*) (**Figure 7**).

Bien qu'ils soient connus comme récepteurs aux acides gras retrouvés dans l'alimentation courante tels que les acides oléiques, linoléiques et linoléiques, les PPARs se lient également à divers métabolites lipidiques, notamment la prostaglandine J2, l'acide 8S-hydroxyéicosatétraénoïque et une série de phospholipides oxydés. Malgré leurs nombreuses similitudes, chaque isotype de PPAR a des fonctions uniques *in vivo*, probablement en raison de la distribution tissulaire distincte, des

réponses différentielles à des ligands distincts et des différences inhérentes des propriétés biochimiques.

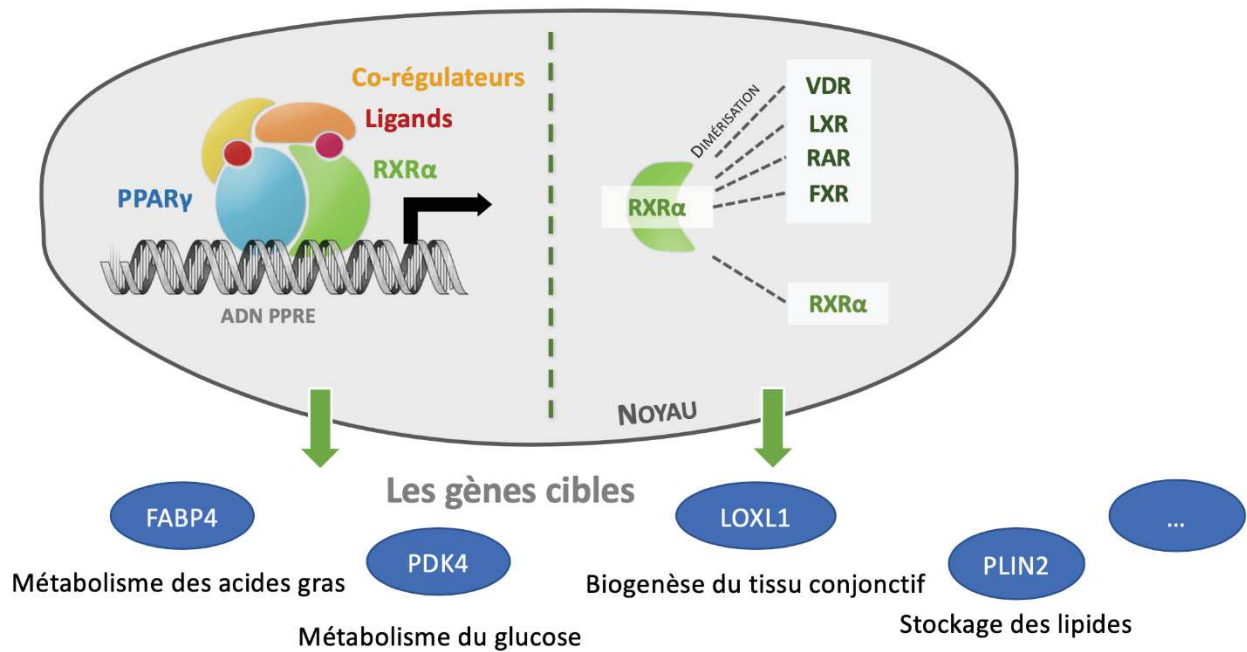


Figure 7 : Mécanisme d'action général du récepteur nucléaire PPAR γ , sa distribution tissulaire et les voies métaboliques qu'il régule.

a. Les différents isotypes de PPARs et leur répartition tissulaire

i. PPAR α

PPAR α (ou NR1C1 pour *Nuclear Receptor subfamily 1 group C member 1*) est le premier PPAR identifié, principalement exprimé dans les tissus où le catabolisme des acides gras est important, tels que les muscles, le foie, le cœur ou les reins (Chinetti et al., 2000). Ce facteur de transcription est un régulateur majeur du métabolisme des lipides dans le foie (**Figure 8**). PPAR α régite de nombreux processus biologiques en modifiant l'expression d'un grand nombre de gènes ciblés, régulant l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines. Ce récepteur est principalement activé par la liaison de ligands endogènes naturels ou synthétiques (Sher et al., 1993).

PPAR α est naturellement activé par divers dérivés d'eicosanoïdes, constituant une vaste famille de dérivés d'oxydation d'acides gras polyinsaturés à 20 atomes de carbone, comme l'acide arachidonique, le précurseur le plus abondant, à travers la voie métabolique impliquant la protéine

enzymatique lipoxygénase. Cette voie permet de catalyser l'oxydation des acides gras. La biosynthèse des eicosanoïdes permet de générer trois types de composés : les leucotriènes, les prostaglandines et les thromboxanes (Delerive et al., 2000).

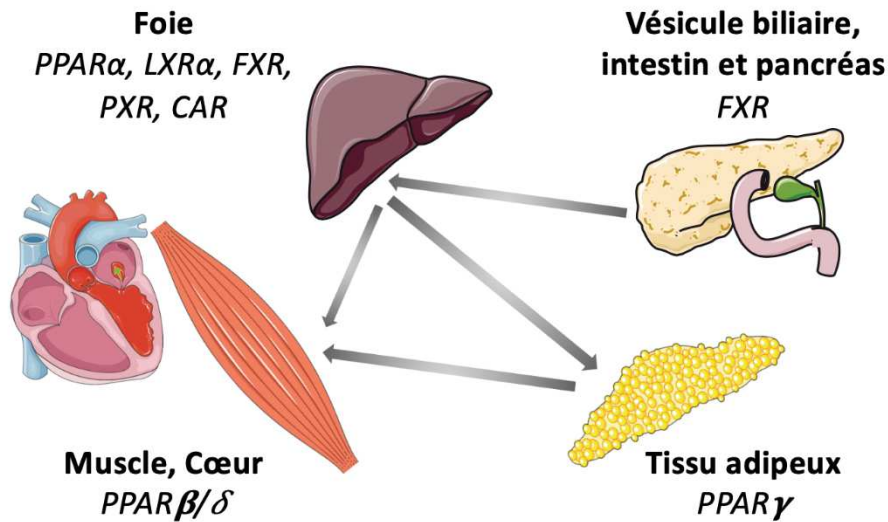


Figure 8 : Homéostasie métabolique et répartition tissulaire entre les différents isotypes des PPARs.

Des ligands synthétiques sont connus pour se lier à PPARα, ces ligands sont appelés « **fibrates** », composés appartenant à une famille de molécules médicamenteuses hypolypémiantes (Evans and Mangelsdorf, 2014). Ces molécules synthétiques ont été développées pour réguler le taux de cholestérol et/ou de triglycérides. Ils sont prescrits lors d'un diagnostic d'hypertriglycéridémies pures mais également des dyslipidémies par exemple. Ils peuvent aussi être prescrits dans des cas d'hypercholestérolémies. L'hétérodimérisation de PPARα avec le récepteur RXR est requise pour assurer l'activité de transactivation des gènes cibles tels que *PDK4*, *ACOX1* ou encore *CPT1*.

ii. PPARβ/δ

PPARδ, également appelé **PPARβ** ou plus communément **PPARβ/δ** (ou NR1C2 pour *Nuclear Receptor subfamily 1 group C member 2*) partage des fonctions similaires avec PPARα. Il est exprimé de manière ubiquitaire et joue un rôle crucial dans l'oxydation des acides gras dans les tissus métaboliques tels que les tissus rénaux, le muscle squelettique, le foie, et le cœur (Barish, 2006) (**Figure 8**). De par sa localisation ubiquitaire et l'absence de ligands spécifiques connus, ce membre de la famille des PPARs reçoit une plus faible attention. Cette sous-famille de PPAR reste à ce jour

la plus énigmatique et la moins caractérisée dans la littérature. Néanmoins, des études ont montré le rôle important de PPAR δ/β dans le métabolisme lipidique, la dépense énergétique ainsi que l'athérosclérose (Evans et al., 2004). Certains ligands agonistes en phase clinique pour traiter l'obésité sur des singes ont été développés (GW501516), afin de diminuer le taux de triglycérides du plasma chez des singes ayant une forte densité de lipoprotéines. Ces essais cliniques ont pour but de traiter des cas d'hyperlipidémies chez les patients. Ces études ont mis en évidence l'importance de PPAR β/δ qui semble être un régulateur clé du processus de combustion des graisses.

iii. PPAR γ

PPAR γ (NR1C3) est impliqué dans diverses voies métaboliques, particulièrement l'**adipogenèse**. Il a un intérêt fondamental et clinique puisqu'il intervient dans des processus physiopathologiques importants, tels que la différenciation, la résistance à l'insuline, le diabète de type 2, l'athérosclérose, ou encore plusieurs cancers tels que les cancers de la vessie et de la prostate. PPAR γ a des ligands activateurs endogènes connus qui sont les acides gras et leurs dérivés : les **eïcosanoïdes**, famille d'acides gras insaturés, dont le principal est l'**acide arachidonique**. Il s'agit donc d'une famille de molécules complexes à 20 atomes de carbone. Les molécules comme le 15-désoxy- Δ 12,14 prostaglandine-J2, et des composants des LDL oxydés tels que les acides 9- et 13-hydroxyoctadécadiénoïque, constituent des ligands naturels plus spécifiques pour le PPAR γ (Nagy et al., 1998). PPAR γ est une cible thérapeutique majeure, et plusieurs ligands synthétiques de forte affinité sont développés pour se lier à PPAR γ . Ces ligands appartiennent notamment à la famille des **thiazolidinediones** (TZD) ou **glitazones**, et certains exemples comme la rosiglitazone, la troglitazone ou encore la pioglitazone ont été utilisés en recherche clinique pour leurs propriétés de sensibilisation de la réponse à l'insuline et donc dans le traitement du **diabète de type 2**. Néanmoins, des effets secondaires ont été observés, et ces molécules ont été retirées du marché pharmaceutique.

Chez l'Homme, le gène *PPARG* est situé sur le chromosome 3. Quatre ARN messagers (ARNm) différents ont été identifiés, aboutissant à l'expression de deux isoformes après l'étape de traduction : **PPAR γ 1** est codé par les ARNm *PPARG1*, *PPARG3* et *PPARG4*, tandis que **PPAR γ 2** est codé par l'ARNm *PPARG2* (**Figure 9.A et 9.B**). Ces deux protéines diffèrent par leur extrémité N-terminale, où l'isoforme PPAR γ 2 possède une extension protéique de 28 acides aminés (Sundvold and Lien, 2001). Il faut noter que tout au long de cette thèse, la numérotation des acides aminés utilisée correspond à celle de l'**isoforme PPAR γ 2**.

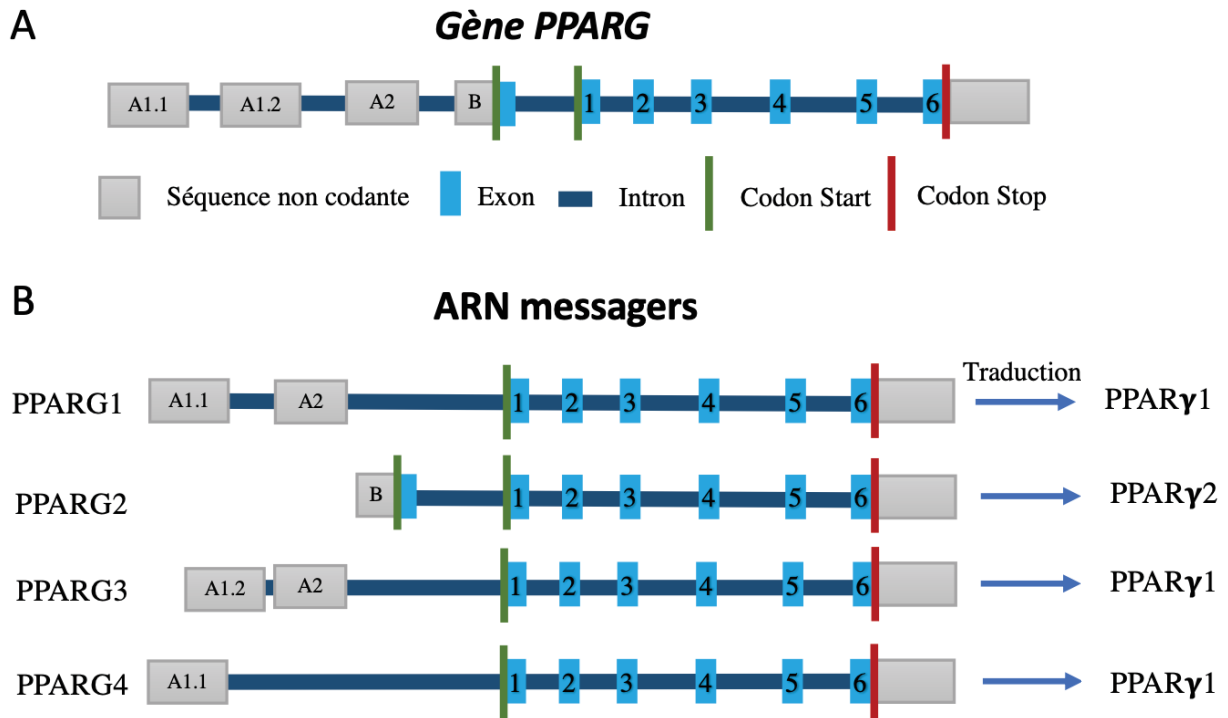


Figure 9 : Les différents transcrits et les isoformes du gène PPARG

A : Structure générale du gène PPARG, **B** : Structure des quatre ARNm et les protéines exprimées après leur traduction, *Adaptée de Aprile et al., 2014.*

Alors que PPAR γ 1 est exprimé dans de nombreux tissus, l'expression de PPAR γ 2 est limitée au tissu adipeux dans des conditions physiologiques, mais peut être induite dans d'autres tissus par un régime riche en graisses (Sarraf et al., 2012). Enfin, PPAR γ 3 est exprimé à la fois au sein des tissus adipeux ainsi qu'au sein de l'épithélium du côlon. Mais cette isoforme a un taux élevé d'expression dans le noyau des macrophages humains (Fajas et al., 1998). Plusieurs études ont par ailleurs montré le rôle principal de l'isoforme PPAR γ 3 dans le contrôle de l'adipogenèse ainsi que le maintien de l'homéostasie lipidique.

L'hétérodimérisation de PPAR γ avec le récepteur nucléaire RXR est requise pour assurer l'activité de transactivation des gènes cibles. Une fois hétérodimérisé, le complexe se lie sur l'élément de réponse à l'ADN (PPRE), l'interaction avec ses coactivateurs et ses ligands naturels est permise, permettant ainsi l'initiation de la transcription des gènes cibles.

b. Organisation modulaire des PPARs

Les récepteurs nucléaires possèdent une architecture structurale modulaire (**Figure 10A et 10B**), et contiennent les domaines suivants (Gronemeyer et al., 2004):

- Un **domaine A/B** qui est un domaine régulateur en N-terminal (**NTD**), contenant la fonction d'activation 1 (**AF-1**) dont l'action est ligand-indépendante. Cette région modulaire est la plus variable, aussi bien en taille qu'en séquence. Le domaine NTD est également la cible de modifications post-traductionnelles (PTMs) telles que des phosphorylations médiées par différentes voies de signalisation pouvant affecter significativement l'activité transcriptionnelle (Shao and Lazar, 1999). Les régulations transcriptionnelles nécessaires à l'expression de gènes d'intérêts sont également dépendantes du domaine N-terminal flexible (NTD) permettant d'augmenter la spécificité de chaque RN. Les différents protagonistes impliqués tels que les différents cofacteurs se liant aux RNs, les ligands, le domaine DBD et sa spécificité pour un élément de réponse à l'ADN ainsi que les modifications post-traductionnelles (PTMs) connues, peuvent moduler par des changements conformationnels les domaines NTD des RNs. En effet, de par les différentes interactions de chaque domaine, le domaine NTD au préalable désordonné en solution acquièrent un degré élevé de structuration en réponse aux différents effecteurs impliqués aboutissant à la transactivation des gènes cibles (**Figure 11**).
- Un **domaine C** de liaison à l'ADN (**DBD**), hautement conservé ; il est constitué de 60 à 70 acides aminés, contient deux doigts de zinc coordonnés chacun par 4 cystéines et d'une extension terminale COOH (CTE). Des structures tridimensionnelles de DBDs ont été obtenues par cristallographie aux rayons-X et par résonance magnétique nucléaire (RMN) (Schwabe et al., 1993) (Osz et al., 2015) et ces domaines ont été étudiés par dynamique moléculaire (Huang et al., 2013).
- Un **domaine D** qui est un domaine **charnière** flexible permet de lier le DBD au domaine de fixation au ligand (LBD) (**Figure 10A**), connu pour être une région très flexible pour la plupart des récepteurs nucléaires, permettant d'accommoder les différentes conformations du DBD et du LBD. La région D contient néanmoins une séquence de localisation nucléaire NLS (Guiochon-Mantel et al., 1994).

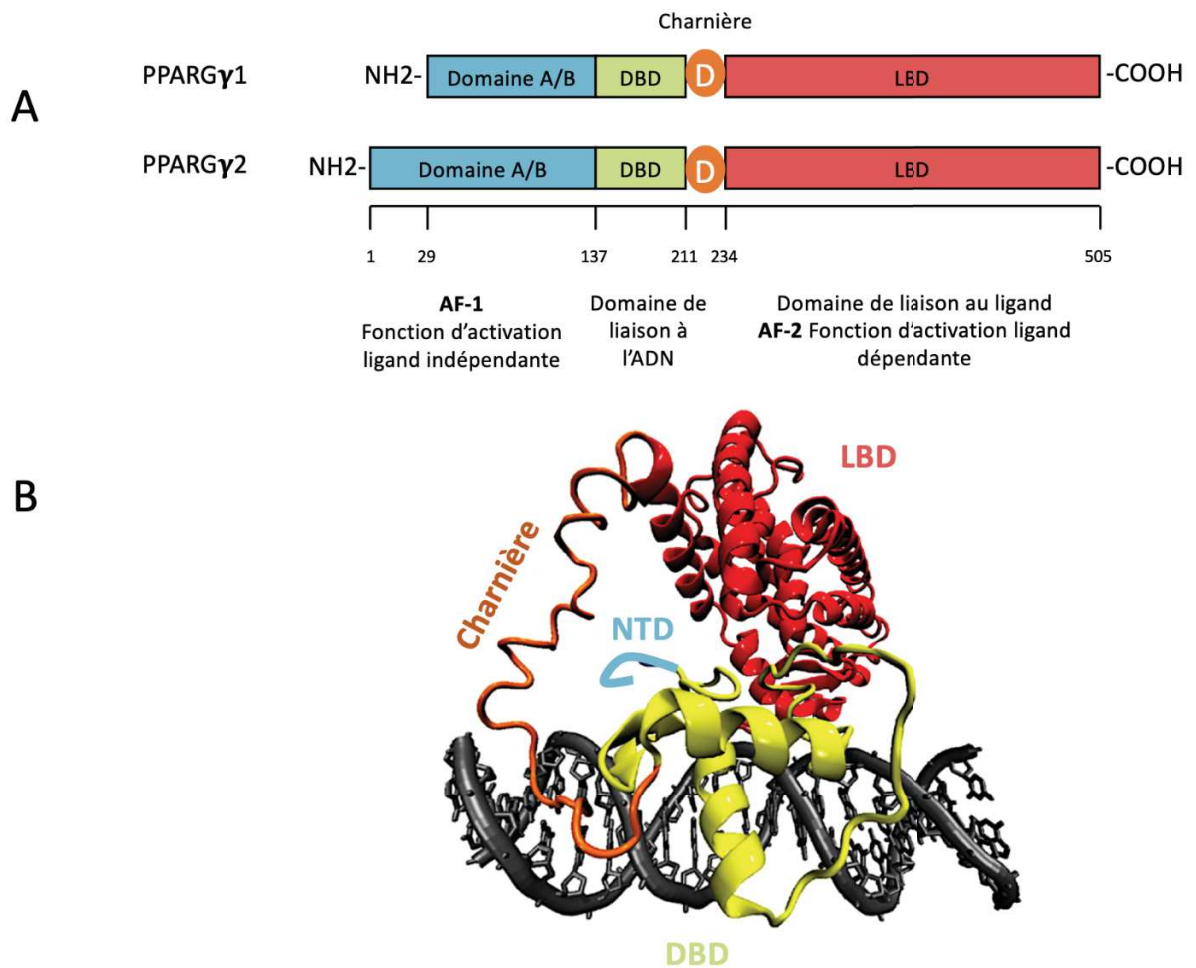


Figure 10 : Structure modulaire de PPAR γ 1 et PPAR γ 2 et les fonctions des domaines qui les composent, **A** : Schéma général de l'organisation modulaire des domaines fonctionnels de PPAR γ ; **B** : Structure tridimensionnelle des différentes interactions inter-domaines de PPAR γ , Code PDB : 3DZY, Adaptée de Aagaard et al., 2011.

- Un **domaine E** qui est un domaine de fixation au ligand (**LBD**), modérément conservé en séquence et hautement conservé en structure entre les différents récepteurs nucléaires. Le domaine LBD est constitué d'environ 250 acides aminés, et présente une bonne conservation intra et inter-espèces (Laudet et al., 1992). Avec le DBD, le LBD contribue à l'interface de dimérisation du récepteur permettant la liaison aux protéines coactivatrices et corépressives. Il intervient donc dans la formation d'homodimères et d'hétérodimères. Ce domaine contient également deux motifs très conservés : un motif dit « signature » nommé Ti et la fonction d'activation 2 (**AF-2**) au niveau terminal COOH, dont l'action est ligand-dépendante (Wurtz et al., 1996) ou actif sans ligand (certains récepteurs nucléaires dits « orphelins »). De nombreuses structures tridimensionnelles de LBDs ont été

résolues, mettant en évidence une forte similarité de structures entre les LBDs de différents RNs, suggérant une **structure canonique** pour les divers membres de cette superfamille.

- Le **domaine F** est un domaine hautement variable situé à l'extrémité C-terminale des récepteurs nucléaires dont la fonction est encore mal connue à ce jour.

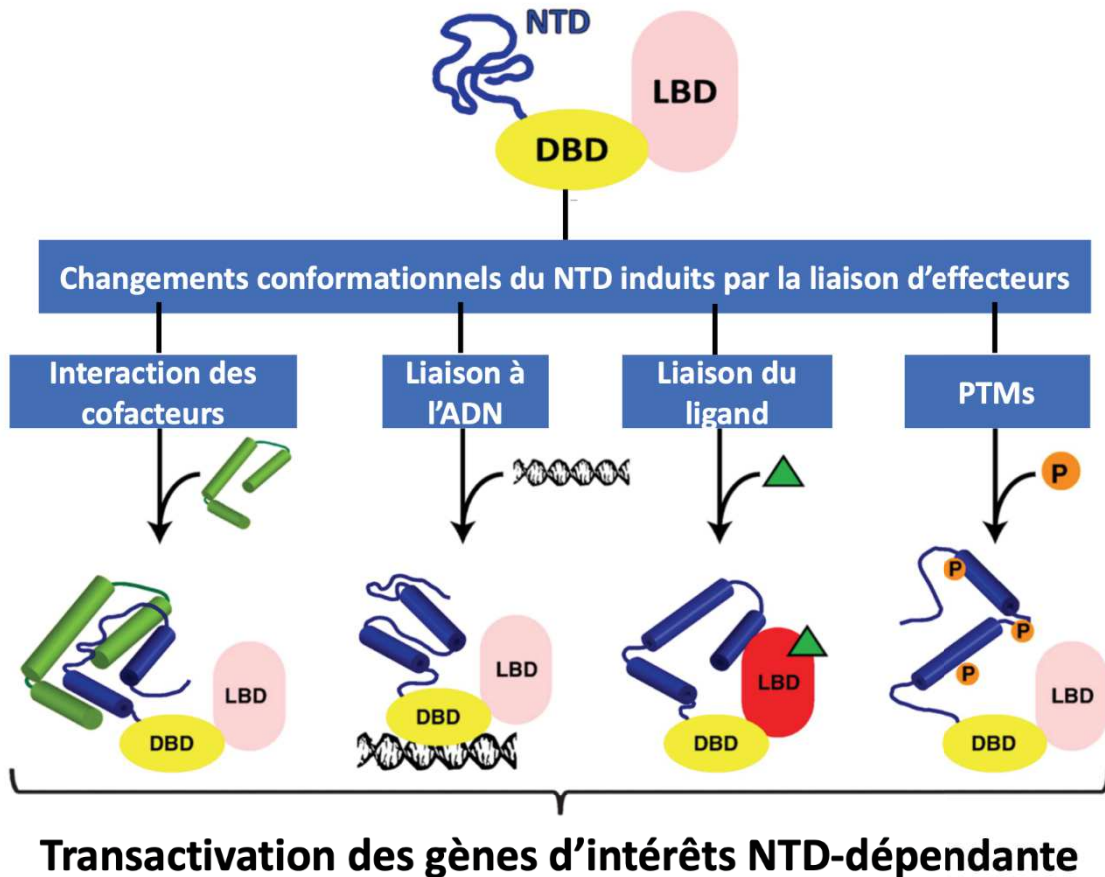


Figure 11 : Transactivation de gènes cibles en partie dépendante du domaine N-terminal NTD flexible grâce à l'interactions et à l'action des différents protagonistes, *Adaptée de Aagaard et al., 2011.*

Tout au long de ce manuscrit, nous allons particulièrement focaliser l'analyse et la description du mécanisme d'action du récepteur nucléaire de type II, **PPAR γ** , plus particulièrement l'isoforme **PPAR γ 2**. Ce dernier possède tous les domaines structuraux décrits précédemment. Néanmoins l'extrémité C-terminale (domaine F) contient seulement trois acides aminés, ce qui, ne constituent pas un domaine structural à part entière.

c. Mécanisme de liaison à l'ADN : Les DBDs

i. Généralités

Le **domaine de liaison à l'ADN** est un des domaines les plus conservés dans la superfamille des récepteurs nucléaires, composé d'un domaine structuré de 66 acides aminés. La diversité du répertoire des éléments de réponses aux hormones provient de la répétition de ces séquences. Cette reconnaissance se fait simultanément à la dimérisation des domaines de liaison à l'ADN (DBDs) (**Figure 10B**). Seuls les DBDs sont capables de reconnaître ces séquences spécifiques sur l'ADN et de générer un profil de dimérisation semblable à celui d'un récepteur nucléaire entier. Les études structurales des DBDs sous forme monomérique ou dimérique au cours du temps ont permis de comprendre le principe régissant la reconnaissance des éléments de réponses spécifiques à l'ADN ainsi que le mécanisme de dimérisation (Schwabe et al., 1993).

En effet, le cœur du domaine de liaison à l'ADN des RNs présente une structure globale similaire. Les séquences consensus reconnues sont répétées en tandem, en palindromes ou de manière inversées.

Le DBD se replie autour de deux motifs de liaison aux zincs indispensables pour l'un au repliement du domaine et à la dimérisation (**boîte-D**), et pour l'autre à sa liaison à l'ADN (**boîte-P**). Chaque atome de zinc est coordonné par 4 cystéines conservées (**Figure 12**). Un premier motif en doigts de zinc est donc impliqué dans l'interaction spécifique à l'ADN, le deuxième dans l'interface de dimérisation permettant la formation de dimères coopératifs (Rastinejad et al., 1995).

Les DBDs ont une structure globale sous forme de deux sous-domaines ayant l'organisation topologique suivante : Domaines en doigt de zinc/hélices/régions étendues. De plus, une extrémité C-terminale (CTE) est présente et des études structurales par RMN ont mis en évidence la présence d'une troisième hélice- α , contenant aussi des boîtes dites boîtes A et T, ayant un rôle dans la liaison à l'ADN de monomères. La structure générale des DBDs contient donc ces 4 séquences appelées « boîtes » (Boîtes D, P et boîtes A et T) et sont responsables de la liaison à l'ADN ainsi que de la dimérisation (Germain et al., 2003).

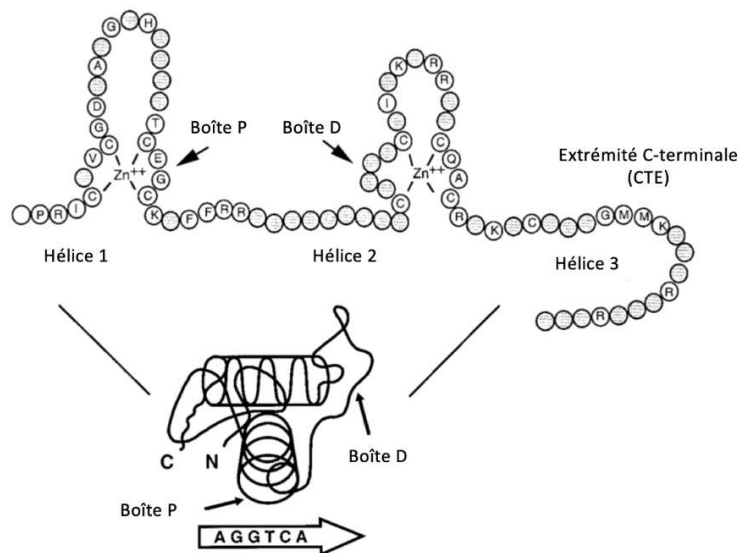


Figure 12 : Structure conservée en doigts de zinc du domaine de liaison à l'ADN (DBD) des récepteurs nucléaires, *Adaptée de Aranda and Pascual, 2001.*

Les premières structures 3D de DBDs ont été résolues par **crystallographie aux rayons-X** à partir des années 1990 permettent de décrire l'interface d'interaction ADN-protéine, notamment le DBD du récepteur nucléaire aux glucocorticoïdes (GR). Les deux hélices- α sont perpendiculaires l'une à l'autre, et leurs chaînes latérales hydrophobes permettent de former un domaine protéique globulaire en interaction avec les régions étendues (Luisi, 1991). Il y a trois modes de liaisons possibles à l'ADN (**Figure 13**). Les deux monomères au sein de l'homodimère formé par le récepteur aux glucocorticoïdes ont une orientation « **tête-à-tête** » sur l'élément de réponse à l'ADN (**Figure 13A**). Une autre orientation des DBDs a été mise en évidence par l'étude structurale de l'hétérodimère RXR-TR, où les deux monomères sont orientés de manière dite « **tête-bêche** » (**Figure 13B**) (Rastinejad et al., 1995). Il faut noter qu'un troisième mode de liaison à l'ADN est connu, notamment pour certains récepteurs nucléaires orphelins qui sont capables de lier l'ADN sous forme **monomérique** (**Figure 13C**).

ii. Le DBD de PPAR γ

PPAR γ est un récepteur nucléaire de **classe II**. Il forme un hétérodimère indispensable avec **RXR** afin d'engendrer la **transactivation** des gènes. Son élément de réponse PPRE reconnu par son domaine de liaison à l'ADN contient la séquence consensus 5'-AGGTCA-3'. Dans le cas de PPAR γ , l'élément de réponse reconnu par le DBD est de type répétition directe DR1 (*Direct Repeat 1*) (Aagaard et al., 2011).

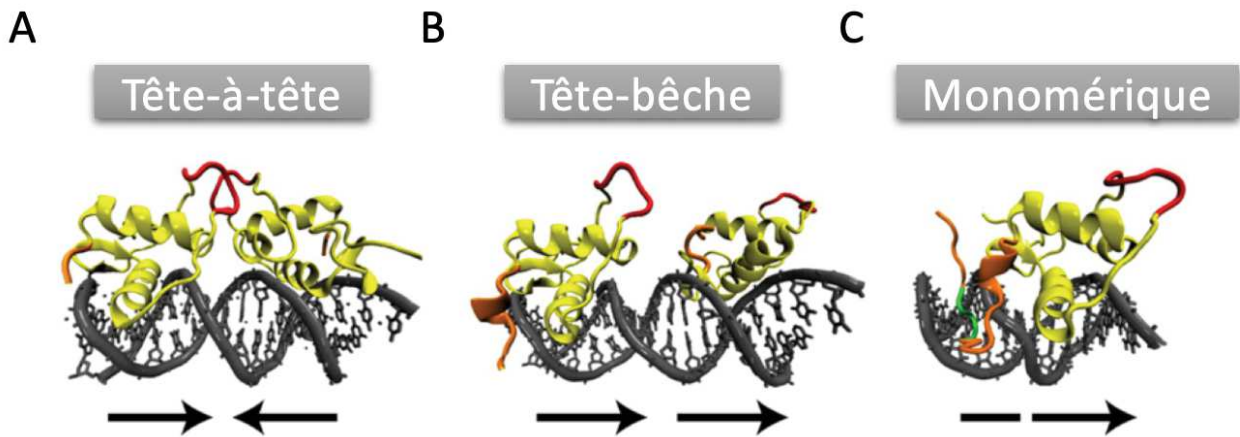


Figure 13 : Trois modes de liaison possibles à l'ADN des différentes classes de récepteurs nucléaires, **A** : **Classe I**, code PDB 1YNW, **B** : **Classe II**, code PDB 1LO1, **C** : **Classe III**, code PDB 1HCQ, *Adaptée de Aagaard et al., 2011.*

La première structure de PPAR γ en complexe avec RXR α a été résolue par cristallographie aux rayons-X en 2008 (Chandra et al., 2008). Comparée aux autres structures de DBDs connues dans les banques de données, on peut remarquer une forte homologie de séquence ainsi qu'un haut niveau de conservation structural.

PPAR γ voit donc ses domaines DBD et LBD proches dans l'espace tridimensionnel en contraste avec d'autres RNs comme RXR α qui voit, quant à lui ses deux domaines DBD et LBD éloignés dans l'espace, permettant au domaine LBD de PPAR γ de s'insérer entre ces deux derniers (**Figure 14**).

Comparée à certains DBDs d'autres RNs ayant une extension carboxy-terminale (CTE) courte, la CTE de PPAR γ forme de fortes interactions avec l'ADN permettant la reconnaissance d'une séquence d'ADN en amont du site héxanucléotidique contenant un motif AACT supplémentaire (**Figure 15**).

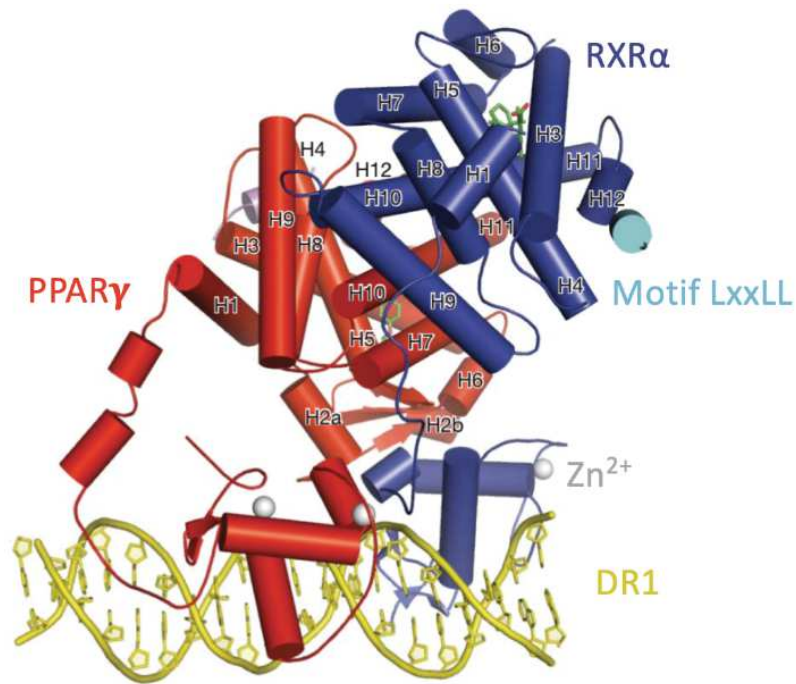


Figure 14 : Première structure du complexe entier PPAR γ -RXR α -Corégulateur lié à son élément de réponse à l'ADN (PPRE) de type DR1 (Direct Repeat 1), *Adaptée de Chandra et al., 2008.*

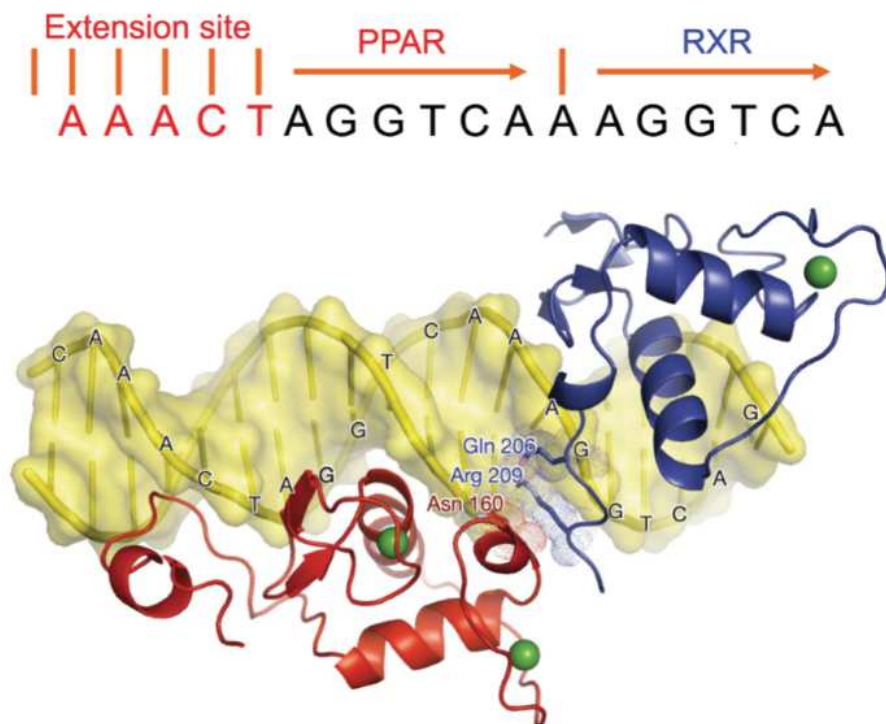


Figure 15 : Mode de liaison « tête-bêche » du complexe PPAR γ -RXR α à l'élément de réponse DR1 et son site d'extension spécifique en 5', *Chandra et al., 2008.*

d. Mécanisme d'activation ligand-dépendant de PPAR γ : les LBDs

i. Structures cristallographiques du domaine LBD de PPAR

De nombreuses structures tridimensionnelles de LBDs ont été résolues par différentes techniques de biologie structurale telles que la cristallographie aux rayons-X et la RMN (Bourguet et al., 1995), sous forme non-ligandée (*apo*) ou ligandée (*holo*), et ont permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la liaison du ligand. Les premières évidences d'un changement conformationnel du LBD lors de la fixation du ligand résultent des structures tridimensionnelles du domaine LBD des récepteurs nucléaires RXR α et RAR sous forme non ligandée *apo* ainsi que sous forme ligandée *holo* (Egea et al., 2000) en présence de son ligand naturel l'**acide 9-*cis* rétinolique (9*cis*-RA)**. Une forte similitude des structures de LBDs révèle une **structure canonique** commune à la superfamille des RNs.

Les LBDs sont composés de **12 hélices-alpha** conservées, numérotées de H1 à H12 et d'un feuillet β antiparallèle constitué de 4 brins β (**Figure 16**). Cependant, PPAR γ possède une structure particulière supplémentaire comparé aux autres RNs et contient une hélice-alpha supplémentaire, nommée H2', située entre le feuillet β et l'hélice H3. Cette particularité structurale semble permettre un meilleur accès aux différents ligands (Nolte et al., 1998a). L'organisation structurale des LBDs possède un repliement de type « sandwich » d'hélices- α en trois couches. Une couche centrale formée par trois hélices est comprise entre deux couches supplémentaires créant une cavité : la **poche de liaison au ligand** (ou *Ligand Binding Pocket*, la **LBP**). Cette partie est essentiellement hydrophobe et enfouie dans la partie inférieure du domaine LBD. Les interactions avec le ligand peuvent être nombreuses en fonction de la nature du ligand, et impliquent différentes parties du LBD lors de ces liaisons. Ces structures ont confirmé l'existence d'un repliement de l'hélice- α H12 en présence de ligands agonistes, en passant d'une conformation ouverte à une conformation fermée bloquant ainsi l'accès à la poche de fixation du ligand.

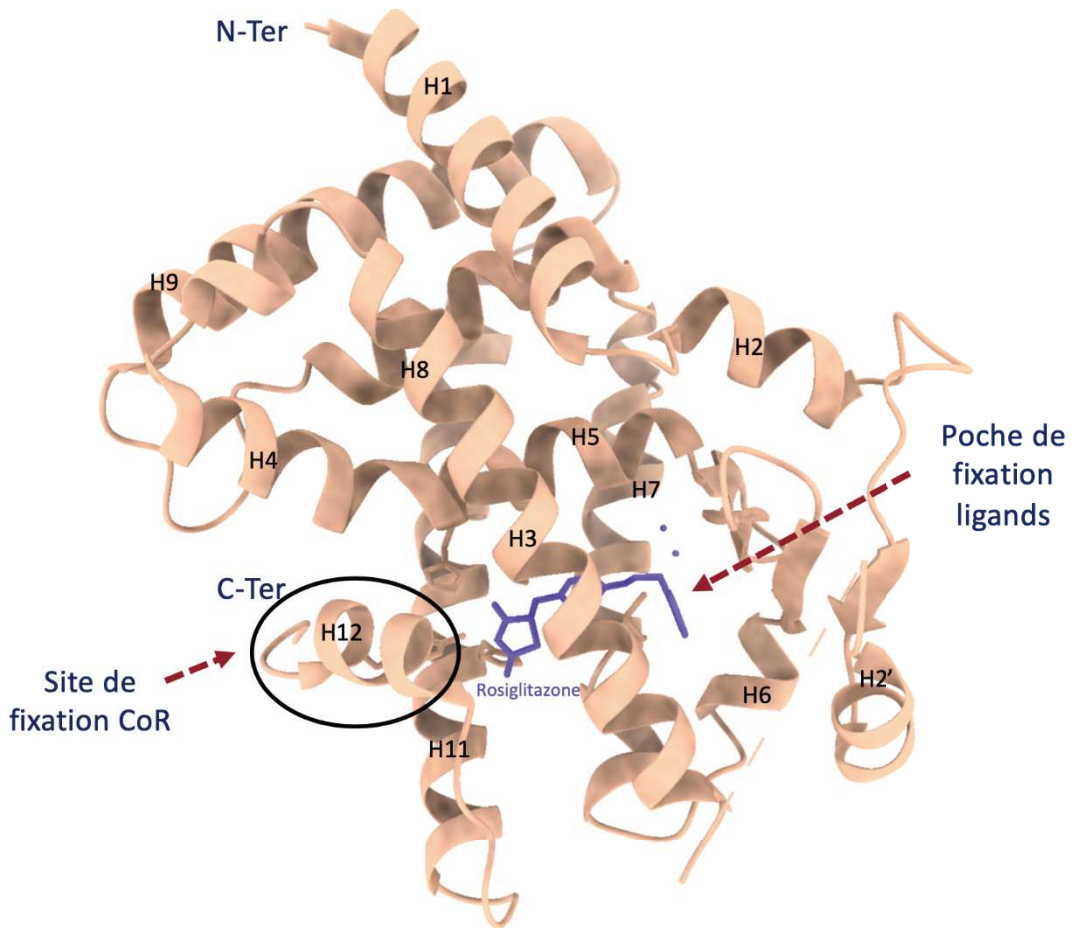


Figure 16 : Structure tridimensionnelle du domaine de liaison au ligand (LBD) de PPAR γ et les sites de fixation du ligand (rosiglitazone ici en violet) et du corégulateur (CoR) au niveau de l'hélice H12, Code PDB : 4EMA.

La présence du ligand agoniste provoque donc un changement conformationnel permettant au LBD d'adopter une conformation favorisant le recrutement d'autres partenaires cellulaires tels que les coactivateurs. Les ligands agonistes et antagonistes se lient à la LBP au niveau du LBD mais stabilisent différemment les régions de la poche du récepteur. La différence principale se situe au niveau de l'hélice 12 qui adopte une conformation différente, en présence d'un type particulier de ligand **agoniste**, **antagoniste** ou **inverse agoniste** par exemple, impactant ainsi d'une manière différente l'affinité de recrutement des corégulateurs.

ii. Poche de fixation du ligand (LBP)

Les interactions avec un ligand d'un type donné peuvent être nombreuses et incluent différentes parties de la poche de liaison au ligand.

Différents types de ligands sont identifiés et chacun est spécifique à un récepteur nucléaire donné (Figure 17).

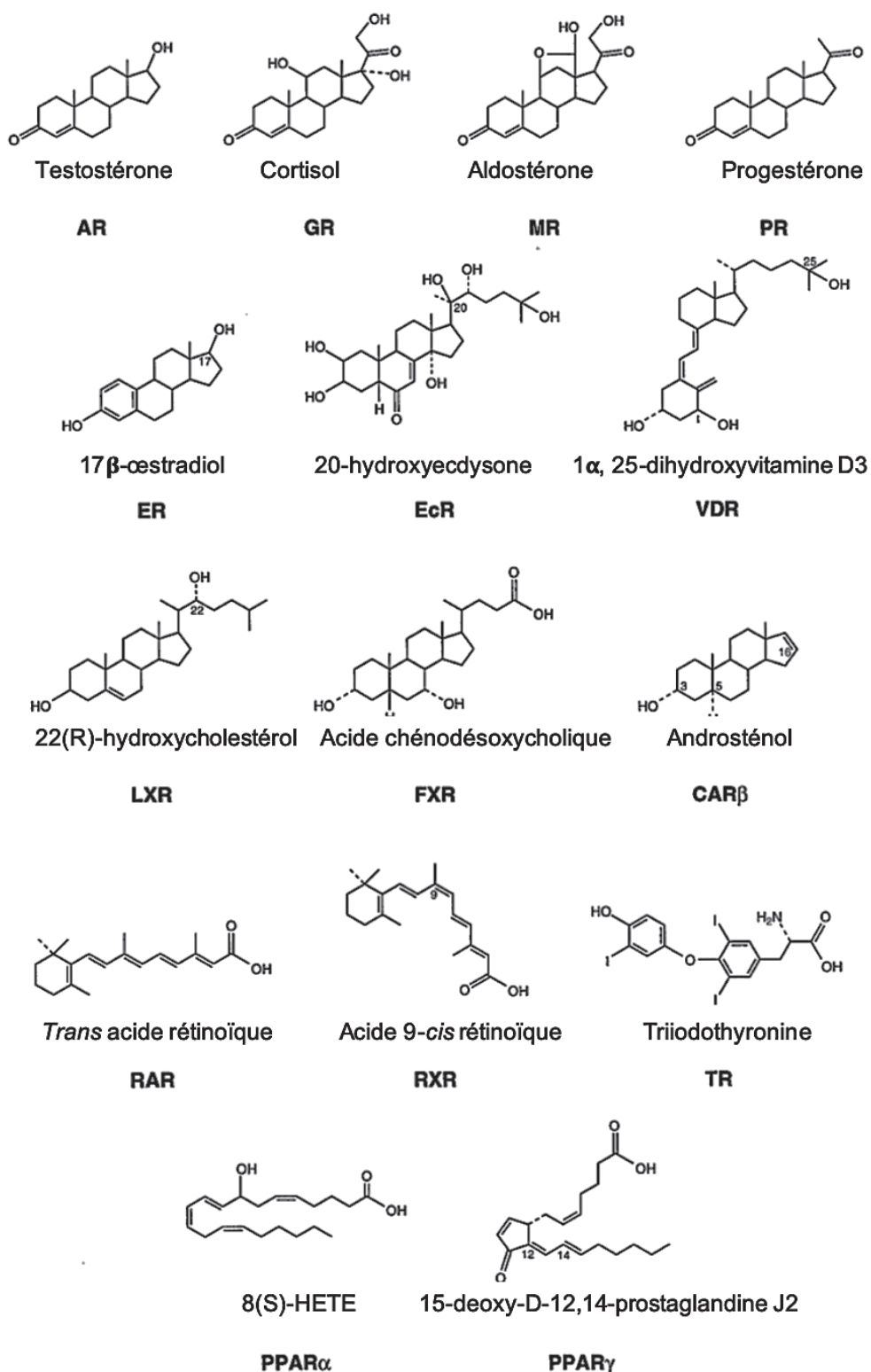


Figure 17 : Les ligands naturels des différents récepteurs nucléaires, *Adaptée de Renaud and Moras*, 2000.*

En dépit de leurs différents précurseurs, ces ligands partagent de nombreuses similitudes. Tous de taille modérée, ces molécules sont rigides, avec un degré d'hydrophobicité relativement élevé. Les groupements polaires sont capables de former des liaisons hydrogènes et des interactions électrostatiques, et sont souvent localisés aux extrémités de ces molécules.

Leur nature hydrophobe leur permet d'entrer dans les cellules par simple diffusion, et des mécanismes de transports actifs sont aussi impliqués. Des calculs de volumes ont permis de déterminer une échelle allant de 250 à 350 Å³ pour tous ces ligands connus. Ces similitudes de propriétés physico-chimiques suggèrent un mode de liaison similaire pour la famille des RNs, hypothèse confirmée par différentes études structurales de complexes ligand-LBD (Weatherman et al., 1999).

La taille de la poche de fixation varie en fonction des RNs ; elle est très grande dans le cas de PPAR γ notamment, soit 1300 Å (contre 600 Å pour les récepteurs aux hormones thyroïdiennes), une des plus grande LBP de la famille des récepteurs nucléaires (Nolte et al., 1998b), lui permettant de lier des molécules de taille très variée. Elle implique des interactions hydrophobes d'une part, et des liaisons hydrogènes entre les résidus polaires et les groupements hydroxyles d'un ligand donné par exemple d'une autre part, impliquant les hélices- α H2, H3, H11 et H12. Lors de la fixation du ligand, une compaction de l'ordre de 10 % du LBD est observée ainsi qu'un changement conformationnel permettant une réorientation des hélices impliquées. Cette réorientation permet ainsi de générer une surface d'interaction avec le ligand et contribue également à la stabilisation du repositionnement de l'**hélice H12** contenant la fonction d'activation **AF-2**. En effet, le changement conformationnel le plus remarquable lors de la fixation du ligand concerne l'hélice H12. Cette hélice est complètement exposée au solvant en condition *apo* non ligandée, et se repositionne au cœur du LBD dans la poche de fixation, refermant ainsi cette dernière en condition *holo*, ligandée. En fonction de la nature du ligand et de ses propriétés, plusieurs conformations sont décrites dans la littérature : on parle de **conformation agoniste** ou **antagoniste** en fonction du positionnement structural de H12 (Kojetin and Burris, 2013) (**Figure 18**).

La conformation *holo*-agoniste est stabilisée par des interactions directes et indirectes entre le ligand et les résidus des hélices H3, H11 et H12. Il faut donc noter que lors de la fixation du ligand dans la LBP, l'hélice H3 subit aussi un changement de conformation, passant d'une forme convexe à une forme concave.

De plus, ces changements de conformations de l'hélice H12 présente ou non dans cette cavité hydrophobe, permettent d'accommoder un motif structural présent chez la plupart des corégulateurs impliquant les hélices H3, H4 et H12 dans un site de fixation du corégulateur (Aagaard et al., 2011) (**Figure 19**). Ce motif possède la séquence consensus **LxxLL** pour les **coactivateurs**, et la séquence **LxxlxxLL** pour les **corépresseurs**.

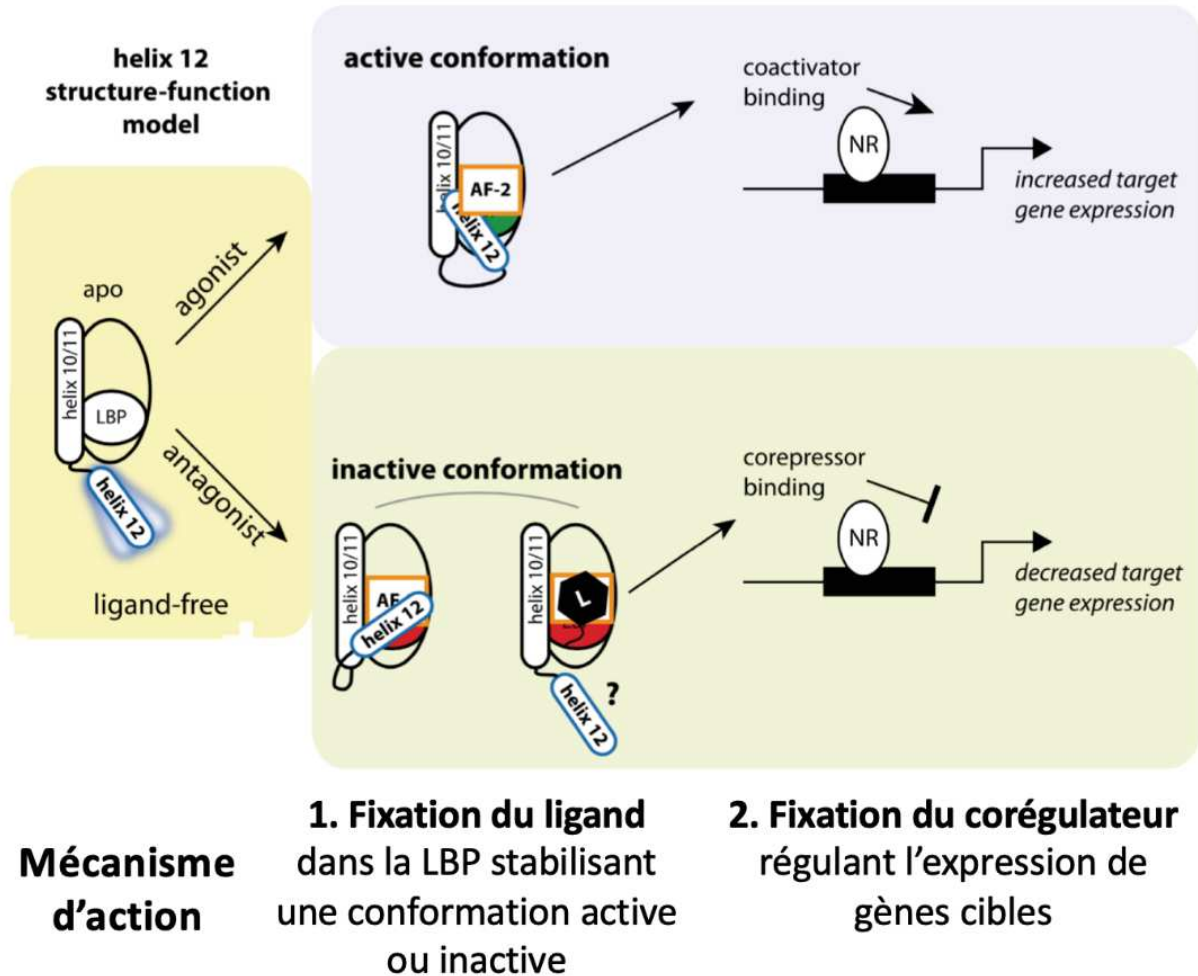


Figure 18 : Le mécanisme d'action de l'hélice- α H12 est un modèle conformationnel commun à la superfamille des récepteurs nucléaires : conformation active et inactive de H12, **Adaptée de Kojetin and Burris, 2013.**

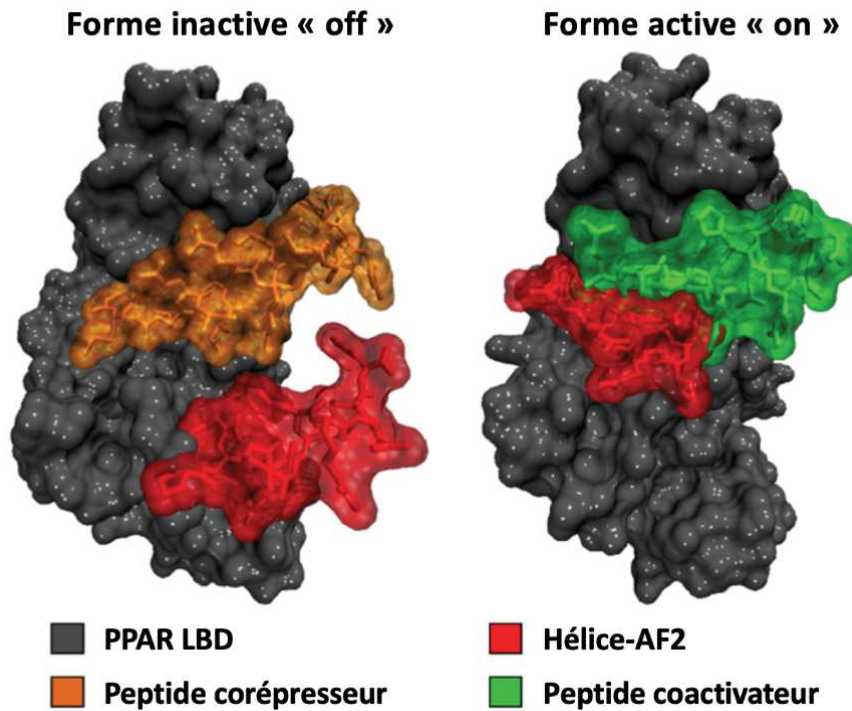


Figure 19: Les changements conformationnels observés après fixation des corégulateurs dans la cavité hydrophobe du LBD de PPAR, *Adaptée de Aagaard et al., 2011*

La poche de fixation du ligand est capable d’accommoder un grand nombre de ligands naturels et synthétiques, ouvrant ainsi la possibilité, *via* cette poche, de cibler thérapeutiquement les RNs contre différentes pathologies et les cancers dans lesquels ils sont impliqués.

La poche de fixation du ligand de PPAR γ est une des plus grande connue dans cette superfamille de facteurs de transcription, cela fait donc de PPAR γ une **cible thérapeutique** majeure.

e. Les ligands naturels et pharmacologiques de PPAR γ

i. Ligands naturels

PPAR γ est activé par des métabolites dérivés de l’**acide arachidonique** *via* les voies métaboliques de la cycloxygénase et de la lipoxygénase comme par exemple la PG-12 (15-deoxy-D-12,14-prostaglandine J2) (Forman et al., 1995). De plus, des composés dérivés d’acides gras issus de l’oxydation des lipoprotéines de basse densité (ou LDL) comme les acides 9-ou-13-hydroxyoctadécadiénoïque (9/13-HODE) sont également connus comme ligands activateurs

endogènes de PPAR γ (Nagy et al., 1998). Tous ces ligands endogènes peuvent activer PPAR γ *in vitro*, mais leur affinité de liaison à PPAR γ ainsi que leur détectabilité cellulaire sont faibles.

ii. *Ligands synthétiques*

Les **PPARs** sont modulés par de nombreuses molécules pharmacologiques connues et décrites à ce jour. Plus d'une centaine de structures tridimensionnelles de PPAR γ -LBD ont été résolues en présence de différents ligands synthétiques modulant plusieurs activités pharmacologiques. Ces études structurales montrent de fortes similitudes, quel que soit le ligand présent dans la poche de liaison (Chrisman et al., 2018). Il est par ailleurs difficile de comprendre le mécanisme d'action structural par lequel la liaison de ces différents ligands affecte la dynamique structurale, notamment au niveau de l'hélice H12 qui est déterminante au recrutement des coactivateurs transcriptionnels. Au cours des différentes études menées, il a été mis en évidence un certain ensemble de conformations, et non une conformation statique ou unique de l'hélice H12, en présence ou non de ligands (Kojetin and Burris, 2013). Cette dynamique conformationnelle est un tremplin pour la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques ciblant les RNs.

La **rosiglitazone**, un exemple d'antidiabétique très étudié de la famille des **thiazolidinediones** ou TZD, (appelés aussi « glitazones ») apparue sur le marché du médicament en 2002, permet de sensibiliser les tissus ciblés par l'insuline en réduisant la glycémie, diminuant ainsi l'insulino-résistance au niveau des tissus adipeux, du muscle squelettique et du foie. *In vivo*, ces molécules induisent la différenciation des adipocytes. Son activité anti-hyperglycémique a été démontrée et améliore le contrôle glycémique chez les patients diabétiques de type 2. Plusieurs structures 3D de PPAR γ -LBD sont décrites en présence de ce ligand agoniste sélectif afin de mieux comprendre le mécanisme d'action et de recrutement des ligands et des corégulateurs. Néanmoins, son autorisation de mise sur le marché (AMM) a été suspendue en 2010 en France en raison d'importants effets secondaires tels que des risques cardiovasculaires (**Tableau 2**).

Ces molécules permettent de moduler l'activité transcriptionnelle de certains gènes impliqués dans différentes pathologies et cancers. Ces ligands peuvent être **agonistes**, permettant d'améliorer l'activité transcriptionnelle ; des **antagonistes** bloquant ou maintenant une activité basale de transcription des gènes cibles ; ou encore des **inverses agonistes** réprimant l'activité transcriptionnelle par rapport au niveau d'activité basal du récepteur. De nombreux ligands synthétiques sélectifs de PPAR γ ont déjà été étudiés ou sont en cours d'étude à ce jour : des ligands

agonistes (pioglitazone, troglitazone, GW1929, ou encore ciglitazone par exemples), antagonistes (GW9662 et le diclofenac), ou encore inverse agonistes (tel que le T0070907).

Substance(s)	Spécialité	Fabricant	AMM*
Troglitazone	REZULIN®	Parke-Davis/Warner Lambert	FDA 29/01/ 1997
Rosiglitazone	AVANDIA®	SmithKline Beecham	EMA 11/07/2000
Rosiglitazone	NYRACTA®	SmithKline Beecham	EMA 11/07/2000
Rosiglitazone	VENVIA®	SmithKline Beecham	EMA 11/07/2000
Rosiglitazone / Metformine	AVANDAMET®	SmithKline Beecham	EMA 20/10/2003
Rosiglitazone / Glimepiride	AVAGLIM®	SmithKline Beecham	EMA 27/06/2006
Rosiglitazone / Glimepiride	AVAGLIM®	SmithKline Beecham	EMA 27/06/2006
Pioglitazone	ACTOS® / GLUSTIN®	Takeda	EMA 13/10/2000 FDA 15/07/1999
Pioglitazone / Metformine	COMPETACT® / ACTOPLUS MET®	Takeda	EMA 28/07/2006 FDA 29/08/2005
Pioglitazone / Glimepiride	TANDEMACT®	Takeda	EMA 08/01/2007
Pioglitazone / Metformine	GLUBRAVA®	Takeda	EMA 11/12/2007
Pioglitazone	PAGLITAZ®	Krka	EMA 21/03/2012
Pioglitazone	GLIDIPION®	Actavis	EMA 15/03/2012
Pioglitazone	PIOGLITAZONE ACCORD®	Accord	EMA 21/03/2012
Pioglitazone	PIOGLITAZONE ACTAVIS®	Actavis	EMA 15/03/2012
Pioglitazone	PIOGLITAZONE KRKA®	Krka	EMA 21/03/2012
Pioglitazone	PIOGLITAZONE TEVA®	Teva	EMA 26/03/2012
Pioglitazone	SEPIOGLIN®	Vaia	EMA 09/03/2012
Alogliptin / Pioglitazone	INCRESYNC®	Takeda	EMA 19/09/2013

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché, EMA : *European Medicines Agency*, FDA : *Food and Drug Administration*

Tableau 2 : Les spécialités commercialisées des Thiazolidinediones (TZD).

Comme dit précédemment, il existe donc **4 types de ligands** se liant aux récepteurs nucléaires (**Figure 20**) :

- Les **ligands agonistes** : ils se lient dans la poche de fixation du ligand (LBP) induisant un changement conformationnel de l'hélice H12, permettant ainsi le recrutement des coactivateurs nécessaires à l'activation de la transcription des gènes régulés ; ils augmentent par conséquent l'activité transcriptionnelle basale du récepteur auquel ils se lient (Batista and Martínez, 2013).
- Les **ligands antagonistes « purs »** : ils empêchent le recrutement des corégulateurs et bloquent donc la transcription des gènes cibles, mais n'affectent pas l'activité transcriptionnelle basale des récepteurs nucléaires.
- Les **ligands inverses agonistes** : ce sont des compétiteurs des agonistes purs et diminuent l'activité transcriptionnelle basale en favorisant le recrutement de corépresseurs. Cela conduit donc à l'inhibition de la transcription de gènes cibles.
- Les **ligands agonistes/antagonistes partiels** : ils possèdent une efficacité « partielle » donc réduite par rapport aux ligands dits « purs ». Leurs effets dépendent du type cellulaire, de l'environnement intracellulaire ainsi que de la présence de corégulateurs.

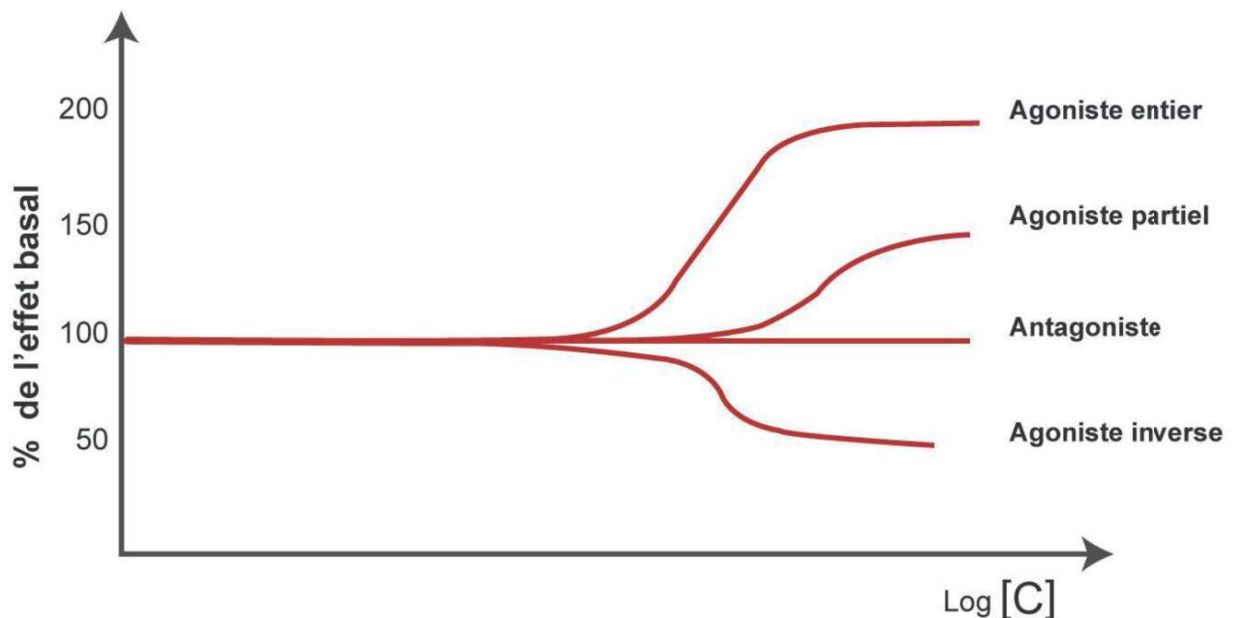


Figure 20 : L'effet pharmacologique des différents types de ligands en fonction de l'activité transcriptionnelle basale du récepteur nucléaire étudié.

f. Hétérodimérisation de PPAR γ avec RXR α

i. Le récepteur nucléaire X des rétinoïdes RXR : Généralités

Les **récepteurs X des rétinoïdes** (RXR) sont des corégulateurs de gènes de type facteurs de transcription répondant aux ligands suivants : l'**acide 9-cis rétinoïque** ou **9cis-RA**, premier ligand naturel de RXR à avoir été décrit (**Figure 21**). C'est un métabolite dérivé de la vitamine A ou rétinol. Les ligands naturels de RXR incluent également l'acide docosahéxaénoïque (DHA) ainsi que des acides gras polyinsaturés, tel que l'acide arachidonique (Lengqvist et al., 2004). Des ligands synthétiques ont aussi été développés permettant notamment l'inhibition de l'activité de RXR (Watanabe and Kakuta, 2018).

Il existe **trois isotypes** de RXR chez les mammifères : **RXR α** (NR2B1), **RXR β** (NR2B2), et **RXR γ** (NR2B3). L'isotype **RXR α** est exprimé au niveau du foie, de la peau, de l'épiderme, des muscles, des poumons, des reins, et de l'intestin. Quant à l'isotype **RXR β** , il est exprimé dans tous les tissus du corps, tandis que **RXR γ** est localisé dans les muscles squelettiques, cardiaques ainsi que dans le cerveau. Il est démontré que les deux sous-types RXR α et β jouent un rôle majeur dans l'équilibre énergétique corporel ; **RXR α** joue un rôle dans le stockage et la mobilisation des triglycérides, alors que **RXR β** est impliqué quant à lui au cours du processus de développement (Li et al., 2002).

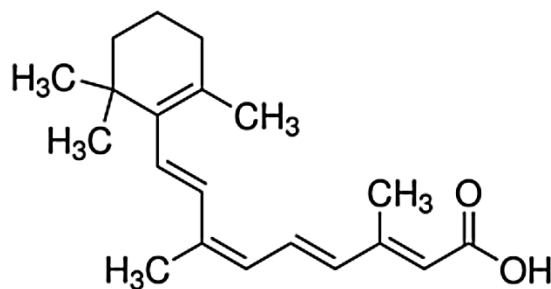


Figure 21 : Structure chimique de l'acide 9-cis rétinoïque (9cis-RA).

Il a été montré pour la première fois que les PPARs étaient les premiers récepteurs à s'hétérodimériser avec RXR (Kliwer et al., 1992). Les RXRs peuvent aussi se lier aux RNs non stéroïdiens de type RAR, VDR ou encore TR. Il a aussi été montré que RXR pouvait former un homodimère RXR/RXR capable de se lier à l'élément de réponse (RXRE). RXR possède une grande capacité de se lier à un grand nombre de RNs permettant de réguler spécifiquement des gènes

cibles, impliqués dans différentes voies métaboliques ; on parle d'une théorie du « **Big Bang de RXR** » (Figure 22).

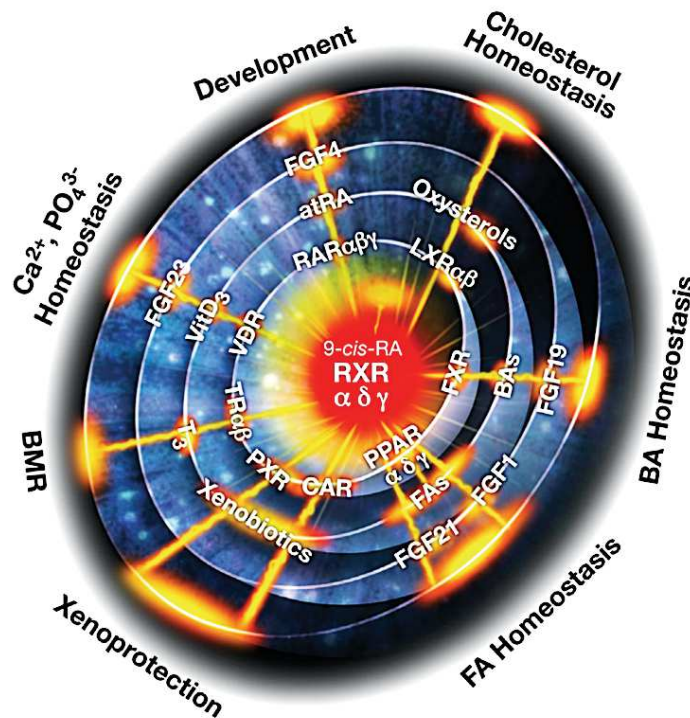


Figure 22 : Théorie du « Big Bang de RXR » décrivant l'habilité de RXR à se lier à différents partenaires et à intervenir dans la régulation de plusieurs voies métaboliques, **Evans and Mangelsdorf, 2014.**

RXR peut donc se lier à près de 14 partenaires, reconnaissant ainsi différents éléments de réponse à l'ADN de type **Répétitions Directes DR 1 à DR 5** (Figure 23). Cette variabilité de reconnaissance est responsable de la modularité des différentes fonctions qu'assure RXR avec ses différents partenaires, variant ainsi l'affinité de liaison et induisant différents changements conformationnels (Osz et al., 2019). RXR partage une organisation modulaire similaire aux autres RNs (Bourguet et al., 1995): un domaine N-terminal variable (NTD) contenant une la fonction d'activation ligand-indépendante (AF-1), un domaine C-terminal constitué par le LBD contenant la surface de dimérisation ainsi qu'un domaine DBD conservé qui interagit avec le motif héxanucléotidique 5'-(A/G)G(G/T)TCA (Belorusova et al., 2016). La liaison au ligand induit un changement conformationnel au niveau de l'hélice H12 induisant le passage de la forme *apo* à la forme *holo* de cette dernière (Figure 24).

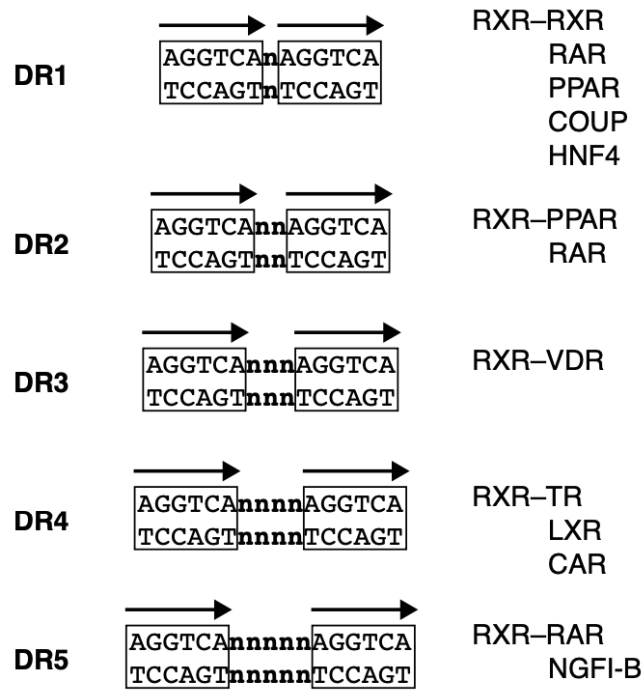


Figure 23 : Caractéristiques des éléments de réponse à l'ADN de RXR et ses partenaires de type « Direct Repeat » DR1 à DR5, *Rastinejad, 2001*.

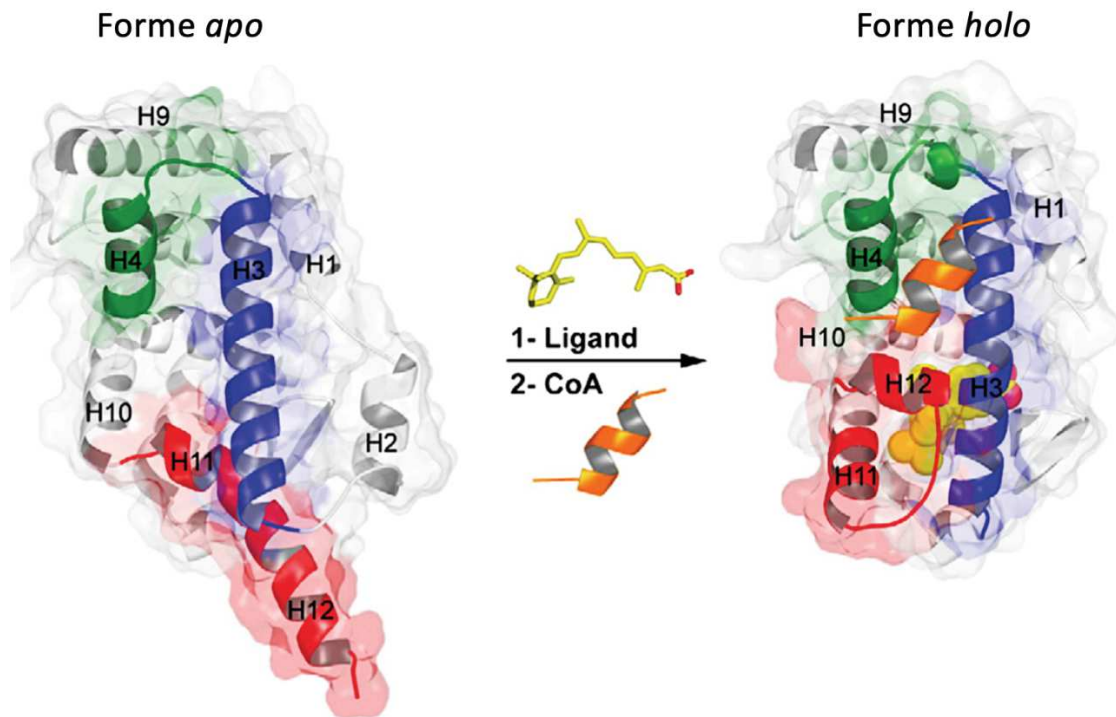


Figure 24 : Changements conformationnels du LBD de RXR induits par la liaison d'un ligand naturel ou synthétique et d'un corégulateur permettant le passage de l'état inactif « apo » à actif « holo » de l'hélice H12, *Adaptée de Pérez et al., 2012*.

Ce changement de conformation permet de former une surface d'interaction ou fonction d'activation AF-2 avec les hélices H3 et H5, permettant d'interagir avec des **remodeleurs de la chromatine** ainsi que des corégulateurs pour activer ou réprimer la transcription d'un gène (Rosenfeld, 2006). Cette fonction d'activation **AF-2 ligand-dépendante** forme donc un domaine qui implique H3, H4, H5, H11 et H12 du domaine LBD. Néanmoins, une fonction d'activation **ligand-indépendante AF-1** existe et est impliquée dans le recrutement de corégulateurs et localisée dans la région N-terminale du LBD. Elle est intrinsèquement désordonnée, et peut affecter l'efficacité et la sélectivité de l'expression des gènes cibles, ainsi que les réponses aux ligands liés au LBD des récepteurs stéroïdiens (Thompson et al., 1998).

RXR est une **cible thérapeutique** majeure : en effet, il est impliqué dans plusieurs pathologies telles que les lymphomes cutanés, les cancers du sein, du foie ou encore dans des maladies métaboliques. Le développement de ligands synthétiques agonistes ou antagonistes de RXR permettrait de moduler des réponses physiologiques spécifiques à travers la régulation de l'activité transcriptionnelle des gènes cibles (Pérez et al., 2012).

ii. *Le complexe PPAR γ -RXR α : Généralités et état des lieux*

Lors de la **transactivation** ADN-dépendante, **PPAR γ** forme un **hétérodimère permissif** avec le récepteur à l'acide rétinoïque **RXR α** pour ensuite se lier à l'élément de réponse PPRE, régulant ainsi la transcription de gènes cibles (**Figure 25**).

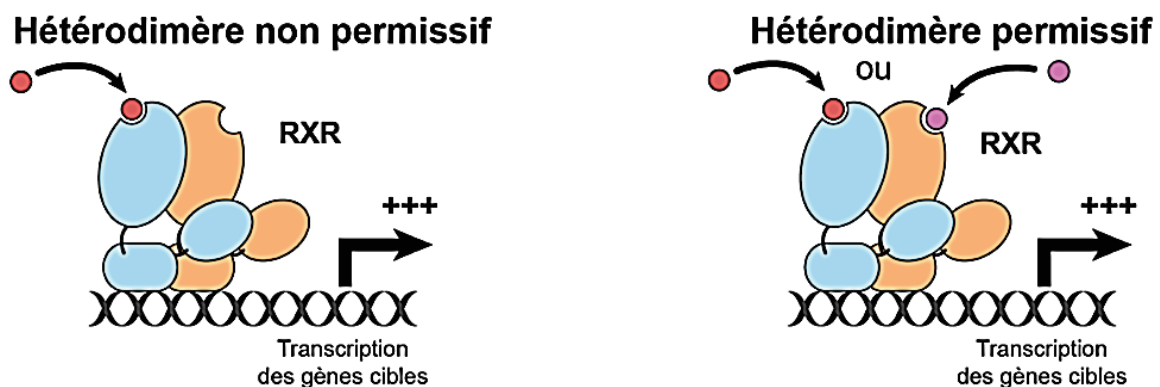


Figure 25 : Mode d'activation des hétérodimères de récepteurs nucléaires avec RXR selon leur permissivité : hétérodimère non permissif (gauche) ou permissif (droite).

En effet, cet hétérodimère PPAR/RXR est dit « **permissif** » et peut être activé par un ligand de PPAR ou un ligand de RXR (Shulman et al., 2004). En revanche, il faut noter que d'autres types d'hétérodimères formés avec le partenaire RXR existent et sont classés selon l'effet du ligand de RXR sur l'activité transcriptionnelle : en plus des hétérodimères « **permissifs** » décrits précédemment, il existe des récepteurs dits « **non permissifs** », où RXR est un partenaire « silencieux » et ne peuvent pas être activés par le ligand de RXR ; et enfin, des récepteurs dits « **permissifs conditionnels** », où le ligand de RXR seul ne suffit pas à l'activation de l'hétérodimère, mais présente cependant un effet synergique avec le ligand de son partenaire permettant ainsi la transactivation du gène cible (Pérez et al., 2012).

L'hétérodimère protéique **PPAR γ /RXR α** permet de recruter un complexe protéique coactivateur ou corépresseur, permettant, d'activer ou de réprimer la transcription respectivement. L'activité de ce complexe est largement modulée par de nombreux corégulateurs, entraînant ainsi des effets extrêmement variables selon les tissus et les situations physiopathologiques. Par ce mécanisme, l'activation par le complexe PPAR γ /RXR α permet de contrôler l'expression des gènes cibles impliqués dans des métabolismes glucido-lipidiques (Duran-Sandoval et al., 2003).

De nombreux cofacteurs sont recrutés, se fixant comme décrit précédemment sur PPAR γ et RXR α et modifiant ainsi la conformation du complexe et l'affinité de liaison pour les différents corégulateurs (coactivateurs et corépresseurs). Cela conduit à une expression différentielle des gènes cibles, et à une réponse biologique distincte de différents ligands se liant au même récepteur PPAR γ (Balint and Nagy, 2006). Ainsi, les différents ligands peuvent, *via* un même récepteur nucléaire, induire des réponses biologiques communes, mais aussi des réponses biologiques qui leur sont spécifiques (**Figure 26**).

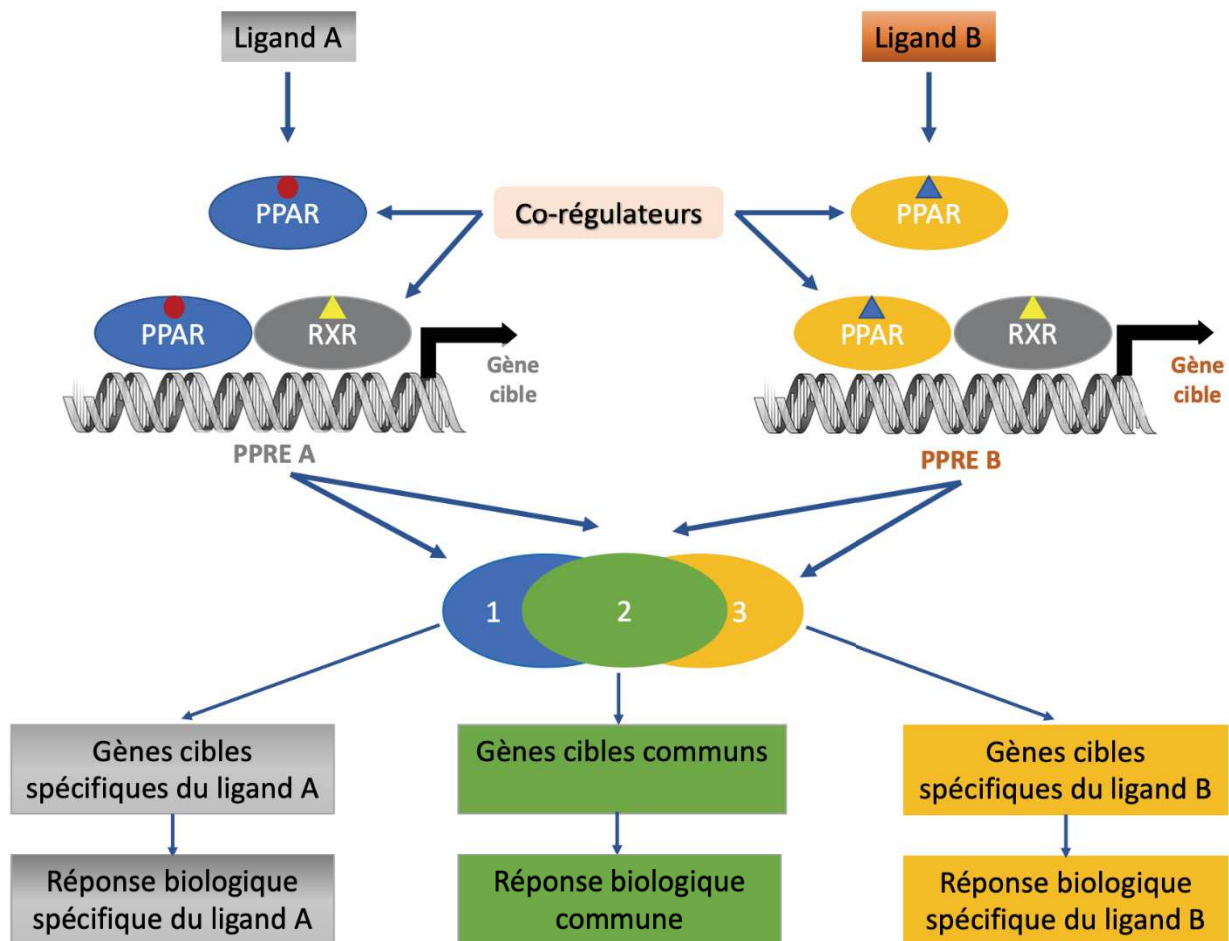


Figure 26 : L'expression des gènes cibles sous le contrôle du complexe PPAR-RXR modulée par les cofacteurs sélectifs de PPAR.

4. PPAR γ et la régulation transcriptionnelle de gènes cibles

a. Les corégulateurs de PPAR γ : Généralités

Le développement de tissus adipeux est un processus impliquant la coopération concertée de nombreux facteurs de transcription tel que PPAR γ , ainsi que leurs corégulateurs de types coactivateurs ou corépresseurs. En effet, PPAR γ est considéré comme un des principaux régulateurs de la différenciation des **adipocytes**. Les corégulateurs de PPAR γ dans ces processus physiologiques, et la spécificité de leurs fonctions biologiques constitue un niveau supplémentaire de régulation du développement du tissu adipeux. Une liste non exhaustive des corégulateurs interagissant avec PPAR γ et jouant un rôle dans l'adipogenèse est connue dans la littérature (**Figure 27**).

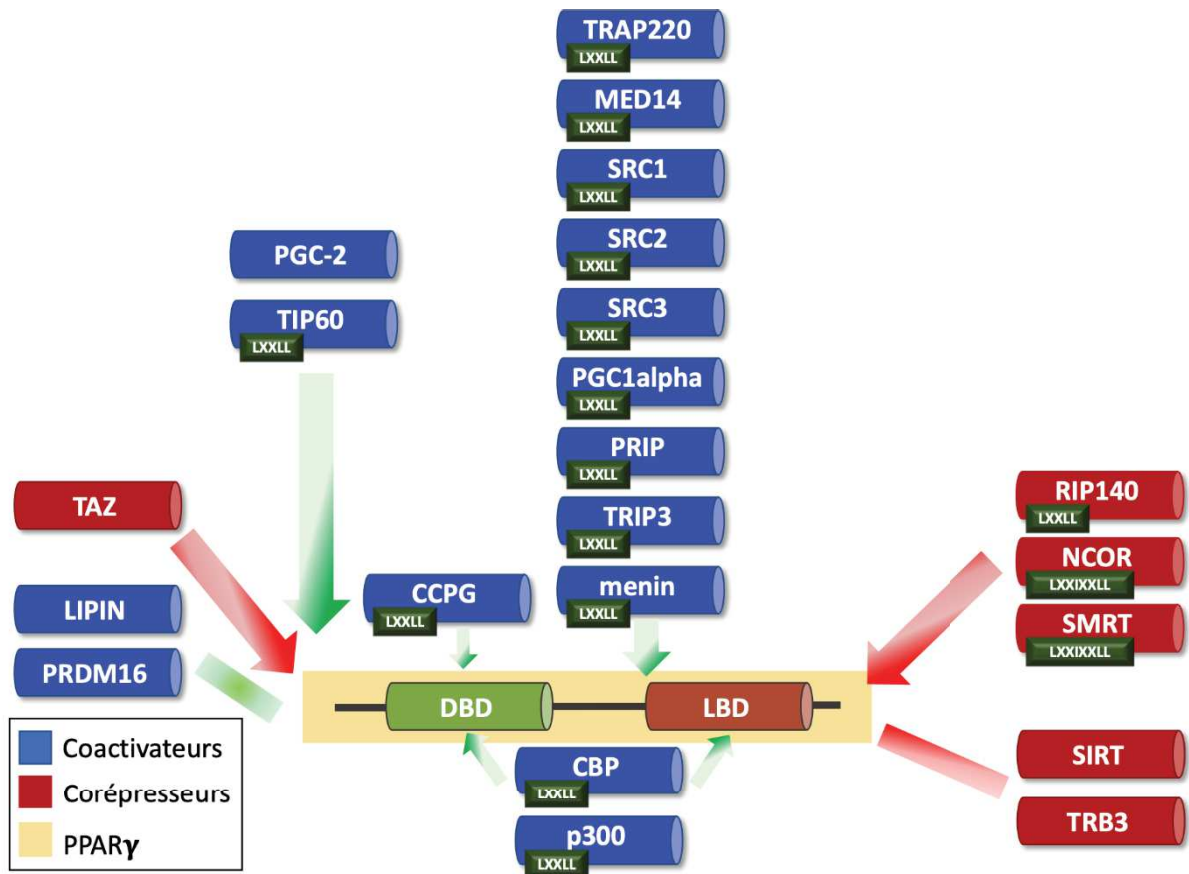


Figure 27 : Vue d'ensemble des coactivateurs (bleu) et des corépresseurs (rouge) de PPAR γ (vert-orange) impliqués dans l'adipogenèse, *Adaptée de Koppen and Kalkhoven, 2010.*

Les protéines du complexe médiateur constituent un exemple bien décrit des protéines de liaisons aux RNs, notamment PPAR γ . Le **médiateur** (MED) est un macro-complexe très conservé entre les espèces, servant d'interface physique et fonctionnelle entre les facteurs généraux de transcription (GTFs) liés à l'ADN et à la machinerie transcriptionnelle eucaryote (Conaway et al., 2005). Il possède une organisation **modulaire** et son organisation globale est constituée de **4 modules** : la **tête**, le **milieu**, la **queue** et le **module kinase** qui n'est pas toujours associé aux autres sous-unités du médiateur (**Figure 28**). Nous pouvons citer les sous-unités **MED1** (aussi appelée TRAP220/DRIP205) ou encore **MED14** comme coactivateurs connus dans la régulation de PPAR γ dans la voie métabolique des adipocytes. Quant aux corépresseurs de PPAR γ , plusieurs sont connus à ce jour, mais **SMRT** et **NCoR** restent les premiers identifiés (Chen and Evans, 1995).

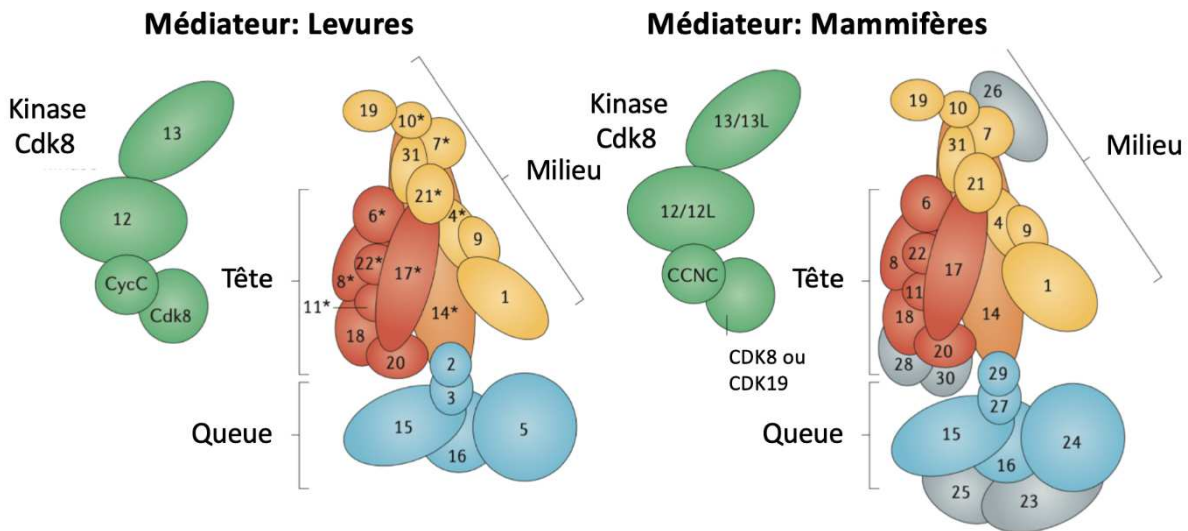


Figure 28 : Composition modulaire du complexe médiateur des levures et des mammifères, dont plusieurs sous-unités sont identifiées comme coactivateurs de PPAR γ ; **Adaptée de Soutourina, 2018.**

b. Répression de la transcription par PPAR γ -RXR α : Structure-Fonction

i. Répression de la transcription : Généralités

L'acquisition ou le maintien d'une fonction cellulaire repose aussi bien sur l'activation que sur la répression des gènes. De nombreux régulateurs transcriptionnels peuvent donc exercer une fonction *trans*-répressive sur une partie des gènes ciblés. La répression de la transcription de certains gènes *via* les récepteurs nucléaires implique le recrutement du complexe de corépresseurs. En absence de son ligand, le récepteur nucléaire présent dans le noyau agit avec son partenaire protéique, comme par exemple RXR, et le complexe peut se lier à son élément de réponse à l'ADN, mais reste maintenu dans un état dit « silencieux » par des complexes de corépression qui sont recrutés, ayant une activité enzymatique de type **désacétylase**, comme les corépresseurs **SMRT** ou **NCoR**, permettant d'agir sur les histones en les désacétylant (Nagy et al., 1999). Cela permet de maintenir la chromatine dans un état compacte rendant le recrutement de la machinerie transcriptionnelle inaccessible. Néanmoins, les mécanismes d'action régissant la répression demeurent peu connus.

Les récepteurs nucléaires possèdent différents sites de fixation en fonction de la nature du corégulateur, coactivateur ou corépresseur. Les protéines corégulatrices se fixent au domaine LBD des récepteurs nucléaires, au niveau de la poche de fixation du corégulateur formée par les hélices

H3, H4 et H12 du LBD, région appelée **fonction d'activation AF-2**. En effet, plusieurs études montrent que les mutations de différents résidus clés de la région AF-2, impactent fortement l'affinité de recrutement des corégulateurs. Les **corépresseurs** sont donc des protéines qui se fixent aux RNs en absence de ligand agoniste, et se dissocient lors de la liaison de ce dernier (Chen and Evans, 1995). Il est aussi montré qu'ils peuvent se lier en présence d'un ligand antagoniste (Zhang et al., 1998). Le mécanisme de recrutement *via* l'hélice AF-2 concerne aussi une autre catégorie de corépresseurs ligand-dépendants : les **LCoR** (*Ligand-dependant nuclear Corepressor*). Les changements conformationnels de l'hélice AF-2 induits par la liaison des ligands sont suffisants pour inhiber l'interaction des corépresseurs et permettre le recrutement des coactivateurs suggérant un mécanisme d'échanges actifs (Perissi et al., 2004).

ii. *Les corépresseurs de PPAR γ -RXR α*

Les **corépresseurs** se fixent en présence de ligand antagoniste ou en absence de ligand *via* le motif **LxxLxxL**. Il existe plusieurs types de protéines corépressives de l'hétérodimère PPAR-RXR : les **NCoRs** (*Nuclear Receptor Corepressor*), les **SMRTs** (*Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid receptor*), ou encore la protéine d'interaction des **récepteurs 140** (RIP140) par exemple (**Figure 29**).

Les corépresseurs vont permettre d'avoir une action de répression sur certains gènes, notamment en recrutant des **histones désacétylases (HDAC)** (Viswakarma et al., 2010). Le recrutement d'histones-désacétylases est une propriété commune à plusieurs répresseurs transcriptionnels. Le recrutement est soit **direct** (une HDAC se lie directement à un facteur de transcription), soit **indirect** (*via* des intermédiaires protéiques comme SMRT/NCoR). Leurs motifs de reconnaissances sont souvent situés dans des régions intrinsèquement désordonnées, ce qui rend plus difficile les études structurales de ces complexes (Simons et al., 2014). De plus, il faut noter que lors de la *trans*-répression, les PPARs peuvent réprimer de manière ADN-indépendante la transcription de gènes en inhibant d'autres voies de transduction du signal, telle que la voie de signalisation du facteur nucléaire κ B (NF- κ B).

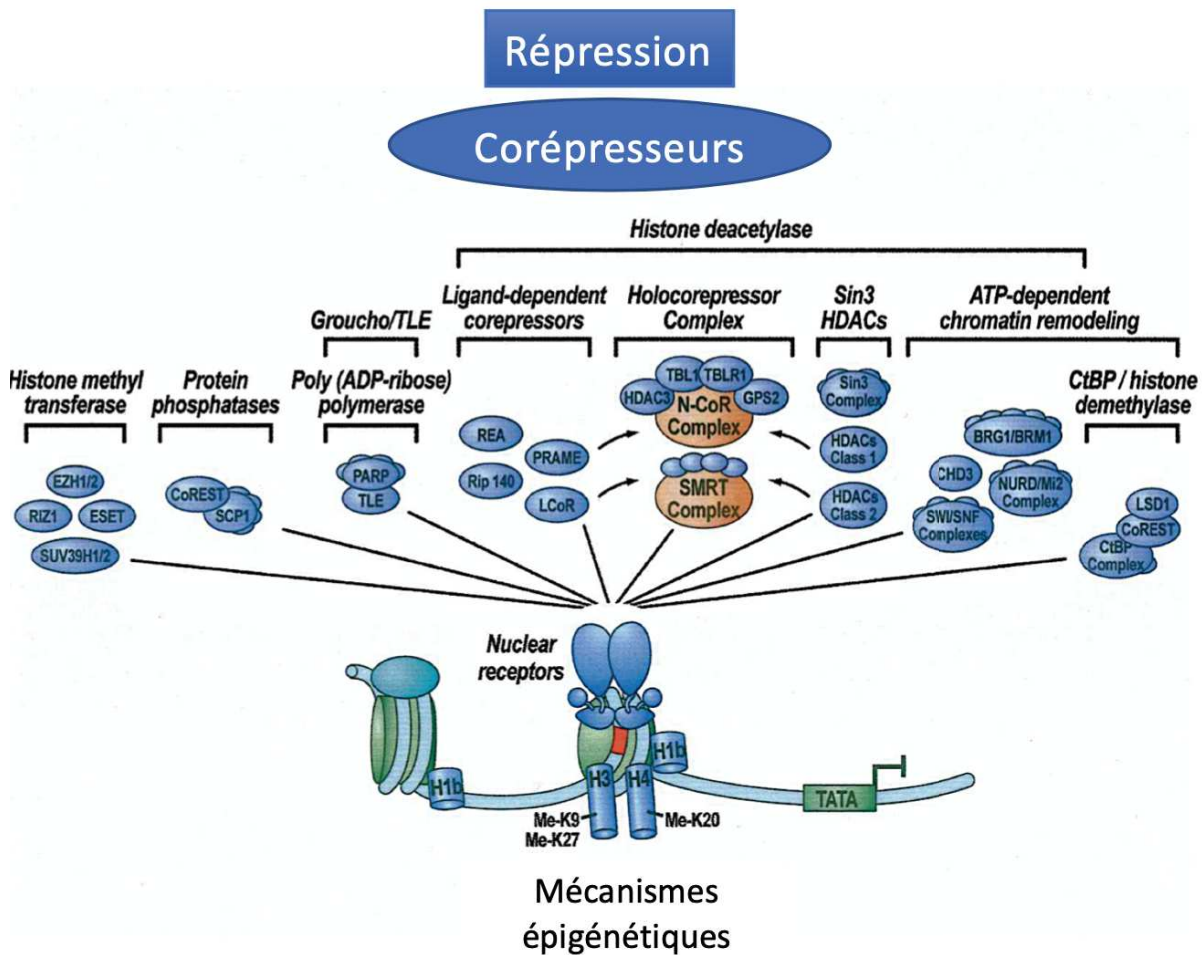


Figure 29 : Les différentes voies métaboliques de la répression transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires et les complexes corépresseurs associés, *Adaptée de Rosenfeld, 2006.*

Très peu de structures en présence d'un corégulateur de type corépresseur existent dans les banques de données aujourd'hui. La première structure de **PPAR γ LBD** sauvage (WT) en présence des peptides corépresseurs, **NCoR** et **SMRT**, ainsi que d'un ligand inverse agoniste (T0070907) ont été résolues très récemment par cristallographie aux rayons-X à 1,8 Å et 2,1 Å respectivement (Shang et al., 2020) (**PDB** : 6ONI et 6PDZ). Ces structures permettent de mettre en évidence, le rôle conformationnel primordial de l'hélice H12 du LBD pour le recrutement des corégulateurs. En présence de ligands, la **trans-répression** laisse place à la **trans-activation** de gènes cibles par les RNs concernés.

c. Activation de la transcription par PPAR γ -RXR α : Structure-Fonction

i. Activation de la transcription : Généralités

Alors que l'ARN polymérase II et les facteurs généraux de transcription sont suffisants pour activer la transcription, des facteurs supplémentaires ou effecteurs sont requis afin d'exprimer des gènes en réponse à des corégulateurs, ici des **coactivateurs**. L'existence des coactivateurs a été découverte dans les années 1990 ; cette découverte est basée sur leur capacité à interagir avec les TFs et ces derniers peuvent être classés en **deux catégories (Figure 30)** :

- Les coactivateurs interagissant directement avec la Pol II ou d'autres composants de la machinerie transcriptionnelle basale,
- Les coactivateurs agissant directement sur la chromatine comme les histones acétyltransférases (**HATs**) ou encore les histones désacétylases (**HDACs**) (Näär et al., 2001).

Il existe cependant d'autres coactivateurs de ce type comme les peptidylarginine, les méthyltransférases, les déméthylases, des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine ATP-dépendant ou encore les sous-unités du médiateur (MED) comme décrit précédemment.

Parmi les complexes **HATs** identifiés comme activateurs transcriptionnels, **deux types** sont caractérisés : les HATs de **type A** nucléaires, et les HATs de **type B** cytoplasmiques. Les HATs de type A vont particulièrement nous intéresser lors de cette introduction. En effet, plusieurs familles de ce type de HATs ont été identifiées :

La famille **p300/CBP**, les coactivateurs des récepteurs nucléaires comme par exemple les coactivateurs des **récepteurs stéroïdiens SRC** (SRC-1, SRC-2 ou SRC-3), le coactivateur spécifique du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes PPAR (**PGC-1 α**), ou encore **MED1/TRAP2020/DRIP205** qui interagit avec plusieurs types de RNs. En effet, il a été montré que l'activation d'un gène semble effectivement dépendre de l'acétylation ciblée des histones, puisque de nombreux coactivateurs, tels que les protéines citées précédemment (p300/CBP, SRC ou encore les protéines TAFs) présentent une activité enzymatique intrinsèque de type histone-acétyltransférase (Spencer et al., 1997).

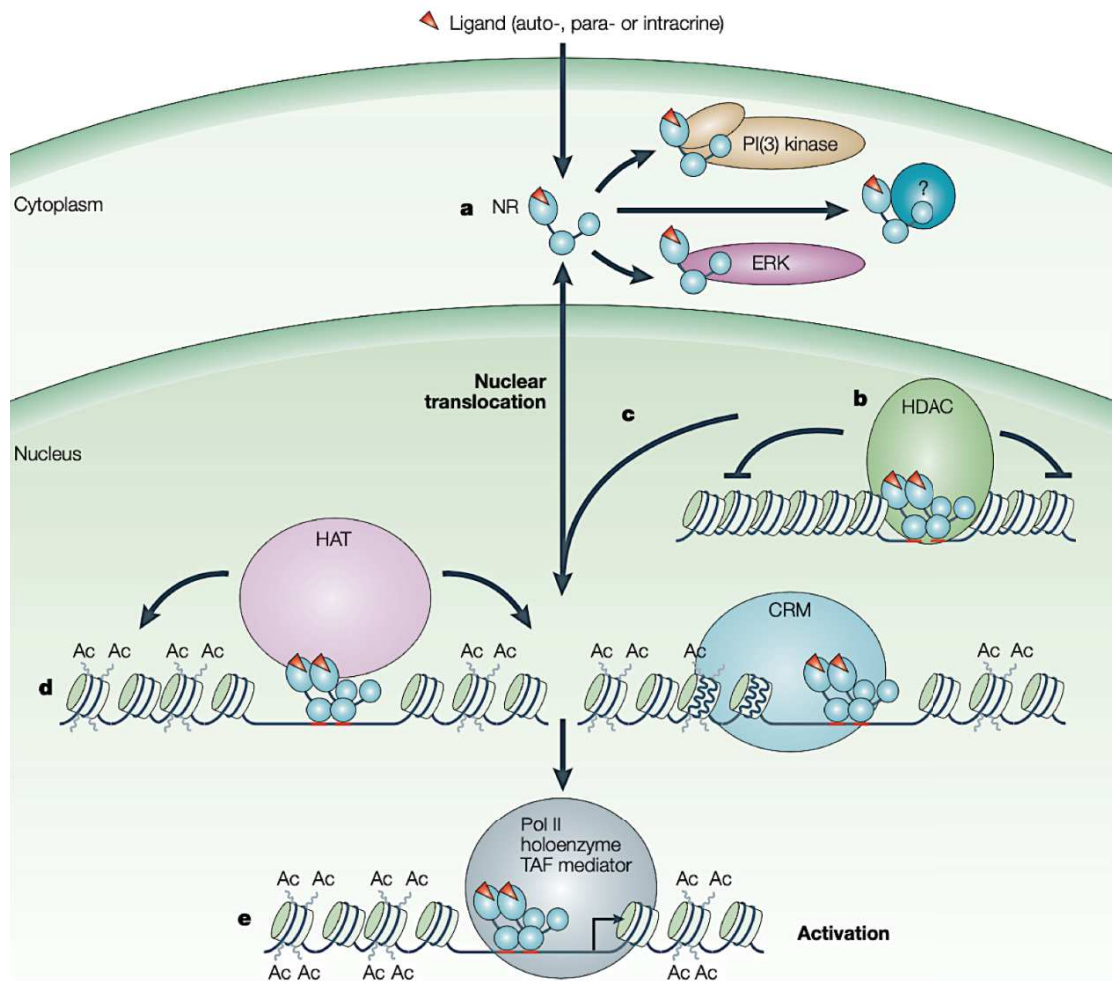


Figure 30 : Schéma global du mode d'action des récepteurs nucléaires, Gronemeyer et al., 2004.

ii. Les coactivateurs de PPAR γ -RXR α

Comme décrit précédemment, le **mécanisme de régulation** de la transcription des gènes par l'activation des récepteurs **PPAR** répond à plusieurs étapes passant par une étape de répression de la transcription, par la liaison de l'agoniste permettant la dissociation du complexe de répression, la liaison du complexe PPAR-RXR sur son élément de réponse (PPRE), et enfin par le recrutement des coactivateurs aboutissant à la transcription du/des gènes cibles. Par ce mécanisme, l'activation des PPARs contrôle ainsi l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et dans celui du glucose. Cependant, il faut noter que de nombreux autres gènes sont régulés *via* cette voie d'activation, provoquant ainsi des effets pleiotropes dans différentes voies métaboliques (métabolisme, prolifération, migration ainsi que la structure cellulaire).

Les nombreux cofacteurs recrutés (différents types de ligands) existant ou en cours de développement, peuvent, en se fixant sur le récepteur PPAR modifier la conformation du complexe

et ainsi l'affinité de liaison pour les différents coactivateurs. Cela conduit à l'expression différentielle de plusieurs gènes et ainsi, à une réponse biologique distincte de différentes molécules se liant au même récepteur PPAR.

Les **coactivateurs** (CoA) se fixent en présence de ligand agoniste *via* le motif consensus **LxxLL** (L : Leucine et x : autre acide aminé). Ces CoA contiennent un ou plusieurs motifs conservés LxxLL nécessaires à l'interaction avec la fonction d'activation AF-2 située à l'extrémité C-terminale du récepteur nucléaire (Voegel, 1998). Il existe plusieurs familles de **protéines coactivatrices**, notamment SRC-1, TIF2/SRC-2, les protéines de la famille p160, CBP/p300, PGC1- α/β ou encore MED1/DRIP (**Figure 31**).

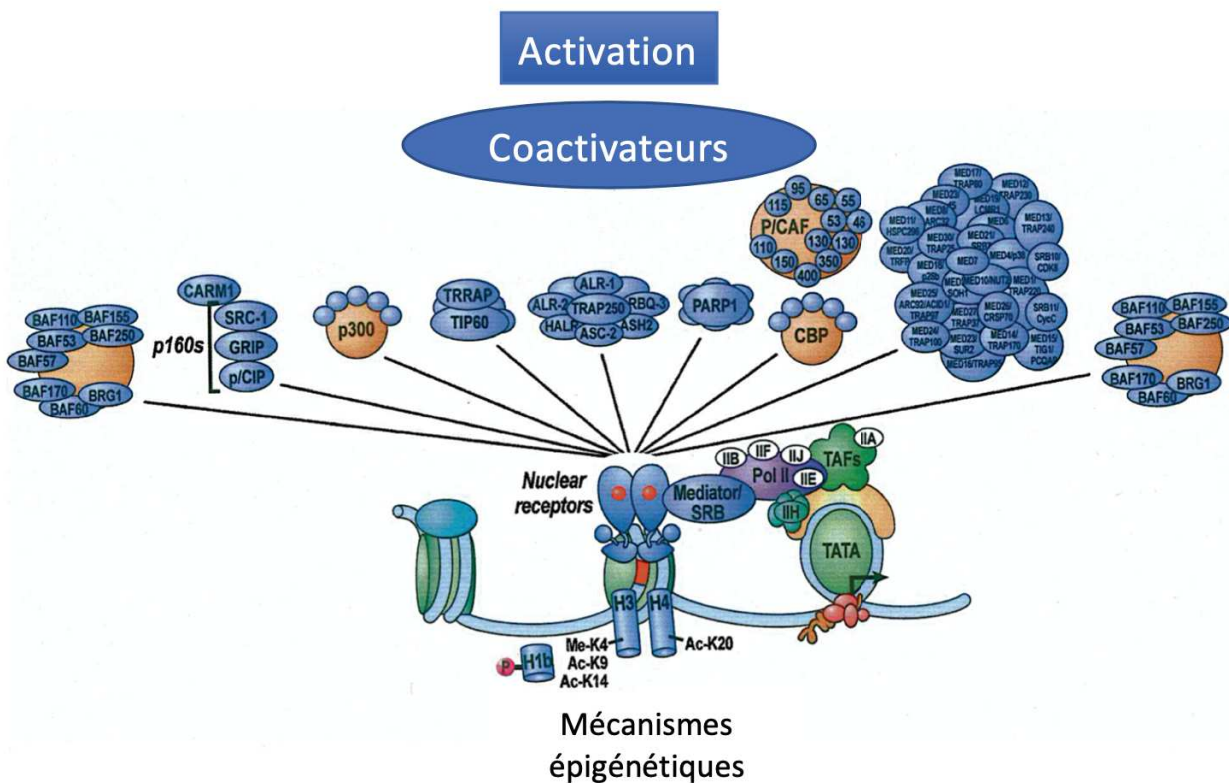


Figure 31 : Les différentes voies métaboliques de l'activation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires et les complexes coactivateurs associés, *Adaptée de Rosenfeld, 2006.*

Les **coactivateurs** vont permettre l'association de complexes pour assurer la transcription des gènes, notamment en recrutant des histones acétyltransférase (Spencer et al., 1997). Certains coactivateurs sont plus spécifiques que d'autres.

En effet, le coactivateur membre de la famille des « *PPAR γ coactivator-1* » (**PGC-1 α** et **PGC-1 β**) présente une expression beaucoup plus marquée dans les tissus qui nécessitent une consommation d'énergie importante tels que les tissus adipeux bruns, le cœur, les muscles squelettiques ainsi que le cerveau et le rein. Ils servent en effet de plateforme de recrutement d'autres membres du complexe d'activation de la transcription (Finck, 2006). Les coactivateurs PGC-1 sont connus pour leur interaction à plusieurs récepteurs nucléaires, néanmoins, leur première cible identifiée était PPAR γ dont ils tirent leur nom. Il a été caractérisé en 1998 comme coactivateur de PPAR γ pour activer l'expression de la protéine mitochondriale UCP-1 (*Uncoupling Protein-1*). **PGC-1 α** est un régulateur de la **thermogenèse** induisant la production de chaleur physiologique en fonction des variations environnementales. En effet, lors de l'exposition au froid, cette protéine permet de stimuler l'expression de UCP-1 qui, à son tour, dissipe le gradient électrochimique mitochondrial et induit la production de chaleur (Puigserver et al., 1998). Le corégulateur PGC-1 α possède trois motifs consensus **LxxLL** permettant l'interaction avec les récepteurs nucléaires.

D'autres coactivateurs sont impliqués dans le remodelage de la chromatine, tels que les protéines membres du complexe **SWI/SNF**. Ces derniers permettent la décompaction ou ouverture de la chromatine ATP-dépendante agissant ainsi sur les nucléosomes (Yoshinaga et al., 1992).

Les corégulateurs sont des protéines constituées de domaines très peu structurés ou intrinsèquement désordonnés. C'est pourquoi, la littérature décrit très mal les structures de complexes de RNs en présence d'un corégulateur entier. Il existe néanmoins un grand nombre de structures en présence de peptides corégulateurs, notamment la région d'interaction incluant le motif consensus LxxLL, permettant de comprendre les bases structurales du mécanisme allostérique contrôlant la liaison des coactivateurs.

Les premières structures tridimensionnelles de **PPAR γ LBD apo** (PDB : 1PRG) ou du complexe ternaire constitué d'un ligand agoniste de type TZD (rosiglitazone) ainsi que d'un domaine du coactivateur SRC-1 (88 acides aminés) contenant deux motifs LxxLL ont été résolus par cristallographie au rayons-X en 1998 (PDB : 2PRG) à 2,3 Å (Nolte et al., 1998b). Plusieurs études biochimiques ont montré l'importance de ces motifs LxxLL pour l'interaction coopérative de SRC-1 aux récepteurs nucléaires. Cette structure décrit l'interaction du domaine de SRC-1 à un homodimère de PPAR γ , où chaque motif LxxLL (motif 1 et 2 respectivement) interagit avec chacun des monomères de PPAR γ . Il a été mis en évidence l'importance de deux résidus très conservés chez tous les RNs : le **glutamate 471 (E471)**, et la **lysine 301 (K301)**. Ces résidus interagissent avec les

domaines hélicoïdaux (HD) de SRC-1 formés par les motifs LxxLL 1 et 2 (HD1 et HD2). Ces deux résidus permettent de former une « **pince chargée** » jouant un rôle dans l'orientation et le placement des motifs HDs de SRC-1 dans le site de fixation du coactivateur (**Figure 32**). Ces peptides contenant HD1 et HD2 forment une hélice-alpha amphipathique que l'on retrouve dans toutes les structures résolues des différents complexes de RNs. Cette hélice interagit avec l'**interface hydrophobe** formée par les hélices H3, la boucle 3-4, ainsi que les hélices H4 et H12 du domaine LBD (Osz et al., 2012).

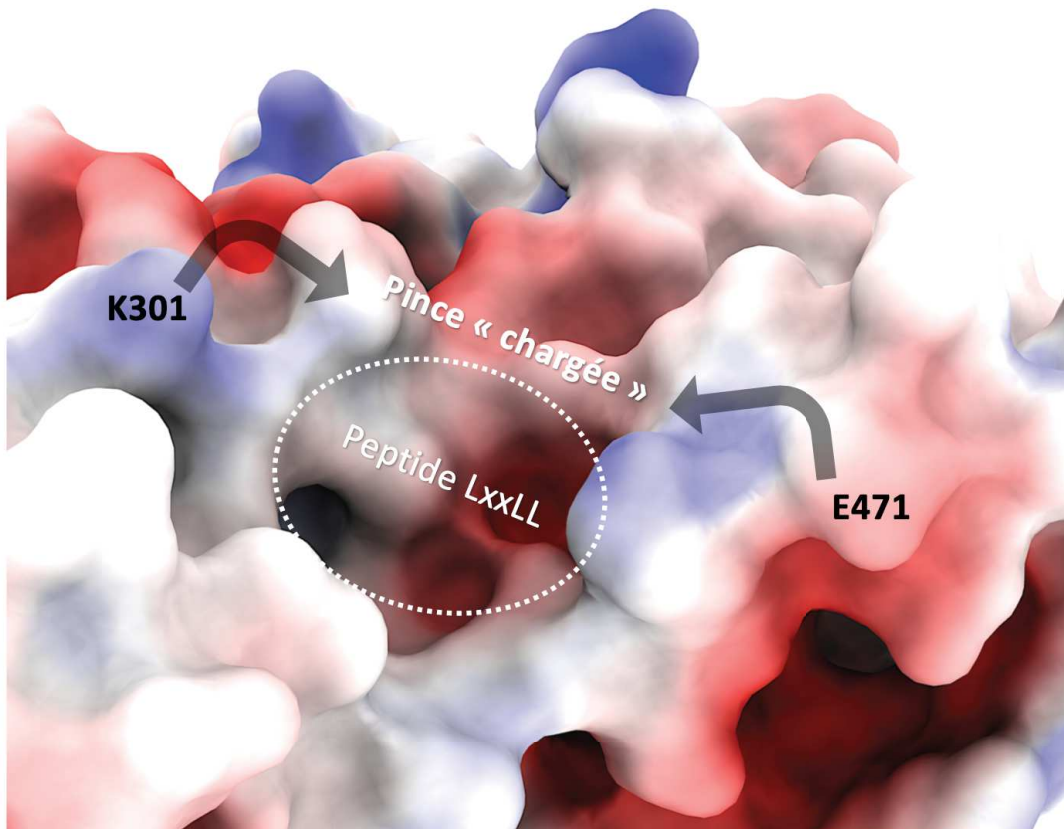


Figure 32 : Surface électrostatique de PPAR γ LBD formant une pince « chargée » entre les résidus conservés K301 et E471 permettant d'accommoder le peptide coactivateur contenant le motif LxxLL dans la poche de fixation du corégulateur, **ChimeraX**.

Plusieurs structures ont été résolues par cristallographie permettant de montrer les différentes conformations des domaines de liaison au ligand LBD en présence de différents corégulateurs : cela permet de décrire les **conformations active** ou **répressive** de l'hélice **H12** du LBD, ainsi que l'interface d'interaction entre les peptides corégulateurs et le domaine LBD. La surface d'interaction des peptides corépresseurs (NCoR ID2 et SMRT ID2) est plus grande que celle du coactivateur

TRAP220/MED1 (**Figure 33**). Cela s'explique par une hélice contenant les motifs consensus LxxLL/LxxlxxL plus étendue pour les corépresseurs NCoR/SMRT d'un tour d'hélice supplémentaire par rapport au coactivateur TRAP220/MED1 (Shang et al., 2020).

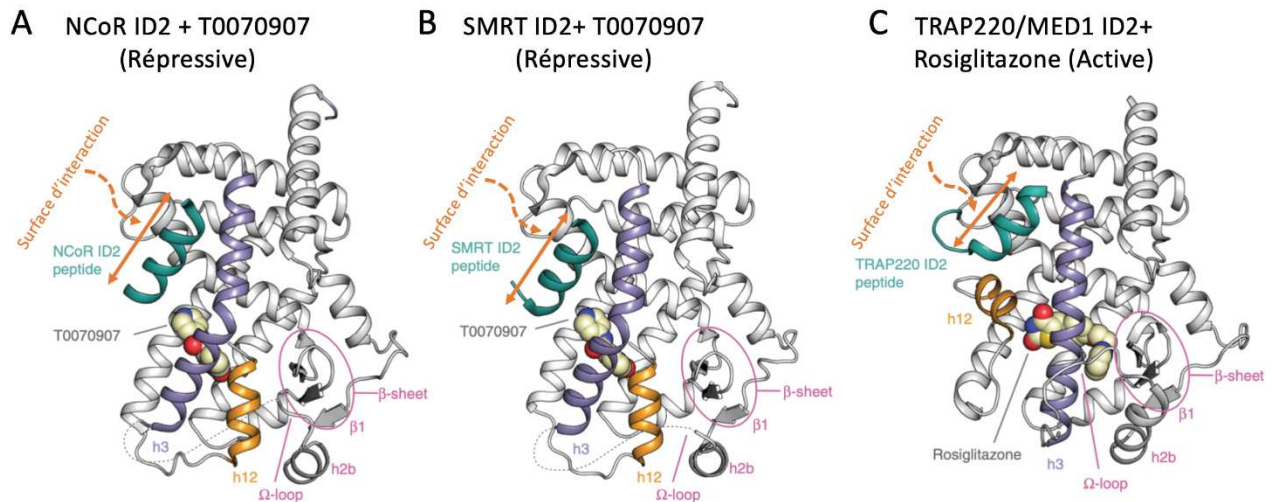


Figure 33 : La surface d'interaction des peptides corépresseurs et coactivateurs diffère (orange), **A** : Structure cristallographique en conformation répressive de PPAR γ LBD WT en présence du peptide corépresseur NCoR ID2 et du ligand inverse agoniste T0070907, **B** : PPAR γ LBD en conformation répressive en présence du peptide corépresseur SMRT ID2 ID2 et de l'inverse agoniste T0070907, **C** : PPAR γ LBD en conformation active en présence du peptide coactivateur TRAP220/Med1 et du ligand agoniste rosiglitazone, **Adaptée de Shang et al., 2020.**

iii. MED1 : le coactivateur des récepteurs nucléaires

Plusieurs complexes constitués de certaines sous-unités du médiateur et d'autres protéines de nature « facteurs de transcription » ayant un rôle dans la régulation de l'expression des gènes ont été isolés. La protéine **MED1** est la sous-unité n°1 du complexe **médiateur** constitué de 30 sous-unités chez l'homme, localisée dans son module central. MED1 est une des protéines partenaire des récepteurs nucléaires comme PPAR ou encore VDR, permettant d'initier la transcription de gènes cibles. Lors de ces interactions avec les RNs, un corégulateur de type coactivateur comme MED1 permet de faire le lien entre ces derniers, la machinerie transcriptionnelle et le médiateur. La protéine MED1 est aussi connue sous le nom de **TRAP** quand elle a initialement été découverte liée au récepteur de l'hormone thyroïdienne (TR) chez l'homme (Fondell et al., 1996), puis mise en

évidence par sa liaison au récepteur de la vitamine D (VDR) sous le nom de **DRIP** (Rachez et al., 1998). L'interaction du complexe médiateur à l'hétérodimère PPAR γ -RXR α se fait donc par l'intermédiaire de MED1/DRIP/TRAP qui joue le rôle de « **pont** » entre ces derniers afin d'initier l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II (Jia et al., 2014) (**Figure 34**).

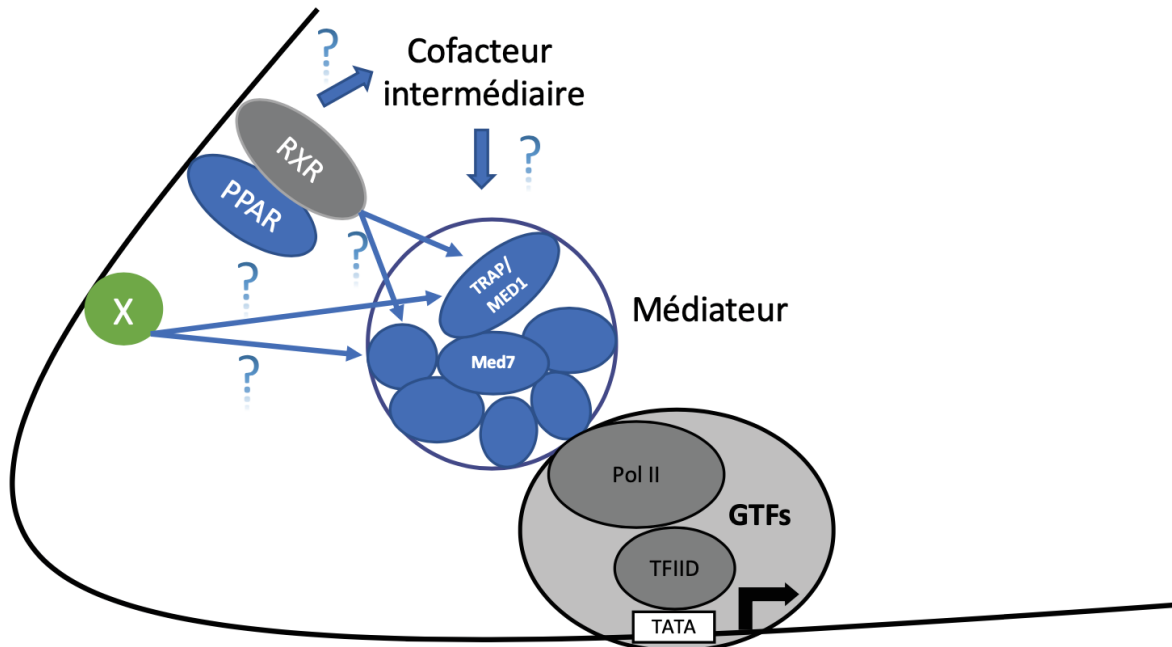


Figure 34 : Modèle du mécanisme d'interaction entre l'hétérodimère PPAR-RXR et le complexe médiateur via TRAP220/MED1 jouant un rôle de « pont » pour la liaison à la machinerie transcriptionnelle, *Adaptée de Ge et al., 2008.*

La protéine MED1 est une protéine de 169 kDa, majoritairement intrinsèquement désordonnée, ce qui explique qu'aucune structure tridimensionnelle de cette protéine n'est disponible dans la littérature actuellement (**Figure 35**). Elle possède **deux motifs consensus LxxLL**, interagissant de façon préférentielle l'un ou l'autre avec un type de RN particulier. En effet, MED1 interagit avec différents RNs : TRs, VDR, RXR α , PPAR α/γ , ou encore ER α/β . Il a été montré que MED1 interagit avec PPAR γ de manière **ligand-dépendante** suggérant un rôle de coactivateur de PPAR γ (Zhu et al., 1997). Néanmoins, le mécanisme d'action permettant de comprendre le lien entre la structure et la fonction de cette protéine reste mal connu à ce jour, malgré un rôle important de MED1 pour PPAR γ mis en évidence dans les processus physiologique d'adipogenèse par exemple (Ge et al., 2008). Les seules structures de complexes RN-MED1 connues à ce jour se limitent à des

peptides coactivateurs, contenant un des deux motifs consensus LxxLL interagissant avec la fonction d'activation AF-2 ligand-dépendante du domaine LBD de PPAR γ .

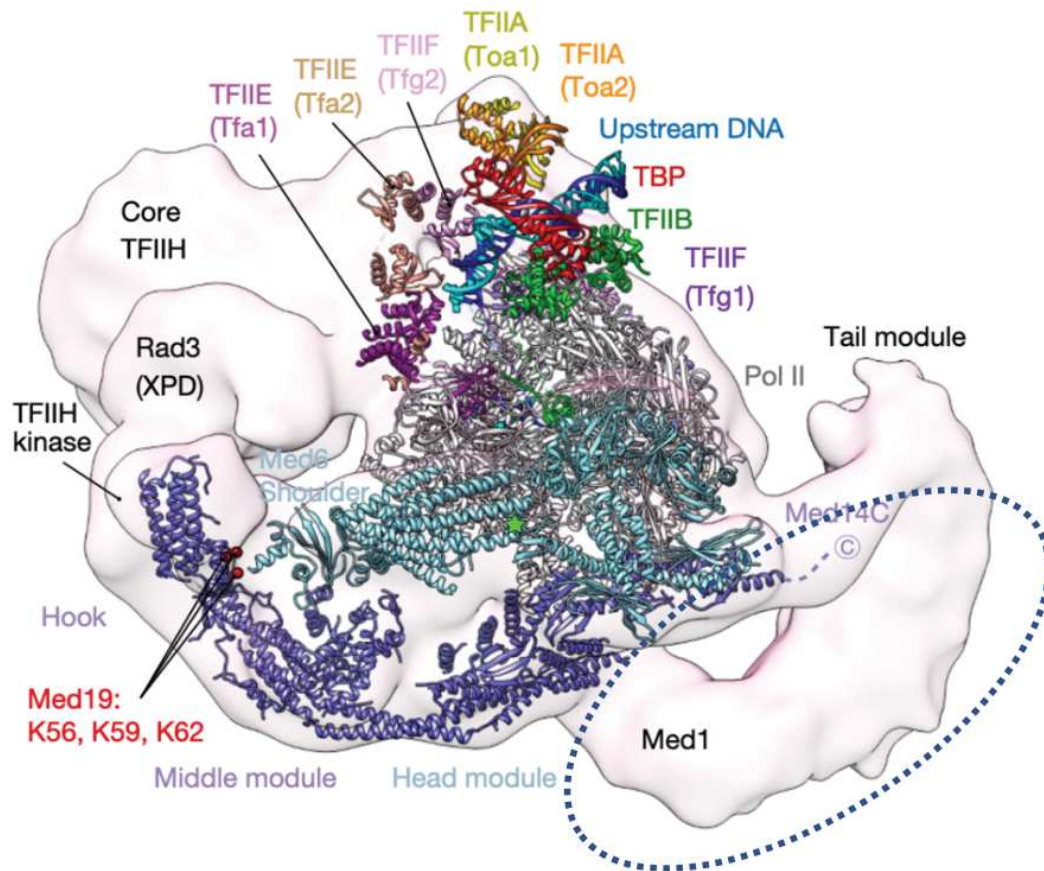


Figure 35 : Modèle du complexe d'initiation de la transcription cPIC-cMed où seule la sous-unité MED1 est manquante dans le complexe cMed résolu par cristallographie aux rayons-X à 3,4 Å, Adaptée de Nozawa et al., 2017b.

5. PPAR γ -RXR α et le cancer de la vessie

a. Structure-Fonction du complexe : état des lieux

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription multi-domaines se liant à l'ADN *via* des éléments de réponse spécifiques permettant la régulation de l'expression génique. Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPARs) forment des hétérodimères avec le récepteur X de rétinoïdes (RXR) où PPAR a été activement étudié comme **cible thérapeutique** de par son lien avec la régulation de l'**insuline**. Néanmoins, l'étude du mécanisme moléculaire par lequel les multi-domaines coopèrent pour moduler les propriétés des récepteurs nucléaires reste

mal connu. En effet, ces complexes sont **dynamiques** et leur **flexibilité** rend leurs études structurales très difficiles. C'est pourquoi, de nombreuses études structurales portent sur l'étude des éléments de réponses isolés ou encore des segments de liaisons avec les ligands, ce qui rend difficile la compréhension du processus dans sa globalité.

Une première structure du complexe **PPAR γ -RXR α entier** (Domaine A/B manquant dans la structure, de par son haut degré de flexibilité) sous forme hétérodimérique lié à l'élément de réponse à l'ADN de type **DR1** (PPRE), à un ligand ainsi qu'au peptide coactivateur a été résolue par **cristallographie aux rayons-X** en 2008 (**Code PDB** : 3DZY), montrant la formation d'un **complexe asymétrique** où le domaine de liaison au ligand (LBD) de PPAR γ est à l'interface d'interaction avec d'autres domaines du complexe entier, ainsi que la mise en évidence de l'existence de trois interfaces d'interactions liant PPAR γ à RXR α qui semblent ADN dépendante. En effet, l'étude montre que le domaine LBD de PPAR γ coopère avec son propre domaine de liaison à l'ADN (DBD) et celui de RXR α , permettant d'améliorer la liaison à l'élément de réponse PPRE. La structure décrit un arrangement **polaire** des **DBDs** de PPAR γ et RXR α respectivement, où PPAR γ semble se positionner en amont de RXR α , montrant aussi que les DBDs et leur extension C-terminale (CTE) forment une interaction de type « **tête-bêche** » ADN-dépendante à travers les chaînes latérales de leurs résidus (**Figure 36**). L'élément de réponse PPRE semble contribuer de manière **allostérique** à sa propre interaction aux DBDs des deux récepteurs (Chandra et al., 2008).

Parallèlement à cette étude, une autre étude met en évidence une **structure en solution** du complexe PPAR γ -RXR α en présence de l'élément de réponse à l'ADN de type DR1, de peptides coactivateurs tels que MED1 ou encore SRC1 et de ligands par **Diffusion de rayons-X aux petits angles (SAXS)**, montrant une conformation différente que celle résolue par cristallographie aux rayons-X (Rochel et al., 2011).

Ces deux études citées précédemment soulignent l'importance de l'étude de structures de complexes de RNs entiers dans différents états fonctionnels afin de dénouer l'architecture et le rôle allostérique que joue l'ADN dans la formation et l'organisation structurale de l'**hétérodimère PPAR γ -RXR α** . Il faut noter que les informations structurales obtenues par la méthode SAXS ont le privilège de ne pas être biaisées par le « *packing* » cristallin évitant ainsi les artéfacts. Les résultats de cette étude montrent une forme allongée du complexe PPAR γ -RXR α -DR1 entier, ainsi qu'un

volume d'interaction entre les DBDs et les LBDs plus large que celui présenté dans la structure cristallographique (Code PDB : 3DZY) (Figure 37).

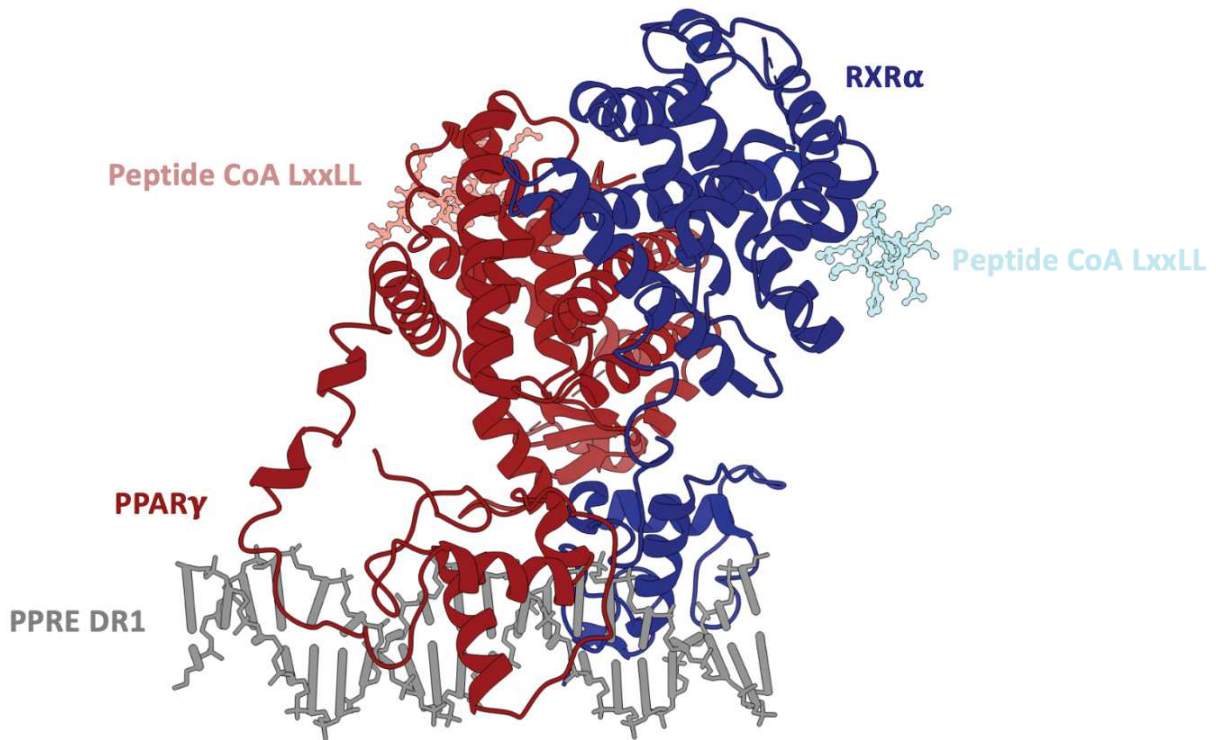


Figure 36 : Structure du complexe PPAR-RXR en interaction « tête-bêche » avec son élément de réponse PPRE à l'ADN de type DR1 (Direct Repeat 1), **ChimeraX**.

De plus, les domaines LBDs sont localisés d'un seul côté de l'élément de réponse à l'ADN de type DR1 suivant l'axe orienté de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' qui le définit (Figure 37). On peut donc observer qu'actuellement, les rares données structurales du complexe entier sont contradictoires : d'une part une étude structurale par cristallographie aux rayons-X décrivant une conformation compacte, et à l'inverse, une étude par SAXS en solution décrivant une conformation allongée du complexe PPAR γ -RXR α -DR1. Ces différentes conformations peuvent être ensuite reconnues par les corégulateurs. Des études structurales de complexes de PPAR-RXR-ADN avec les corégulateurs sont ainsi nécessaires pour déterminer la conformation de complexes plus fonctionnels et sont indispensables pour la compréhension des mécanismes moléculaires régissant l'activation ou la répression de la transcription des gènes régulés par PPAR-RXR.

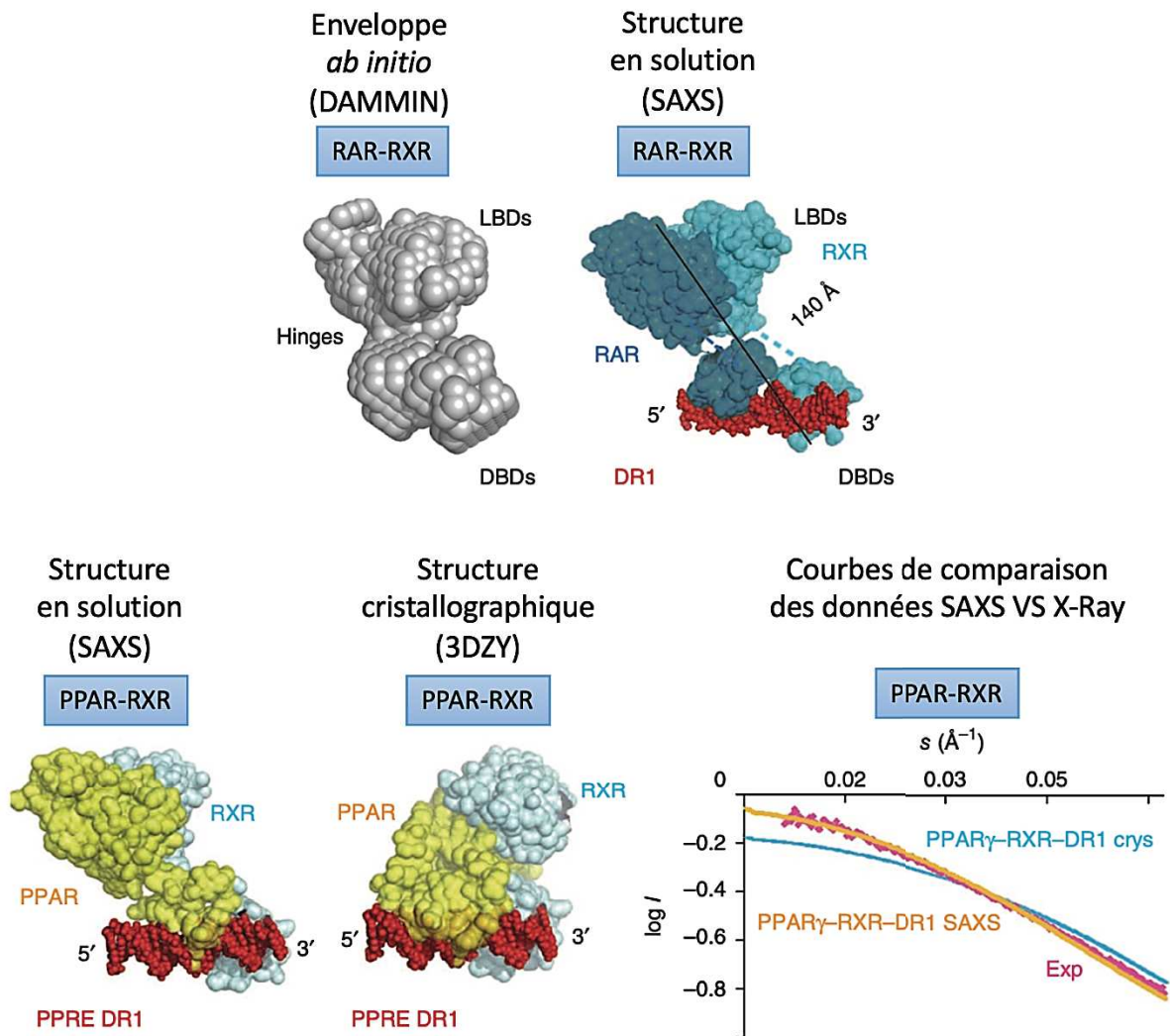


Figure 37 : Analyses et comparaisons des données structurales par cristallographie aux rayons-X (PDB 3DZY) et en solution par SAXS des complexes RAR-RXR et PPAR-RXR liés à leur élément de réponse à l'ADN de type DR1, *Adaptée de Rochel et al., 2011.*

b. La tumorigenèse urothéliale

i. Le cancer de la vessie : Généralités

Le **cancer** est un processus particulier où la transformation cellulaire est générée par une accumulation de modifications génétiques et épigénétiques. Ces modifications altèrent des processus vitaux tels que la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, ou encore le contrôle du maintien de l'intégrité du génome. Néanmoins, les modifications les plus connues dans les cancers concernent l'activation de gènes préexistants en oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs entraînant une prolifération cellulaire incontrôlée. La majorité des cancers chez l'Homme se manifestent par l'apparition de **carcinomes** : des tumeurs issues d'une désorganisation des épithéliums. De plus, les facteurs aggravants tels que les facteurs

environnementaux, génétiques acquis ou innés, ainsi que des agents infectieux jouent un rôle important dans l'apparition de tumeurs. Le cancer est un problème majeur de santé publique en France puisqu'il est responsable de près de 150 000 décès par an.

Dans les pays industrialisés, le **cancer urothélial de vessie** se situe au onzième rang au niveau mondial. En France, on estime à 13 100 nouveaux cas en 2018, dont 81 % chez l'homme. Ce cancer touche trois à quatre fois plus les hommes que les femmes et la mortalité est cinq fois plus élevée chez ce dernier. Le **tabac** est la première cause des cancers de vessie dû aux cancérogènes urothéliaux contenus dans la fumée du tabac (métabolites du tryptophane et des amines aromatiques). Le deuxième facteur de risque connu est lié aux expositions professionnelles notamment pour les personnes du secteur industriel, comme les industries chimiques, automobiles ou métallurgiques (Kogevinas et al., 2003). Rajoutés à ces facteurs de risques, l'agence internationale de la recherche contre le cancer (IARC) a classé la pollution atmosphérique parmi les cancérogènes. En effet, de plus en plus d'études montrent le lien important entre la pollution et l'augmentation des risques de développer un cancer, notamment du poumon mais également de la vessie (Loomis et al., 2014). Les **tumeurs de la vessie** sont classées selon **trois types** : les tumeurs à faible potentiel de malignité, les tumeurs de bas grade et enfin les tumeurs de haut grade. Elles sont soit **invasives** soit **non invasives** ou **superficielles**, appelées aussi **infiltrantes** ou **non infiltrantes** (**Figure 38**).

ii. Les différents types de tumeurs urothéliales

Les **tumeurs de vessie** forment un groupe hétérogène aux caractéristiques morphologiques et biologiques différentes, ainsi qu'aux pronostics variés. Il faut noter que le modèle admis de l'**oncogenèse urothéliale** est donc séparé en **deux voies** distinctes possédant chacune ses caractéristiques, ses pronostics et altérations propres (Wu, 2005).

La première voie la plus fréquente englobe 80 % des tumeurs urothéliales : ces tumeurs de bas grade sont caractérisées par une morphologie papillaire (**Figure 38**) et possèdent des pronostics encourageants. Cependant, leur fort taux de récurrence (70 % environ) nécessite une surveillance accrue du patient. La première altération génomique mise en évidence pour cette voie tumorale urothéliale concerne l'oncogène *HRAS* (Reddy et al., 1982).

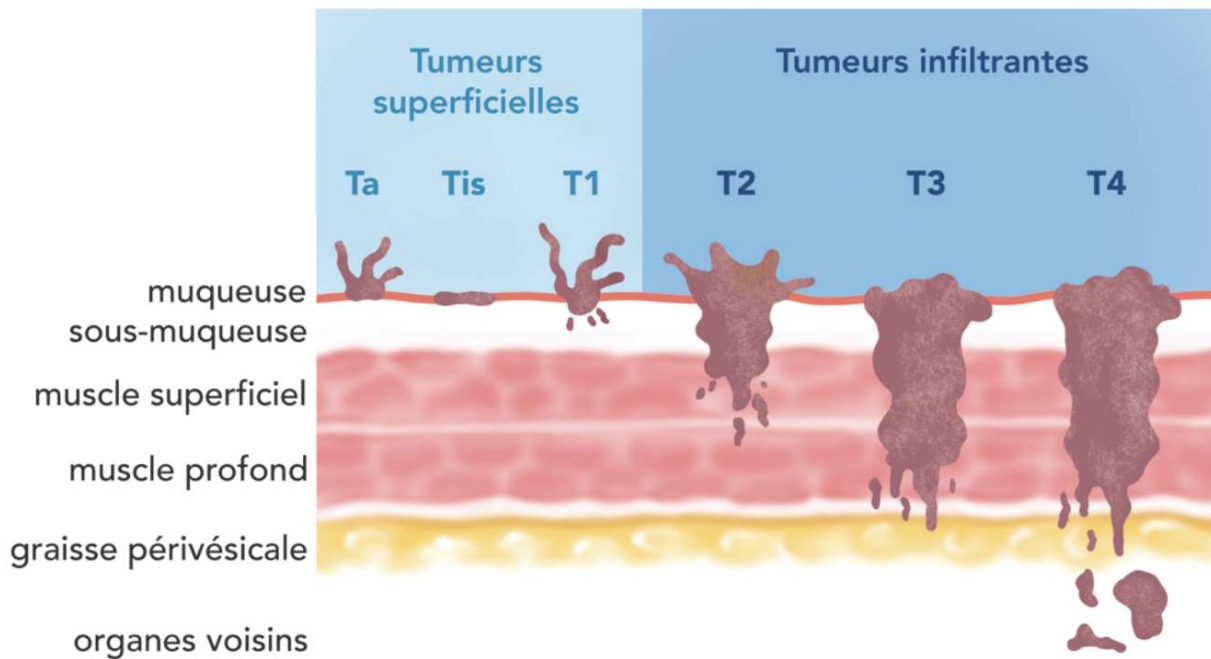


Figure 38 : Représentation schématique de la classification de la progression tumorale des cancers de vessie, www.e-cancer.fr.

De plus, 70 % de ces tumeurs papillaires présentent des mutations de *FGFR3* entraînant une activation constitutive de la protéine (Williams et al., 2013).

Les 20 % des tumeurs restantes sont diagnostiquées à un état avancé de type invasif. Ces tumeurs sont particulièrement agressives : en effet, 50 % des patients décèdent dans les 5 ans suivant le diagnostic. Ces tumeurs dérivent d'un carcinome *in situ* (CIS), une lésion cancéreuse plane de haut grade (**Figure 39**). Contrairement aux tumeurs papillaires, ces dernières sont soumises à un haut risque de progression (5 % contre 40-50 % respectivement). Cette deuxième voie présente aussi des marqueurs d'altérations génomiques, notamment une altération touchant la voie de signalisation p53. Des mutations identifiées engendrent une inactivation totale de la voie p53 ayant pour conséquence la perte de la régulation du cycle cellulaire ainsi que celle de l'apoptose (He et al., 2009). De plus, les tumeurs infiltrantes sont également enrichies en altérations de *RB1*. Les mutations de cette protéine initialement décrite comme facteur de risque dans le rétinoblastome de l'enfant, entraînent chez l'adulte une augmentation du développement de tumeurs urothéliales (Fletcher et al., 2004).

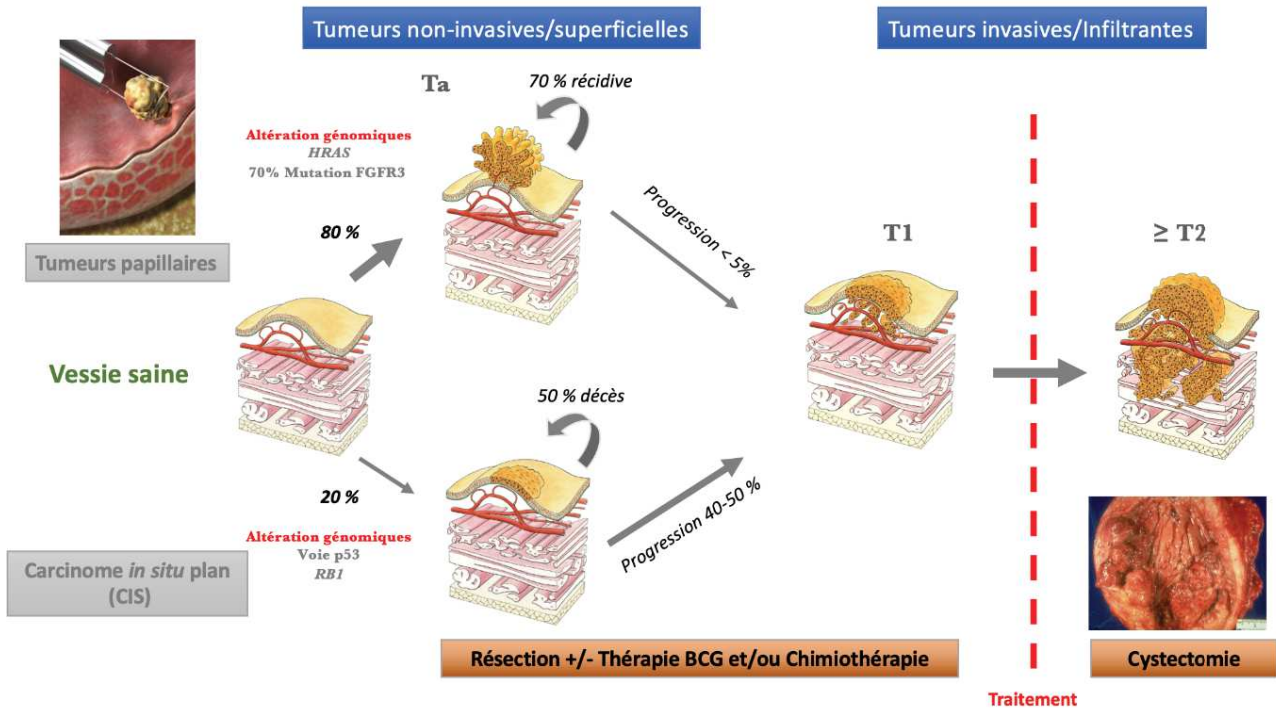


Figure 39 : Schéma global des deux principales voies de la tumorigenèse urothéliale, les différents types de tumeurs et les altérations génomiques associées.

On distingue plus particulièrement **3 groupes de tumeurs urothéliales (Figure 39)** :

- Les **tumeurs superficielles de stade pTa** de bas grade sous forme de carcinomes de vessie. Ces tumeurs récidivent très souvent (60 % des cas) mais progressent rarement (5 % des cas). Ces tumeurs sont intra-épithéliales et peuvent être résectuées de manière chirurgicale en association ou non avec un traitement de type immunothérapie (BCG) ou par chimiothérapie.
- Les **tumeurs superficielles à risque** (Tumeurs Ta de haut grade, carcinomes *in situ*, tumeurs T1). Ces tumeurs récidivent également très souvent, et peuvent progresser vers un phénotype agressif. Elles peuvent être résectuées chirurgicalement mais il faut noter que leurs évolutions restent imprévisibles. Une surveillance par cystoscopie du patient est donc requise, mais néanmoins invasive et coûteuse.
- Les **tumeurs invasives, infiltrantes ou métastatiques** représentent le dernier groupe de tumeurs urothéliales (tumeurs de stade pT2 à pT4). Elles envahissent le muscle et les organes avoisinants. Ces tumeurs sont très agressives et ont un fort potentiel métastatique. Elles ne permettent que 50 % de survie à 5 ans pour les stades localisés. L'intervention quasi

systématique pour traiter ces tumeurs reste la cystectomie ou ablation de la vessie : une intervention lourde et invalidante pour le patient n'empêchant pas un pronostic vital engagé. Le traitement complémentaire reste la chimiothérapie associée ou non à la radiothérapie. Plusieurs protocoles médicamenteux pour traiter ces tumeurs sont connus et utilisés à ce jour mais la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques pour leur traitement apparaît comme un enjeu majeur.

c. PPAR γ -RXR α et les tumeurs urothéliales

i. *Rôle de PPAR γ comme potentiel suppresseur de tumeurs*

Chez l'Homme, **PPAR γ** est l'isotype le plus largement étudié des PPARs. Récemment, PPAR γ a été montré comme étant exprimé dans plusieurs types de cancers : foie, prostate, vessie, côlon, sein, duodénum ou encore thyroïde, et certaines études semblent montrer que les activateurs de PPAR γ inhibent la prolifération des tumeurs de vessie. Les premières études du rôle de PPAR γ dans la tumorigenèse urothéliale ont été réalisées sur une lignée de carcinomes de vessie non-luminale (T24) ayant une faible expression de PPAR γ (Earl et al., 2015). Le traitement de ces lignées par des ligands de PPAR γ entraîne une diminution de la viabilité cellulaire, tandis que l'activation de l'hétérodimère PPAR γ -RXR α par leurs ligands respectifs montre un effet synergique sur cette diminution de la viabilité cellulaire (Mansure et al., 2013).

Des études montrent également qu'un agoniste de PPAR γ inhibait la croissance de cellules cancéreuses de vessie, décrivant ainsi un rôle de **suppresseur de tumeurs** de PPAR γ . Ces résultats laissent supposer que l'activation de PPAR γ semble être une piste prometteuse pour un éventuel traitement du cancer de la vessie, ce qui rend PPAR γ une **cible thérapeutique** intéressante. Néanmoins, des études ont mis à jour un lien significatif entre l'utilisation d'agonistes de PPAR γ , notamment la pioglitazone, et l'incidence de cancer de la vessie (Azoulay et al., 2012). Par conséquent, l'hypothèse du rôle oncogénique de PPAR γ va à l'encontre du rôle de suppresseur de tumeurs décrit précédemment.

ii. *Rôle protumorigénique de PPAR γ dans les tumeurs luminales de vessie*

Depuis la mise en évidence de ces deux hypothèses opposées, plusieurs études se sont focalisées sur la compréhension du mécanisme moléculaire par lequel PPAR γ intervient et dans quelles mesures il peut être soit suppresseur de tumeurs, soit oncogène. L'un des premier indices

du rôle protumorigénique de PPAR γ a été mis en évidence par la suspicion d'une augmentation des risques de cancers de vessie chez des patients traités par la pioglitazone pour une diabète de type 2 (Lewis et al., 2011). De nombreuses études ont été menées à ce sujet, aboutissant à des résultats variés. Cependant, des métadonnées publiées ont confirmé qu'il y a bien une augmentation du risque de développement d'un cancer de la vessie chez les patients ayant été exposés au traitement à long terme (Chiu et al., 2017).

De plus, une amplification du gène *PPARG* est observée dans 20 % des tumeurs de vessie montrant le rôle de cette dernière dans la progression des tumeurs, notamment les tumeurs invasives et les tumeurs de haut grade, soulignant ainsi l'importance de l'activation de la voie PPAR γ dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses urothéliales (Yang et al., 2013).

Au vu de l'ensemble des résultats des différentes études dans la littérature, une meilleure compréhension du rôle de PPAR γ dans la cancérogenèse urothéliale semble essentielle pour mieux comprendre les voies métaboliques impliquées dans l'évolution des tumeurs de vessie dans un but de développer de nouvelles **cibles thérapeutiques** plus **spécifiques**. Afin de mieux comprendre les mécanismes de progression tumorale des cancers de vessie, l'équipe de François Radvanyi (Institut Curie) a entrepris une analyse du transcriptome de plus de 200 échantillons tumoraux permettant l'analyse simultanée de plus de 12 000 gènes. Une corrélation significative entre l'altération génomique et l'expression du gène *PPARG* dans les échantillons tumoraux et les lignées cellulaires de vessie a été observée. De plus, des **données transcriptomiques** ont permis de mettre en évidence l'existence de sous-types de tumeurs invasives du muscle urothélial : des **tumeurs basales** ou **luminales** de la vessie.

Des recherches systématiques de **mutations** de ce récepteur nucléaire ont été entreprises par différentes équipes. Il est montré que le gène *PPARG* qui code pour le récepteur nucléaire PPAR γ est activé dans les cancers de vessie, directement par l'amplification du gène ou par l'effet de mutations de PPAR γ ou de RXR α (Goldstein et al., 2017a). Goldstein et al., ont également montrés qu'une exposition prolongée de lignées cellulaires de tumeurs luminales aux inverses agonistes de PPAR γ entraîne également une diminution de la viabilité cellulaire, soutenant ainsi l'hypothèse du **rôle protumorigénique** de PPAR γ au sein de ces tumeurs. La question de l'importance du partenaire d'hétérodimérisation RXR α de PPAR γ a également été soulevée. Des études ont tenté de répondre aux interrogations et mettent en évidence des mutations récurrentes activatrices identifiées sur RXR α (Korpál et al., 2017a) (Goldstein et al., 2017a). Ces mutations S427F/Y touchent une zone

particulière qui correspond à l'interface de dimérisation entre RXR α et PPAR γ , entraînant une stabilisation de l'interaction entre les deux partenaires protéiques, ainsi que la stabilisation de la conformation agoniste aboutissant à l'augmentation de la transcription des gènes cibles (**Figure 40A et 40B**).

Des **altérations génomiques** sont également observées et sont complétées par des études fonctionnelles, mettant ainsi en évidence l'existence de **mutations activatrices** ou **inactivatrices** de **PPAR γ** révélant ainsi un rôle protumorigénique de ce dernier dans les tumeurs luminales du muscle urothélial (Biton et al., 2014a).

Le **statut mutationnel** de *PPARG* a été étudié à partir de tumeurs de vessies par l'équipe de François Radvanyi, et cette étude a mis en évidence des **mutations récurrentes** ou non de **PPAR γ** ainsi que de **RXR α** dans 3,9 % (14/359) et 1,7 % (6/338) des tumeurs, respectivement (Rochel et al., 2019a). L'ensemble des résultats de ces études a permis de montrer que PPAR γ semble se comporter plutôt comme un **oncogène** dans certaines tumeurs de vessie, contrairement à ce qui était décrit dans la plupart de la littérature à ce jour.

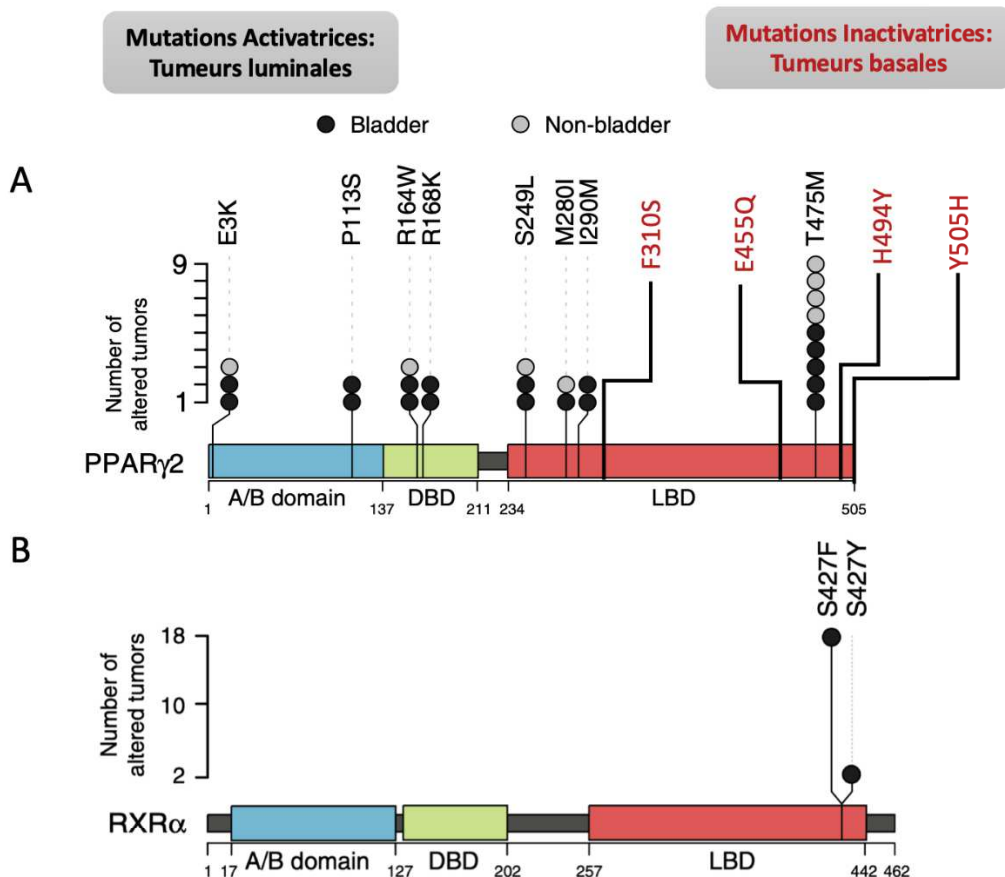


Figure 40 : Représentation schématique des mutations récurrentes activatrices ou inactivatrices identifiées de PPAR γ (A) et RXR α (B) dans des tumeurs de vessie, **Adaptée de Rochel et al., 2019.**

6. Objectifs de thèse

Ce projet de thèse en collaboration entre l'équipe de N. Rochel (Département de Biologie Structurale Intégrative, UMR 7104-IGBMC) et l'équipe de F. Radvanyi (UMR144, CNRS-Institut Curie), équipe labélisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, a pour sujet d'étude, les récepteurs nucléaires PPAR γ et RXR α et leurs mécanismes d'action à la base de l'activité protumorigénique dans les cancers de vessie.

Une analyse du transcriptome et des altérations génomiques sur des échantillons tumoraux de vessie ont été réalisés par l'équipe de F. Radvanyi à l'institut Curie. Ces études ont permis de mettre en évidence une région minimale contenant le gène codant pour le récepteur nucléaire PPAR γ . En effet, le rôle protumorigénique de PPAR γ dans les tumeurs lumineales de la vessie est définit. Néanmoins, les mécanismes impliqués suite aux altérations observées restent mal compris à ce jour. De plus, une corrélation significative entre l'altération génomique et le niveau d'expression de PPAR γ est observée dans les échantillons tumoraux analysés ainsi que les lignées cellulaires de vessie étudiées. Ces données sont confrontées aux données contradictoires dans la littérature où PPAR γ est considéré comme **suppresseur de tumeur** d'une part, ou comme **oncogène** d'une autre part. Ces contradictions nous ont mené à se focaliser sur ce facteur de transcription afin de comprendre le rôle joué par PPAR γ dans les cancers de la vessie et les mécanismes impliqués.

Tout d'abord, le statut mutationnel du gène *PPARG* dans les tumeurs de vessie a été étudié. Plusieurs mutations récurrentes ou non, **activatrices** (tumeurs lumineales) ou **inactivatrices** (tumeurs basales) ont été identifiées chez PPAR γ et son partenaire RXR α dans différentes tumeurs et lignées cellulaires étudiées. Les gènes cibles régulés par PPAR γ sont connus, notamment les gènes dans les adipocytes qui ont été largement étudiés. Néanmoins, les gènes qu'il régule dans l'urothélium vésical sain et tumoral sont mal connus à ce jour. Il est donc essentiel de comprendre le fonctionnement de cette voie dans les tumeurs lumineales et basales et d'établir plus précisément le rôle de l'hétérodimère PPAR γ /RXR α dans les mécanismes protumorigéniques observés. Il faut donc d'une part caractériser le rôle du complexe PPAR γ /RXR α dans la tumorigénèse urothéliale et d'une autre part l'utiliser comme potentielle cible thérapeutique pour le traitement des cancers de la vessie.

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les cancers de la vessie, les rôles joués par le récepteur nucléaire PPAR γ et le complexe PPAR γ /RXR α , et de répondre aux questions

biologiques posées, **deux objectifs généraux** de la thèse sont définis. Ceux-ci seront détaillés dans la partie « **Introduction et objectifs** » de chaque chapitre :

(I) Caractériser les changements de structure et d'activité induits par des mutations inactivatrices de PPAR γ , sa liaison à des séquences d'ADN et à des coactivateurs, et identifier des ligands qui modulent cette structure/activité. Au cours de mon projet de thèse, j'ai mené une étude de caractérisation de complexes formés par PPAR γ et des peptides corégulateurs en utilisant des méthodes biochimiques et biophysiques. L'impact de mutations somatiques inactivatrices, identifiées auparavant sur des tumeurs de patients atteints de cancers de vessie, ont été étudiées par des approches biophysiques et structurales afin de comprendre leurs mécanismes d'actions et leurs impacts dans le recrutement de ligands et de corégulateurs essentiels à la transcription de gènes cibles. Plusieurs structures tridimensionnelles ont été obtenues par cristallographie aux rayons-X. L'impact des mutations inactivatrices sur l'affinité de recrutement de ligands et de corégulateurs par des approches biophysiques a aussi été étudié. Une première partie concernant deux mutants inactivateurs est en cours de publication (Laure Coutos-Thévenot, **Syrine Beji**, *et al*, 2020) et une seconde partie des données font l'objet de la préparation d'une deuxième publication scientifique (**Syrine Beji** *et al*, *In preparation*). Cet axe de mon projet de recherche est présenté dans le « **Chapitre 2** » de ce manuscrit de thèse.

(II) Caractériser l'interaction de PPAR γ -RXR α avec des séquences ADN (élément de réponse de PPAR γ , PPRE) et le coactivateur MED1. L'optimisation biochimique de l'étude du complexe a été réalisée durant mon travail de thèse. L'optimisation de l'étude structurale du macro-complexe protéique PPAR γ -RXR α et leur coactivateur MED1 a été réalisée par cryo-microscopie électronique (Cryo-ME), des résultats préliminaires ont été obtenus. Cet axe de mon projet de thèse est exposé dans le « **Chapitre 3** » de ce manuscrit de thèse.

Chapitre 2

Études structurales et biophysiques des mutants de PPAR γ impliqués dans le cancer de la vessie

Chapitre 2 : Études structurales et biophysiques de mutants de PPAR γ impliqués dans le cancer de la vessie

1. Introduction et objectifs

Le domaine de liaison au ligand ou **LBD** va faire l'objet principal de cette étude. Les ligands sont responsables de la régulation de l'activité du récepteur nucléaire auquel ils sont liés, permettant d'initier la transcription des gènes cibles via le recrutement de corégulateurs protéiques : **corépresseurs** ou **coactivateurs**.

Les PPARs sont actifs en tant qu'hétérodimères en association avec le récepteur nucléaire X des rétinoïdes, RXR. Le complexe PPAR γ /RXR α est un régulateur clé de la différenciation des adipocytes et est impliqué dans l'homéostasie du glucose et la sensibilisation à l'insuline, il est également impliqué dans la différenciation de l'urothélium. Plusieurs études à ce jour mettent en évidence les rôles que joue PPAR γ dans la régulation de l'expression génétique de nombreuses maladies, dont l'obésité, le diabète et certains cancers. Le rôle de PPAR γ dans les **tumeurs basales de vessie** va faire l'objet de cette partie du manuscrit de thèse.

Initialement PPAR γ a principalement été montré comme présentant des activités de suppresseur de tumeurs, mais récemment plusieurs arguments indiquent qu'il présente un rôle protumorigénique dans les cancers de vessie (Rochel et al., 2019a) (Li et al., 2008). L'hypothèse d'un rôle oncogénique de PPAR γ a été émise suite à l'observation d'un risque accru de développer des cancers de vessie chez des patients diabétiques ayant suivi un traitement à base d'agonistes de PPAR γ . Depuis 2012, ces composés agonistes (la rosiglitazone, la troglitazone ou encore la pioglitazone par exemples) de PPAR γ ont été retirés du marché dans plusieurs pays dont la France. Cette hypothèse a par la suite été confortée par l'identification d'une signature transcriptomique d'activation de PPAR γ dans un sous-groupe de tumeurs de vessie envahissant le muscle. Ce rôle oncogénique de PPAR γ dans les tumeurs de vessie a encore été renforcé par les travaux de l'équipe de F. Radvanyi qui a mis en évidence une région minimale d'amplification contenant uniquement *PPARG* puis a démontré que

la perte d'expression de PPAR γ induisait une inhibition de la croissance cellulaire. Une récente publication met en évidence une classification précise des différentes classes selon le pourcentage de tumeurs envahissant le muscle (MIBC) décrivant les cellules tumorales, leurs microenvironnements, ainsi que les mécanismes oncogéniques et altérations génomiques connus à ce jour (Kamoun et al., 2020) (Figure 41).

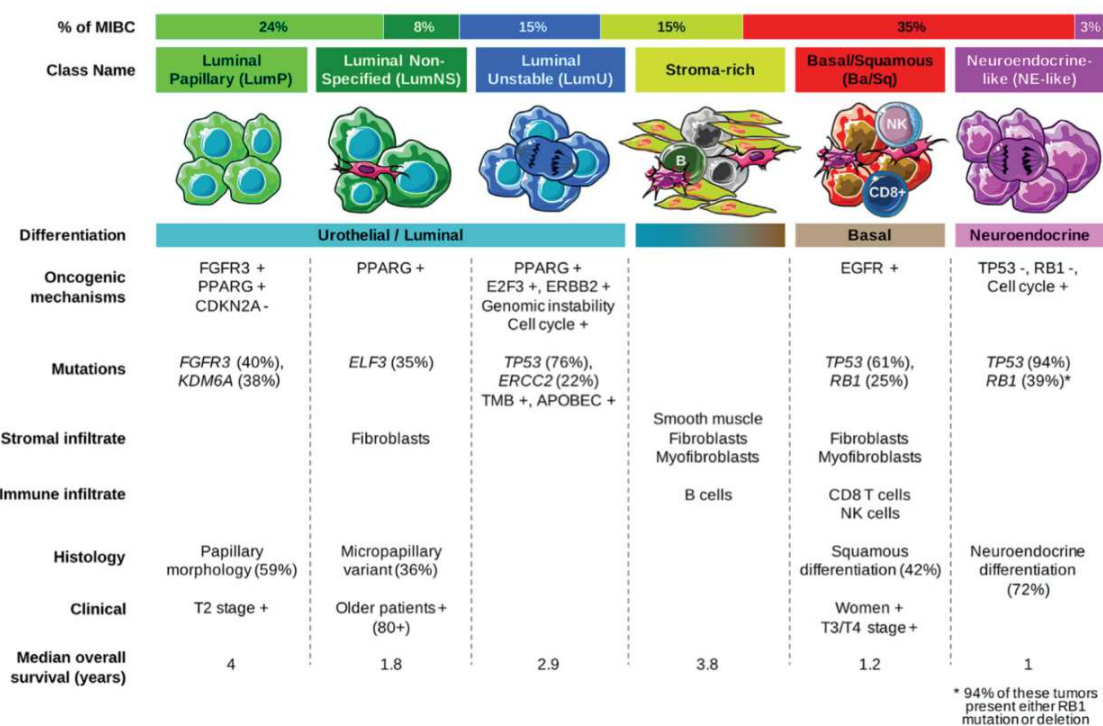


Figure 41 : Représentation graphique des cellules tumorales et leurs microenvironnements classées selon le pourcentage de chaque type de tumeurs envahissant le muscle urothélial (MIBC), (Kamoun et al., 2020).

Afin de démontrer l'implication de PPAR γ , les auteurs ont étudié l'effet de l'inactivation de la fonction de PPAR γ par l'utilisation de siRNA sur la croissance de neuf lignées cellulaires dérivées de cancers de la vessie et ont montré que l'inhibition de la prolifération cellulaire était corrélée au taux d'expression de PPAR γ dans ces cellules (Biton et al., 2014a) (Rochel et al., 2019a). De plus, il a été montré que PPAR γ contrôle l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des cellules tumorales. Plus récemment, l'équipe de F. Radvanyi a exploré la possibilité que PPAR γ soit non seulement amplifié dans les tumeurs de vessie envahissant le muscle mais aussi qu'il soit muté. Le séquençage de PPAR γ dans des tumeurs de cancers de vessie de différents grades et stades de tumeurs (tumeurs invasives et non invasives) a révélé 8 mutations somatiques. Par conséquent, PPAR γ peut être affecté par des amplifications dans les cancers de vessie (environ 30 % des cas)

mais aussi par des mutations (3 % des cas). De plus, le séquençage de *RXR α* dans 403 tumeurs, montre la présence de deux mutations récurrentes du partenaire hétérodimérique de PPAR γ , (TCGA, 2014) dans les tumeurs envahissant le muscle (5 % des cas).

Globalement, il a été trouvé des altérations génétiques de *PPARG* ou *RXR α* (amplifications ou mutations) dans 50 % des cas de cancers de vessie. Les mutations trouvées sont localisées dans les domaines DBDs et LBDs de PPAR γ , et dans le domaine LBD de *RXR α* (**Figure 42**). Ces mutations sont soit activatrices (Rochel et al., 2019a), soit inactivatrices ou encore appelées mutations perte de fonction.

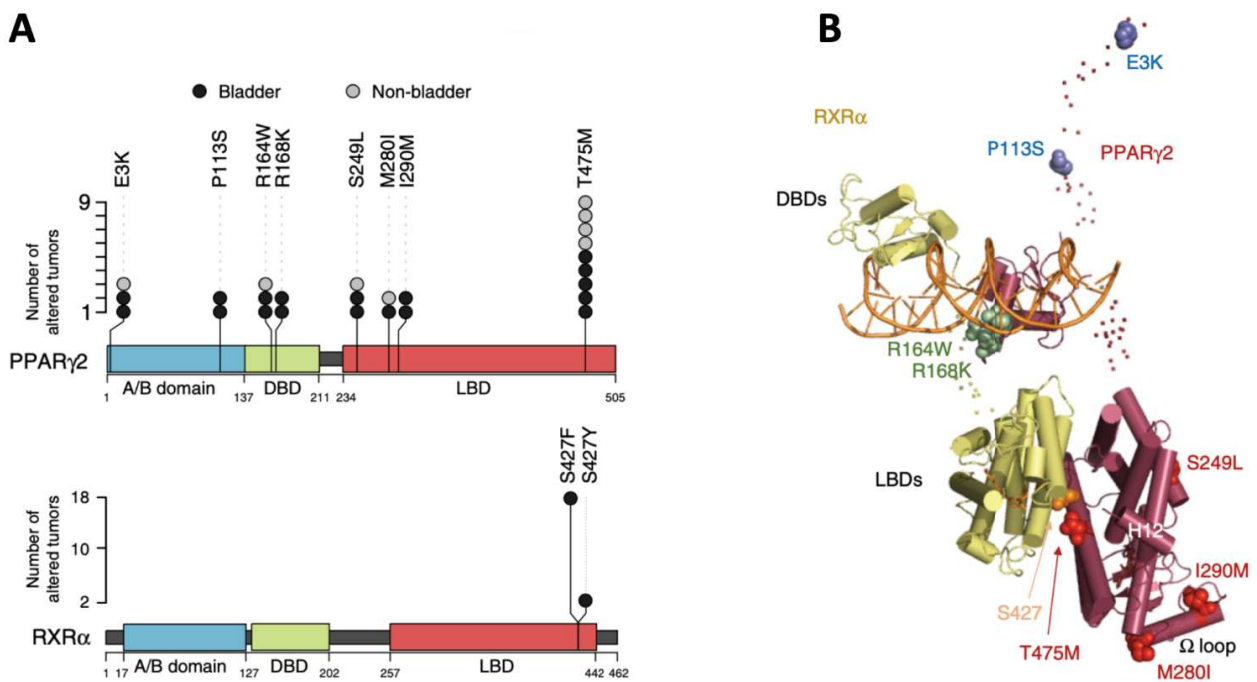


Figure 42 : Les mutations de PPAR γ et de RXR α identifiées dans les cancers de vessie, **A** : Lollipop des mutations récurrentes de PPAR γ (panel du haut) et de RXR α (panel du bas) identifiées sur 859 tumeurs, **B** : Positions des résidus affectés par les mutations récurrentes du complexe PPAR γ RXR α entier, (Rochel et al., 2019a) .

Les mutations récurrentes de PPAR γ identifiées dans des tumeurs lumorales ont fait l'objet d'une première publication (Rochel et al., 2019a). Cette étude a montré l'impact de ces mutations sur la régulation transcriptionnelle de gènes ciblés par PPAR γ -RXR α dans les tumeurs lumorales urothéliales présentant une surexpression de ces gènes. Dans cette partie du manuscrit de thèse, d'autres mutations non récurrentes identifiées dans les cancers de vessie ont été caractérisées afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de régulation de la transcription par PPAR γ et

Chapitre 2 : Caractérisations de mutants de PPAR γ impliqués dans le cancer de la vessie

RXR α et de comprendre les mécanismes étant à la base de l'activité protumorigénique de PPAR γ -RXR α dans les cancers de vessie. Cette étude a été conduite en étroite collaboration avec l'équipe d'Oncologie Moléculaire de François Radvanyi (Institut Curie, Paris). Mes travaux ont porté sur la caractérisation de l'impact des mutations sur le recrutement des corégulateurs et de l'effet de ligands qui modulent cette structure/activité.

Des mutations inactivatrices non récurrentes ont été identifiées telles que les mutations F310S, E455Q, ou encore H494Y. L'analyse de ces mutations et la caractérisation structure-fonction des mutations F310S et H494Y de PPAR γ a fait l'objet d'une publication scientifique en cours de soumission et est présentée dans ce manuscrit de thèse en **Partie 2** (Coutos-Thévenot et al., 2019).

Très peu d'études structurales et biophysiques expliquent à ce jour le recrutement des corépresseurs de PPAR γ et l'impact des mutations sur ce dernier. C'est pourquoi, un dernier volet de cette étude se focalise sur l'étude du recrutement des corépresseurs de PPAR γ (NCoR et SMRT) médié par la présence d'un inverse agoniste (T0070907) et l'impact des mutations identifiées dans les tumeurs basales (F310S et H494Y) sur ce recrutement comparé à la protéine native WT. Cette étude sera présentée sous forme de manuscrit pour publication scientifique en **Partie 3** (Syrine Beji et al, 2020, *In Preparation*).

Manuscrit déposé dans BioRxiv:

Basal subtype-specific tumor suppressor role for

PPAR γ in bladder cancer

2. Caractérisation des mutations inactivatrices de PPAR γ :

Manuscrit déposé dans BioRxiv

Basal subtype-specific tumor suppressor role for PPAR γ in bladder cancer

Laure Coutos-Thévenot^{1,2}, **Syrine Beji**³⁻⁶, Hélène Neyret-Kahn^{1,2}, Quentin Pippo³⁻⁶, Carole Peluso-Ilitis³⁻⁶, Jacqueline Fontugne^{1,2}, Judit Osz³⁻⁶, Clémentine Krucker^{1,2}, Clarice Dos Santos Groeneveld^{1,2}, Florent Dufour^{1,2}, Aurélie Kamoun⁷, Marie Ley⁸, Elodie Chapeaublanc^{1,2}, Aurélien de Reynies⁷, Thierry Lebret^{9,10}, Yves Allory^{1,10,11}, Sarah Cianférani⁸, François Radvanyi^{1,2}, Natacha Rochel^{3-6*} and Isabelle Bernard-Pierrot^{1,2}. *

¹Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR144, Équipe Labellisée Ligue contre le Cancer, 75005 Paris, France

²Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, CNRS, UMR144, 75005 Paris, France

³Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), ⁴Institut National de La Santé et de La Recherche Médicale (INSERM), ⁵U1258/Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), ⁶UMR7104/Université de Strasbourg, Illkirch, France

⁷Ligue Nationale Contre le Cancer, Programme Cartes d'Identité des Tumeurs (CIT), Paris, France

⁸Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, 67000 Strasbourg, France

⁹Hôpital Foch, Department of Urology, Suresnes, France.

¹⁰Université Paris Saclay, UFR de santé, Versailles Saint-Quentin en Yvelines, France

¹¹Institut Curie, department of Pathology, 35 rue Dailly, 92210 Saint-Cloud

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: isabelle.bernard-pierrot@curie.fr

E-mail: rochel@igbmc.fr

Abstract

PPAR γ activation appears to be a critical event in luminal muscle-invasive bladder cancer (MIBC) tumorigenesis, favoring both tumor cell growth and microenvironment modulation toward tumor immune escape. Conversely, the down-regulation of PPAR γ activity in basal MIBC suggests tumor suppressive effects in this subgroup. We identified heterozygous deletions, DNA hyper-methylation and loss-of-function mutations of PPAR γ in basal MIBC, associated with PPAR γ under-expression supporting its tumor suppressor role. Re-expression of PPAR γ in basal tumor cells modulated fatty acid metabolism and cell differentiation and induced a decreased cell growth that could partly rely on EGFR down-regulation. Structure-function studies of two PPAR γ mutant proteins allowed the identification of key structural elements for PPAR γ activities and should help develop potent molecules to activate PPAR γ as a therapeutic strategy for MIBC. The identification of this subtype-dependent dual role of PPAR γ in MIBC strengthens the critical role of PPAR γ in bladder tumorigenesis and reinforces the interest in stratified medicine based on tumor molecular subtyping.

Introduction

PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) is a member of the nuclear receptor transcription family that functions as a permissive heterodimer with retinoid X receptor (RXR α) and recognizes specific sequence motifs, defined as PPRE (peroxisome proliferative response elements) in the regulatory regions of target genes. In the absence of ligand, PPAR γ is complexed with corepressor proteins such as NCoR1 (Nuclear receptor corepressor 1) or SMRT (silencing mediator of retinoic acid receptor) recruiting HDACs (histone deacetylase) and PPAR γ suppresses transcription. Upon ligand binding, a conformational change allows the release of corepressors and recruitment of coactivators such as MED1 (Mediator complex subunit 1) or PGC1 α (PPARGC1A, PPARG coactivator 1 alpha) and PPAR γ acts as a transcriptional activator. A variety of natural ligands, such as polyunsaturated fatty acid or prostaglandin J2 derivatives, and synthetic ligands, such as thiazolinediones, can activate PPAR γ . PPAR γ is involved in regulating glucose homeostasis and adipogenesis (Ahmadian et al., 2013b; Tontonoz and Spiegelman, 2008) but also in differentiation in several tissues including the urothelium (Varley et al., 2004) (Liu et al., 2019). Its role in cancer is less clear and seems to be dual, tumor suppressive (as in colon, lung cancers and neuroblastoma) or pro-tumorigenic (as in pancreatic or bladder cancers) depending on the cell type (Ahmad et al., 2016; Biton et al., 2014b; Goldstein et al., 2017b; Lee et al., 2012; Peters et al., 2012).

In bladder cancer, the 4th most frequent cancer in men in industrialized countries, luminal muscle-invasive bladder carcinomas (MIBCs), a subtype of bladder tumors accounting for 60% of MIBCs (Kamoun et al.; Robertson et al., 2017), have been shown to display a PPAR γ activation signature (Biton et al., 2014b; Choi et al., 2014). This activation is associated with genetic alterations - DNA gains and amplifications (30%), recurrent activating mutations of RXR α (5%) or PPAR γ (4%) - associated with luminal tumors

(Halstead et al., 2017; Korpál et al., 2017b; Robertson et al., 2017; Rochel et al., 2019b; TCGA, 2014). PPAR γ activation renders bladder tumor cell growth PPAR γ -dependent (Halstead et al., 2017; Rochel et al., 2019b) and promotes immune evasion in MIBCs (Hedegaard et al., 2016) highlighting crucial pro-tumorigenic roles of the PPAR γ /RXR α pathway in luminal bladder tumors.

Interestingly, PPAR γ activation signature or regulon activity is dramatically decreased in basal bladder tumors, a subtype accounting for 30% of MIBCs and presenting a poor prognosis, suggesting that PPAR γ could display an opposite role in these tumors (Choi et al., 2014; Kamoun et al.; Rebouissou et al., 2014; Robertson et al., 2017). The loss of PPAR γ activity could be essential for the tumorigenesis of these basal tumors. In this work, we searched for genetic and epigenetic alterations that could drive PPAR γ inactivation in basal bladder tumors and could support a tumor suppressor role of PPAR γ . We identified both heterozygous deletions and DNA hyper-methylation of PPAR γ , associated with PPAR γ loss of expression enriched in basal tumors. Among the non-recurrent mutations of PPAR γ that we previously identified by sequencing PPAR γ in 359 tumors and studying publicly available data for 455 MIBCs (Rochel et al., 2019b), we identified four mutations associated with basal tumors. Functional analysis revealed that these four mutations reduce the transcriptional activity of PPAR γ . A structure-function analysis revealed that two of the mutations affecting the ligand-binding domain, favor the inactive state of PPAR γ through the destabilization of helix H12, thereby impairing the release of corepressors and recruitment of coactivators. Finally, induced PPAR γ expression in basal bladder cancer cell lines activated PPAR γ - dependent transcription and decreased cell viability whereas it displayed no effect on cell viability of luminal cells, supporting a PPAR γ tumor suppressive activity in basal tumors. These tumor suppressive activities could at least partially rely on EGFR down-regulation. Our study provides genetic, epigenetic and functional evidences for a tumor suppressive

role of PPAR γ in basal bladder cancer and therefore support the use of PPAR γ synthetic agonists as a therapeutic option for these tumors. It reinforces the critical central role of PPAR γ in bladder tumorigenesis that appears to be subgroup dependent: pro-tumorigenic in differentiated luminal tumors and tumor suppressive in basal tumors.

Results

Heterozygous deletions, DNA hypermethylation and loss of expression of PPAR γ associated with basal MIBC

We studied *PPAR γ* expression in 197 bladder tumors -101 of which were Non Muscle-Invasive Bladder Cancers (NMIBCs)- in our CIT series of tumors (Carte d'Identité des Tumeurs) using U133 plus 2.0 Affymetrix transcriptomic data (Biton et al., 2014b; Rebouissou et al., 2014) and in 405 MIBC samples using publicly available RNAseq data from The Cancer Genome Atlas (Robertson et al., 2017; TCGA, 2014) genomic database (<http://cancergenome.nih.gov>) (**Fig. 1a**). Tumors were grouped in six molecular classes according to a molecular consensus classification derived from six independent classification systems previously described for MIBC (Kamoun et al.) (**Supplementary Table 1**). In good agreement with the loss of transcriptional activity of PPAR γ observed in basal tumors (Choi et al., 2014; Kamoun et al.; Robertson et al., 2017), we observed a significantly lower expression of PPAR γ in Basal/Squamous tumors and more widely in non-luminal tumors including Neuroendocrine-like and Stroma-rich tumors (**Fig.1a**). Using available copy number data for 385 MIBCs from the TCGA, we observed heterozygous deletions of PPAR γ that were significantly associated with a low expression (**Fig.1b left panel**) and activity (**Fig.1b right panel**) of PPAR γ . Conversely, gains and amplifications were associated with overexpression and hyper-activity of PPAR γ as previously described

(Biton et al., 2014b; Goldstein et al., 2017b; Halstead et al., 2017; Rochel et al., 2019b). We further noticed that these heterozygous deletions were significantly enriched in basal/squamous tumors and could therefore account for part of the losses of expression of PPAR γ in these tumors (**Fig. 1c**). The genomic deletions of PPAR γ in basal tumors were a first genomic evidence supporting a tumor suppressor role of PPAR γ in these tumors. Since aberrant patterns of DNA methylation can also affect tumor suppressor gene expression during tumorigenesis, we analyzed PPAR γ DNA methylation in 368 MIBCs using DNA methylation array data available from TCGA. We identified a significant hyper-methylation of PPAR γ CpGs in basal tumors compared to luminal ones, mostly in shore regions of CpG islands within the PPAR γ promoter (**Fig.1d, upper panel and supplementary Fig.1a**). This hyper-methylation, which correlated with the down-regulation of PPAR γ expression in basal tumors (**Fig.1d, middle and lower panels**), could also account for part of its loss of expression in basal tumors. These results were also validated in our CIT series of tumors (**Supplementary Fig.1b**) and provide an epigenetic evidence supporting the tumor suppressor role of PPAR γ in basal tumors.

Loss-of-function mutations of PPARG in basal tumors

Loss-of-function mutations are also a hallmark of tumor suppressor genes. We therefore searched for such alterations of PPAR γ in basal bladder tumors. We previously sequenced PPAR γ in 359 bladder tumors and studied publicly available data for 455 MIBCs, which allowed us to identify recurrent activating mutations of PPAR γ in 4% of bladder tumors (Rochel et al., 2019). These mutations were enriched in tumors presenting a high PPAR γ activation score, which were mostly luminal tumors, supporting a protumorigenic role of PPAR γ in this subgroup. We also identified eleven non recurrent PPAR γ mutations that we did not further study previously (Rochel et al., 2019b) (**Fig. 2a**). We numbered all mutations

relative to the PPAR γ 2 isoform (NM_015869), which is 28 amino acids longer than the PPAR γ 1 isoform (NM_138712) at the N-terminal end (**Fig. 2a**). Four of these non-recurrent mutations, S74C, F310S, E455Q and H494Y, were associated with basal tumors which presented a low PPAR γ activation score (**Fig. 2b**). We therefore hypothesized that these four mutations could be loss-of-function mutations and investigated their functional impact on the transcriptional activity of PPAR γ (**Fig. 2c and 2d**). We used, in HEK293FT cells, a luciferase reporter gene containing three copies of the DR1 sequence of PPAR γ DNA response element (PPRE) arranged in tandem and linked to the thymidine kinase promoter (PPRE-3X-TK) (Kim et al., 2002). The four PPAR γ mutant proteins had significantly lower levels of transcriptional activity than the wild type even in the presence of rosiglitazone, a synthetic PPAR γ agonist ligand (activity reduced by 25% to 90%) (**Fig. 2c**). We further focused on the two most inactive mutants that affect the ligand binding domain (LBD) of PPAR γ , F310S and H494Y. We showed that their overexpression in basal bladder 5637 cells induced a significantly lower expression of several known PPAR γ target genes (*FABP4* and *ACSL5*) compared to the wild-type protein as shown by RT-qPCR (**Fig. 2d**). The effects of the mutants were comparable to that of the empty plasmid, suggesting an absence of transcriptional activity of the proteins in this system. The results of these two different approaches to measure PPAR γ transcriptional activity clearly showed that PPAR γ mutations F310S and H494Y are loss-of-function mutations affecting basal tumors.

Loss-of-function mutations impair the release of corepressors and recruitment of coactivators by PPAR γ in the presence of ligand.

We then used biochemical and biophysical analyses to understand how these two mutations impair PPAR γ activity. The H494Y mutation involves a residue at the N-terminal boundary of helix 12 whereas F310S is located in the N-ter of helix 3 facing the loop between

helices 11 and 12 (**Fig. 3a**). Native electrospray mass spectrometry indicated that the purified recombinant LBD wild-type and mutants (**Supplementary Figs. 2-3**) were not bound to any ligand (**Supplementary Fig. 4**). We used nano differential scanning fluorimetry to compare the thermal stability of the purified PPAR γ WT and mutants, alone and upon binding to the agonist ligand, GW1929 (**Supplementary Fig. 2c**). The two mutants in their apo form, exhibit a lower melting temperature (T_m) than the WT with a ΔT_m of 1°C and 2°C for F310S and H494Y, respectively. Of note, GW1929 induced a strong stabilization of the WT, as well as of the 2 mutants, suggesting that the 2 mutations do not significantly affect the binding of the ligands. Both mutants efficiently formed heterodimers with RXR α similarly to PPAR γ wild-type (**Supplementary Fig. 2b**). We therefore focused on the ability of mutations to modulate PPAR γ binding to corepressors and coactivators, which involves recognition of motifs on coregulators by the LBD, and ultimately regulates the transcriptional output of target genes. Mammalian two-hybrid assay in HEK293FT cells using VP16-fused PPAR γ (wild-type, F310S and H494Y), GAL4-DNA-binding-domain-fused co-repressor (NCoR1 or SMRT) or co-activator MED1 and pG5-LUC reporter showed that in the context of full protein and in presence of 1 μ M exogenous ligand (rosiglitazone), the two mutations significantly favor the binding of the two co-repressor domains and inhibit the recruitment of MED1 coactivator domain compared to PPAR γ wild-type (**Fig. 3b**). The lower recruitment of the coactivator and increased recruitment of the corepressor by the two mutants was confirmed by monitoring coregulator peptides recruitment by the different LBDs (**Fig. 3c**). We measured the interaction between wild-type or mutant forms of PPAR γ and a fluorescently labeled coactivator peptide of PGC1 α (PPARGC1A) or a fluorescent labeled NCoR1 corepressor peptide, by MicroScale Thermophoresis. In the absence of ligand, the WT recruits the coactivator peptide with higher affinity than the two mutants (**Fig. 3c**). The addition of a full agonist, rosiglitazone (**Supplementary Fig. 5**), enhanced the interaction between PPAR γ and PGC1 α coactivator peptide, with the WT exhibiting again the highest

affinity. On the other hand, the 2 mutants exhibit increased affinity for the corepressor peptide of NCoR1 compared to WT (**Fig. 3c**). The increased interaction with corepressor and decreased interaction with coactivator of the mutants was also observed by native mass spectrometry (**Supplementary Figs. 6-8**). Together, these data suggest that the two considered mutations, F310S and H494Y, impair the adoption of an agonist conformation by PPAR γ in the absence of ligand, thereby enhancing corepressor interactions and inhibiting coactivator interaction.

PPAR γ LBD mutations F310S and H494Y favor an inactive conformation

To elucidate the structural basis for the deleterious functional effects of the mutations, we analyzed the crystal structures of PPAR γ LBD F310S and H494Y (**Supplementary Table 2**). PPAR γ F310 LBD mutant was crystallized in complex with GW1929 and PPAR γ H494Y LBD in complex with GW1929 and the PGC1 α coactivator peptide. Although the two mutants are less active than the wild-type protein, the ligand and/or coactivator peptide concentration used for crystallization allowed the proteins complexes to be crystallized in an active conformation. The GW1929 agonist ligand in the two mutant complexes maintains the same position as the WT complex forming similar interactions (Rochel et al., 2019b) with the exception, in the F310S mutant, of the presence of two water molecules as a consequence of a larger binding pocket (**Supplementary Fig. 9**).

In the WT complex, H494 in helix 12 packs on top of V318 (H3) and forms intra-helical interactions with P495 and L496 that both contribute to a hydrophobic surface on which the coactivator packs (**Fig. 4a**). In the H494Y mutant, the side chain pointed toward loop 2-3 and the side interactions with P495 and L496 were lost suggesting a destabilization of helix 12. Due to the Y494 side chain re-orientation, Y494 forms new interactions with residues F315 (H3) and F292 and H294 (loop 2-3) of the mutant.

In the other mutant of interest, the bulky F310 side chain faces the loop 11-12 and is involved in van der Waals interactions with F388 (H7), I484 (H11) and M491 (loop 11-12). Because of the smaller size of the S310 side chain, these interactions are lost (**Fig. 4b**), and induces a different more flexible conformation of the loop 11-12. In contrast S310 hydroxyl group interacts with the carbonyl moiety of Q311 and a water molecule. These variations in helix 11 and loop11-12 interactions will result in H12 destabilization and less efficient recruitment of coactivator. Overall, these data suggest that the two studied mutations, F310S and H494Y, are important residues for proper stabilization of helix 12 of PPAR γ , preventing proper corepressor release and coactivator interaction.

PPAR γ displays an inhibitory effect on basal bladder cancer cells growth

The down-regulation of PPAR γ in basal tumors suggested a potential tumor suppressive activity of PPAR γ in these tumors. Association of PPAR γ down-regulation with genomic deletions, DNA hypermethylation and of loss-of-function mutations, although rare events in basal tumors (observed in 4 out of 188 basal tumors, **Fig. 2b**), strongly reinforced this hypothesis. Activation of PPAR γ by synthetic agonists has been a matter of debate regarding the PPAR γ independent-effects of such molecules (Chaffer et al., 2006). Therefore, to study the ability of PPAR γ activation to inhibit basal bladder cancer cell proliferation, we transiently expressed PPAR γ in three cell lines presenting a low PPAR γ activation score and a low PPAR γ expression level (UMUC-3, unclassified; UMUC-6 and VMCUB-1, Basal/Squamous cell lines), as well as in one luminal papillary cell line, SD48, which displays a high expression level of PPAR γ , a high PPAR γ activation score and relies on PPAR γ expression for its growth (Biton et al., 2014b) (**Fig. 5a and 5b**). PPAR γ overexpression, observed by western-blot (**Fig. 5b, upper panel**) or RT-qPCR analysis (**Supplementary Fig. 10a**), activated a PPAR γ -dependent transcription program

(**Supplementary Fig. 10a**) in the four cell lines. PPAR γ overexpression induced a significant decrease in cell viability in the three cell lines expressing low levels of endogenous PPAR γ , but did not affect the growth of SD48 cells (**Fig. 5b, lower panel**). Using UMUC-6 basal cells, we confirmed that the observed effects with the wild-type receptor or the activating mutation T475M were dependent on PPAR γ activity since the overexpression of the inactive mutant of PPAR γ , H494Y, had no effect neither on cell viability nor on PPAR γ target gene expression (**Fig. 5c and supplementary Fig. 10b**). The tumor suppressive role of PPAR γ in basal tumors was further supported by our attempt to establish stable clones of basal UMUC-6 cells. We were only able to obtain a few clones with the wild-type or T475M PPAR γ constructs, which turned out not to express PPAR γ , whereas we obtained PPAR γ -expressing clones using H494Y PPAR γ construct (**Supplementary Fig. 10c**). To better understand the molecular mechanisms underlying this tumor suppressive property of PPAR γ , we compared UMUC-6 transcriptomic data after transient transfection using either a control backbone or a PPAR γ encoding plasmid. We identified 459 differentially expressed genes using LIMMA algorithm and considering a p-value<0.05 (**Supplementary table 4**). Analysis of the biological processes enriched in these genes using DAVID software highlighted that, as previously observed in luminal bladder cell lines, PPAR γ expression induced an increased lipid metabolism (Biton et al., 2014b; Goldstein et al., 2017b; Halstead et al., 2017) and impaired immunity and inflammation (Korpál et al., 2017b). However, PPAR γ expression also induced a down-regulation of two sets of genes favoring cell proliferation and inhibiting apoptosis (**Fig. 5d**). The regulation of these two process by PPAR γ could account for the inhibition of cell viability induced upon PPAR γ expression in basal cell lines. Focussing on the list of urothelial differentiation markers recently provided by Liu et al. 2019, we also confirmed the role of PPARG in inducing differentiation that we previously described (Biton et al. 2014) (**Fig. 5e**). However, as described by Warrick et al.,

(Warrick et al., 2017) PPARG expression alone was not sufficient to transduce basal cells into luminal ones according to our consensus classifier for cell lines. These were also supported by GSEA analysis of regulated genes using Reactome databases, which highlighted an up-regulation of “fatty acid metabolism” and “fatty acid beta oxydation” as well as an increase of “FOXO-mediated transcription of cell death genes”. A potential involvement of the EGFR pathway in the regulation of cell growth was suggested by the down-regulation of “GRB2 events in EGFR signaling”, which included a down-regulation in gene expression of EGFR and its ligands EREG and EPGN (**Supplementary Figure 11**). We further validated this finding at the protein level by western-blot in UMUC-6, VMCUB1 and UMUC-3: PPAR γ expression induced a down-regulation of Aurora B, AXL and EGFR levels, which could regulate cell proliferation and apoptosis (**Fig.5f**). These down-regulations relied on PPAR γ activity since they were stronger after the expression of the active mutant of PPAR γ T475M but not observed after the expression of the inactive mutant PPAR γ H494Y (**Fig. 5f**, UMUC6 cells).

Discussion

Previous studies have suggested a tumor suppressive role of PPAR γ in bladder cancer, based on its observed down-regulation in a subset of tumors and on the inhibitory effects of PPAR γ agonist on bladder cancer cell lines (Guan et al., 1999; Lv et al., 2019; Yan et al., 2014; Yoshimura et al., 2003). Simvastatin-induced inhibition of bladder cancer cell growth was also attributed to the activation of the PPAR γ pathway, further supporting its tumor suppressive role in bladder tumors (Wang et al., 2016). In this study, we provided epigenetic, genetic and functional evidence to demonstrate the tumor suppressive role of PPAR γ , and we associated this role to a particular subgroup of tumors: the basal subtype. In order to demonstrate its tumor suppressive properties, we overexpressed PPAR γ in basal or

unclassified cell lines expressing low level of PPARG including UMUC-3 cells in which PPARG expression induced comparable results to those observed using agonists (Lv et al., 2019). In addition, cell lines for which PPARG agonist has been shown to induce cell growth inhibition (Guan et al., 1999; Lv et al., 2019; Yan et al., 2014; Yoshimura et al., 2003) happened to be non-luminal cell lines. This finding suggests that the observed effects using agonist molecules were indeed PPAR γ -dependent and thus supports the use of PPAR γ synthetic agonists as a therapeutic option for basal tumors. However, a better understanding of the molecular basis of the tumor suppressive activity of PPAR γ in basal bladder tumors may lay the groundwork to propose alternative therapeutic strategies to indirectly target the PPAR γ pathway and avoid various side effects induced by the available PPAR γ synthetic agonists (Colhoun et al., 2012; Guan et al., 2005). We previously showed in preclinical models that basal tumors present an activation of the EGFR pathway and rely on EGFR activity for their growth *in vitro* and *in vivo* (Rebouissou et al., 2014). Here, we showed that PPAR γ overexpression in basal cell lines induces a down-regulation of EGFR and its ligands, which was, at least for EGFR, dependent on PPAR γ activity, since not observed upon the overexpression of the inactive mutant of PPARG, H494Y. These results suggest that the decreased cell viability induced by PPAR γ overexpression may be partly EGFR-mediated. A tumor suppressor role of PPARG has already been reported for several cancer types including colon, lung, breast and ovarian cancers, but the relationship with the EGFR pathway has not been reported in these cancers. So far, the tumor suppressive properties of PPARG have been more linked to anti-angiogenic effects (Review in cancer biology and therapy, Panigraphy et al., 2005) or to an increase in reactive oxygen species (ROS) level due to a metabolic switch induced by PPARG (Srivastava, cell metabolism 2014). The modulation of fatty acid metabolism and mitochondrial beta-oxidation by PPARG in basal bladder cancer cell could also contribute to the modulation of ROS level and its tumor suppressive activities. *In vivo* studies should allow studying the impact of PPARG

expression on angiogenesis and tumor microenvironment and their contribution on tumor growth. Inactivating mutations, although not frequent, seem to be bladder cancer-specific, but deletions or methylations appear to be the main causes of PPARG loss of activity. Inactivating mutations were initially reported in colon cancer but remain controversial since they have never been observed in independent cohorts. A better knowledge of the structure/function effects of the loss-of-function mutation of PPAR γ could also guide the design of new potent agonists.

Together with our previous studies that pointed out a pro-tumorigenic role of PPAR γ associated with DNA amplification and gain-of-function mutations (Biton et al., 2014b; Rochel et al., 2019b) in luminal tumors, this study highlights a dual role of PPAR γ in bladder cancers. The therapeutic strategies targeting PPAR γ should therefore be tumor subtype-dependent, strengthening the interest for a molecular classification in the clinic. The dual role of PPAR γ also suggest that the risk of bladder cancer associated with the use of pioglitazone (Lewis et al., 2015; Mamtani et al., 2012) should be associated with development of luminal tumors. The cell context dependent effect of PPAR γ has already been shown in breast and colon cancer (Lefebvre et al., 1998; Menendez, 2010; Saez et al., 1998). A better understanding of the signaling pathways activated by the receptor to mediate both its pro-tumorigenic and tumor suppressive effects should help further our understanding of the relation between cell context, in particular cell differentiation, and PPAR γ activity in bladder cancer but also in other tumor types.

Methods

Materials and chemicals. Rosiglitazone and GW1929 were purchased from Tocris Bioscience. The fluorescent PGC1 α peptide (137-EAEEPSLLKLLLAPA-152) and fluorescent NCoR1 peptide (2260-NLGLEDIIRKALMG-2273) were purchased from Thermo-Fisher. The PGC1 α peptide (139-EEPSLLKLLLAPA-152) and NCoR1 (2258-ASNLGLEDIIRKALMGS-2274) were synthesized by Pascal Eberling (IGBMC peptide synthesis common facility).

Transcriptomic, genomic, methylation and ChipSeq data. We used transcriptomic data available for our CIT series of tumors (Biton et al., 2014b; Rebouissou et al., 2014) and for 405 MIBC from TCGA (<http://cancergenome.nih.gov>). We used our affymetrix exon st.0 transcriptomic data available for RT112, L1207, VMCUB-1, UMUC-3, UMUC-6 cell lines. Tumors and cell lines were classified using a molecular consensus classification system (Kamoun et al.) and PPARG activation score were calculated as previously described taking into consideration the expression levels of 77 PPARG target genes (Rochel et al., 2019b). We used publicly available copy number data for 402 MIBC from TCGA (<http://cancergenome.nih.gov>). We used methylation data (450k methylation array) available for 368 MIBC from TCGA and for 59 samples from our CIT series.

Plasmid constructs. The pcDNA3-PPAR γ 2 and PPRE X3-TK-luc were generously provided by Pr. Chatterjee (Institute of Metabolic Science, IMS, Cambridge) and Bruce Spiegelman (Addgene plasmid #1015), respectively. We used pcDNA3.1-PPAR γ 2 and the QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's protocol, to generate all the mutations.

Mutations were confirmed by DNA sequencing. The GAL4 DNA-binding domain cloning vector pM and the activation-domain cloning vector pVP16 are part of the Mammalian Matchmaker Two-Hybrid Assay kit (BD Biosciences Clontech). The construct pM-MED1 (510-787) expressing the Gal4 DBD-MED1 nuclear receptor interacting domain was provided by Lieve Verlinden (KU Leuven, Belgium). The pCMX-GAL4N-SMRT was a gift of Makoto Makishima (Nihon University School of Medicine). The Gal4 DBD-NCOR1 NR1D was kindly provided by William Bourget (Centre de Biochimie Structurale, Montpellier, France).

Cell culture and transfection. The HEK293FT human cell line and the UMUC-6, UMUC-3, VMCUB-1, RT112 and 5637 human bladder tumor-derived cell lines were obtained from DSMZ (Heidelberg, Germany). HEK293FT, UMUC-6, UMUC-3, VMCUB-1, L1207 cells were cultured in DMEM, whereas 5637 and RT112 cells were cultured in RPMI. Media were supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). Cells were incubated at 37°C, under an atmosphere containing 5% CO₂. The identity of the cell lines used was checked by analyzing genomic alterations with comparative genomic hybridization arrays (CGH array), and FGFR3 and TP53 mutations were checked with the SNaPshot technique (for FGFR3) or by classical sequencing (for TP53). The results obtained were compared with the initial description of the cells. We routinely checked for mycoplasma contamination.

For reporter gene assays, HEK293FT cells were plated in 96-well plates (30,000 cells/well) and transfected with 30 ng pcDNA3-PPAR γ 2 (wild-type or mutated), 50 ng PPRE X3-TK-luc and 6 ng pRL-SV40 (Promega), in the presence of the Fugene HD transfection reagent (Promega), in accordance with the manufacturer's protocol 24 hours later, cells were stimulated by 1 μ M rosiglitazone. Luciferase activity was

determined 24 hours later, with the Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega), according to the manufacturer's instructions, and the results obtained were normalized with the *Renilla* luciferase signal obtained with the pRL-SV40 plasmid.

For PPAR γ 2 transient overexpression in the 5637 cell line, we used six-well plates, 250,000 cells seeded per well. These cells were transfected 24 h later with 2.5 μ g of pcDNA3-PPAR γ 2 (wild-type or mutated) in the presence of the Fugene HD transfection reagent (Promega). PPAR γ 2 transient overexpression in the UMUC3, UMUC6, VMCUB1 and SD48 cell lines were performed in six-well plates, 500,000 cells were seeded per well for the UMUC3 cell line, and 250,000 cells for the three other cell lines. 24 h later, cells were transfected with 2.5 μ g of pRP-PPARG2 wild-type or mutated vector (Vector Builder) in the presence of Fugene HD transfection reagent according to manufacturer's instructions (Promega). The cells were selected 24 h after transfection with 4 μ g/mL of puromycin for 24 h, and then seeded at respectively 7,000, 3,000, 3,000 and 2,500 cells per wells in ninety-six-well plates. Cell viability was assessed by CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) 72 h later and normalized by the signal obtained just after plating.

RNAs were extracted with the RNA easy mini kit (Qiagen) and proteins were extracted by cell lysis in Laemmli buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 1% SDS) supplemented with protease inhibitors and phosphatase inhibitors (Roche) 48 h after transfection.

For mammalian two-hybrid assay, HEK293FT cells were plated in 96-well plate (30 000 cells/ well) and transfected with 20 ng pV16-PPAR γ 2 (wild-type or mutated), 20 ng pM-MED1, 50 ng pG5-luc (Promega) reporter plasmid and 6 ng pRL-SV40 (Promega), in the presence of the Fugene HD transfection reagent (Promega), in accordance with the manufacturer's protocol. Luciferase activity was determined 48

hours later, with the Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega), according to the manufacturer's instructions, and the results obtained were normalized with the *Renilla* luciferase signal obtained with the pRL-SV40 plasmid.

Immunoblotting. Cell lysates were clarified by centrifugation. The protein concentration of the supernatants was determined with the BCA protein assay (Thermo Scientific). 10 μ g of proteins were resolved by SDS-PAGE in a 4-15% polyacrylamide gels, electrotransferred onto Biorad nitrocellulose membranes and analyzed by incubation with primary antibodies against PPAR γ (Abcam #ab41928, used at 1/1000) and β -actin (Sigma Aldrich #A2228, used at 1/25,000). Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Cell Signaling Technology # 7074, used at 1/3,000) was used as the secondary antibody. Protein loading was checked by staining the membrane with Amido Black after electroblotting.

Real-time reverse transcription-quantitative PCR. Reverse transcription was performed with 1 μ g of total RNA, and a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). cDNAs were amplified by PCR in a Roche real-time thermal cycler, with the Roche *Taqman* master mix (Roche) and *Taqman* probe/primer pairs that we previously used and described (Rochel et al., 2019b). Relative gene expression was analyzed by the delta Ct method, with TBP as reference.

Biochemistry. The sequences encoding the ligand-binding domain of the His-hPPAR γ (231-505) receptors was inserted into pET15b. Point mutations were introduced into PPAR γ with the QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent), in accordance with the manufacturer's instructions.

The corresponding proteins were produced in *Escherichia coli* BL21 DE3 by overnight incubation at 22°C after induction with 1 mM IPTG at an OD₆₀₀ of ~0.8. Soluble proteins were purified by Ni-NTA chromatography followed by size exclusion chromatography on a Superdex 200 (GE) column equilibrated in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 5% glycerol, and 1 mM TCEP. The proteins were concentrated to 3-6 mg/mL with an Amicon Ultra 10 kDa MWCO. Purity and homogeneity of all proteins were assessed by SDS and Native Page (**Supplementary Figure 2**).

Crystallization, X-ray data collection and crystal structure refinement. The crystallization experiments were performed by sitting drop vapor diffusion at 290 K, mixing equal volumes (200 nL) of protein at 5 mg/mL and reservoir solution. For all crystal structures, the data were indexed and integrated with XDS (Kabsch, 2010a) and scaled with AIMLESS (Collaborative Computational Project, 1994; Evans, 2006a). The structure was solved by molecular replacement in PHASER (McCoy et al., 2005a) and refined with PHENIX (Adams et al., 2010a) and BUSTER (Smart et al., 2012) with TLS refinement, followed by iterative model building in COOT (Emsley and Cowtan, 2004a).

Crystals of PPAR γ F310S-GW1929 were grown in 25% PEG3350, 0.2 M LiSO₄, BisTris 0.1 M pH 6.5, transferred to artificial mother liquor containing 35% PEG3350 and flash-cooled in liquid nitrogen. X-ray diffraction data were collected at PX1 beamline of the SOLEIL synchrotron with a wavelength of 0.979 Å. The final structure was refined to R_{work} and R_{free} values of 16.8 and 20.6%, respectively, with excellent geometry (97.27% of residues in favored region of the Ramachandran plot and 2.73% in the allowed region).

Crystals of PPAR γ H494Y-GW1929-PGC1 α were grown in 0.2 M ammonium acetate, 0.1 M Hepes pH 7.5, trisodium citrate 1.2 M, transferred to artificial mother liquor containing 15% glycerol and flash-cooled in liquid nitrogen. X-ray diffraction data were collected at the ID30A3 beamline of ESRF with a wavelength of 0.968 Å. The final structure was refined to R_{work} and R_{free} values of 17.22 and 20.30%, respectively, with excellent geometry (97.81 % of residues in favored region of the Ramachandran plot and 2.19% in the allowed region). Data collection and refinement statistics are provided in **Supplementary Table 1**. GW1929 and side chains of the mutated residues of H494Y and F310S complexes could be modelled with confidence as shown into the Polder omit maps (Liebschner et al., 2017) displaying reduced model bias and exclusion of solvent molecules (**Supplementary Fig. 3B and 3C**). All structural figures were prepared with PyMOL (www.pymol.org/).

Microscale thermophoresis measurements were performed with a Monolith NT.115 instrument (NanoTemper Technologies GmbH, Munchen, Germany). The PPAR γ complexes were prepared in 20 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM TCEP, 0.05% Tween 20. Each measurement consists of 16 reaction mixtures where the fluorescent-labeled peptide concentration was constant (70 nM) and serial dilutions of PPAR γ LBD from a concentration of 100 μ M down to 2 nM. Measurements were made with standard glass capillaries (Nanotemper) at 25°C, at 20-40% LED excitation and 80% MST power, with a laser-on time of 30 s and a laser-off time of 5s. NanoTemper Analysis 2.3 software was used to fit the data and to determine the K_D .

Thermal unfolding, nanoDSF. Fluorescence based thermal experiments were performed using Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies, Germany) with

capillaries containing 10 μ L PPAR γ WT or mutants at 4mg/mL. The temperature was increased by a rate of 1 °C/min from 20 to 95 °C and the fluorescence at emission wavelengths of 330 nm and 350 nm was measured. NanoTemper PR.Stability Analysis v1.0.2 was used to fit the data and to determine the melting temperatures T_m .

Mass Spectrometry Analysis. Prior to mass spectrometry analysis, PPAR γ and all the different mutant proteins were buffer exchanged against 200 mM of ammonium acetate at pH 6.8, using five cycles of concentration/dilution with a microconcentrator (Vivaspin, 10-KD cutoff, Sartorius, Göttingen, Germany). All the samples were diluted either in H₂O/ACN/HCOOH (denaturing MS conditions) or in 200 mM AcONH₄ (native MS conditions) to a final concentration of 5 μ M and infused with an automated chip based nanoelectrospray device (Triversa Nanomate, Advion Bioscience, Ithaca, USA) operating in the positive ion mode, coupled to a Synapt G2 HDMS mass spectrometer (Waters, Manchester, UK).

DNA array

In order to identify genes displaying changes in expression after PPAR γ transient expression in UMUC-6 cells, we transfected the cells for 96 hours with pRP-PPARG2 wild-type or backbone vector (Vector Builder). Three independent transfections were performed. mRNA was extracted and purified with RNeasy Mini kits (Qiagen). Total RNA (200 ng) from control and PPAR γ expressing UMUC-6 cells was analyzed with the Affymetrix Human Clariom R DNA array. Raw gene expression data were normalized and summarized by the RMA (robust multi-array averaging) method with a customized chip definition developed by Microarray Lab, BrainArray (ClariomDHuman_Hs_ENTREZG_v22) (Bolstad et al., 2003; Irizarry et al., 2003).

The LIMMA algorithm was used to identify genes differentially expressed after PPARG expression (Ritchie and Phipson 2015). The p-values were adjusted for multiple testing by Benjamini–Hochberg FDR methods. Genes with a FDR below 5% were considered to be differentially expressed.

Data availability

Atomic coordinates and related structure factors have been deposited in the Protein Data Bank with accession codes: 6T1S and 6T1V. Transcriptomic analysis of UMUC6 cell line following PPAR γ 2 overexpression have been deposited in the GEO database.

References

- Aagaard, M.M., Rasmus Siersbæk, and Mandrup, S. (2011). Molecular basis for gene-specific transactivation by nuclear receptors. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1812**, 824–835.
- Adams, P.D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., et al. (2010a). PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*
- Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.-W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., et al. (2010b). *PHENIX* : a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221.
- Ahmad, I., Mui, E., Galbraith, L., Patel, R., Tan, E.H., Salji, M., Rust, A.G., Repiscak, P., Hedley, A., Markert, E., et al. (2016). Sleeping Beauty screen reveals Pparg activation in metastatic prostate cancer . *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Ahmadian, M., Suh, J.M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A.R., Downes, M., and Evans, R.M. (2013a). PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med.* **19**, 557–566.
- Ahmadian, M., Suh, J.M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A.R., Downes, M., and Evans, R.M. (2013b). Pparg signaling and metabolism: The good, the bad and the future. *Nat. Med.*
- Aprile, M., Ambrosio, M.R., D’Esposito, V., Beguinot, F., Formisano, P., Costa, V., and Ciccodicola, A. (2014). *PPARG* in Human Adipogenesis: Differential Contribution of Canonical Transcripts and Dominant Negative Isoforms. *PPAR Res.* **2014**, 1–11.

Aranda, A., and Pascual, A. (2001). Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiol. Rev.* *81*, 1269–1304.

Azoulay, L., Yin, H., Filion, K.B., Assayag, J., Majdan, A., Pollak, M.N., and Suissa, S. (2012). The use of pioglitazone and the risk of bladder cancer in people with type 2 diabetes: nested case-control study. *BMJ* *344*, e3645–e3645.

Balint, B., and Nagy, L. (2006). Selective Modulators of PPAR Activity as New Therapeutic Tools in Metabolic Diseases. *Endocr. Metab. Immune Disord. - Drug Targets* *6*, 33–43.

Barish, G.D. (2006). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Liver X Receptors in Atherosclerosis and Immunity. *J. Nutr.* *136*, 690–694.

Batista, M.R.B., and Martínez, L. (2013). Dynamics of Nuclear Receptor Helix-12 Switch of Transcription Activation by Modeling Time-Resolved Fluorescence Anisotropy Decays. *Biophys. J.* *105*, 1670–1680.

Belorusova, A.Y., Osz, J., Petoukhov, M.V., Peluso-Iltis, C., Kieffer, B., Svergun, D.I., and Rochel, N. (2016). Solution Behavior of the Intrinsically Disordered N-Terminal Domain of Retinoid X Receptor α in the Context of the Full-Length Protein. *Biochemistry* *55*, 1741–1748.

Biton, A., Bernard-Pierrot, I., Lou, Y., Krucker, C., Chapeaublanc, E., Rubio-Pérez, C., López-Bigas, N., Kamoun, A., Neuzillet, Y., Gestraud, P., et al. (2014a). Independent Component Analysis Uncovers the Landscape of the Bladder Tumor Transcriptome and Reveals Insights into Luminal and Basal Subtypes. *Cell Rep.* *9*, 1235–1245.

Biton, A., Bernard-Pierrot, I., Lou, Y., Krucker, C., Chapeaublanc, E., Rubio-Pérez, C., López-Bigas, N., Kamoun, A., Neuzillet, Y., Gestraud, P., et al. (2014b). Independent Component Analysis Uncovers the Landscape of the Bladder Tumor Transcriptome and Reveals Insights into Luminal and Basal Subtypes. *Cell Rep.* *9*, 1235–1245.

Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., Åstrand, M., and Speed, T.P. (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*.

Borggreffe, T., and Yue, X. (2011). Interactions between subunits of the Mediator complex with gene-specific transcription factors. *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 759–768.

Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *375*, 6.

Brelivet, Y., Kammerer, S., Rochel, N., Poch, O., and Moras, D. (2004). Signature of the oligomeric behaviour of nuclear receptors at the sequence and structural level. *EMBO Rep.* *5*, 423–429.

Brust, R., Lin, H., Fuhrmann, J., Asteian, A., Kamenecka, T.M., and Kojetin, D.J. (2017). Modification of the Orthosteric PPAR γ Covalent Antagonist Scaffold Yields an Improved Dual-Site Allosteric Inhibitor. *ACS Chem. Biol.* *12*, 969–978.

Brust, R., Shang, J., Fuhrmann, J., Bass, J., Cano, A., Heidari, Z., Chrisman, I.M., Blayo, A.-L., Griffin, R.P., Kamenecka, T.M., et al. (2018). A structural mechanism for directing inverse agonism of PPAR γ (Biochemistry).

Bugge, A., Grøntved, L., Aagaard, M.M., Borup, R., and Mandrup, S. (2009). The PPAR γ 2 A/B-Domain Plays a Gene-Specific Role in Transactivation and Cofactor Recruitment. *Mol. Endocrinol.* 23, 794–808.

Burke, T.W., and Kadonaga, J.T. (1997). The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes Dev.* 11, 3020–3031.

Burris, T.P., Solt, L.A., Wang, Y., Crumbley, C., Banerjee, S., Griffett, K., Lundasen, T., Hughes, T., and Kojetin, D.J. (2013). Nuclear Receptors and Their Selective Pharmacologic Modulators. *Pharmacol. Rev.* 65, 710–778.

Chaffer, C.L., Thomas, D.M., Thompson, E.W., and Williams, E.D. (2006). PPAR γ -independent induction of growth arrest and apoptosis in prostate and bladder carcinoma. *BMC Cancer.*

Chandra, V., Huang, P., Hamuro, Y., Raghuram, S., Wang, Y., Burris, T.P., and Rastinejad, F. (2008). Structure of the intact PPAR- γ -RXR- α nuclear receptor complex on DNA. *Nature* 456, 350–356.

Chen, J.D., and Evans, R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454–457.

Chinetti, G., Fruchart, J.-C., and Staels, B. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm. Res.* 49, 497–505.

Chiu, M., McBeth, L., Sindhvani, P., and Hinds, T.D. (2017). Deciphering the Roles of Thiazolidinediones and PPAR γ in Bladder Cancer. *PPAR Res.* 2017, 1–9.

Choi, W., Porten, S., Kim, S., Willis, D., Plimack, E., Hoffman-Censits, J., Roth, B., Cheng, T., Tran, M., Lee, I.L., et al. (2014). Identification of Distinct Basal and Luminal Subtypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer with Different Sensitivities to Frontline Chemotherapy. *Cancer Cell* 25, 152–165.

Chrisman, I.M., Nemetchek, M.D., de Vera, I.M.S., Shang, J., Heidari, Z., Long, Y., Reyes-Caballero, H., Galindo-Murillo, R., Cheatham, T.E., Blayo, A.-L., et al. (2018). Defining a conformational ensemble that directs activation of PPAR γ . *Nat. Commun.* 9, 1794.

Colhoun, H.M., Livingstone, S.J., Looker, H.C., Morris, A.D., Wild, S.H., Lindsay, R.S., Reed, C., Donnan, P.T., Guthrie, B., Leese, G.P., et al. (2012). Hospitalised hip fracture risk with rosiglitazone and pioglitazone use compared with other glucose-lowering drugs. *Diabetologia* 55, 2929–2937.

Collaborative Computational Project, N. 4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 50, 760–763.

Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *50*, 760–763.

Conaway, R.C., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Yao, T., and Conaway, J.W. (2005). The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 250–255.

Coutos-Thévenot, L., Beji, S., Neyret-Kahn, H., Pippo, Q., Fontugne, J., Osz, J., Krucker, C., Groeneveld, C.D.S., Dufour, F., Kamoun, A., et al. (2019). PPAR γ is a tumor suppressor in basal bladder tumors offering new potential therapeutic opportunities (*Cancer Biology*).

Deblois, G., and Giguère, V. (2013). Oestrogen-related receptors in breast cancer: control of cellular metabolism and beyond. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 27–36.

Delerville, P., Furman, C., Teissier, E., Fruchart, J.-C., Duriez, P., and Staels, B. (2000). Oxidized phospholipids activate PPAR α in a phospholipase A2-dependent manner. *FEBS Lett.* *471*, 34–38.

Duran-Sandoval, D., Thomas, A.-C., Bailleul, B., Fruchart, J.-C., and Staels, B. (2003). Pharmacologie des agonistes de PPAR α et PPAR γ et des activateurs PPAR α/γ mixtes en développement clinique. *médecine/sciences* *19*, 819–825.

Earl, J., Rico, D., Carrillo-de-Santa-Pau, E., Rodríguez-Santiago, B., Méndez-Pertuz, M., Auer, H., Gómez, G., Grossman, H.B., Pisano, D.G., Schulz, W.A., et al. (2015). The UBC-40 Urothelial Bladder Cancer cell line index: a genomic resource for functional studies. *BMC Genomics* *16*, 403.

Eberhardt, J., McEwen, A.G., Bourguet, W., Moras, D., and Dejaegere, A. (2019). A revisited version of the apo structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor retinoic X receptor α . *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* *75*, 98–104.

Egea, P.F., Klaholz, B.P., and Moras, D. (2000). Ligand-protein interactions in nuclear receptors of hormones. *FEBS Lett.* *476*, 62–67.

Emsley, P., and Cowtan, K. (2004a). Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*

Emsley, P., and Cowtan, K. (2004b). *Coot* : model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *60*, 2126–2132.

Escriva, H. Amphioxus RA signaling. *12*.

Evans, P. (2006a). Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*

Evans, P. (2006b). Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *62*, 72–82.

Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2014). Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* *157*, 255–266.

- Evans, R.M., Barish, G.D., and Wang, Y.-X. (2004). PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.* *10*, 355–361.
- Fajas, L., Fruchart, J.-C., and Auwerx, J. (1998). PPARQ3 mRNA: a distinct PPARQ mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* *6*.
- Finck, B.N. (2006). PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J. Clin. Invest.* *116*, 615–622.
- Fletcher, O., Easton, D., Anderson, K., Gilham, C., Jay, M., and Peto, J. (2004). Lifetime Risks of Common Cancers Among Retinoblastoma Survivors. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *96*, 357–363.
- Fondell, J.D., Ge, H., and Roeder, R.G. (1996). Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 8329–8333.
- Forman, B.M., Tontonoz, P., Brun, P., and Evans, M. 15Deoxy-A 12g14-Prostaglandin J2 Is a Ligand for the Adipocyte Determination Factor PPAR γ . *10*.
- Gallastegui, N., Mackinnon, J.A.G., Fletterick, R.J., and Estébanez-Perpiñá, E. (2015). Advances in our structural understanding of orphan nuclear receptors. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 25–35.
- Ge, K., Cho, Y.-W., Guo, H., Hong, T.B., Guermah, M., Ito, M., Yu, H., Kalkum, M., and Roeder, R.G. (2008). Alternative Mechanisms by Which Mediator Subunit MED1/TRAP220 Regulates Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ -Stimulated Adipogenesis and Target Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 1081–1091.
- Germain, P., Altucci, L., Bourguet, W., Rochette-Egly, C., and Gronemeyer, H. (2003). Nuclear receptor superfamily: Principles of signaling. *Pure Appl. Chem.* *75*, 1619–1664.
- Goddard, T.D., Huang, C.C., Meng, E.C., Pettersen, E.F., Couch, G.S., Morris, J.H., and Ferrin, T.E. (2018). UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis: UCSF ChimeraX Visualization System. *Protein Sci.* *27*, 14–25.
- Goldstein, J.T., Berger, A.C., Shih, J., Duke, F.F., Furst, L., Kwiatkowski, D.J., Cherniack, A.D., Meyerson, M., and Strathdee, C.A. (2017a). Genomic Activation of *PPARG* Reveals a Candidate Therapeutic Axis in Bladder Cancer. *Cancer Res.* *77*, 6987–6998.
- Goldstein, J.T., Berger, A.C., Shih, J., Duke, F.F., Furst, L., Kwiatkowski, D.J., Cherniack, A.D., Meyerson, M., and Strathdee, C.A. (2017b). Genomic Activation of *PPARG* Reveals a Candidate Therapeutic Axis in Bladder Cancer. *Cancer Res.* *77*, 6987–6998.
- Gronemeyer, H., Gustafsson, J.-Å., and Laudet, V. PRINCIPLES FOR MODULATION OF THE NUCLEAR RECEPTOR SUPERFAMILY. *DRUG Discov.* *16*.
- Guan, Y., Hao, C., Cha, D.R., Rao, R., Lu, W., Kohan, D.E., Magnuson, M.A., Redha, R., Zhang, Y., and Breyer, M.D. (2005). Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPAR γ stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption. *Nat. Med.* *11*, 861–866.

Guan, Y.F., Zhang, Y.H., Breyer, R.M., Davis, L., and Breyer, M.D. (1999). Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in human transitional bladder cancer and its role in inducing cell death. *Neoplasia N. Y. N* 1, 330–339.

Guiochon-Mantel, A., Delabre, K., Lescop, P., and Milgrom, E. (1994). Nuclear localization signals also mediate the outward movement of proteins from the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 7179–7183.

Halstead, A.M., Kapadia, C.D., Bolzenius, J., Chu, C.E., Schriefer, A., Wartman, L.D., Bowman, G.R., and Arora, V.K. (2017). Bladder-cancer-associated mutations in RXRA activate peroxisome proliferator-activated receptors to drive urothelial proliferation. *ELife* 6, 1–27.

He, F., Mo, L., Zheng, X.-Y., Hu, C., Lepor, H., Lee, E.Y.-H.P., Sun, T.-T., and Wu, X.-R. (2009). Deficiency of pRb Family Proteins and p53 in Invasive Urothelial Tumorigenesis. *Cancer Res.* 69, 9413–9421.

Hedegaard, J., Lamy, P., Nordentoft, I., Algaba, F., Høyer, S., Ulhøi, B.P., Vang, S., Reinert, T., Hermann, G.G., Mogensen, K., et al. (2016). Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. *Cancer Cell*.

Huang, W., Greene, G.L., Ravikumar, K.M., and Yang, S. (2013). Cross-talk between the ligand- and DNA-binding domains of estrogen receptor: ER α Domain Cross-Talk. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 81, 1900–1909.

Hughes, T.S., Chalmers, M.J., Novick, S., Kuruvilla, D.S., Chang, M.R., Kamenecka, T.M., Rance, M., Johnson, B.A., Burris, T.P., Griffin, P.R., et al. (2012). Ligand and Receptor Dynamics Contribute to the Mechanism of Graded PPAR γ Agonism. *Structure* 20, 139–150.

Irizarry, R.A., Bolstad, B.M., Collin, F., Cope, L.M., Hobbs, B., and Speed, T.P. (2003). Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.*

Jia, Y., Viswakarma, N., and Reddy, J.K. (2014). Med1 Subunit of the Mediator Complex in Nuclear Receptor-Regulated Energy Metabolism, Liver Regeneration, and Hepatocarcinogenesis. *Gene Expr.* 16, 63–75.

Kabsch, W. (2010a). Software XDS for image rotation, recognition and crystal symmetry assignment. *Acta Crystallogr Sect Biol Crystallogr.*

Kabsch, W. (2010b). XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 125–132.

Kamoun, A., Reynies, A. de, Allory, Y., Sjødahl, G., Robertson, A.G., Seiler, R., Hoadley, K., Al-Ahmadie, H., Choi, W., Groeneveld, C.S., et al. The consensus molecular classification of muscle-invasive bladder cancer. *Eur. Urol. In Press*.

Kamoun, A., de Reyniès, A., Allory, Y., Sjødahl, G., Robertson, A.G., Seiler, R., Hoadley, K.A., Groeneveld, C.S., Al-Ahmadie, H., Choi, W., et al. (2020). A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur. Urol.* 77, 420–433.

Khorasanizadeh, S., and Rastinejad, F. (2016). Visualizing the Architectures and Interactions of Nuclear Receptors. *Endocrinology* 157, 4212–4221.

Kim, J.B., Wright, H.M., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (2002). ADD1/SREBP1 activates PPAR through the production of endogenous ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

Kliwer, S.A., Umesono, K., Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (1992). Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* 355, 446–449.

Kogevinas, M., Mannetje, A. 't, Cordier, S., Ranft, U., González, C.A., Vineis, P., Chang-Claude, J., Lynge, E., Wahrendorf, J., Tzonou, A., et al. (2003). Occupation and bladder cancer among men in Western Europe. *Cancer Causes Control* 14, 907–914.

Kojetin, D.J., and Burris, T.P. (2013). Small Molecule Modulation of Nuclear Receptor Conformational Dynamics: Implications for Function and Drug Discovery. *Mol. Pharmacol.* 83, 1–8.

Koppen, A., and Kalkhoven, E. (2010). Brown vs white adipocytes: The PPAR γ coregulator story. *FEBS Lett.* 584, 3250–3259.

Korpai, M., Puyang, X., Jeremy Wu, Z., Seiler, R., Furman, C., Oo, H.Z., Seiler, M., Irwin, S., Subramanian, V., Julie Joshi, J., et al. (2017a). Evasion of immunosurveillance by genomic alterations of PPAR γ /RXR α in bladder cancer. *Nat. Commun.* 8.

Korpai, M., Puyang, X., Jeremy Wu, Z., Seiler, R., Furman, C., Oo, H.Z., Seiler, M., Irwin, S., Subramanian, V., Julie Joshi, J., et al. (2017b). Evasion of immunosurveillance by genomic alterations of PPAR γ /RXR α in bladder cancer. *Nat. Commun.* 8, 103.

Kroker, A.J., and Bruning, J.B. (2015). Review of the Structural and Dynamic Mechanisms of PPAR γ Partial Agonism. *PPAR Res.* 2015, 1–15.

Laudet, V., Hänni, C., Coll, J., Catzeflis, F., and Stéhelin, D. (1992). Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J.* 11, 1003–1013.

Lee, G., Elwood, F., McNally, J., Weiszmann, J., Lindstrom, M., Amaral, K., Nakamura, M., Miao, S., Cao, P., Learned, R.M., et al. (2002). T0070907, a Selective Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ , Functions as an Antagonist of Biochemical and Cellular Activities. *J. Biol. Chem.* 277, 19649–19657.

Lee, J.J., Drakaki, A., Iliopoulos, D., and Struhl, K. (2012). MiR-27b targets PPAR γ to inhibit growth, tumor progression and the inflammatory response in neuroblastoma cells. *Oncogene.*

Lefebvre, A.-M., Chen, I., Desreumaux, P., Najib, J., Fruchart, J., Geboes, K., Briggs, M., Heyman, R., and Auwerx, J. (1998). Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat. Med.* 4, 1053–1057.

Lefterova, M.I., Steger, D.J., Zhuo, D., Qatanani, M., Mullican, S.E., Tuteja, G., Manduchi, E., Grant, G.R., and Lazar, M.A. (2010). Cell-Specific Determinants of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Function in Adipocytes and Macrophages. *Mol. Cell. Biol.* 30, 2078–2089.

Lengqvist, J., Mata de Urquiza, A., Bergman, A.-C., Willson, T.M., Sjövall, J., Perlmann, T., and Griffiths, W.J. (2004). Polyunsaturated Fatty Acids Including Docosahexaenoic and Arachidonic Acid Bind to the Retinoid X Receptor α Ligand-binding Domain. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 692–703.

Lenhard, B., Sandelin, A., and Carninci, P. (2012). Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nat. Rev. Genet.* 13, 233–245.

Lewis, J.D., Ferrara, A., Peng, T., Hedderson, M., Bilker, W.B., Quesenberry, C.P., Vaughn, D.J., Nessel, L., Selby, J., and Strom, B.L. (2011). Risk of Bladder Cancer Among Diabetic Patients Treated With Pioglitazone: Interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes Care* 34, 916–922.

Lewis, J.D., Habel, L.A., Quesenberry, C.P., Strom, B.L., Peng, T., Hedderson, M.M., Ehrlich, S.F., Mamtani, R., Bilker, W., Vaughn, D.J., et al. (2015). Pioglitazone use and risk of bladder cancer and other common cancers in persons with diabetes. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*

Li, D., Li, T., Wang, F., Tian, H., and Samuels, H.H. (2002). Functional Evidence for Retinoid X Receptor (RXR) as a Nonsilent Partner in the Thyroid Hormone Receptor/RXR Heterodimer. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5782–5792.

Li, H., Weiser-Evans, M.C.M., and Nemenoff, R. Anti- and Protumorigenic Effects of PPAR γ in Lung Cancer Progression: A Double-Edged Sword. *PPAR Res.* 13.

Liebschner, D., Afonine, P. V., Moriarty, N.W., Poon, B.K., Sobolev, O. V., Terwilliger, T.C., and Adams, P.D. (2017). Polder maps: improving OMIT maps by excluding bulk solvent. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.*

Loomis, D., Huang, W., and Chen, G. (2014). The International Agency for Research on Cancer (IARC) evaluation of the carcinogenicity of outdoor air pollution: focus on China. *Chin. J. Cancer* 33, 189–196.

Luisi, B.F. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. 352, 9.

Lv, S., Wang, W., Wang, H., Zhu, Y., and Lei, C. (2019). PPAR γ activation serves as therapeutic strategy against bladder cancer via inhibiting PI3K-Akt signaling pathway. *BMC Cancer* 19, 204.

Mamtani, R., Haynes, K., Bilker, W.B., Vaughn, D.J., Strom, B.L., Glanz, K., and Lewis, J.D. (2012). Association between longer therapy with thiazolidinediones and risk of bladder cancer: A cohort study. *J. Natl. Cancer Inst.*

Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841–850.

Mansure, J.J., Nassim, R., Chevalier, S., Szymanski, K., Rocha, J., Aldousari, S., and Kassouf, W. (2013). A Novel Mechanism of PPAR Gamma Induction via EGFR Signalling Constitutes Rational for Combination Therapy in Bladder Cancer. *PLoS ONE* 8, e55997.

McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2005a). Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*

McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2005b). Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* *61*, 458–464.

Menendez, J.A. (2010). Fine-tuning the lipogenic/lipolytic balance to optimize the metabolic requirements of cancer cell growth: Molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1801*, 381–391.

Näär, A.M., Lemon, B.D., and Tjian, R. (2001). Transcriptional Coactivator Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* *70*, 475–501.

Nagy, L., Kao, H.-Y., Love, J.D., Li, C., Banayo, E., Gooch, J.T., Krishna, V., Chatterjee, K., Evans, R.M., and Schwabe, J.W.R. (1999). Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev.* *13*, 3209–3216.

Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J.G.A., Chen, H., and Evans, R.M. Oxidized LDL Regulates Macrophage Gene Expression through Ligand Activation of PPAR β . *12*.

Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., and Rosenfeld, M.G. (1998a). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- β . *8*. 395, 9.

Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., and Rosenfeld, M.G. (1998b). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- β . *8*. 395, 7.

Nozawa, K., Schneider, T.R., and Cramer, P. (2017). Core Mediator structure at 3.4 Å extends model of transcription initiation complex. *Nature* *545*, 248–251.

Ohashi, M., Gamo, K., Oyama, T., and Miyachi, H. (2015). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARc) has multiple binding points that accommodate ligands in various conformations: Structurally similar PPARc partial agonists bind to PPARc LBD in different conformations. *Bioorg Med Chem Lett* *5*.

Osz, J., Brelivet, Y., Peluso-Iltis, C., Cura, V., Eiler, S., Ruff, M., Bourguet, W., Rochel, N., and Moras, D. (2012). Structural basis for a molecular allosteric control mechanism of cofactor binding to nuclear receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, E588–E594.

Osz, J., McEwen, A.G., Poussin-Courmontagne, P., Moutier, E., Birck, C., Davidson, I., Moras, D., and Rochel, N. (2015). Structural Basis of Natural Promoter Recognition by the Retinoid X Nuclear Receptor. *Sci. Rep.* *5*, 8216.

Osz, J., McEwen, A.G., Wolf, J., Poussin-Courmontagne, P., Peluso-Iltis, C., Chebaro, Y., Kieffer, B., and Rochel, N. (2019). Modulation of RXR-DNA complex assembly by DNA context. *Mol. Cell. Endocrinol.* *481*, 44–52.

Penrose, A., Keenan, J.L., Bray, D., Ramlall, V., and Siggers, T. (2019). Comprehensive study of nuclear receptor DNA binding provides a revised framework for understanding receptor specificity. *Nat. Commun.* *10*, 2514.

Pérez, E., Bourguet, W., Gronemeyer, H., and de Lera, A.R. (2012). Modulation of RXR function through ligand design. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1821*, 57–69.

Perissi, V., Aggarwal, A., Glass, C.K., Rose, D.W., and Rosenfeld, M.G. (2004). A Corepressor/Coactivator Exchange Complex Required for Transcriptional Activation by Nuclear Receptors and Other Regulated Transcription Factors. *Cell* *116*, 511–526.

Peters, J.M., Shah, Y.M., and Gonzalez, F.J. (2012). The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *12*.

Plaschka, C., Larivière, L., Wenzek, L., Seizl, M., Hemann, M., Tegunov, D., Petrotchenko, E.V., Borchers, C.H., Baumeister, W., Herzog, F., et al. (2015). Architecture of the RNA polymerase II–Mediator core initiation complex. *Nature* *518*, 376–380.

Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell* *92*, 829–839.

Rachez, C., Suldan, Z., Ward, J., Chang, C.-P.B., Burakov, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Freedman, L.P. (1998). A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev.* *12*, 1787–1800.

Rastinejad, F. (2001). Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *11*, 33–38.

Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R.M., and Sigler, P.B. (1995). Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* *375*, 203–211.

Rebouissou, S., Bernard-Pierrot, I., de Reyniès, A., Lepage, M.-L., Krucker, C., Chapeaublanc, E., Hérault, A., Kamoun, A., Caillault, A., Letouzé, E., et al. (2014). EGFR as a potential therapeutic target for a subset of muscle-invasive bladder cancers presenting a basal-like phenotype. *Sci. Transl. Med.* *6*, 244ra91.

Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E., and Barbacid, M. (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* *300*, 149–152.

Renaud, J.P., and Moras*, D. (2000). Structural studies on nuclear receptors: *Cell. Mol. Life Sci.* *57*, 1748–1769.

Robertson, A.G., Kim, J., Al-Ahmadie, H., Bellmunt, J., Guo, G., Cherniack, A.D., Hinoue, T., Laird, P.W., Hoadley, K.A., Akbani, R., et al. (2017). Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*.

- Robinson-Rechavi, M., Carpentier, A.-S., Duffraisse, M., and Laudet, V. (2001). How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet.* *17*, 554–556.
- Rochel, N., Ciesielski, F., Godet, J., Moman, E., Roessle, M., Peluso-Iltis, C., Moulin, M., Haertlein, M., Callow, P., Mély, Y., et al. (2011). Common architecture of nuclear receptor heterodimers on DNA direct repeat elements with different spacings. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 564–570.
- Rochel, N., Krucker, C., Coutos-Thévenot, L., Osz, J., Zhang, R., Guyon, E., Zita, W., Vanthong, S., Hernandez, O.A., Bourguet, M., et al. (2019a). Recurrent activating mutations of PPAR γ associated with luminal bladder tumors. *Nat. Commun.* *10*.
- Rochel, N., Krucker, C., Coutos-Thévenot, L., Osz, J., Zhang, R., Guyon, E., Zita, W., Vanthong, S., Hernandez, O.A., Bourguet, M., et al. (2019b). Recurrent activating mutations of PPAR γ associated with luminal bladder tumors. *Nat. Commun.* *10*, 253.
- Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2001). PPAR γ : a Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth. *J. Biol. Chem.* *276*, 37731–37734.
- Rosenfeld, M.G. (2006). Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev.* *20*, 1405–1428.
- Saez, E., Tontonoz, P., Nelson, M.C., Alvarez, J.G.A., Ming U, T., Baird, S.M., Thomazy, V.A., and Evans, R.M. (1998). Activators of the nuclear receptor PPAR γ enhance colon polyp formation. *Nat. Med.* *4*, 1058–1061.
- Sainsbury, S., Bernecky, C., and Cramer, P. (2015). Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 129–143.
- Sarraf, P., Mueller, E., Smith, W.M., Wright, H.M., Kum, J.B., and Aaltonen, L.A. Loss-of-Function Mutations in PPAR γ Associated with Human Colon Cancer. *Mol. Cell* *6*.
- Schwabe, J.W.F., Chapman, L., Rhodes, D., and Finch, J.T. The Crystal Structure of the Estrogen Receptor DNA-Binding Domain Bound to DNA: How Receptors Discriminate between Their Response Elements. *12*.
- Shang, J., Mosure, S.A., Zheng, J., Brust, R., Bass, J., Nichols, A., Solt, L.A., Griffin, P.R., and Kojetin, D.J. (2020). A molecular switch regulating transcriptional repression and activation of PPAR γ . *Nat. Commun.* *11*, 956.
- Shao, D., and Lazar, M.A. (1999). Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J. Clin. Invest.* *103*, 1617–1618.
- Sher, T., Yi, H.F., McBride, O.W., and Gonzalez, F.J. (1993). cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* *32*, 5598–5604.
- Shulman, A.I., Larson, C., Mangelsdorf, D.J., and Ranganathan, R. (2004). Structural Determinants of Allosteric Ligand Activation in RXR Heterodimers. *Cell* *116*, 417–429.

Simons, S.S., Edwards, D.P., and Kumar, R. (2014). Minireview: Dynamic Structures of Nuclear Hormone Receptors: New Promises and Challenges. *Mol. Endocrinol.* *28*, 173–182.

Smart, O.S., Womack, T.O., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Sharff, A., Vornrhein, C., and Bricogne, G. (2012). Exploiting structure similarity in refinement: Automated NCS and target-structure restraints in BUSTER. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*

Soutourina, J. (2018). Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *19*, 262–274.

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). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* *389*, 194–198.

Spitz, F., and Furlong, E.E.M. (2012). Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 613–626.

Sundvold, H., and Lien, S. (2001). Identification of a Novel Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) γ Promoter in Man and Transactivation by the Nuclear Receptor ROR α 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *287*, 383–390.

TCGA (2014). Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* *507*, 315–322.

Thompson, P.D., Jurutka, P.W., Haussler, C.A., Whitfield, G.K., and Haussler, M.R. (1998). Heterodimeric DNA Binding by the Vitamin D Receptor and Retinoid X Receptors Is Enhanced by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and Inhibited by 9-*cis*-Retinoic Acid: EVIDENCE FOR ALLOSTERIC RECEPTOR INTERACTIONS. *J. Biol. Chem.* *273*, 8483–8491.

Tontonoz, P., and Spiegelman, B.M. (2008). Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR γ . *Annu. Rev. Biochem.*

Varley, C.L. (2004). Role of PPAR and EGFR signalling in the urothelial terminal differentiation programme. *J. Cell Sci.* *117*, 2029–2036.

Varley, C.L., Stahlschmidt, J., Lee, W.-C., Holder, J., Diggle, C., Selby, P.J., Trejdosiewicz, L.K., and Southgate, J. (2004). Role of PPAR γ and EGFR signalling in the urothelial terminal differentiation programme. *J. Cell Sci.* *117*, 2029–2036.

Viswakarma, N., Jia, Y., Bai, L., Vluggens, A., Borensztajn, J., Xu, J., and Reddy, J.K. (2010). Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression. *PPAR Res.* *2010*, 1–21.

Voegel, J.J. (1998). The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* *17*, 507–519.

Wang, G., Cao, R., Wang, Y., Qian, G., Dan, H.C., Jiang, W., Ju, L., Wu, M., Xiao, Y., and Wang, X. (2016). Simvastatin induces cell cycle arrest and inhibits proliferation of bladder cancer cells via PPAR γ signalling pathway. *Sci. Rep.* *6*, 35783.

Watanabe, M., and Kakuta, H. (2018). Retinoid X Receptor Antagonists. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 2354.

Weatherman, R.V., Fletterick, R.J., and Scanlan, T.S. (1999). Nuclear-Receptor Ligands and Ligand-Binding Domains. *Annu. Rev. Biochem.* *68*, 559–581.

Williams, S.V., Hurst, C.D., and Knowles, M.A. (2013). Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 795–803.

Wilson, T.E., Fahrner, T.J., and Milbrandt, J. (1993). The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 5794–5804.

Wu, X.-R. (2005). Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 713–725.

Wurtz, J.-M., Bourguet, W., Renaud, J.-P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., and Gronemeyer, H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat. Struct. Biol.* *3*, 87–94.

Yan, S., Yang, X., Chen, T., Xi, Z., and Jiang, X. (2014). The PPAR γ agonist Troglitazone induces autophagy, apoptosis and necroptosis in bladder cancer cells. *Cancer Gene Ther.*

Yang, D.-R., Lin, S.-J., Ding, X.-F., Miyamoto, H., Messing, E., Li, L.-Q., Wang, N., and Chang, C. (2013). Higher Expression of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ or Its Activation by Agonist Thiazolidinedione-rosiglitazone Promotes Bladder Cancer Cell Migration and Invasion. *Urology* *81*, 1109.e1-1109.e6.

Yoshimura, R., Matsuyama, M., Segawa, Y., Hase, T., Mitsuhashi, M., Tsuchida, K., Wada, S., Kawahito, Y., Sano, H., and Nakatani, T. (2003). Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human urinary bladder carcinoma and growth inhibition by its agonists. *Int. J. Cancer* *104*, 597–602.

Yoshinaga, S., Peterson, C., Herskowitz, I., and Yamamoto, K. (1992). Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science* *258*, 1598–1604.

Zhang, X., Jeyakumar, M., Petukhov, S., and Bagchi, M.K. (1998). The Population Council and The Rockefeller University New York, New York 1002. *12*, 12.

Zhu, Y., Qi, C., Jain, S., Rao, M.S., and Reddy, J.K. (1997). Isolation and Characterization of PBP, a Protein That Interacts with Peroxisome Proliferator-activated Receptor. *J. Biol. Chem.* *272*, 25500–25506.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from Ligue Nationale Contre le Cancer (L.C.-T, H.N-K, C.K, J.F, C.DSG,F.D, E.C, Y.A., F.R., I.B.-P.) as an associated team (Équipe

labellisée), the “Carte d’Identité des Tumeurs” program initiated, developed and funded by Ligue Nationale Contre le Cancer, by a “PL-Bio” project funded by INCa (2016–146), the French Ministry of Education and Research, the CNRS, and the Institut Curie. The project was also supported by the Ligue Régionale Grand-Est Contre le Cancer, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the University of Strasbourg. We acknowledge ANR-10-LABX-0030-INRT under the frame program Investissements d’Avenir labelled ANR-10-IDEX-0002-02ANR and the support and the use of resources of the French Infrastructure for Integrated Structural Biology FRISBI ANR-10-INBS-05, the INSTRUCT-ERIC and the French Proteomic Infrastructure ProFI ANR-10-INBS-08–03. We would like to thank the staff of Proxima 1 at SOLEIL as well as of ID30A3 at ESRF for assistance in using the beamlines. We also thank Alastair McEwen (IGBMC) for help in X-ray data collections. We would like to thank Simone Benhamou (IGR) and Thierry Lebret (Foch Hospital) for their help in setting up the CIT series of bladder tumors. We thank GIS IBiSA and Région Alsace for financial support in purchasing a Synapt G2 HDMS instrument.

Author contributions

L.C-T, S.C, F.R, N.R. and I.B.-P. designed the study. L.C.-T., H.N-K, J.F, C.DSG, E.C carried out the bioinformatics analysis. A.K and A. DR classified the tumors and cell lines according to the consensus molecular classification, Y-A performed histological analysis of the tumors, T-L and Y-A. L.C.-T., H.N-K, F.D., C.K., J.F. and I.B.-P. performed the functional studies and analyzed the data. S.B, Q.P, C.P.I. and J.O. performed the biochemical, and biophysical studies. N.R. performed the structural studies and analyzed the biophysical and structural data. M.L. performed the mass

spectrometry experiments, M.L. and S.C. analyzed the mass spectrometry data. L.C.-T, H.N-K, J.F, N.R. and I.B.-P. wrote the manuscript. All authors made comments on the manuscript.

Figures

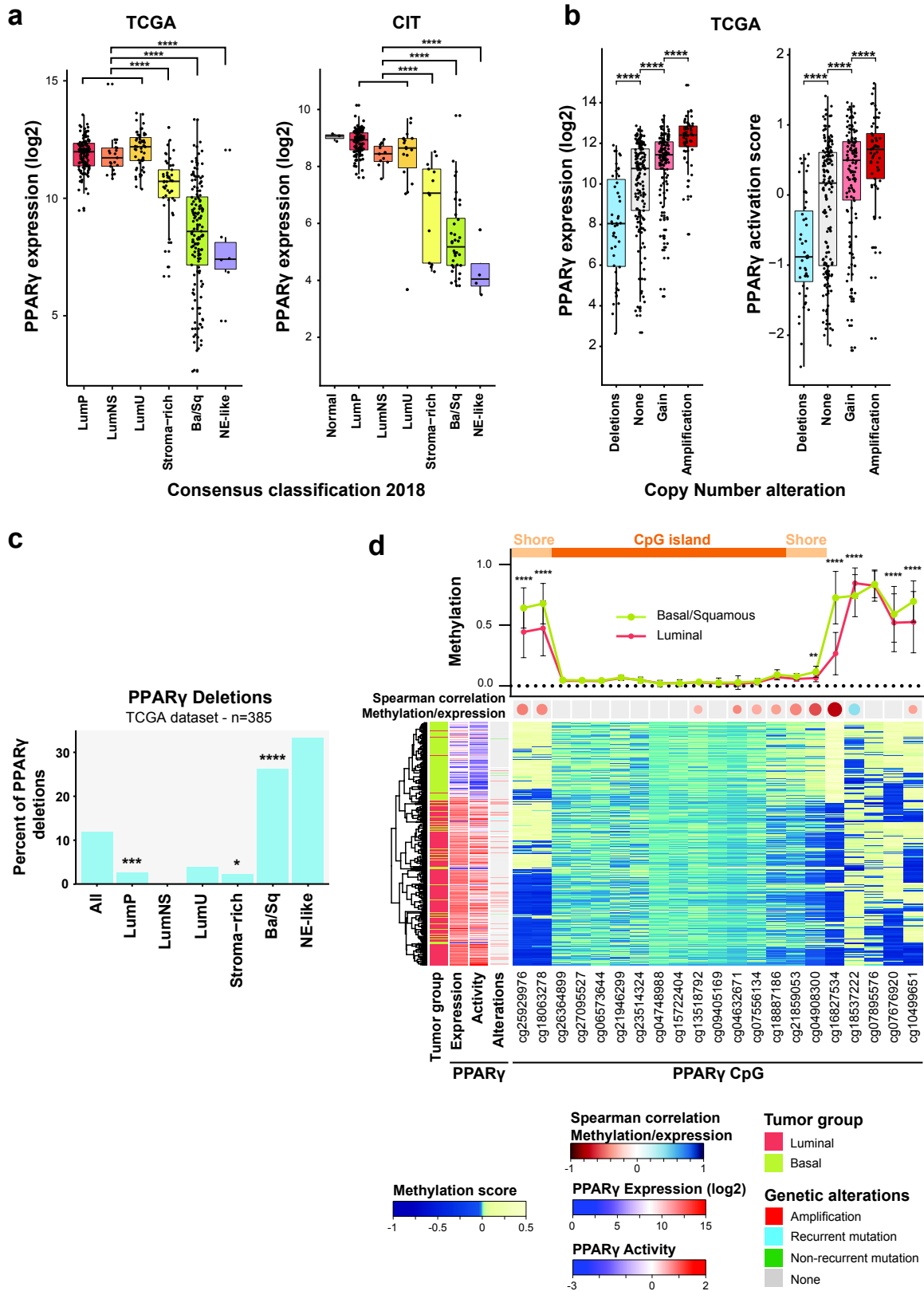


Figure 1: Heterozygous deletions and DNA hypermethylation are associated with loss of expression of PPAR γ in basal bladder tumors. **a)** Expression level of PPAR γ in 336 bladder tumors from our CIT series of tumors (Affymetrix U133 plus2.0 signal) and in 405 MIBCs from TCGA (RNA-seq). Tumors were classified according to a consensus molecular classification that defines six subgroups of MIBC (Kamoun et al., 2018). PPAR γ expression levels in stroma-rich, basal/squamous (Ba/Sq) and in Neuroendocrine-like (NE-like) tumors were compared to those in luminal tumors, comprising luminal papillary (LumP), Luminal non-specified (LumNS) and Luminal unstable (LumU) tumors using Dunnett's multiple comparison test, **** $p < 0.0001$. **b)** Expression level and activity of PPAR γ were compared in relation to PPAR γ copy number alterations in 385 MIBCs from TCGA using Dunnett's multiple comparison test, **** $p < 0.0001$. **c)** Frequency of genomic heterozygous deletion of PPAR γ in the different consensus subgroups of MIBC. Enrichment or depletion in genomic PPAR γ deletion in the different subgroups were evaluated using Fisher exact t-test, * $0.01 < p < 0.05$; *** $0.0001 < p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. **d)** Methylation of each CpG in TCGA dataset for basal (green) and luminal (red) tumors (upper panel), correlation of CpG methylation and PPAR γ expression (middle panel) and heatmap representing centered methylation score for each tumor (lower panel). Enrichment in CpG methylation in the different subgroups were evaluated using 2way ANOVA test, * $0.01 < p < 0.05$; *** $0.0001 < p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

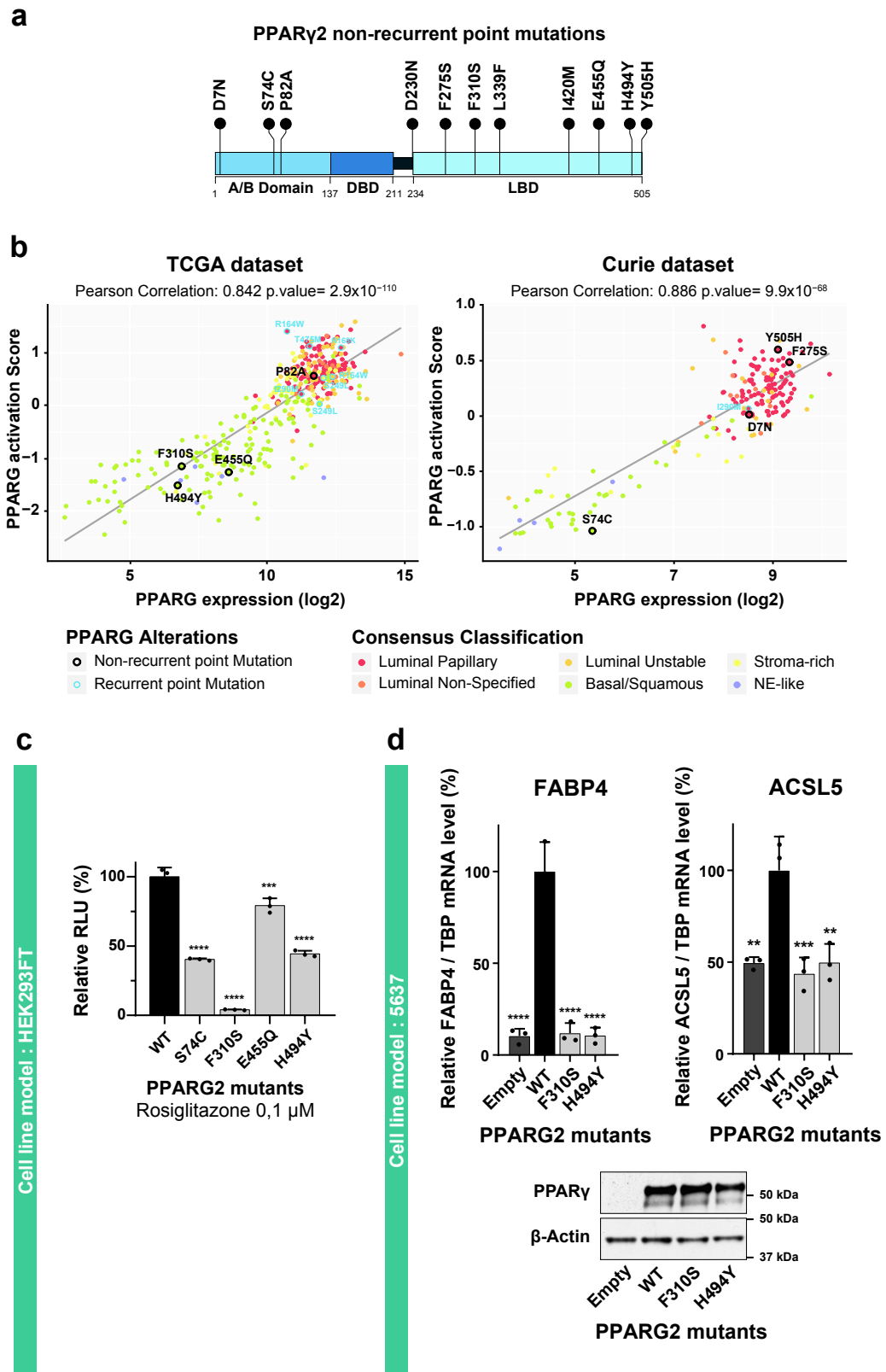


Figure 2: Transcriptional activity of non-recurrent PPAR γ mutants identified

in basal tumors. a) Lollipop representation of non-recurrent mutations of PPAR γ that

we previously identified in 859 bladder tumors (Rochel et al., 2019). Sequences are numbered according to the PPAR γ 2 isoform. A/B: N-terminal domain; DBD: DNA-binding domain; LBD: ligand-binding domain (LBD). **b)** PPAR γ expression levels and activation scores in 403 and 196 tumors from TCGA and CIT series respectively, for which both PPAR γ mutation data and transcriptomic data were available. **c)** A reporter plasmid containing the firefly luciferase gene under the control of a PPRE-X3-TK promoter was co-expressed in HEK293FT cells with a pcDNA3 vector encoding wild-type (WT) or mutant associated with basal tumors (S74C, F310S, E455Q, H494Y) PPAR γ 2. *Renilla* luciferase, expressed under the control of the CMV promoter, was used to normalize the signal. The data shown are the means \pm SD of one representative experiment conducted in triplicate. The results for each mutant were compared with those for the wild-type using Dunnett's multiple comparison test, *** $0.0001 < p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ **B)** 5637 cells were transiently transfected with a pcDNA3 vector encoding wild-type (WT) or mutant of the LBD domain (F310S, H494Y) PPAR γ . The expression of all PPAR γ forms was checked by western blotting, β -actin was used as loading control (lower panel). The expression of two PPAR γ target genes was normalized against TBP expression and is expressed as percentage relative to the expression induced by wild-type PPAR γ (upper panel). The data are presented as the mean \pm SD of three independent experiments. The results for each mutant were compared with those for the wild type using Dunnett's multiple comparison test: ** $0.001 < p < 0.01$; *** $0.0001 < p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

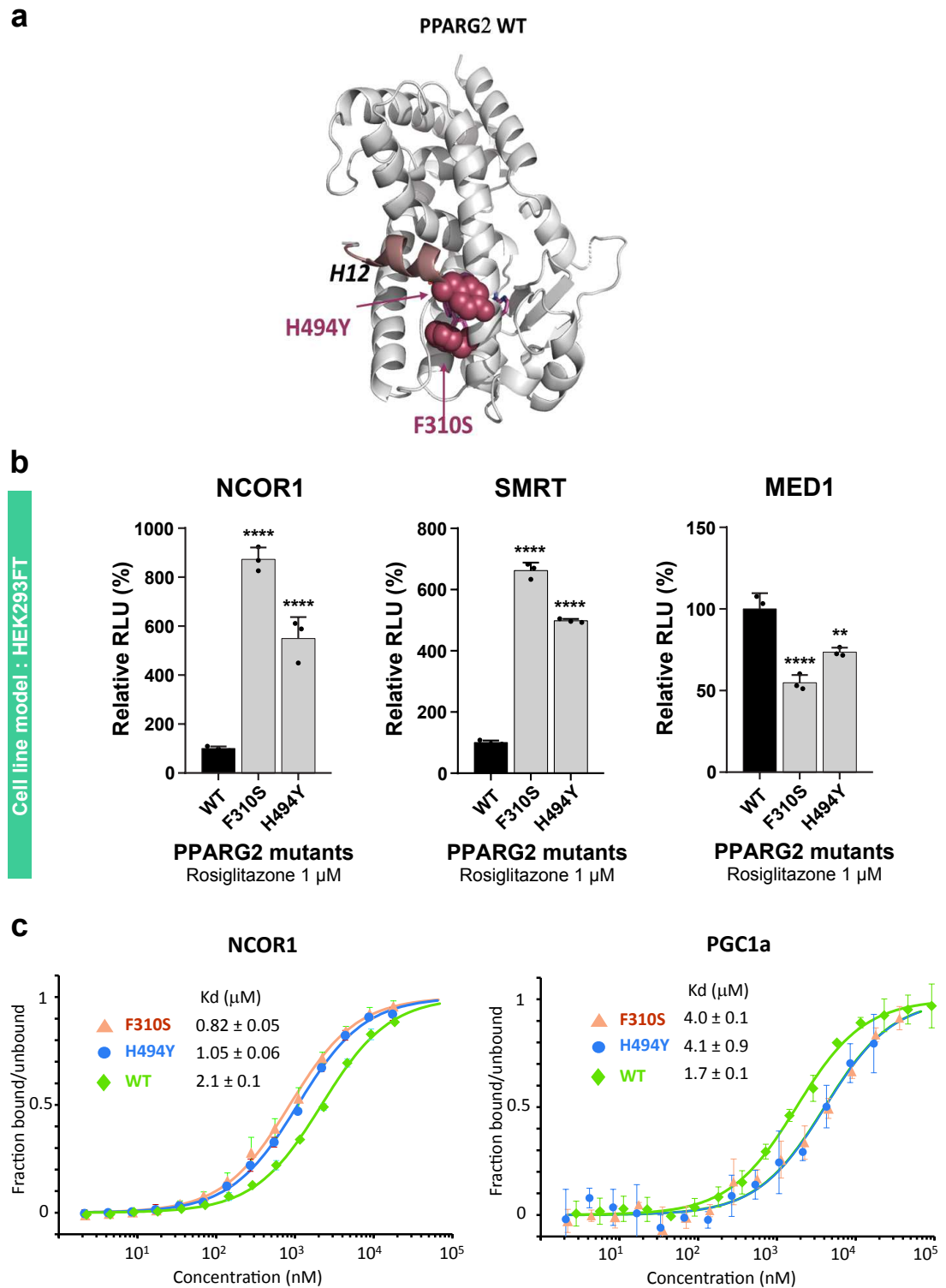


Figure 3: Effect of PPAR γ F310S and H494Y mutations on coregulator interactions. **a)** Position of the residues affected by non-recurrent PPAR γ mutations associated with basal tumors on the 3D structure of PPAR γ LBD. **b)** Mammalian two-

hybrid analysis in HEK293T cells. pG5-Firefly luciferase reporter plasmid was co-expressed with VP16-PPARG (wild-type or mutants full-length proteins) and with GAL4-DNA-binding-domain-fused NCoR1 or SMRT corepressor or MED1 coactivator domains. *Renilla* luciferase, expressed under the control of the CMV promoter, was used to normalize the signal. The data shown are the means \pm SD of one representative experiment conducted in quadruplicate. The results for each mutant were compared with those for the wild-type using Dunnett's multiple comparison test, ** $0.001 < p < 0.01$, **** $p < 0,0001$. **c)** Effect of PPAR γ mutations on the NCoR1 peptide (left) and PGC1 α peptide (right) interactions as determined by microscale thermophoresis. Unlabeled PPAR γ LBD protein was titrated into a fixed concentration of fluorescently labeled peptide in the absence of ligand. Isotherms were averaged over three consecutive measurements and fitted according to the law of mass action to yield the apparent K_D . Each plot is representative of at least two independent experiments performed with different batches of protein preparation.

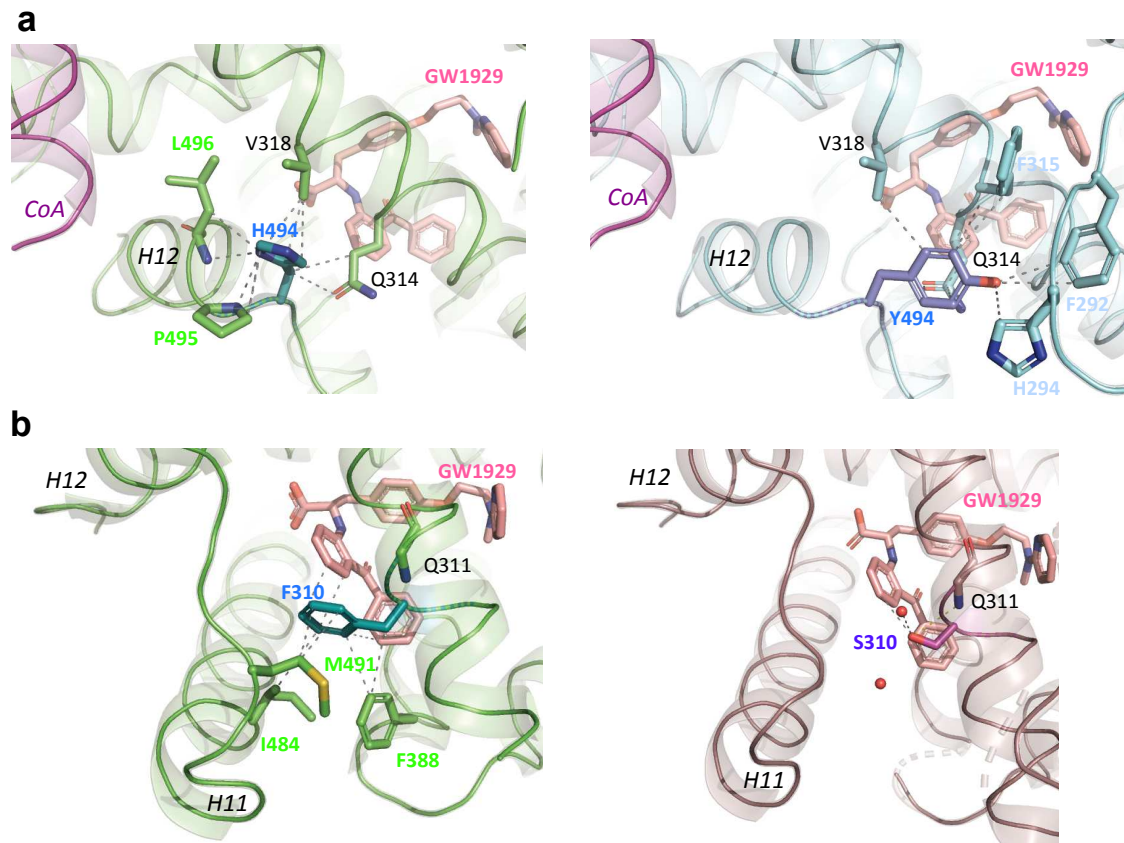


Figure 4: Impact of PPAR γ F310S and H494Y mutations on the crystal structure of the protein. a) Close-up of the regions around the H494Y mutation, showing its interactions in the WT complex (left) and in the mutant complex (right). PPAR γ WT and H494Y are in green and cyan, respectively, with the coactivator peptide in plum. b) Close-up of the regions around the F310S mutation, showing its interactions in the WT complex (left) and in the mutant complex (right).

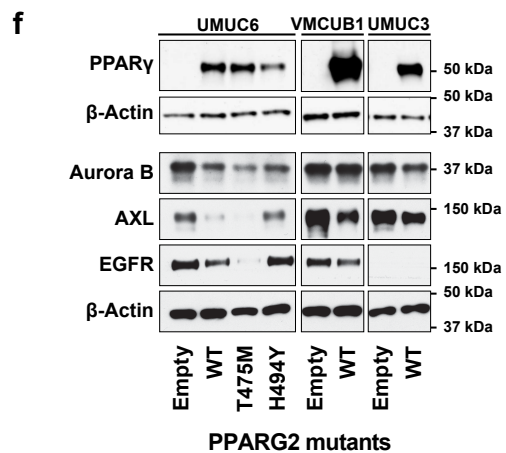
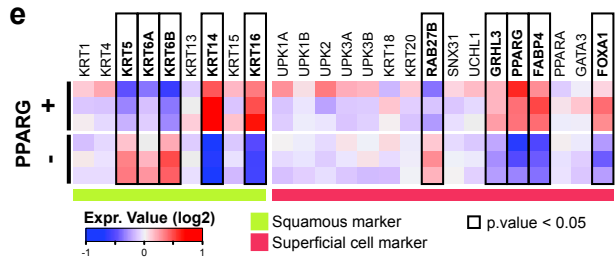
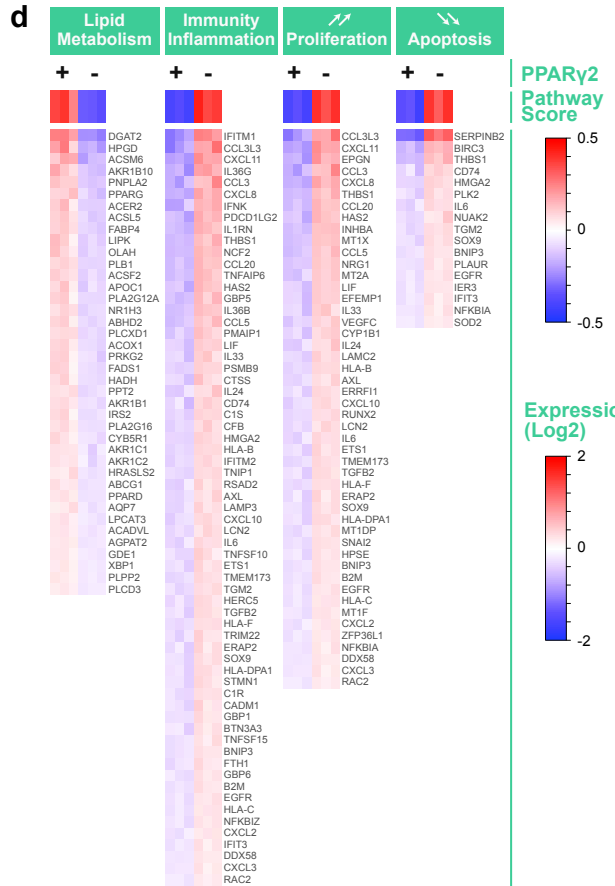
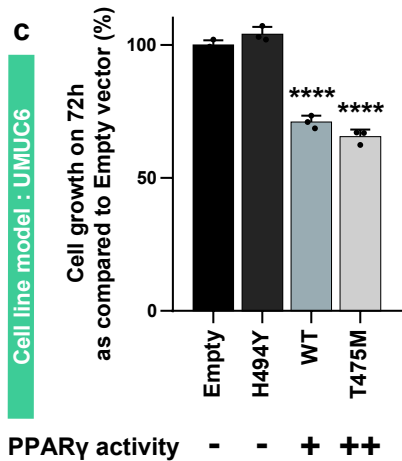
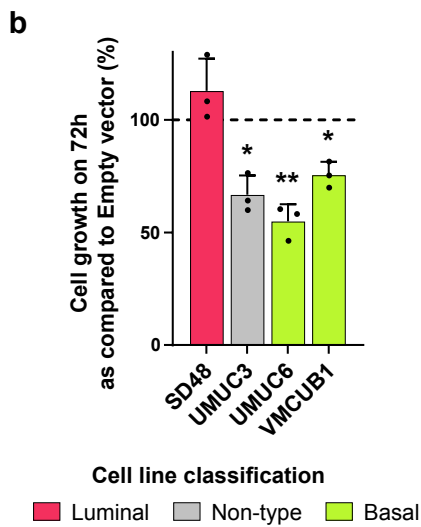
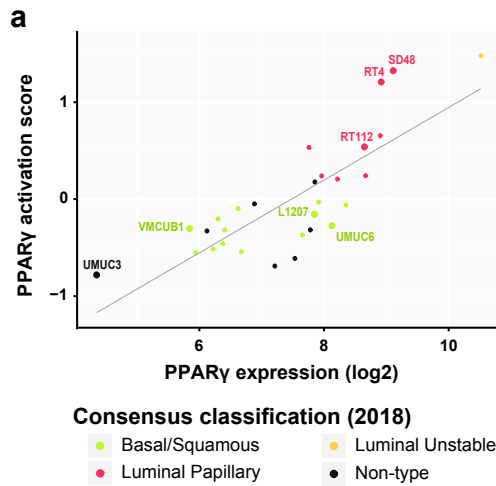


Figure 5: Effects of PPAR γ overexpression on basal bladder cancer cell growth. **a)** PPAR γ expression and activation score in a panel of bladder cancer cell lines. **b)** Four bladder cancer cell lines were transfected by a pRP vector encoding wild-type (WT) PPAR γ . 48h later, expression of PPAR γ was estimated by western-blot analysis (upper panel). The number of viable cells was quantified by CellTiter-Glo at 72h (lower panel). **c)** UMUC-6 cells were transfected by a pRP vector encoding wild-type (WT), inactive mutant (H494Y) or active mutant (T475M) PPAR γ . 48h later, expression of PPAR γ was estimated by western-blot analysis (upper panel). The number of viable cells was quantified by CellTiter-Glo at 72h (lower panel). **b-c:** results with PPAR γ (WT or mutant) were compared to those obtained with an empty vector using Dunnett's multiple comparison test, * $0.01 < p < 0.05$, ** $0.001 < p < 0.01$, **** $p < 0,0001$. **d)** Transcriptomic analysis upon PPAR γ transient expression in UMUC-6 cells transfected with empty vector (-) or control (+). DAVID analysis was performed for a list of 459 differentially expressed genes upon PPAR γ overexpression (p -value < 0.05) to identify the biological process altered by PPARG expression. **e)** Expression of genes involved in urothelial differentiation is highlighted. **f)** Western-blot analysis of PPAR γ , Aurora B, AXL and EGFR expression 72h after transient transfection of cells by a pRP vector encoding wild-type (WT), inactive mutant (H494Y) or active mutant (T475M) PPAR γ . Actin was used as loading control.

Supplementary data

Supplementary Table 1: Clinical and pathological characteristics of TCGA and CIT tumors.

	TCGA	CIT Cohorte
Total population	405	196
Sex		
Male	299	156
Female	106	36
NA	0	4
Tumor stage		
Ta	0	56
T1	2	45
T2	130	28
T3	138	44
T4	133	22
NA	2	1
Tumor classification		
LumP	127	114
LumU	53	18
LumNS	20	11
Stroma-rich	45	13
Ba/Sq	152	36
NE-like	6	4
NA	2	0

Supplementary Table 2: crystallographic data and refinement.

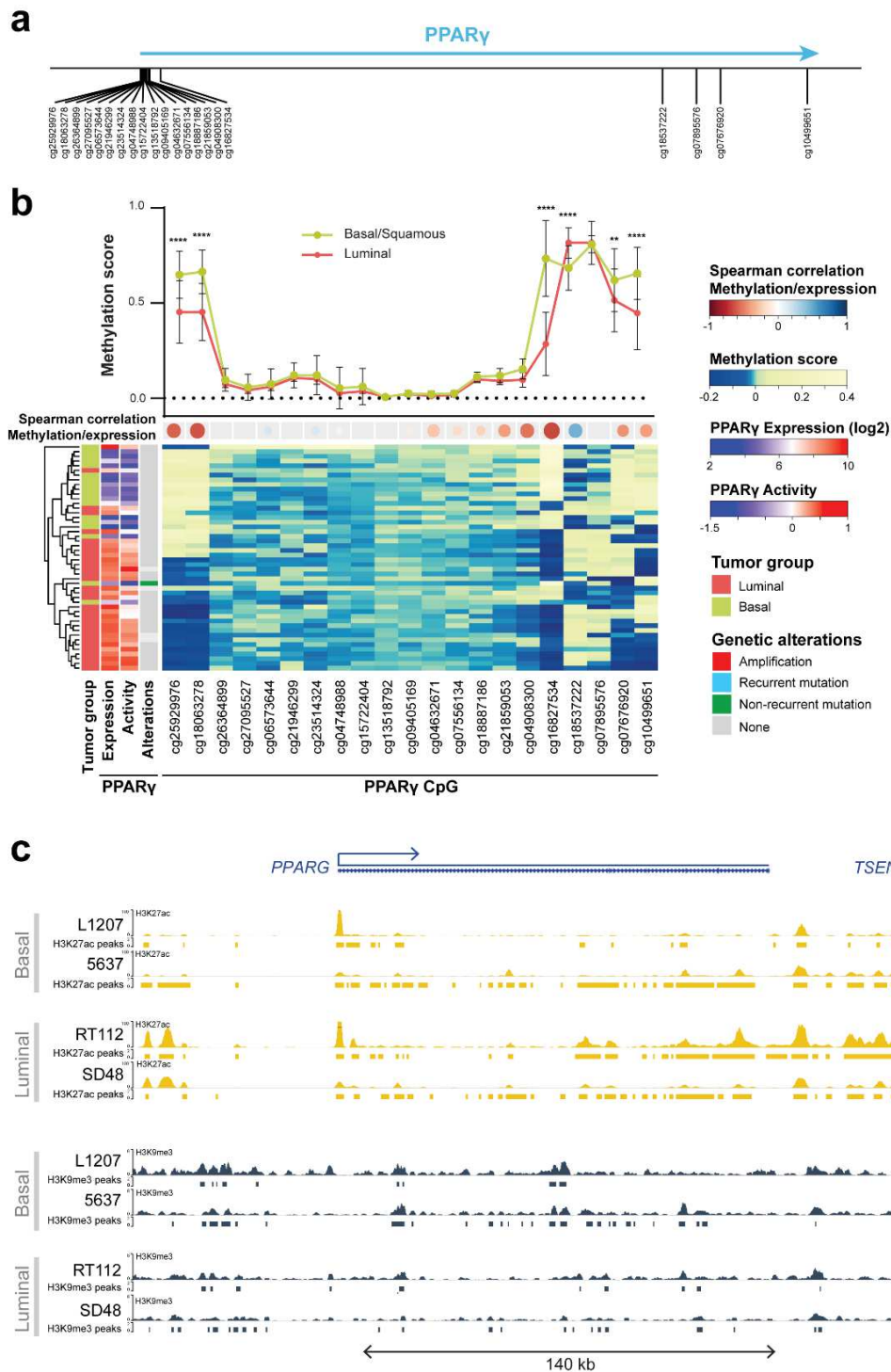
	PPAR γ 2 F310S-GW1929	PPAR γ 2 H494Y-GW1929-PGC1 α
PDB ID	6T1S	6T1V
Data collection		
Space group	P4 ₁ 2 ₁ 2	I 2 2 2
Cell dimensions		
a, b, c (Å)	60.66 60.66 169.52	56.35, 120.74, 149.84
a, b, g (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolution (Å)	49.33-1.65	52.74-2.21
Rmerge (%)	0.0096 (0.675)	0.026 (0.291)
Rpim (%)	0.0096 (0.675)	0.026 (0.291)
I/ σ	25.77 (1.0)	17.90 (2.43)
Completeness (%)	99.72 (97.31)	99.75 (99.96)
Redundancy	2.0 (2.0)	2.0. (2.0)
CC(1/2)	1 (0.524)	0.999 (0.842)
Refinement		
Resolution	49.33-1.65	56.35-2.21
N° reflections	39253	25889
Rwork/Rfree	0.168/0.206	0.184/0.198
N° atoms		
Protein	2206	2250
Ligand/ion	52	37
Water	243	169
B-factors		
Protein	48.34	48.46
Ligand/ion	50.88	36.02
Water	48.29	50.99
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.016	0.004
Bond angles	1.74	0.98

Supplementary Table 3: Up and down-regulated genes following PPARG2 overexpression

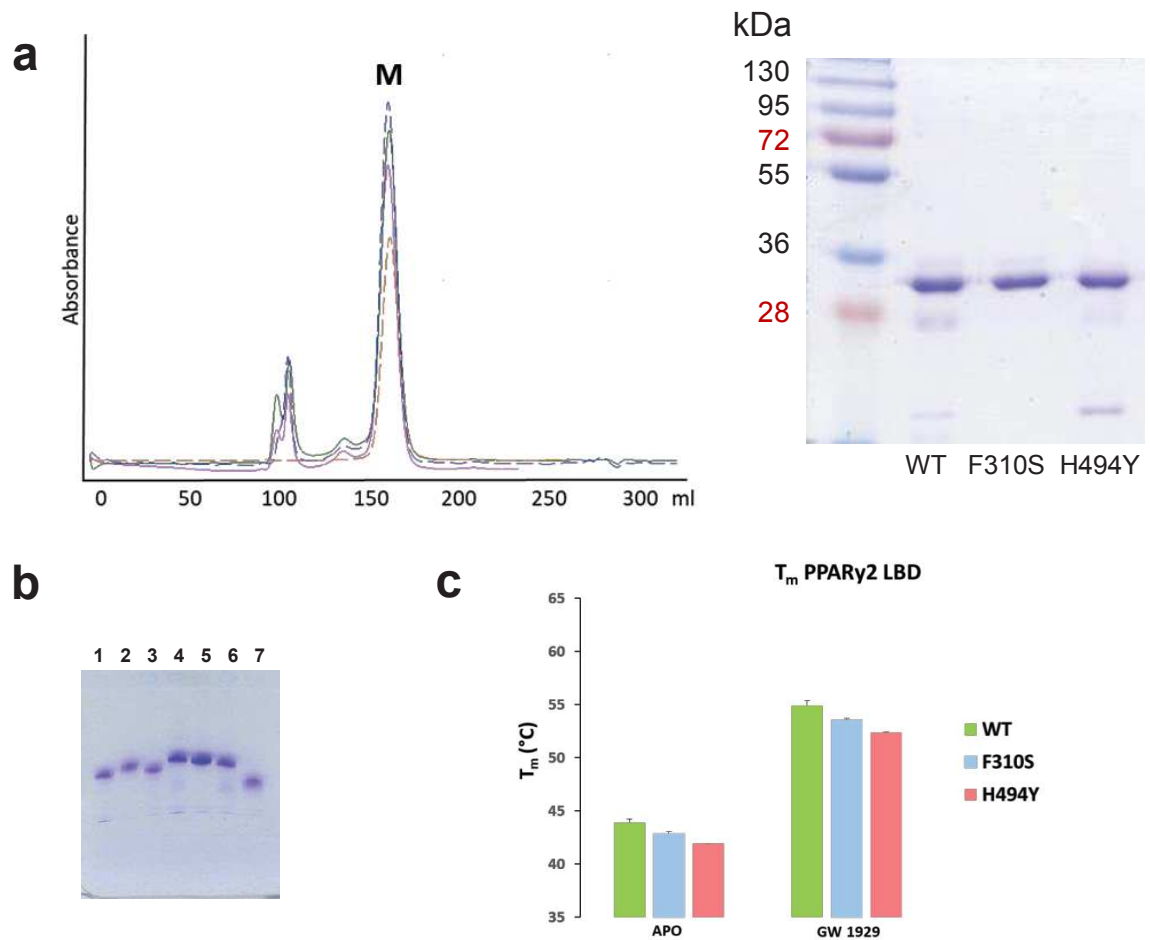
Gene	logFC	p_value	Gene	logFC	p_value	Gene	logFC	p_value	Gene	logFC	p_value
MMP19	2,0627	1,21E-03	KRT16P1	0,8469	2,85E-02	ENTPD3	0,6399	1,42E-02	MAB21L3	0,5081	1,42E-02
SLITRK6	1,9623	1,63E-03	LOC647859	0,8462	1,86E-02	CYFIP2	0,6372	4,51E-02	ST6GALNAC4	0,5045	3,83E-02
DGAT2	1,9461	1,21E-03	PRR15	0,8457	4,98E-03	TNFRSF21	0,6363	1,08E-02	NR1D1	0,5044	2,23E-02
SDC2	1,8178	5,62E-03	SLC44A3	0,8306	5,64E-03	PRKG2	0,6362	4,62E-02	AKR1C2	0,5010	4,93E-02
LOC100506253	1,7562	4,07E-02	SERPINE1	0,8284	5,64E-03	FRRS1	0,6337	3,36E-02	HRASLS2	0,4936	3,28E-02
C11orf86	1,6620	3,16E-03	ACER2	0,8229	2,33E-02	LOC107985544	0,6288	1,83E-02	MIR1266	0,4916	2,71E-02
AQP3	1,6444	3,19E-03	B4GALT1	0,8184	5,86E-03	DMBX1	0,6270	1,17E-02	LOC101928635	0,4905	3,52E-02
HPGD	1,4955	1,29E-02	TNFAIP2	0,8102	5,73E-03	METTL7A	0,6170	4,78E-02	ABCG1	0,4884	2,23E-02
HYAL4	1,4728	3,19E-03	ACSL5	0,8075	9,89E-03	FAM89A	0,6161	1,85E-02	PPARD	0,4860	1,85E-02
PRG4	1,4664	5,86E-03	SNHG18	0,8036	3,88E-03	TRIM31	0,6161	1,71E-02	WSB2	0,4852	4,07E-02
GPRIN3	1,4048	4,19E-03	LYPD3	0,8015	3,88E-03	FADS1	0,6100	3,36E-02	S100A16	0,4851	2,87E-02
LOC101927118	1,3952	3,88E-03	FABP4	0,7930	6,78E-03	SSPN	0,6049	8,93E-03	CORO2B	0,4778	4,18E-02
STAT4	1,3772	7,51E-03	SPOCD1	0,7909	4,54E-03	STEAP3	0,6011	1,86E-02	ATP13A3	0,4770	3,65E-02
PTGER4	1,3736	3,16E-03	ABCG2	0,7856	2,79E-02	DIO2	0,5997	1,29E-02	ZNF750	0,4703	4,62E-02
S100A9	1,3525	1,89E-02	SMOX	0,7842	7,67E-03	FABP5P2	0,5979	3,86E-02	MDFIC	0,4702	3,98E-02
KRT14	1,2979	2,54E-03	LIPK	0,7827	3,44E-02	AKR1B1P7	0,5975	9,19E-03	CSF1R	0,4699	3,56E-02
RHOF	1,2973	4,42E-03	S100A4	0,7671	3,70E-02	ATP2B4	0,5914	3,46E-02	UBE2Q2	0,4663	4,93E-02
TGFBR3	1,2928	4,42E-03	GMFG	0,7643	7,56E-03	HADH	0,5912	2,85E-02	SORBS1	0,4663	3,79E-02
ACSM6	1,2830	4,98E-03	IL1RAPL2	0,7611	2,78E-02	BHLHE41	0,5869	1,75E-02	LOC105377818	0,4655	2,74E-02
SEMA5A	1,2354	3,34E-03	BBOX1	0,7579	2,00E-02	PPT2	0,5831	1,15E-02	CSR2P2	0,4647	2,28E-02
KLRC1	1,2334	2,12E-03	LOC100421523	0,7518	3,88E-03	HSPA6	0,5827	1,85E-02	EPCAM	0,4630	2,83E-02
TGM5	1,2178	1,21E-03	OLAH	0,7452	2,42E-02	SHC1P1	0,5805	1,65E-02	C1orf220	0,4613	3,19E-02
PADI4	1,2048	2,12E-03	RNF128	0,7339	3,66E-02	ABCC11	0,5771	1,14E-02	AQP7	0,4602	4,18E-02
BCL6	1,1894	4,62E-03	LONRF3	0,7281	1,42E-02	CSR2P2P1	0,5746	1,85E-02	PROM2	0,4542	2,72E-02
SNORD123	1,1779	2,00E-02	ETFDH	0,7270	2,23E-02	AKR1B1	0,5740	1,49E-02	HSPA7	0,4538	3,52E-02
AATBC	1,1369	3,19E-03	PLB1	0,7233	4,42E-03	HEIH	0,5718	2,07E-02	SLC9A7P1	0,4516	4,31E-02
LOC105369593	1,1238	2,37E-02	EPHB6	0,7216	8,01E-03	PHLDA3	0,5709	1,65E-02	LPCAT3	0,4471	3,36E-02
OR7E14P	1,0806	1,51E-03	LOC105374470	0,7105	2,72E-02	IFRD1	0,5702	2,42E-02	SLC45A3	0,4422	2,96E-02
TIMP3	1,0538	2,12E-03	ACKR3	0,7102	9,15E-03	RDH10	0,5676	1,71E-02	POU5F1B	0,4377	2,45E-02
AKR1B10	1,0483	1,03E-02	SLC25A20	0,7073	2,53E-02	LOC105369592	0,5642	2,08E-02	ACADVL	0,4363	2,87E-02
RALGPS2	1,0430	1,40E-02	ACSF2	0,7059	1,08E-02	IRS2	0,5634	3,65E-02	TMEM56	0,4352	4,75E-02
PIM1	1,0035	3,88E-03	TUFT1	0,7004	1,63E-02	TFCP2L1	0,5612	3,33E-02	GRHL3	0,4340	2,72E-02
TRAJ23	0,9982	3,02E-02	TTC39B	0,6965	2,23E-02	AKR1B1P3	0,5607	1,67E-02	ITGAV	0,4334	4,44E-02
KRT16	0,9826	4,42E-03	LBH	0,6963	1,81E-02	LMNTD1	0,5605	2,58E-02	EPB41L1	0,4302	3,02E-02
FAM213A	0,9763	4,42E-03	CXADR	0,6906	2,79E-02	ABHD6	0,5601	2,87E-02	IMPDH1P4	0,4286	3,13E-02
CEACAM1	0,9670	1,08E-02	APOC1	0,6887	3,81E-02	THRB	0,5573	1,48E-02	ARHGAP42P5	0,4280	4,66E-02
AKR1B10P1	0,9616	4,98E-03	LINC00847	0,6832	6,79E-03	LOC102724908	0,5572	1,83E-02	MARC1	0,4276	4,22E-02
ZNF436	0,9541	3,16E-03	EPAS1	0,6822	1,08E-02	LOC105371688	0,5532	2,44E-02	AGPAT2	0,4247	2,60E-02
FOS	0,9493	2,65E-02	LRRC8B	0,6764	4,65E-02	HSPB8	0,5517	1,65E-02	CDC26	0,4204	2,84E-02
MFSD6	0,9454	2,48E-02	ARHGAP26	0,6736	1,41E-02	PLA2G16	0,5471	1,76E-02	PTK2B	0,4186	3,43E-02
MEP1AP3	0,9439	2,14E-02	CYP2C18	0,6682	3,98E-02	C12orf45	0,5434	3,84E-02	PLEKHA6	0,4185	3,02E-02
DMBT1	0,9339	4,71E-02	PLA2G12A	0,6645	3,12E-02	SLC4A11	0,5429	1,85E-02	OAS1	0,4166	3,83E-02
PNPLA2	0,9324	2,41E-03	NR1H3	0,6643	8,78E-03	AKR1C3	0,5406	4,39E-02	FST	0,4142	4,71E-02
GOLGA7B	0,9266	3,16E-03	LOC102724608	0,6623	2,28E-02	LOC105373998	0,5339	2,72E-02	AKR1B15	0,4118	4,51E-02
FOXO1	0,9178	1,10E-02	ABHD2	0,6597	2,28E-02	SHC1	0,5338	1,71E-02	MAL2	0,4116	3,40E-02
DENND2D	0,9166	2,54E-03	UAP1	0,6594	2,42E-02	RHOD	0,5335	1,77E-02	POR	0,4102	3,98E-02
LOC107986632	0,8951	4,32E-02	PLCXD1	0,6577	5,84E-03	COL4A1	0,5329	1,63E-02	H2AFJ	0,4091	3,40E-02
FAM213AP2	0,8913	1,29E-02	HTRA1	0,6568	4,84E-02	CYB5R1	0,5274	3,79E-02	LOC724105	0,4079	4,55E-02
S100A7	0,8903	2,36E-02	ACOX1	0,6544	1,54E-02	IL13RA2	0,5262	2,91E-02	CDV3	0,4055	3,31E-02
PPARG	0,8894	1,18E-02	S100A14	0,6506	3,40E-02	DOCK8	0,5259	4,51E-02	GDE1	0,4029	4,32E-02
SPINK7	0,8751	3,56E-02	LOC107986160	0,6496	3,46E-02	LOC105373567	0,5253	4,81E-02	PCSK6	0,4024	4,62E-02
TLR4	0,8673	1,03E-02	LINC01589	0,6450	1,09E-02	ALAS1	0,5211	2,33E-02	FOSL2	0,3986	4,22E-02
LOC105376192	0,8638	3,02E-02	LOC574538	0,6435	1,42E-02	LINC01384	0,5189	3,70E-02	XBP1	0,3892	4,32E-02
FGFBP1	0,8614	4,18E-02	CKMT1A	0,6419	2,08E-02	IMPDH1P6	0,5181	2,85E-02	PLPP2	0,3880	5,00E-02
ABLIM3	0,8573	4,54E-03	EGLN1	0,6414	1,85E-02	AKR1C1	0,5172	4,68E-02	PPFIBP2	0,3850	4,62E-02
LOC105372578	0,8551	1,81E-02	PCED1B-AS1	0,6402	1,08E-02	ARHGAP23	0,5106	2,28E-02	PLCD3	0,3717	4,51E-02

Chapitre 2 : Caractérisations de mutants de PPAR γ impliqués dans le cancer de la vessie

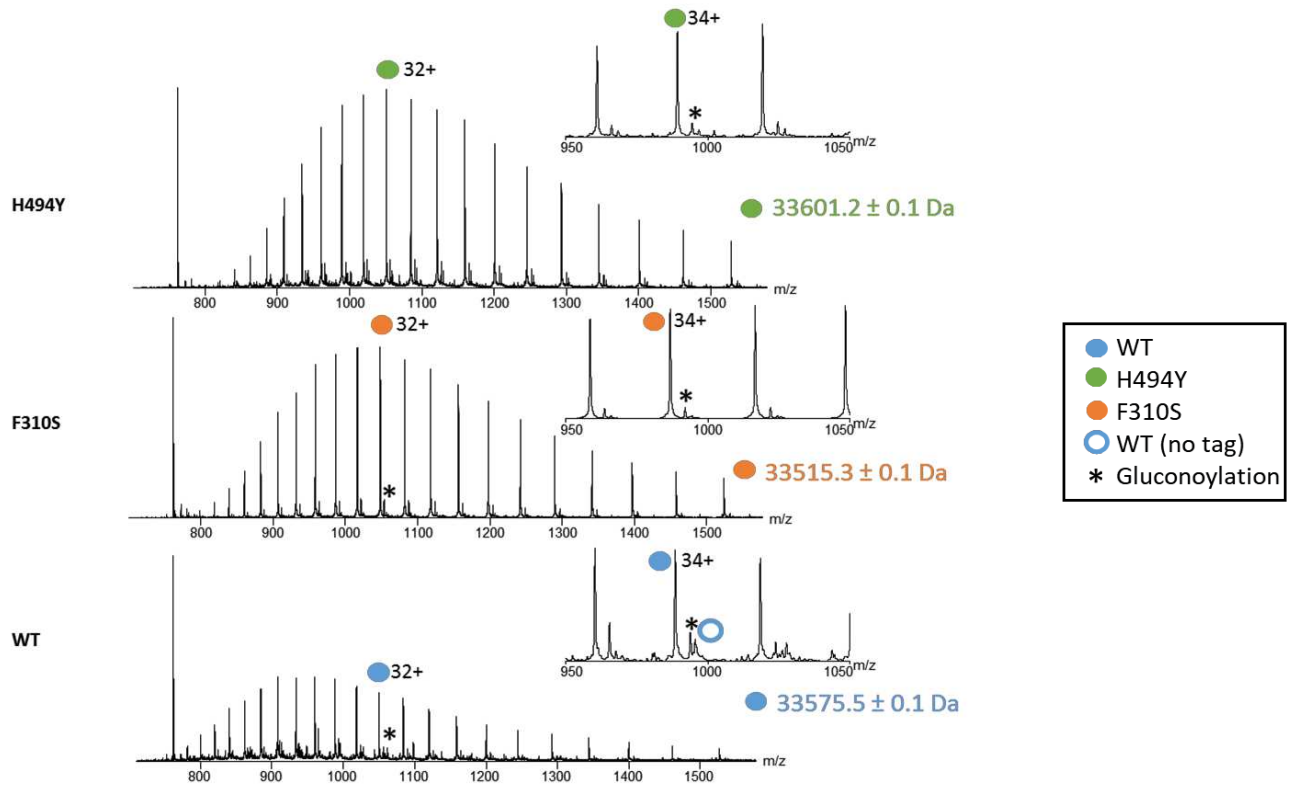
Gene	logFC	p_value	Gene	logFC	p_value	Gene	logFC	p_value	Gene	logFC	p_value
SLC7A5	-0,3772	4,22E-02	UNC5C	-0,5136	2,00E-02	ETS1	-0,6294	1,99E-02	CNN3	-0,8165	2,87E-02
FRAS1	-0,3778	4,09E-02	LINC00673	-0,5142	3,39E-02	TNFSF10	-0,6306	3,02E-02	NRP1	-0,8177	4,62E-03
HPS3	-0,3791	4,46E-02	MIR6748	-0,5181	4,51E-02	DOCK10	-0,6323	1,40E-02	RARRES3	-0,8264	1,03E-02
RAC2	-0,3799	4,68E-02	ELK3	-0,5191	2,23E-02	IL6	-0,6345	1,81E-02	RBMS2P1	-0,8334	2,48E-02
GRB14	-0,3800	4,78E-02	GBP6	-0,5195	2,23E-02	PLK2	-0,6367	2,46E-02	ANTXR2	-0,8494	1,03E-02
LOC100506411	-0,3800	4,09E-02	FTH1	-0,5201	3,14E-02	LCN2	-0,6376	1,29E-02	EFEMP1	-0,8570	9,04E-03
TRIM21	-0,3879	3,98E-02	PHLDB2	-0,5205	2,28E-02	RUNX2	-0,6402	7,04E-03	LIF	-0,8625	6,10E-03
GPR63	-0,3902	3,57E-02	BNIP3	-0,5229	1,48E-02	ITGB8	-0,6428	3,93E-02	MUC13	-0,8767	4,91E-03
SOD2	-0,3906	4,15E-02	TRAM2	-0,5252	3,36E-02	CXCL10	-0,6445	1,41E-02	STRIP2	-0,8767	5,03E-03
LOC100131849	-0,3923	4,46E-02	TNFSF15	-0,5260	2,49E-02	ERRF1	-0,6477	1,65E-02	TOX	-0,8782	1,08E-02
TPRA1	-0,4037	3,61E-02	TENM2	-0,5276	3,12E-02	TCN1	-0,6478	4,22E-02	LOC107984462	-0,8823	3,79E-02
LAMB2	-0,4114	4,28E-02	ARSL	-0,5288	3,12E-02	LAMP3	-0,6482	1,66E-02	PMAIP1	-0,8907	7,56E-03
GJB5	-0,4188	3,16E-02	HPSE	-0,5307	2,91E-02	MT2P1	-0,6496	1,40E-02	LOC541472	-0,9098	3,51E-02
CXCL3	-0,4264	4,02E-02	BTN3A3	-0,5346	4,64E-02	SLC28A3	-0,6497	6,79E-03	MT2A	-0,9174	6,78E-03
ARNTL2	-0,4330	4,02E-02	ADAMTS6	-0,5348	4,62E-02	HERC3	-0,6498	3,40E-02	NRG1	-0,9327	2,13E-03
COL17A1	-0,4371	4,64E-02	SYT14	-0,5364	4,51E-02	IGFL2-AS1	-0,6516	1,07E-02	SERPINB13	-0,9353	1,85E-02
STARD5	-0,4409	2,61E-02	GBP1	-0,5389	1,71E-02	AXL	-0,6537	1,40E-02	TMEM27	-0,9536	6,78E-03
IRF6	-0,4415	4,22E-02	LOC107986820	-0,5471	1,98E-02	RSAD2	-0,6537	3,20E-02	MYOSLID	-0,9867	1,08E-02
ANXA8L1	-0,4431	3,49E-02	RRAS	-0,5497	1,29E-02	RTP4	-0,6612	3,98E-02	EVI2B	-1,0003	1,41E-02
DDX58	-0,4434	2,28E-02	KYNU	-0,5579	1,65E-02	PRR16	-0,6688	1,14E-02	CCL5	-1,0194	3,88E-03
CD68	-0,4439	2,97E-02	NDRG1	-0,5584	1,40E-02	TIPARP	-0,6696	3,01E-02	MBOAT1	-1,0281	1,03E-02
MYO19	-0,4504	4,93E-02	CBLB	-0,5596	1,49E-02	TNIP1	-0,6702	5,78E-03	FDCSP	-1,0334	2,23E-02
PLCG2	-0,4520	3,26E-02	SERPINE2	-0,5657	1,28E-02	DPYD	-0,6715	4,91E-02	MT1X	-1,0382	1,71E-03
WDR66	-0,4529	2,51E-02	UBA7	-0,5679	4,32E-02	IFITM2	-0,6743	7,77E-03	IL36B	-1,0530	1,95E-03
KLF7	-0,4604	4,18E-02	KRT5	-0,5682	4,22E-02	SQOR	-0,6781	2,28E-02	LOC105374003	-1,0648	7,51E-03
NFKBIA	-0,4626	3,36E-02	SNAI2	-0,5736	1,03E-02	LOC105372130	-0,6827	3,02E-02	INHBA	-1,0883	1,63E-03
ZFP36L1	-0,4634	2,78E-02	NT5E	-0,5767	1,17E-02	TGFB1	-0,6968	2,08E-02	GBP5	-1,0890	3,75E-03
SYNE2	-0,4650	2,72E-02	LOC442309	-0,5796	4,09E-02	ARL4C	-0,6969	2,53E-02	HAS2	-1,0900	5,86E-03
FHDC1	-0,4662	4,22E-02	ADAMTS1	-0,5802	1,63E-02	HLA-B	-0,6988	4,54E-03	CDA	-1,1039	7,51E-03
IFIT3	-0,4679	3,36E-02	MT1DP	-0,5833	1,42E-02	ADAM19	-0,7075	7,67E-03	TNFAIP6	-1,1039	2,54E-03
CXCL2	-0,4681	3,10E-02	TMCC3	-0,5834	1,29E-02	SLFN12	-0,7109	3,47E-02	CCL20	-1,1074	2,29E-03
GBP1P1	-0,4703	2,48E-02	CADM1	-0,5834	3,46E-02	NEFL	-0,7110	1,75E-02	MMP13	-1,1234	3,04E-02
ALDOC	-0,4721	4,20E-02	EIF5A2P1	-0,5852	1,63E-02	MSMB	-0,7131	1,03E-02	LINC00704	-1,1263	9,82E-03
EPB41L2	-0,4754	2,85E-02	SLC2A3	-0,5875	4,44E-02	F2RL2	-0,7142	2,34E-02	UCA1	-1,1278	2,54E-03
CPNE8	-0,4776	4,68E-02	CAPRN2	-0,5882	1,71E-02	HMGA2	-0,7153	4,98E-03	SERPINB7	-1,1495	4,06E-03
HEG1	-0,4778	4,62E-02	C1R	-0,5893	1,17E-02	CFB	-0,7158	1,03E-02	NCF2	-1,1621	1,51E-03
MCOLN3	-0,4813	1,85E-02	ANXA3	-0,5900	1,85E-02	PDP1	-0,7171	1,42E-02	THBS1	-1,1629	2,12E-03
ANTXR1	-0,4824	4,18E-02	STMN1	-0,5919	2,23E-02	LOC107986951	-0,7180	1,03E-02	IL1RN	-1,2027	2,13E-03
BAGALT5	-0,4841	2,84E-02	FAM160A1	-0,5923	3,02E-02	LAMC2	-0,7209	8,38E-03	SPTLC3	-1,2268	1,09E-02
IER3	-0,4882	2,64E-02	E2F7	-0,5925	1,62E-02	C1S	-0,7381	4,98E-03	SPRR2A	-1,2456	3,18E-02
EXT1	-0,4896	4,28E-02	HLA-DPA1	-0,5968	2,10E-02	ATP1B1	-0,7408	3,12E-02	GBP4	-1,2649	3,60E-03
DCBLD1	-0,4903	3,59E-02	SOX9	-0,6029	1,65E-02	GALNT5	-0,7504	6,30E-03	BIRC3	-1,2690	2,12E-03
MT1F	-0,4913	2,21E-02	TGFB11	-0,6057	8,38E-03	DKK1	-0,7538	3,57E-02	PDCD1LG2	-1,2727	3,34E-03
P3H2	-0,4968	2,23E-02	ERAP2	-0,6075	4,28E-02	KRT6B	-0,7538	2,28E-02	ALDH1A3	-1,3208	2,12E-03
NFKBIZ	-0,4971	2,44E-02	TRIM22	-0,6084	2,87E-02	CD74	-0,7600	2,68E-02	NAV3	-1,3270	1,69E-03
HLA-C	-0,4985	1,81E-02	TMEM2	-0,6112	4,18E-02	IL24	-0,7610	1,95E-02	IFNK	-1,3308	4,91E-03
JARID2	-0,4991	4,18E-02	HLA-F	-0,6123	7,04E-03	GFPT2	-0,7628	7,95E-03	HCP5	-1,3367	3,75E-03
SERPINA1	-0,4997	2,48E-02	CALB2	-0,6153	1,68E-02	CTSS	-0,7637	2,23E-02	CXCL8	-1,3813	1,63E-03
LRRC49	-0,5008	2,33E-02	TGFB2	-0,6154	2,14E-02	PSMB9	-0,7736	3,52E-03	CCL3	-1,3858	1,08E-02
KRT81	-0,5023	1,81E-02	HERC5	-0,6159	1,85E-02	UNC13C	-0,7747	1,85E-02	AMTN	-1,4289	1,09E-02
BHLHE40	-0,5027	2,83E-02	ZC2HC1A	-0,6166	3,36E-02	LOC102723739	-0,7766	1,69E-02	EPGN	-1,4608	3,31E-03
EGFR	-0,5031	2,34E-02	TGM2	-0,6194	1,09E-02	CYP4V2	-0,7826	4,07E-02	IL36G	-1,5200	3,05E-03
SCN2A	-0,5032	3,01E-02	SLC2A12	-0,6211	3,03E-02	CYP1B1	-0,7864	1,29E-02	CXCL11	-1,6230	1,21E-03
COL12A1	-0,5068	1,85E-02	NUAK2	-0,6228	3,01E-02	PORCN	-0,7893	1,03E-02	DUSP10	-1,6256	1,21E-03
B2M	-0,5074	2,00E-02	FENDRR	-0,6273	3,12E-02	VEGFC	-0,7974	6,79E-03	PTPRZ1	-1,7074	2,12E-03
BNIP3P1	-0,5075	2,23E-02	TMEM173	-0,6274	1,03E-02	LOC105373426	-0,8069	3,65E-02	CCL3L3	-1,7724	4,62E-03
FBXL2	-0,5079	2,33E-02	NME7	-0,6276	2,87E-02	IL33	-0,8093	2,12E-02	IFITM1	-1,9225	1,51E-03
TM4SF1	-0,5103	2,99E-02	LOC105376374	-0,6279	3,12E-02	VSNL1	-0,8146	4,19E-03	SERPINB2	-2,4708	3,96E-04
PLAUR	-0,5115	2,08E-02	RBMS2	-0,6284	2,27E-02	SH3RF2	-0,8153	3,19E-03			



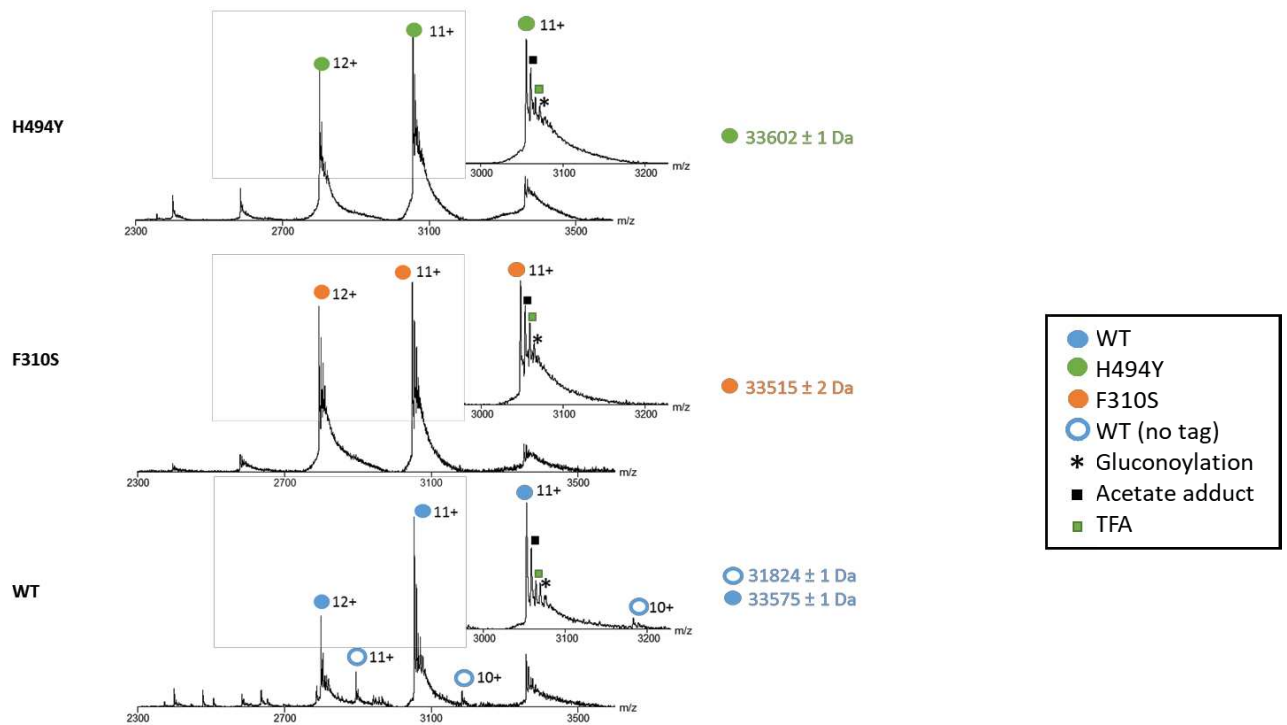
Supplementary Figure 1: a) Relative position of the CpG close to PPAR γ gene. **b)** Methylation of each CpG in CIT dataset for basal (green) and luminal (red) tumors (upper panel), correlation of CpG methylation and PPAR γ expression (middle panel) and heatmap representing centered methylation score for each tumor (lower panel). **c)** Genome Browser view of ChIPseq analysis for PPAR γ locus in Basal (L1207, 5637) and Luminal cell lines (RT112, SD48). ChIPseq aligned reads and associated peaks (MACS2) are represented in yellow and grey for H3K27ac and H3K9me3 marks respectively.



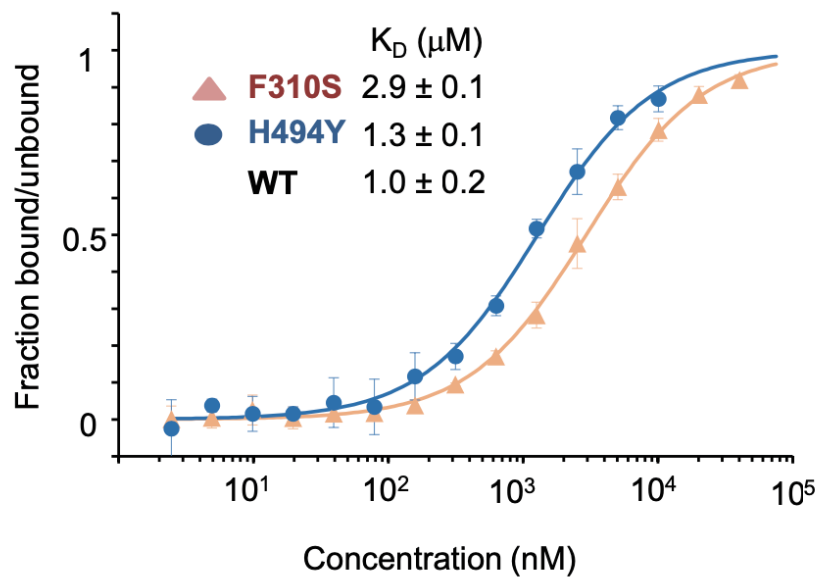
Supplementary Figure 2: Characterization of PPAR γ mutants. **a)** Left: Gel filtration (S75 26/60) elution profile of apo PPAR γ WT and mutants that elute as monomers. Right: coomassie stained SDS gel corresponding to the PPAR γ wild-type (WT) and mutants monomeric peaks. **b)** Native PAGE of PPAR γ WT (lane 1), F310S (lane 2), H494Y (lane 3), PPAR γ WT with 1 equivalent of RXR α WT (lane 4), F310S with 1 equivalent of RXR α WT (lane 5), H494Y with 1 equivalent of RXR α WT (lane 6) and RXR α monomeric WT (lane 7). **c)** Nano differential scanning fluorimetry comparing the thermal stability of the purified PPAR γ WT and mutants alone and upon binding to the agonist ligand.



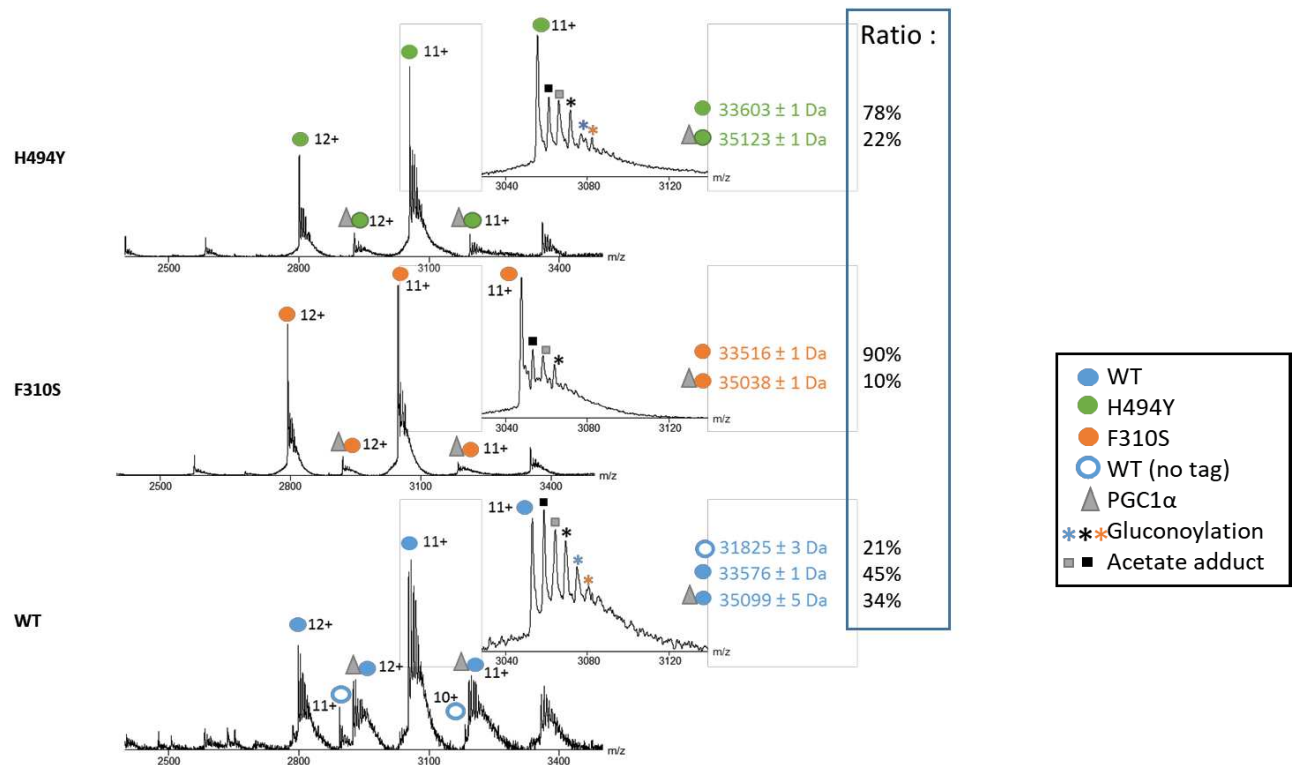
Supplementary Figure 3: Denaturing mass spectra of PPAR γ LBD H494Y, F310S and WT. The experimental measured masses of the proteins are depicted in the right side of the mass spectra.



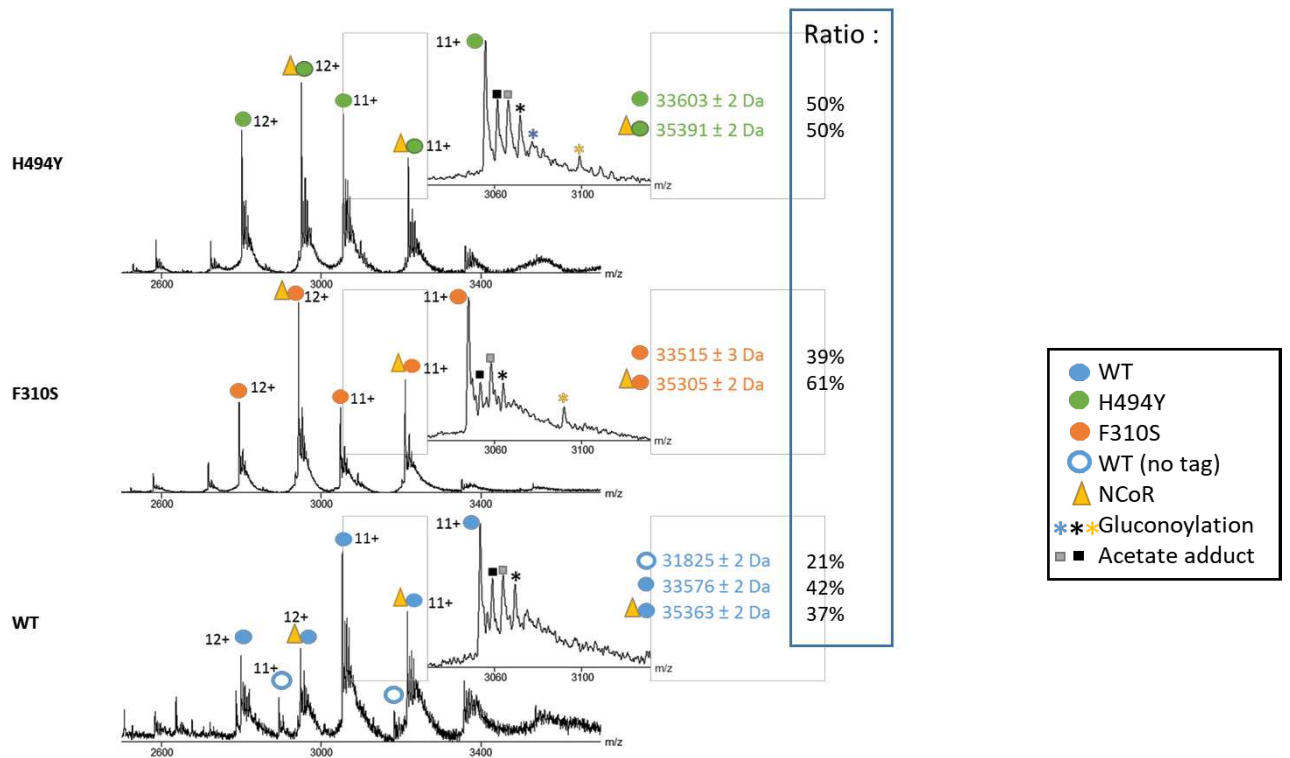
Supplementary Figure 4: Native electrospray ionization mass spectra of PPAR γ LBD H494Y, F310S and WT. Mass spectra of apo proteins indicating the absence of any unexpected bound ligand in apo proteins.



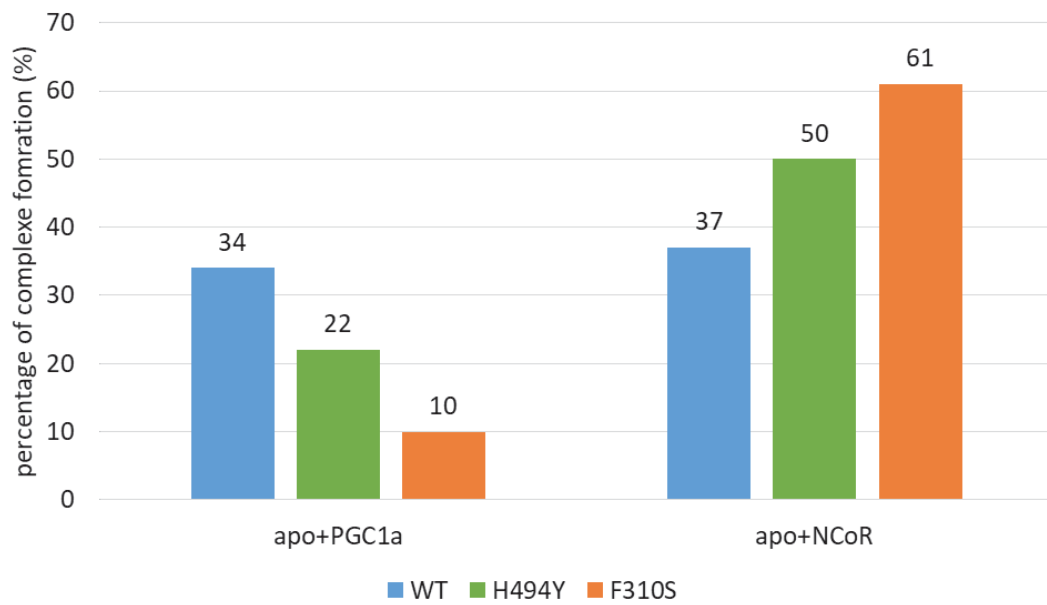
Supplementary Figure 5: Effect of PPAR γ mutations on the PGC1 α peptide interaction in presence of rosiglitazone as determined by microscale thermophoresis. Unlabeled PPAR γ LBD protein was titrated into a fixed concentration of fluorescently labeled peptide in the presence of 3 equivalent of rosiglitazone. Isotherms were averaged over three consecutive measurements and fitted according to the law of mass action to yield the apparent K_D.



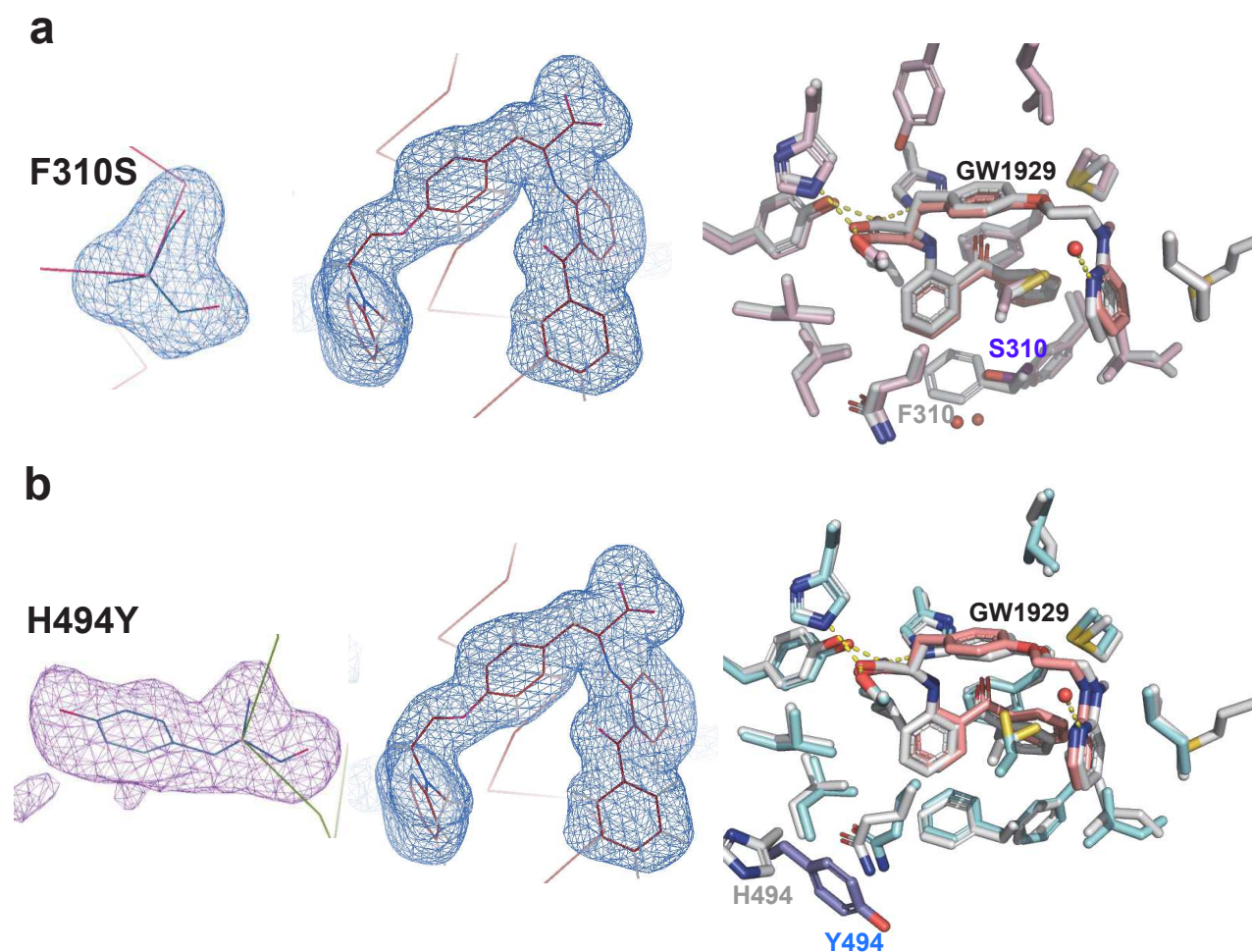
Supplementary Figure 6: Native electrospray ionization mass spectra of PPAR γ LBD H494Y, F310S and WT. Mass spectra of the complexes obtained after addition of 3 fold excess of PGC1a coactivator peptide.



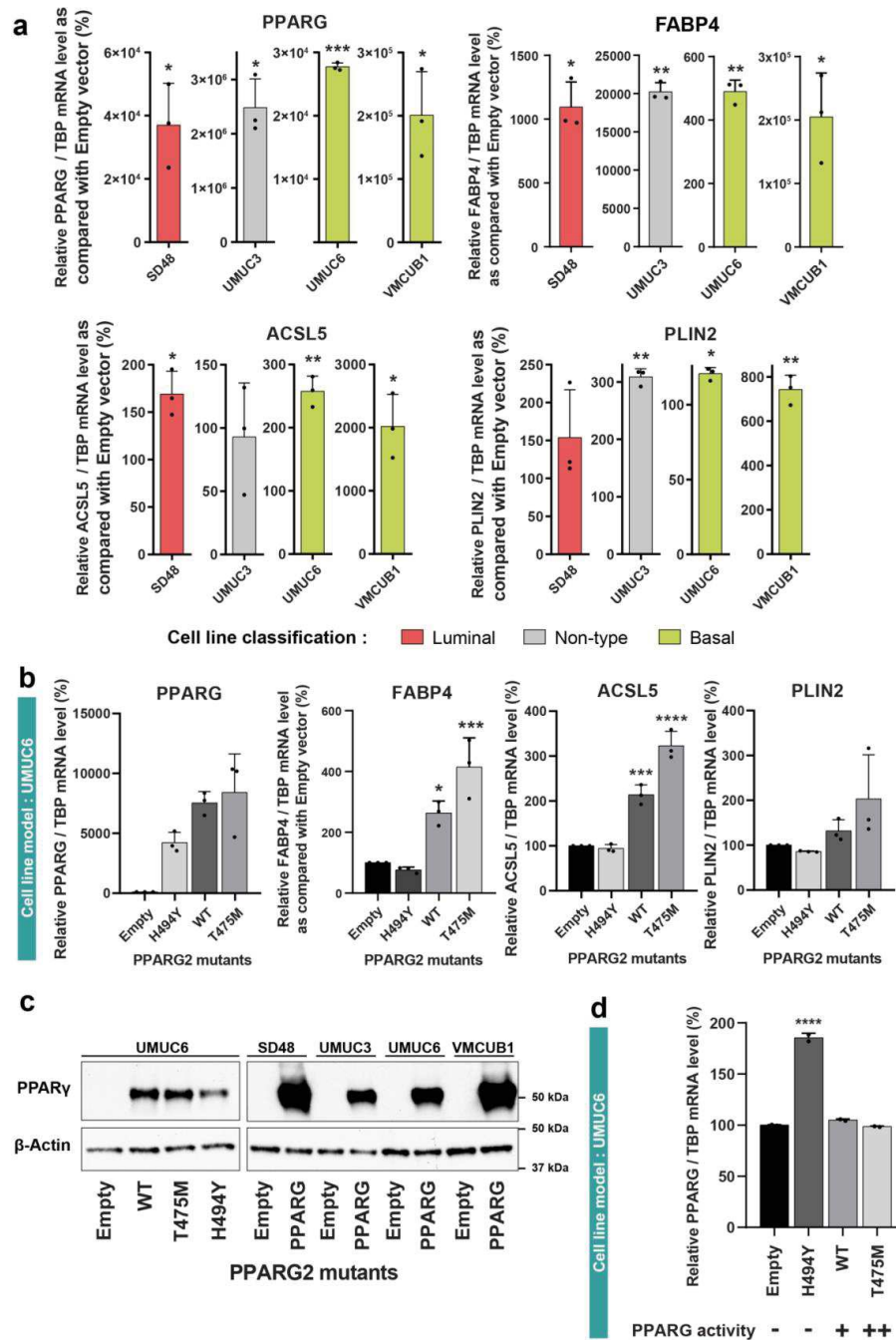
Supplementary Figure 7: Native electrospray ionization mass spectra of PPAR γ LBD H494Y, F310S and WT. Mass spectra of the complexes obtained after addition of 5 fold excess of NCoR corepressor peptide



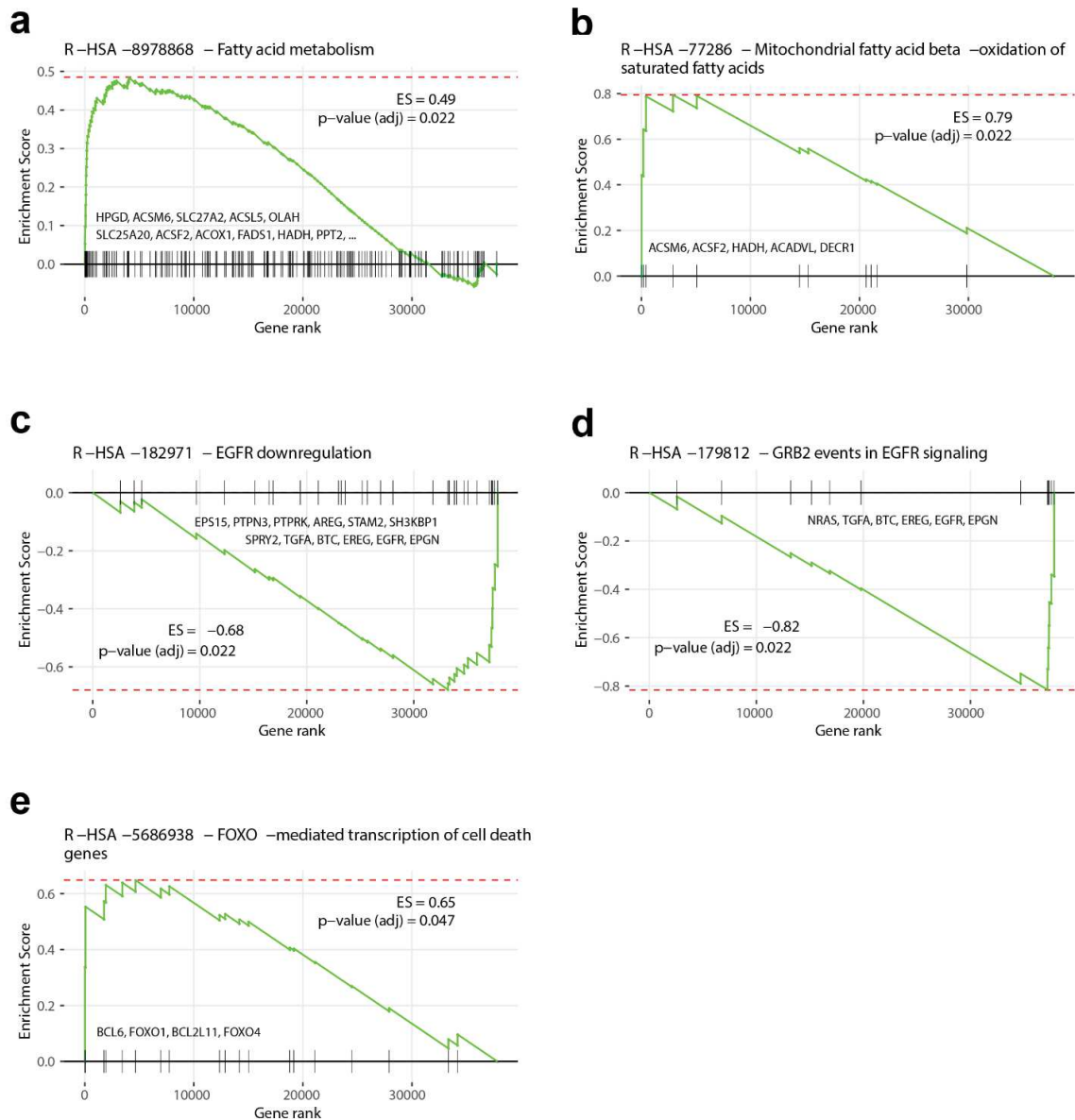
Supplementary Figure 8: Histogram of complexation rate between peptides PGC1 α or NCoR and PPAR γ LBD H494Y, F310S and WT.



Supplementary Figure 9: GW1929 modelled into the difference density of the PPAR γ a) F310S and b) H494Y crystal structures. Left: Residues mutated shown is an unbiased omit Polder map contoured at 3.5σ , with model bias reduction and exclusion of solvent density. Center: GW1929 modelled into the difference density of the mutants crystal structures. Shown is an unbiased omit Polder map contoured at 3.5σ , with model bias reduction and exclusion of solvent density. Right: Comparisons of the interactions made between GW1929 and residues lining the ligand binding pocket of PPAR γ mutants and WT (grey). Contributing side chains are shown as grey sticks, with residue forming hydrogen bonds (yellow dashed lines). Water molecules are shown by red spheres.



Supplementary figure 10: Transient expression of *PPARγ* induces a *PPARγ*-dependent transcription in basal bladder cancer cell lines. a) Expression of *PPARγ* and *PPARγ*-target genes 72 h after transfection by a pRP vector encoding *PPARγ2* in 4 different bladder cancer cell lines. **b)** Expression of *PPARγ* and *PPARγ* target genes 72 h after transfection by a pRP vector encoding WT, gain-of-function (T475M) or loss-of-function mutant (H494Y) *PPARγ2* in UMUC-6 basal bladder cancer cell lines. **c)** Expression of *PPARγ* in pooled-UMUC6 cells transfected by a pRP vector encoding wt, gain-of-function (T475M) or loss-of-function mutant (H494Y) *PPARγ2*. **a-c)** results obtained after *PPARγ* transfection were compared to those obtained after transfection with the backbone vector using Dunnett's multiple comparison test, * 0.01 < *p* < 0.05, ** 0.001 < *p* < 0.01, **** *p* < 0.0001. **d)**



Supplementary figure 11: . Core enrichment genes, present in the leading or trailing edge, are annotated in the plot. Samples with overexpressed PPAR γ were enriched with proteins involved in Fatty Acid Metabolism (**a**), and, specifically, in Mitochondrial fatty acid beta-oxidation of saturated fatty acids (**b**). Conversely, they presented EGFR downregulation (**c**) and were specifically depleted of GRB2 events in EGFR signaling (**d**). Finally, after PPAR γ overexpression, FOXO-mediated transcription of pro-apoptotic genes is upregulated (**e**), which may contribute to the observed lower viability of cells.

Cette étude a donc permis d'apporter des évidences génétiques et fonctionnelles soutenant le rôle de suppresseur de tumeur de PPAR γ dans les tumeurs basales urothéliales. Ce sous-groupe de tumeurs est associé à une diminution de l'expression et de l'activité de PPAR γ , et les mises en évidences des délétions hétérozygotes de ce gène (aboutissant aux mutations citées précédemment) entraînent une diminution de son expression. Les mutations perte de fonction entraînent donc une expression et une activité altérée du gène PPAR γ .

De plus, les mutations inactivatrices (F310S et H494Y) engendrent des défauts de dissociation des corépresseurs ainsi qu'un impact négatif sur le recrutement des coactivateurs. L'analyse structurale met en évidence une déstabilisation de la conformation active de PPAR γ LBD, altérant ainsi l'activité transcriptionnelle et le recrutement des coactivateurs, et donc une altération de l'activité de PPAR γ muté dans les tumeurs basales.

Afin de mieux comprendre pourquoi ces mutants présentent une affinité accrue pour les corépresseurs, nous avons mené une étude sur le recrutement des corépresseurs de PPAR γ (NCoR et SMRT) en présence d'un ligand inverse agoniste (T0070907) et l'impact des mutations identifiées dans les tumeurs basales (F310S et H494Y) sur ce recrutement comparé à la protéine native WT. Au début de cette étude, aucune étude structurale de complexe de corépresseurs avec PPAR γ n'était disponible. Cette étude sera présentée sous forme de manuscrit pour publication scientifique en partie 3 (**Syrine Beji et al.**, 2020, *In preparation*).

Manuscrit en préparation :
Structural basis for inverse agonist-mediated
recruitment of NCoR corepressor by PPAR γ
F310S inactivating mutant

3. Manuscrit en préparation

Structural basis for inverse agonist-mediated recruitment of NCoR corepressor by PPAR γ F310S inactivating mutant

Syrine Beji¹, Quentin Pippo¹, Marie Ley², Alastair Mc Ewen¹, Sarah Cianferani², Natacha Rochel¹

¹ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Institut National de La Santé et de La Recherche Médicale (INSERM), U1258/Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), UMR7104/Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France. Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, ² Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, 67000 Strasbourg, France.

Abstract

The nuclear receptor (NR) ligand-binding domain (LBD) is a highly flexible ensemble. The LBD enables the nuclear receptor to activate the transcription of target genes. In some cases, ligand binding appears to be required for the interaction of the receptor with its DNA-response element. The repressive states of NRs are poorly defined, notwithstanding the fact that NRs are an important drug target. Repression of gene transcription by NRs is mediated by interactions with corepressors, such as NCoR (Nuclear Co-Repressor) and SMRT (Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptor). The NR peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) plays a central role in adipogenesis and urothelial differentiation and is the molecular target for the thiazolidinedione (TZD) class of antidiabetic drugs. T0070907, a non-TZD ligand for PPAR was identified as a potent and selective PPAR inverse agonist. Here we report the crystal structure of a ternary complex of the inactivating mutant F310S of the PPAR γ LBD bound to the inverse agonist T0070907 and an NCoR corepressor motif. In this structure, the carboxy-terminal activation helix, H12 (Activation-Function 2, AF-2) of the receptor adopts an inactive conformation. The F310S and H494Y mutations exhibits increased affinity of the corepressor peptide of NCoR compared to the wild-type protein, that is further reinforced by the inverse agonist T0070907. These studies allow us to understand how these mutations impair PPAR γ activity and by which mechanism it interacts with the corepressor peptide (NCoR or SMRT).

Introduction

The peroxisome proliferator-activated receptor γ or PPAR γ (NR1C3) is a ligand-activated transcription factor and member of the nuclear hormone receptor (NR) superfamily (Rosen and Spiegelman, 2001). PPAR γ , the most intensively studied PPAR isoform, is a key regulator of adipogenesis, glucose homeostasis, has a well-established role in adipocyte differentiation and is involved in urothelium differentiation (Varley, 2004). PPAR γ is also a key player in tumorigenesis of bladder cancer (Biton et al., 2014a). To date, genetic and epigenetic alterations of PPAR γ were identified as involved in PPAR γ activation in luminal bladder tumors (Rochel et al., 2019) or inactivation in basal bladder tumors and support a tumor suppressor role of PPAR γ in basal tumors (Coutos et al., 2019). PPAR γ mutants associated with basal tumors were identified among them F310S and H494Y were identified and associated with PPAR γ loss of expression.

Like other members of this NR subfamily, once activated by ligands, PPAR γ forms a heterodimeric complex with the retinoid X receptor (RXR) and binds to a DNA response element upstream of the coding regions of target genes. Ligand-dependent recruitment of coregulators to NRs is usually mediated by consensus sequences of type LxxLL/LxxlxxLL identified as coactivators and corepressors, respectively (L: Leucine, X: any amino acid). These peptides adopt a helical conformation and bind to the ligand binding domain (LBD). Major conformational states of NR LBDs are known. They all present a common fold: 12 α -helices (numbered H1-H12), and a β -sheet, arranged as a three-layered antiparallel α -helical « sandwich » (Wurtz et al., 1996). A common orthosteric ligand-binding pocket is also described, involving mainly hydrophobic residues. Major structural changes occur upon ligand binding and the flexibility of the C-terminal helix in most NRs (H12) is an important determinant of activity. Drugs bind deep in the ligand binding pocket inside the LBD and allosterically change the receptor surface. A large conformational difference between an « open » apo-form and a compact « closed » holo-form was illustrated by X-ray structures (Bourguet et al., 1995). Crystal structures of the PPAR γ LBD have been important to determine the molecular mechanism of action of PPAR γ -binding ligands. The PPAR γ ligand-binding pocket is one of the largest in the nuclear receptor family (Gallastegui et al., 2015), around 1300-1400 Å³, and described as T or Y shaped (Kroger and Bruning, 2015) that binds diverse types of ligands.

In addition, the comparison of agonist and antagonist-bound LBD structures reveals two distinct conformations for the helix H12 in the carboxy-terminus. Few distinct states are found for H12 for some NR crystal structures such as Estrogen Receptor α (ER α), RXR α and PPAR α (Eberhardt et al., 2019), however, the lack of drug-induced conformational changes of helix H12 of other NRs may distort the physiological structural organization because the main structure in solution may not be easily crystallizable. The three conformational states of NR LBDs known so far are the *apo*-form, the *holo*-agonist, and the *holo*-antagonist states: different positions of helix H12 characterize these different conformational states.

The mechanisms of activation or repression are dictated by the ligand-dependent recruitment of coregulator proteins acting as coactivators such as PGC1 α /SRC1 or corepressors such as NCoR/SMRT, to the PPAR γ LBD domain. It is already known that repressive NR states favor corepressor binding and conversely disfavor coactivator binding and recent structural data on PPAR γ bound to the corepressor-selective inverse agonist T0070907 and corepressor peptides revealed a new mechanism of repression (Shang et al., 2020).

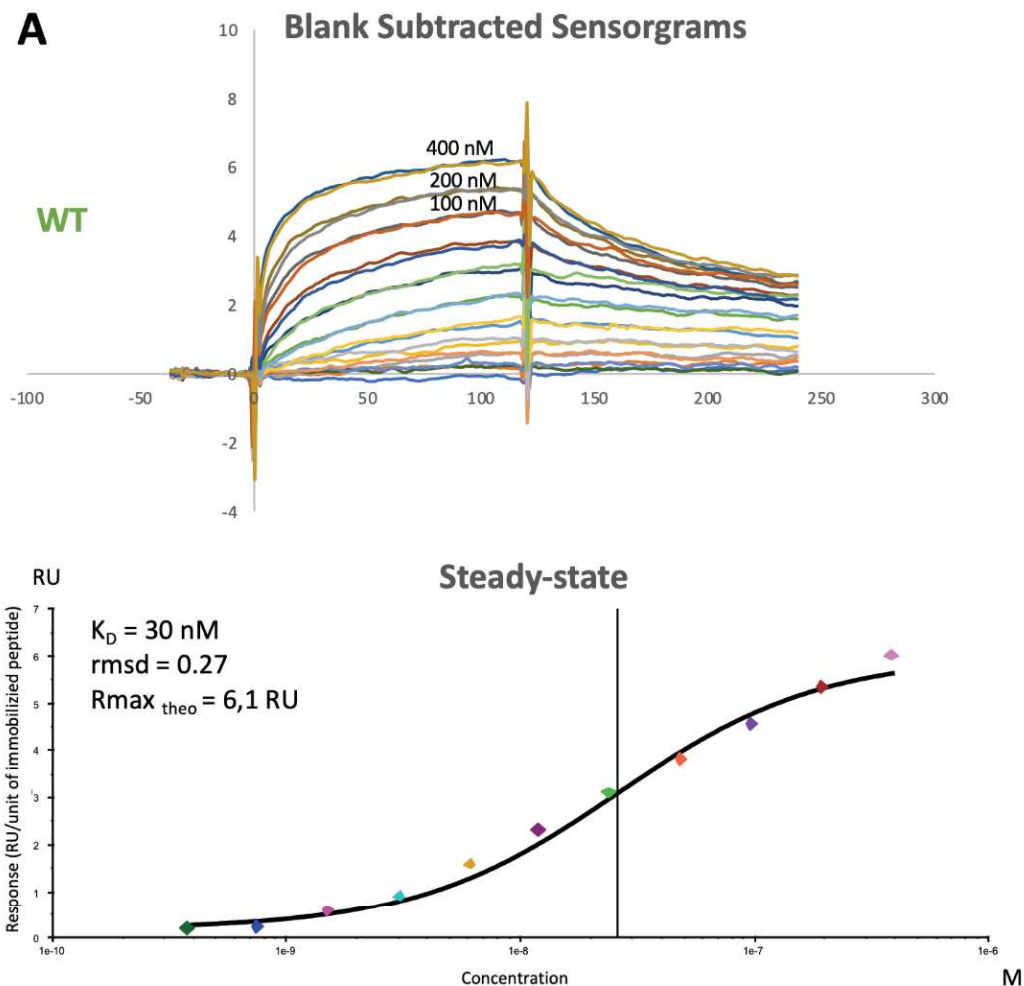
We previously have shown that the PPAR γ mutations F310S and H494Y are inactive mutations leading to enhanced corepressor interactions (Coutos-Thévenot et al., 2019). We used here biophysical methods to decipher how the F310S and H494Y mutations of PPAR γ promotes NCoR corepressor recruitment mediated by T0070907 inverse agonism. In addition, we report the crystal structure of PPAR γ LBD F310S mutant bound to an NCoR peptide and the T0070907 inverse agonist that reveals a new repressive conformation.

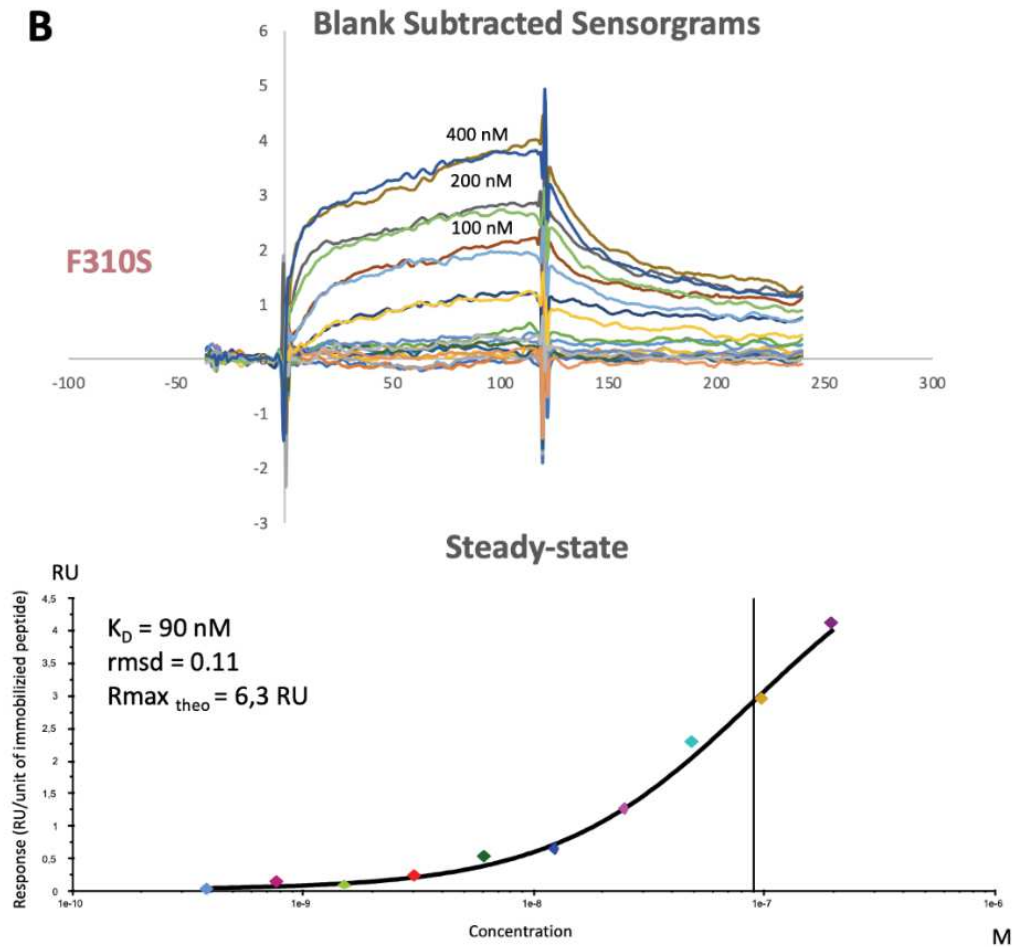
Results

Impact of the mutations on RXR interaction by Surface-Plasmon Resonance

Surface-plasmon resonance (SPR) experiments were done to study the impact of the loss-of-function mutation F310S on PPAR γ heterodimerization with RXR α , where the RXR α LBD domain, as a “ligand”, has been immobilized on the surface of the CM5 sensor chip. A characteristic SPR subtracted sensorgram corresponding to a complete experimental cycle for each protein is shown in **Figure 1** as well as the steady-state curves which make possible K_D estimations. Although in the same range, PPAR γ F310S mutant present a lower binding affinity to RXR α compared to the WT protein (**Figure 1A, 1B, Table 1C**). Indeed, the PPAR γ WT LBD

displays a K_D value of $0.03 \pm 0.00 \mu\text{M}$ for RXR α , while the PPAR γ F310S mutant binds to RXR α with a K_D of $0.09 \pm 0.01 \mu\text{M}$. Formation of all PPAR γ LBD WT-F310S/RXR α LBD complexes has been assessed by Native PAGE (**Supplementary Figure 1**). The quality criteria of the fit are described in **Supplementary table 1**.





C

SPR Parameters							
	Replicate	K_D (μM)	Mean (μM)	Standard deviation (μM)	RMSD (RU)	$R_{\max \text{ Fit}}$ (RU)	$R_{\max \text{ fit/theo}}$
WT	A	0,03	0,03	0,00	0,27	6,06	0,76
	B	0,03			0,22	5,83	0,73
F310S	A	0,09	0,08	0,01	0,11	5,82	0,73
	B	0,07			0,16	6,29	0,79

Figure 1: SPR-Biacore analysis of the interaction between RXR α LBD and PPAR γ LBD WT and loss-of-function mutant F310S. A: Sensorgram and steady-state curve for PPAR γ LBD WT binding to RXR α LBD ligand, B: Sensorgram and steady-state curve for PPAR γ LBD F310S inactivating mutant binding to RXR α LBD ligand, C: Summary table values of SPR parameters

*obtained for this protein-protein interaction study. $R_{max_{theo}}$ corresponds to the highest expected response for a 1:1 interaction ($R_{max_{theo}}=RU_{ligand} * MW_{analyte}/MW_{ligand}$) and $rmsd$ stands for root mean square deviation. These experiments were performed in duplicate. The corresponding K_D values is a first estimation.*

Loss-of-function F310S and H494Y mutations and their inverse agonist-mediated corepressor stabilization

We previously have shown that the inactivating mutants of PPAR γ LBD, F310S and H494Y, interact more strongly with SMRT and NCoR proteins than the PPAR γ LBD wild-type (WT). (Coutos-Thévenot et al., 2019). Structure-function studies of these variants allow us to identify structural elements that hinge their loss-of-function properties. We now investigated if the mutant proteins could bind the inverse agonist ligand, T0070907, and if the ligand could further stabilize the corepressor proteins as it is the case for the WT protein (Shang et al., 2020).

The purified PPAR γ LBD WT and mutants (**Supplementary Figure 1**) were analyzed by electrospray mass spectrometry. Monitoring the apo proteins (**Supplementary Figure 2**) by native electrospray ionization experiments confirm the absence of any unexpected bound ligand in apo protein conditions (**Supplementary Figure 3**). Once this had been verified, native electrospray ionization mass spectra were obtained in *apo* and *holo* conditions for PPAR γ WT, F310S and H494Y proteins (**Supplementary Figures 3-5**). The addition of 5-fold excess of NCoR corepressor peptide leads to complex formation for the WT and mutant proteins (**Supplementary Figure 4**). Both mutants are able to bind the T0070907 inverse agonist ligand (**Supplementary Figure 5**), however less efficiently than F310S with the observations of peaks corresponding to apo and liganded proteins, in contrast to H494Y or WT where fully liganded complexes are only observed. Addition of the NCoR peptide to the T0070907-liganded PPAR γ LBD WT and mutants (**Figure 2**) leads to the formation of the complexes for the three proteins.

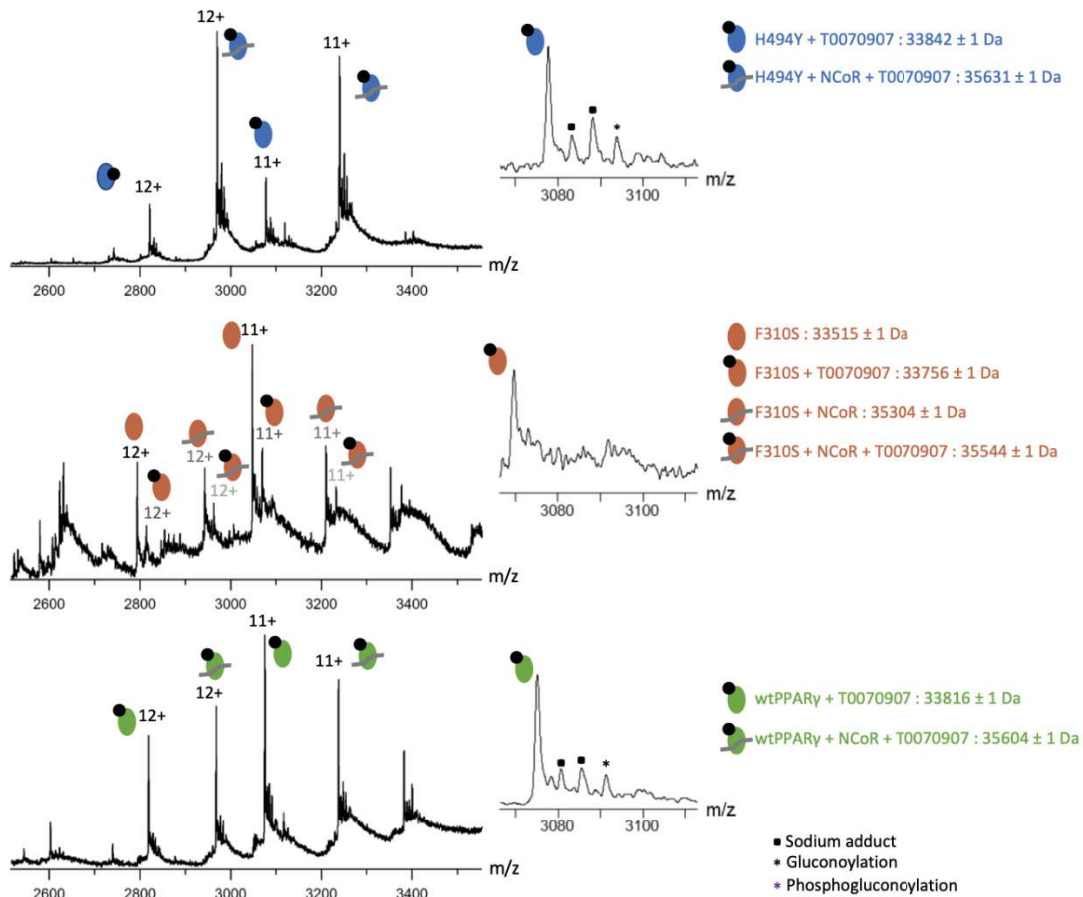
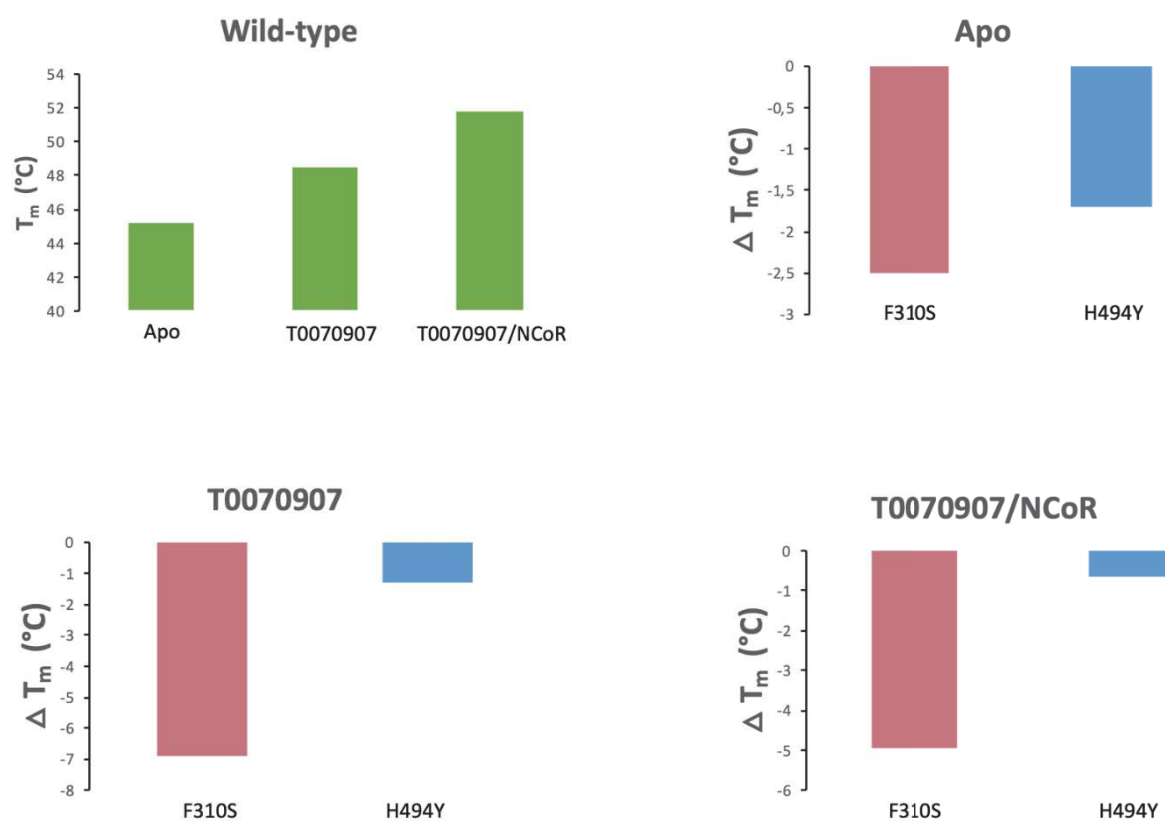


Figure 2: Native electrospray ionization mass spectra of PPAR γ LBD WT, F310S and H494Y. Mass spectra of the complexes obtained after addition of 5-fold excess of NCoR corepressor peptide and 1-fold excess of T0070907 inverse agonist ligand.

We next used *nano* differential scanning fluorimetry (*nano*DSF) to compare the thermal stability of the purified PPAR γ WT, F310S and H494Y mutants in the presence or absence of the corepressor NCoR, alone or upon 2-fold excess of the inverse agonist T0070907 binding (**Figure 3A**). The apo mutants exhibit a smaller melting temperature, T_m , (**Table 3B**) than the WT with a ΔT_m of 2.5 °C and of 1.7 °C for F310S and H494Y, respectively. Addition of T0070907 leads to a stabilization of PPAR γ WT and H494Y, in contrast to the F310S mutant that is not stabilized in agreement with the ESI MS data. Addition of NCoR peptide to T0070907-PPAR γ liganded proteins, leads to a strong stabilization with a ΔT_m of 3.9°C, 5.2°C and 3.2°C for the PPAR γ WT, F310S and H494Y, respectively. Similar effect was observed concerning T0070907-mediated stabilization of the SMRT peptide (**Data not shown**).

A



B

Condition	Protéine	T_m ($^{\circ}\text{C}$)
Apo	WT	45,2
	F310S	42,7
	H494Y	43,5
T0070907	WT	48,5
	F310S	41,6
	H494Y	47,2
T0070907/NCoR	WT	51,75
	F310S	46,8
	H494Y	51,1

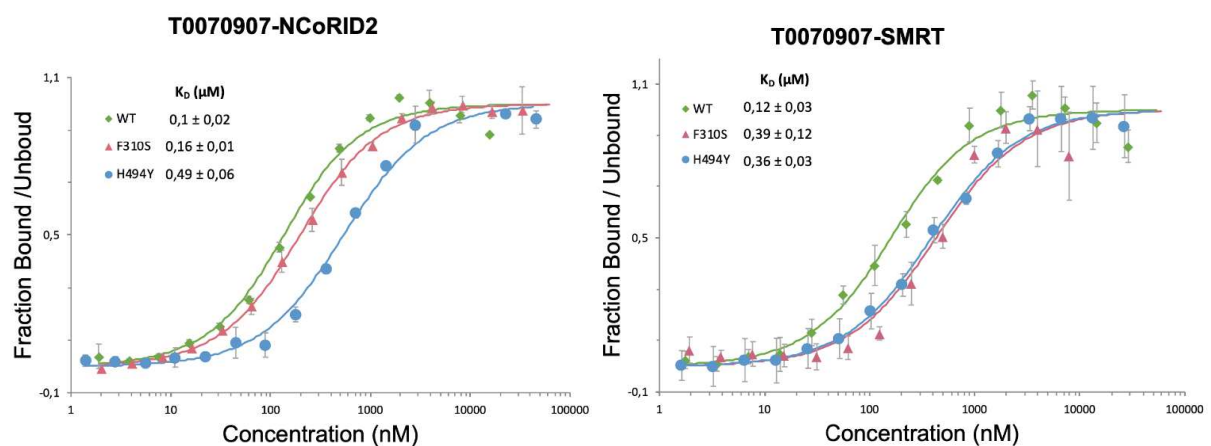
Figure 3: Nano Differential scanning fluorimetry comparing the thermal stability of the purified PPAR γ WT and inactivating mutants alone or upon binding to the inverse agonist T0070907 more or less NCoR corepressor peptide, **A:** Histograms comparing the ΔT_m ($^{\circ}\text{C}$) in different conditions, **B:** Summary values table of T_m ($^{\circ}\text{C}$).

Corepressors binding affinity upon inverse agonist presence by Microscale Thermophoresis (MST)

We next quantified the interaction between monomeric WT, F310S or H494Y mutated forms of the PPAR γ LBD and a fluorescent labeled NCoR or SMRT corepressor peptides by MicroScale Thermophoresis (MST) in the presence or not of the inverse agonist T0070907. Our previous study has shown two apo mutants exhibit an enhanced interactions with NCoR peptide compared to the WT protein and decreased interactions with PGC1 α coactivator peptide (Coutos-Thévenot et al., 2019). Addition of 3-fold excess of the rosiglitazone agonist ligand leads to the dissociation of the NCoR peptide by the WT protein (Figure 3), while the ligand has no or smaller effect on the two mutants, in agreement with a stronger affinity of the two mutants for the corepressor peptide. In the presence of the inverse agonist T0070907, for the WT and both mutant proteins, we note a significant increase of the affinity for the corepressor peptides NCoR and SMRT in agreement with the inverse agonism character of the ligand (Figure 4A and Table 4B).

Overall, these data suggest that these mutations impair the adoption of an agonist conformation by PPAR γ in the absence of ligand, and that this effect is even stronger with the addition of the inverse agonist T0070907 (Figure 4).

A



B

	Apo-NCOR K _D (μ M)*	Rosiglitazone- NCOR K _D (μ M)	T0070907-NCOR K _D (μ M)	T0070907- SMRT K _D (μ M)
WT	2,14 \pm 0,12	3,26 \pm 0,28	0,1 \pm 0,02	0,12 \pm 0,03
F310S	0,82 \pm 0,05	0,60 \pm 0,04	0,16 \pm 0,01	0,39 \pm 0,12
H494Y	1,05 \pm 0,06	1,32 \pm 0,11	0,49 \pm 0,06	0,36 \pm 0,03

Figure 4: Effect of PPAR γ F310S and H494Y mutations on corepressors interactions in the presence or not of an inverse agonist ligand, T0070907. A: Effect of PPAR γ mutations on the

NCOR1 and SMRT peptides interactions as determined by microscale thermophoresis.

*Unlabeled PPAR γ LBD proteins (WT, F310S and H494Y) were titrated into a fixed concentration of fluorescently labeled peptide in the absence and in the presence of an inverse agonist ligand (T0070907). Isotherms were averaged over three consecutive measurements and fitted according to the law of mass action to yield the apparent KD. Each plot is representative of at least two independent experiments performed with different batches of protein preparation. B: Summary table of apparent KD values for the studied conditions, * (Coutos-Thévenot et al., 2019).*

Structural analysis of PPAR γ LBD F310S in complex with T0070907 and NCoR peptide

For a better understanding of the impact of the PPAR γ F310S mutation on corepressor interaction, we solved the crystal structure of the ternary complex T0070907-bound PPAR γ LBD F310S mutant with a NCoR ID2 corepressor peptide.

The successful conditions for crystallization were obtained using PPAR γ F310S LBD at 8 mg/mL mixed with 3 molar equivalents of NCoR ID2 corepressor peptide and 2 molar equivalent of

the inverse agonist T0070907. The PPAR γ F310S mutant crystal belong to the space group $P2_12_12_1$ with the unit cell dimensions $a = 40.393 \text{ \AA}$, $b = 61.79 \text{ \AA}$, $c = 120.523 \text{ \AA}$ and diffracted at 1.86 \AA resolution. After molecular replacement, several rounds of refinement and manual model building, the PPAR γ F310S crystal structure was refined to R-work= 0.21 and R-free= 0.25. **Supplementary Table 2** summarizes the final data processing and refinement statistics. A single PPAR γ LBD forms the asymmetric unit of this crystal structure. The electron density was easily interpretable and a clear density in the 2fo-fc map for T0070907, is observed for the NCoR corepressor peptide as well as S310 mutated residue (**Supplementary Figure 6**).

The PPAR γ F310S LBD adopts the standard NR fold and consists of 12 alpha-helices and a four-stranded beta-sheet (**Figure 5A**). The PPAR γ mutant exhibit an inactive conformation with an extended Helix 12 (H12), a key regulatory structural element in the activation function 2 interacting with coregulators. The inactive conformation allows the corepressor peptide to efficiently bind to the receptor. The corepressor peptide NCoR ID2 adopts a helical conformation, binds along the mobile carboxy-terminal activation function 2 (AF-2) interaction surface, and mimics the extended corepressor consensus binding motif LxxlxxLL. The 2fo-fc density map allows us to build NCoR ID2 amino acid sequence: GLEDIIRKALMG (**Supplementary Figure 6B**). NCoR corepressor peptide binds to PPAR γ F310S LBD domain *via* hydrophobic interactions, as well as electrostatic interactions with N340 and K347 PPAR γ LBD mutant residues (**Supplementary Figure 7**), similarly to the WT structure (6ONI) from Shang *et al.*, (**Supplementary Figure 7A and B**).

PISA interface analysis leads to simulate free energy measurements: ΔG of -7,7 kcal/mol for the WT structure (6ONI) and -8,9 kcal/mol for the mutated PPAR F310S ternary complex, indicating similar corepressor interactions in the T0070907 liganded F310S and WT complexes. The mutated residue S310 located in the ligand binding pocket binds to T0070907 inverse agonist ligand (**Figure 5B**). The T0070907 binds to the open ligand pocket and is covalently bond to C313, in agreement with the known structures of PPAR γ LBD WT bound to T0070907 (Lee *et al.*, 2002), (Shang *et al.* 2020). The ligand is differentially positioned in the mutant structure (**Figure 6A, 6B and 6C**) compared to the WT structures (**Figure 6B and 6C**) as a consequence of a hydrogen bond with the mutated residue (**Figure 6A**) at 2.7 \AA . T0070907 forms hydrophobic interactions with F391 and I484 and maintained at this position by electrostatic interactions of Q311 and E488 (**Figure 6A**).

The differences in ligand positioning lead to different conformations for H11-H12 and the helix H3 compared to the inactive conformation (**Figure 7**). This inactive conformation of the T0070907-F310S differs from the T0070907-WT complex (**Figure 7**) as a consequence of a different ligand positioning.

In summary, the structure reveals a novel inactive antagonist conformation of the F310S LBD complex that is mediated by the mutation and the T0070907 ligand and plays a role in corepressor binding.

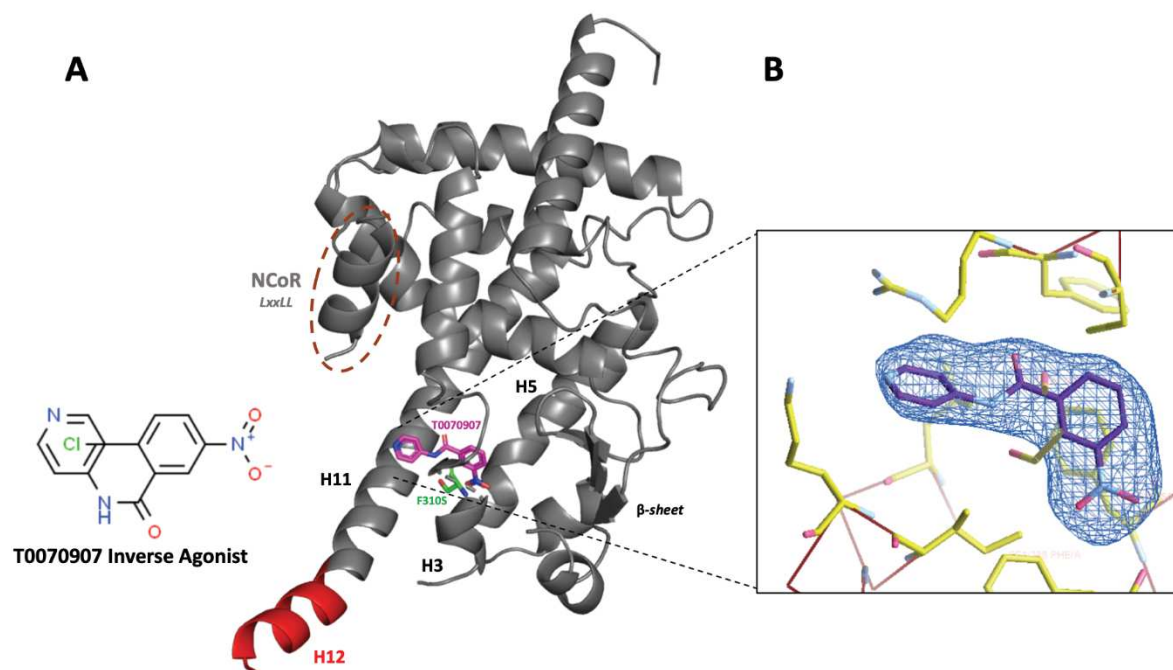


Figure 5: High resolution crystal structure of PPAR γ F310S LBD mutant complexed with NCoR corepressor peptide and T0070907 inverse agonist, A: PPAR γ F310S LBD 3D structure showing the mutated residue position as well as T0070907 inverse agonist in the ligand binding pocket, B: Ligand binding pocket zoom showing T0070907 modelled into the difference density of PPAR γ F310S LBD crystal structure. Unbiased omit Polder map contoured at 3σ .

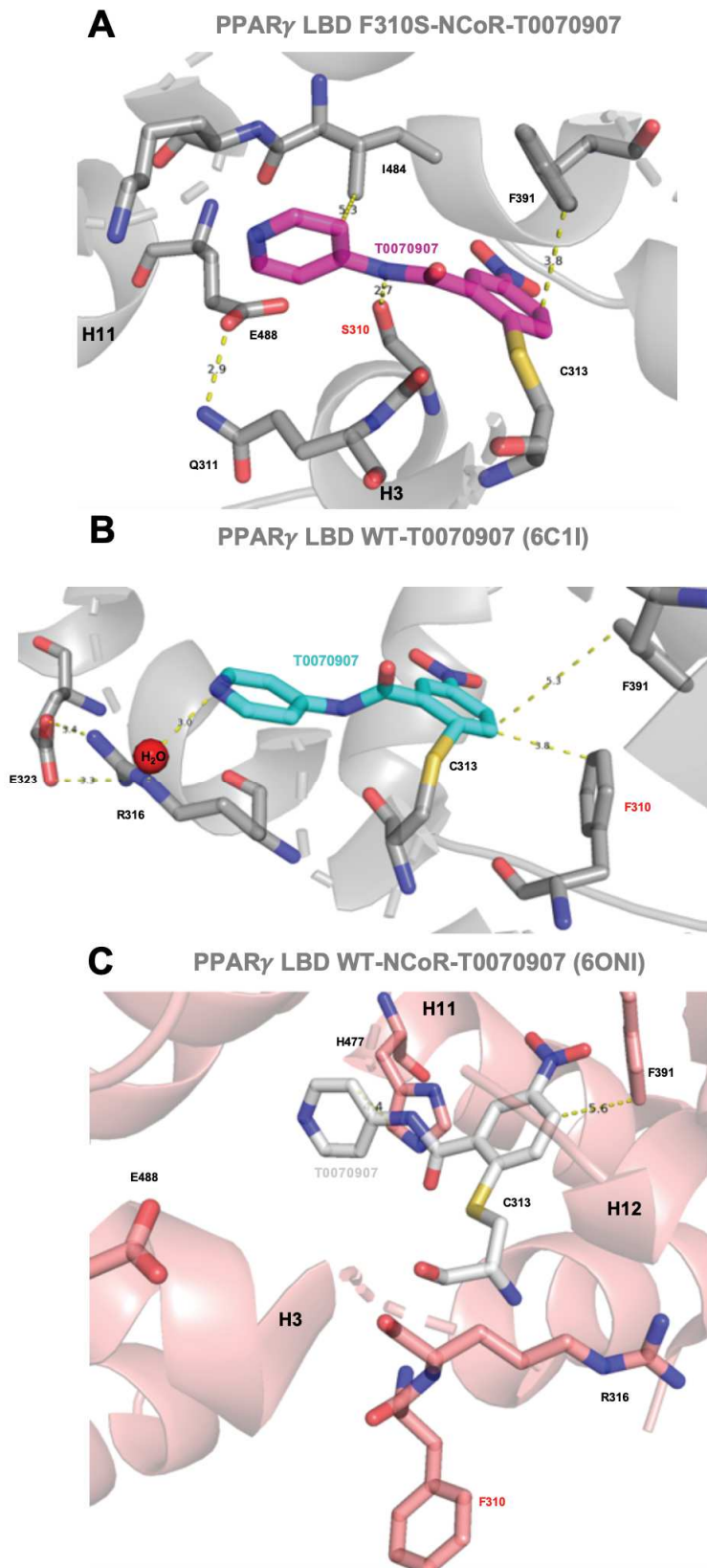


Figure 6: PPAR γ LBD F310S mutant and WT ligand binding pocket, A: PPAR LBD F310S mutant's ligand binding pocket, B: PPAR γ LBD WT-T0070907 ligand binding pocket (PDB: 6C1I), C: PPAR γ LBD WT-NCoR-T0070907 (PDB: 6ONI), (Shang et al., 2020).

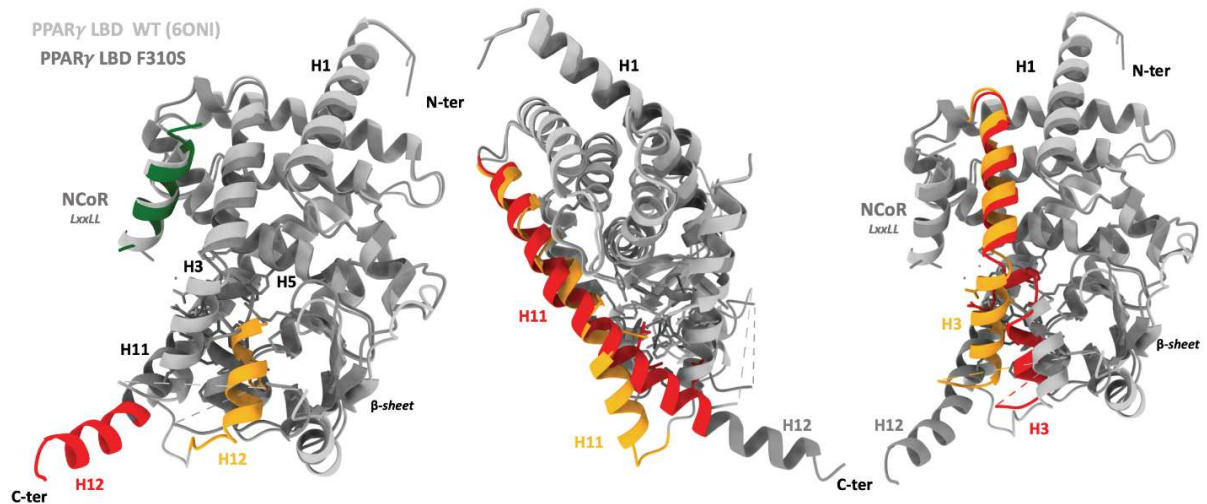


Figure 7: PPAR γ LBD WT (light grey) superimposed to PPAR γ LBD F310S mutant (dark grey) showing two different repressive conformations and conformational changes between both structures, ChimeraX (Goddard et al., 2018), PPAR γ LBD F310S mutant conformational changes (Red), compare to PPAR γ LBD WT LBD structure (PDB ID: 6ONI) (Orange), NCoR corepressor peptide is illustrated in green (F310S structure) and light grey (6ONI), (Shang et al., 2020).

Discussion

Previous studies have already suggested a tumor suppressor role of PPAR γ in bladder cancers, involving a down-regulation of the transcriptional activity of target genes. In this study, we described loss-of-function mutations located in PPAR γ ligand-binding domain, identified in basal bladder tumors (F310S and H494Y). Strong genetic evidences supporting this tumor suppressive role were already described in our previous study (Coutos-Thévenot et al., 2019). We report biochemical and biophysical data on the impact of the mutations on corepressor interactions mediated by the inverse agonist T0070907. These mutations enhance NCoR binding and addition of T0070907 further stabilize the interactions.

Few studies have explored structural mechanisms by which some ligands repress PPAR γ transcription, and it remains still poorly understood. We determine the crystal structure of the F310S mutant in complex with T0070907 inverse agonist and NCoR peptide that allows us to explain how this binding is affected.

Helix 12 located at the carboxyl-terminal end of the protein is a key regulatory structural element and forms part of the transcriptional activation function (AF-2) region (Ohashi et al., 2015), that interact with coregulators such as NCoR through its consensus motif LxxlxxLL. Indeed, the AF-2 surface is composed of three structural elements : helix 3, helix 5 and the critical helix 12 that moves between few conformations in the absence of ligand (Hughes et al., 2012). The F310S –T0070907-NCoR structure reveals a new inactive conformation where H12 is extended as a consequence of ligand binding and of the mutation, that allows the corepressor to bind efficiently.

T0070907 was originally defined as antagonist because of its covalent attachment to C313 within the orthosteric ligand-binding pocket and physically block others ligands to bind to PPAR γ such as rosiglitazone, a noncovalent agonist from binding and activating PPAR γ (Lee et al., 2002). It is also demonstrated that T0070907 represses PPAR γ transcription (Brust et al., 2017). As a potent inverse agonist, T0070907 increased the binding of the peptide derived from NCoR to the PPAR γ LBD, and increased also the binding of full-length NCoR to full-length PPAR γ /RXR α heterodimer (Brust et al., 2018). In the PPAR γ WT T0070907-NCoR (Shang et al., 2020), H12 occupies the ligand-binding pocket and is inserted into the pocket, resulting in a shift in helix 2b and β -strand from the known active conformation. The 3D structure of the

F310S mutant complex shows a different positioning of T0070907 in the ligand binding pocket, modulated by new interactions, especially with Ser310 mutated residue. Indeed, T0070907 is maintained into the pocket by the S310 mutated residue, by C313 and by electrostatic (Q311 and E488) and hydrophobic interactions, that involved other residues such as I484 and F391. These differences leads to a extended inactive H12 conformation.

In summary these data demonstrate how the mutation stabilizes the inactive conformation of PPAR γ that renders accessible the binding surface for corepressor. A better knowledge of the structure-function effects of the inactivating mutations could guide to design new potent synthetic molecules to propose alternative and more specific therapeutic strategies to target this PPAR γ pathway.

Methods

Materials and chemicals

T0070907 was purchased from Tocris Bioscience. The fluorescent NCoR ID2 peptide (2260-NLGLIEDIIRKALMG-2273) was purchased from Thermo-Fisher. The NCoR ID2 peptide (2258-ASNLGLIEDIIRKALMG-2274) was synthesized by Pascal Eberling (IGBMC peptide synthesis common facility), as well as the SMRT ID2 peptide (ASTNMGLEAIIRKALMGKYD).

Biochemistry

The sequences encoding the ligand-binding domains of the His-hPPAR γ (231–505) (WT F310S and H494Y mutants) were inserted into pET15b plasmid. The corresponding proteins were produced in *Escherichia coli* BL21 DE3 by 4 hours incubation at 22 °C after induction with 1 mM IPTG at an OD600 of ~0.8. Soluble proteins were purified by Ni-NTA chromatography followed by size exclusion chromatography on a Superdex 200 10/300 (GE) column equilibrated in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 5 % glycerol, and 1 mM TCEP. The proteins were concentrated to 4-5 mg/mL with an Amicon Ultra 10 kD MWCO. Purity and homogeneity of all proteins were assessed by SDS-PAGE gels and for PPAR proteins by denaturing and native electrospray ionization mass spectrometry.

Surface-Plasmon Resonance (SPR)

SPR measurements were performed on a Biacore T200 instrument using CM5 sensor chip (Cytiva) at 25 °C. (The instrument is equipped with 4 flow cells that can be used in series). Purified RXR α LBD (ligand) diluted in 10 mM sodium acetate buffer pH 4.5, was covalently immobilized on the sensor chip with EDC-NHS using standard protocol after several conditioning steps. PPAR γ LBD WT and F310S mutant were injected onto the chip at 12 two-fold dilutions and with two additional replicates in Biacore buffer, i.e. 20 mM HEPES, pH 8, containing 200 mM NaCl, 5 % glycerol, and 0.005 % P-20 (v/v) (Cytiva). These analytes were injected on the four channels at flow 30 μ L/min for 120 s (association), followed by 120 s dissociation phase. The surface regeneration was achieved by injecting 1 M NaCl during 60 s at flow 30 μ L/min. The signal variation corresponding to the binding of the analyte to the

immobilized ligand was measured in real time and expressed in Resonance Units (RU). The reference-subtracted curves were used for K_D estimation.

For each concentration, the signal at equilibrium was extracted based on a 5-second window. Dissociation constants were estimated from steady-state analysis, which was performed assuming a simple 1:1 interaction binding isotherm model.

Thermal unfolding: nanoDifferential Scanning Fluorimetry

Fluorescence based thermal experiments were performed using Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies, Germany) with standard capillaries containing 10 μ L PPAR γ WT or mutant at 4-5 mg/mL. The temperature was increased by a rate of 1 $^{\circ}$ C/min from 20 to 95 $^{\circ}$ C and the fluorescence at emission wavelengths of 330 nm and 350 nm was measured. NanoTemper PR.Stability Analysis v1.0.2 was used to fit the data and to determine the melting temperatures T_m . Purified proteins were mixed with 3 molar equivalents of NCoR ID2 or SMRT corepressor peptides and 2 molar equivalent of the inverse agonist T0070907.

Microscale thermophoresis

Measurements were performed with a Monolith NT.115 instrument (NanoTemper Technologies GmbH, Munchen, Germany). The PPAR γ complexes were prepared in 20 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM TCEP, 0.05 % Tween 20. Each measurement consists of 16 reaction mixtures where the fluorescent-labeled peptide concentration was constant (140 nM) and serial dilutions of PPAR γ LBD from a concentration of 100 μ M down to 2 nM. Measurements were made with standard glass capillaries (Nanotemper) at 25 $^{\circ}$ C, at 40 % LED excitation and 80 % MST power, with a laser-on time of 30 s and a laser-off time of 5 s. NanoTemper Analysis 2.2.4 software was used to fit the data and to determine the K_D .

Native and denaturing Mass spectrometry analysis

Prior to mass spectrometry analysis, PPAR γ and all the different mutant proteins (F310S and H494Y) were buffer exchanged against 200 mM of ammonium acetate at pH 6.9, using two desalting cycles (Zeba Spin Desalting Columns, 7K MWCO, Thermo Scientific). All the samples were diluted either in H₂O/ACN/HCOOH (denaturing MS conditions) to a final concentration of 5 μ M or in 200 mM AcONH₄ (native MS conditions) to a final concentration of 10 μ M. NCoR

corepressor peptide and T0070907 inverse agonist ligand were added in 1- and 5-fold excess, respectively. The samples were infused with an automated chip based nanoelectrospray device (Triversa Nanomate, Advion Bioscience, Ithaca, USA) operating in the positive ion mode, coupled to a Synapt G2 HDMS mass spectrometer (Waters, Manchester, UK). Under denaturing mass spectrometry conditions, the backing pressure and the cone voltage of the mass spectrometer were set to 2.3 mbar and 40 V, respectively. For native mass spectrometry analysis, the cone voltage and the backing pressure of the mass spectrometer were set to 40 V and 6 mbar, respectively, in order to improve the transmission of the “native-like” molecular ions and avoiding ion heating. Ions were analysed within the time of flight analyser under high vacuum conditions (6.3×10^{-7} mbar) in order to ensure highly accurate mass measurements. Mass spectra recorded with Synapt G2 platform were analysed with MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK).

Crystallization, data collection, and structure refinement

Crystallization trials were performed with either apo protein or with the protein in complex with two-fold excess of T0070907 and threefold excess of NCoR ID2 peptide. The crystallization experiments were performed by sitting drop vapor diffusion at 290 K, mixing equal volumes (200 nL) of protein at 8 mg/ml and reservoir solution. For the crystal structure, the data were indexed and integrated with XDS (Kabsch, 2010b), and scaled with AIMLESS (Evans, 2006b) (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994) The structure of PPAR γ 2 LBD F310S mutant in complex with the synthetic antagonist ligand T0070907 and NcorID2 peptide was solved by molecular replacement in PHASER (McCoy et al., 2005b) and refined with PHENIX (Adams et al., 2010b) with TLS refinement, followed by iterative model building in COOT. Indeed, the programs PHENIX and COOT were used to alternately run cycles of refinement and model building (Emsley and Cowtan, 2004b). Crystal of PPAR γ F310S-T0070907-NcorID2 was grown in 0.2 M ammonium acetate, 0.1 M PIPES pH 7, 26 % PEG 5000, transferred to artificial mother liquor containing 15 % PEG 400 and flash-cooled in liquid nitrogen. X-ray diffraction data were collected at PX1 beamline of the SOLEIL synchrotron with a wavelength of 0.979 Å. The final structure was refined to R-work and R-free values of 0.21 and 0.25, respectively, with excellent geometry (98.47 % of residues in favored region of the Ramachandran plot, 1.53 % in the allowed region, and 0 % outliers). The electron density was

easily interpretable and the 2fo- σ map where the NCoR corepressor peptide was built allows us to build this amino acid sequence: GLEDIIRKALMG.

Data collection and refinement statistics are provided in **Supplementary Table 2**. All structural figures were prepared with PyMOL (www.pymol.org/) and ChimeraX.

References

Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.-W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., et al. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 213–221.

Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . 375, 6.

Brust, R., Lin, H., Fuhrmann, J., Asteian, A., Kamenecka, T.M., and Kojetin, D.J. (2017). Modification of the Orthosteric PPAR γ Covalent Antagonist Scaffold Yields an Improved Dual-Site Allosteric Inhibitor. *ACS Chem. Biol.* 12, 969–978.

Brust, R., Shang, J., Fuhrmann, J., Bass, J., Cano, A., Heidari, Z., Chrisman, I.M., Blayo, A.-L., Griffin, R.P., Kamenecka, T.M., et al. (2018). A structural mechanism for directing inverse agonism of PPAR γ (Biochemistry).

Choi, J.H., Banks, A.S., Kamenecka, T.M., Busby, S.A., Chalmers, M.J., Kumar, N., Kuruvilla, D.S., Shin, Y., He, Y., Bruning, J.B., et al. (2011). Antidiabetic actions of a non-agonist PPAR γ ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation. *Nature* 477, 477–481.

Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 50, 760–763.

Coutos-Thévenot, L., Beji, S., Neyret-Kahn, H., Pippo, Q., Fontugne, J., Osz, J., Krucker, C., Groeneveld, C.D.S., Dufour, F., Kamoun, A., et al. (2019). PPAR γ is a tumor suppressor in basal bladder tumors offering new potential therapeutic opportunities.

Eberhardt, J., McEwen, A.G., Bourguet, W., Moras, D., and Dejaegere, A. (2019). A revisited version of the apo structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor retinoic X receptor α . *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* 75, 98–104.

Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot : model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132.

- Evans, P. (2006). Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62, 72–82.
- Fajas, L., Fruchart, J.-C., and Auwerx, J. (1998). PPARQ3 mRNA: a distinct PPARQ mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* 6.
- Gallastegui, N., Mackinnon, J.A.G., Fletterick, R.J., and Estébanez-Perpiñá, E. (2015). Advances in our structural understanding of orphan nuclear receptors. *Trends Biochem. Sci.* 40, 25–35.
- Goddard, T.D., Huang, C.C., Meng, E.C., Pettersen, E.F., Couch, G.S., Morris, J.H., and Ferrin, T.E. (2018). UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis: UCSF ChimeraX Visualization System. *Protein Sci.* 27, 14–25.
- Goldstein, J.T., Berger, A.C., Shih, J., Duke, F.F., Furst, L., Kwiatkowski, D.J., Cherniack, A.D., Meyerson, M., and Strathdee, C.A. (2017). Genomic Activation of PPAR γ Reveals a Candidate Therapeutic Axis in Bladder Cancer. *Cancer Res.* 77, 6987–6998.
- Hughes, T.S., Chalmers, M.J., Novick, S., Kuruvilla, D.S., Chang, M.R., Kamenecka, T.M., Rance, M., Johnson, B.A., Burris, T.P., Griffin, P.R., et al. (2012). Ligand and Receptor Dynamics Contribute to the Mechanism of Graded PPAR γ Agonism. *Structure* 20, 139–150.
- Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 125–132.
- Kroger, A.J., and Bruning, J.B. (2015). Review of the Structural and Dynamic Mechanisms of PPAR γ Partial Agonism. *PPAR Res.* 2015, 1–15.
- Lee, G., Elwood, F., McNally, J., Weiszmann, J., Lindstrom, M., Amaral, K., Nakamura, M., Miao, S., Cao, P., Learned, R.M., et al. (2002). T0070907, a Selective Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ , Functions as an Antagonist of Biochemical and Cellular Activities. *J. Biol. Chem.* 277, 19649–19657.
- Marciano, D.P., Kuruvilla, D.S., Boregowda, S.V., Asteian, A., Hughes, T.S., Garcia-Ordóñez, R., Corzo, C.A., Khan, T.M., Novick, S.J., Park, H., et al. (2015). Pharmacological repression of PPAR γ promotes osteogenesis. *Nat. Commun.* 6, 7443.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2005). Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 61, 458–464.
- Ohashi, M., Gamo, K., Oyama, T., and Miyachi, H. (2015). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) has multiple binding points that accommodate ligands in various conformations: Structurally similar PPAR γ partial agonists bind to PPAR γ LBD in different conformations. *Bioorg Med Chem Lett* 5.
- Peters, J.M., Shah, Y.M., and Gonzalez, F.J. (2012). The role of peroxisome proliferator-

activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat. Rev. Cancer* 12, 181–195.

Rochel, N., Krucker, C., Coutos-Thévenot, L., Osz, J., Zhang, R., Guyon, E., Zita, W., Vanthong, S., Hernandez, O.A., Bourguet, M., et al. (2019). Recurrent activating mutations of PPAR γ associated with luminal bladder tumors. *Nat. Commun.* 10.

Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2001). PPAR γ : a Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth. *J. Biol. Chem.* 276, 37731–37734.

Shang, J., Mosure, S.A., Zheng, J., Brust, R., Bass, J., Nichols, A., Solt, L.A., Griffin, P.R., and Kojetin, D.J. (2020). A molecular switch regulating transcriptional repression and activation of PPAR γ . *Nat. Commun.* 11, 956.

Varley, C.L. (2004). Role of PPAR and EGFR signalling in the urothelial terminal differentiation programme. *J. Cell Sci.* 117, 2029–2036.

Wang, T., Xu, J., Yu, X., Yang, R., and Han, Z. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor γ in malignant diseases. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 58, 1–14.

Wurtz, J.-M., Bourguet, W., Renaud, J.-P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., and Gronemeyer, H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat. Struct. Biol.* 3, 87–94.

Data availability

Atomic coordinates and related structure factors have been deposited in the Protein Data Bank with accession code: XXXX.

Acknowledgements

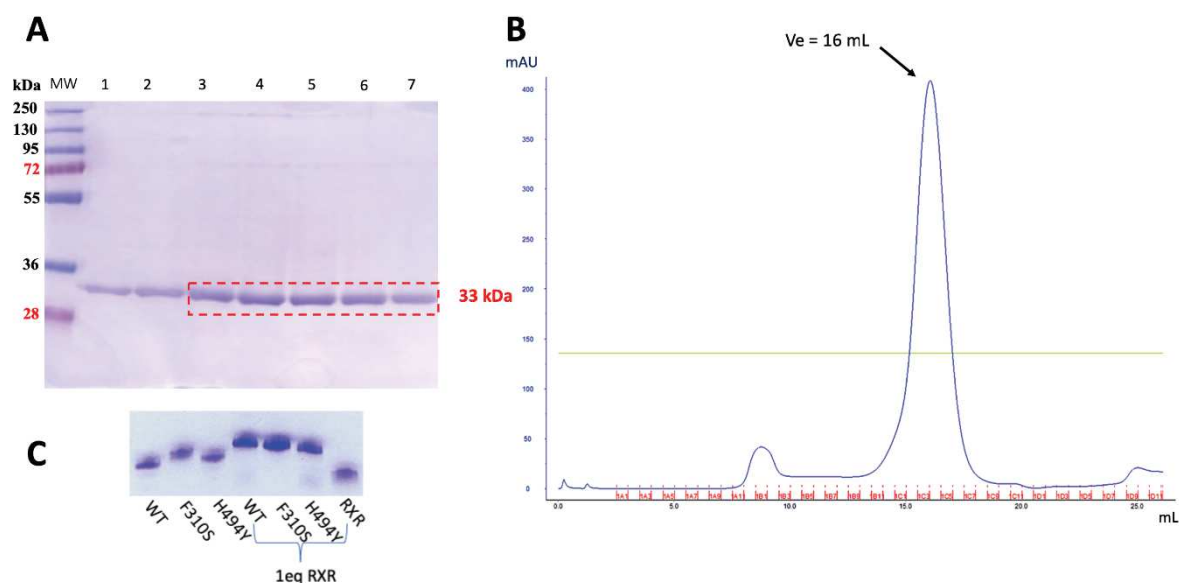
This work was supported by a grant from INCa (2016–146), the Ligue Régionale Grand-Est Contre le Cancer, the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the University of Strasbourg. We acknowledge ANR-10-LABX-0030-INRT under the frame program Investissements d’Avenir labelled ANR-10-IDEX-0002-02ANR and the support and the use of resources of the French Infrastructure for Integrated Structural Biology FRISBI ANR-10-INBS-05, the Instruct-ERIC and the French

Proteomic Infrastructure ProFI ANR-10-INBS-08–03. We would like to thank the staff of Proxima 1 at SOLEIL as well as of ID30A3 at ESRF for assistance in using the beamlines. We thank Thierry Lerouge (Molecular Biology Service IGBMC) for the cloning.

Author contributions

N.R. and S.B. designed the study. N.R applied for funding acquisition. S.B and Q.P performed the biochemical, and biophysical studies. S.B and N.R. performed the structural studies and analyzed the biophysical and structural data. M.L. performed the mass spectrometry experiments, M.L. and S.C. analyzed the mass spectrometry data. S.B and N.R wrote the manuscript. All authors made comments on the manuscript.

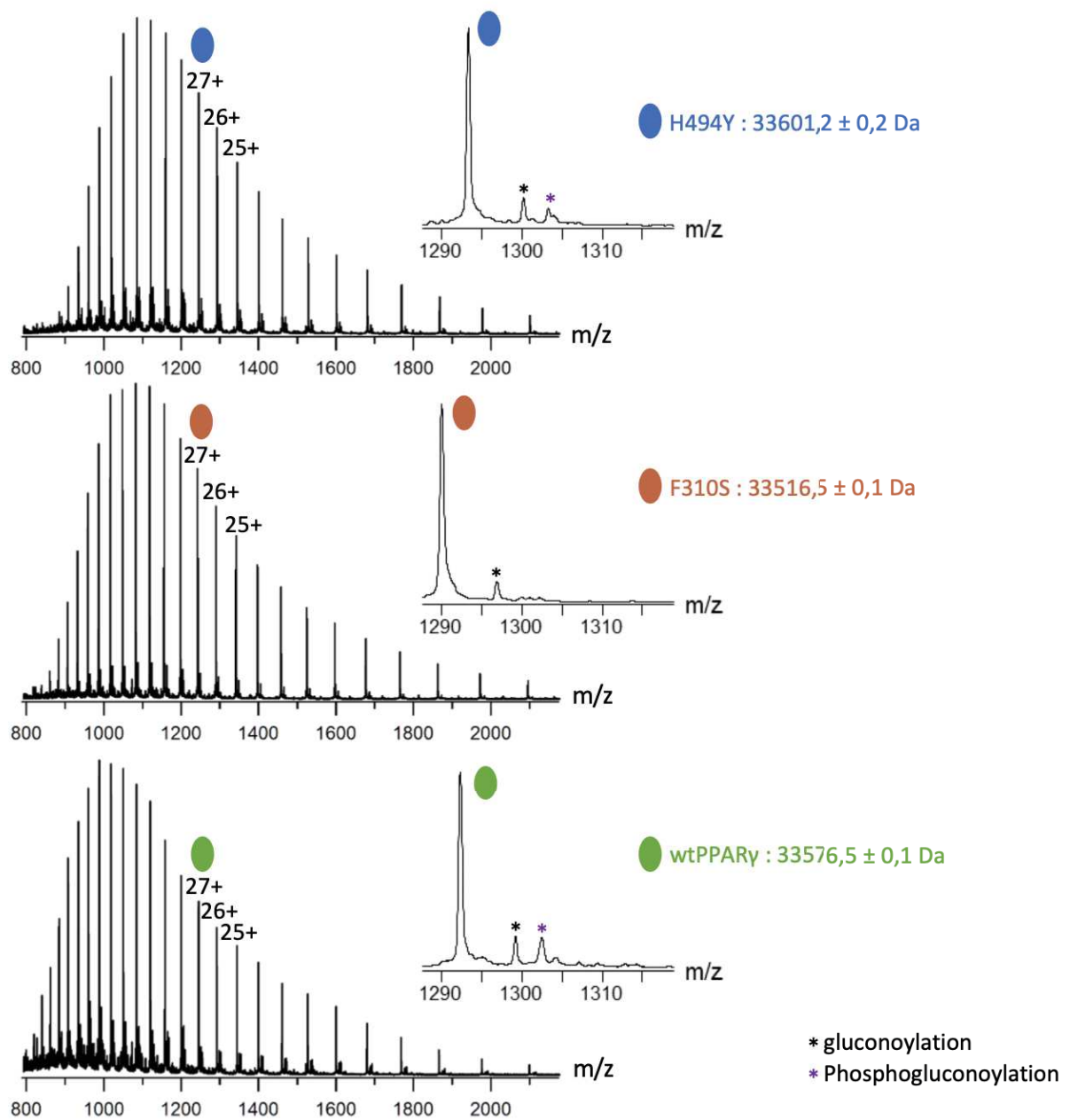
Supplementary data



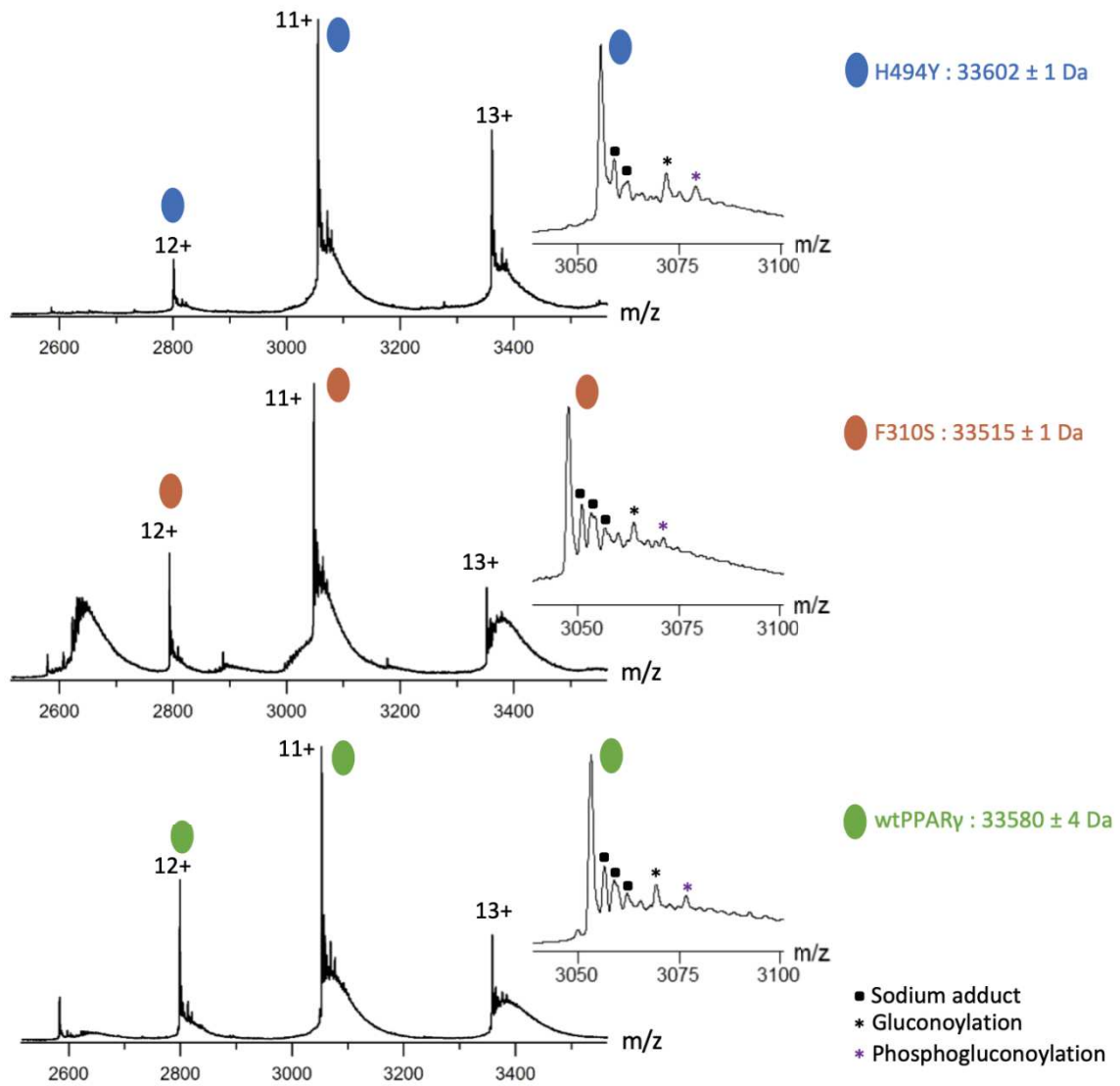
Supplementary figure 1: PPAR γ F310S LBD purified protein **A:** Denaturing SDS-PAGE 12.5 % where lane 1 to 7 correspond to F310S fractions after size exclusion chromatography step, showing F310S homogeneity and purity, **B:** F310S Chromatogram after SEC chromatography step, **C:** Native gel showing PPAR γ LBD WT (lane 1), F310S (lane 2), H494Y (lane 3), PPAR γ WT with 1 equivalent of RXR α WT (lane 4), F310S mutant with 1 equivalent of RXR α WT (lane 5), H494Y mutant with 1 equivalent of RXR α WT (lane 6), and monomeric RXR α WT (lane 7).

Quality criteria of the fit					
	Replicate	K_D (μ M)	R_{max} (RU)	Offset (RU)	Chi^2 (RU 2)
WT	A	2,61E-02	6,1	0,1973	0,0701
	B	2,61E-02	5,8	0,1708	0,0504
F310S	A	9,07E-02	5,8	0,01894	0,0116
	B	7,03E-02	6,3	-0,06033	0,0244

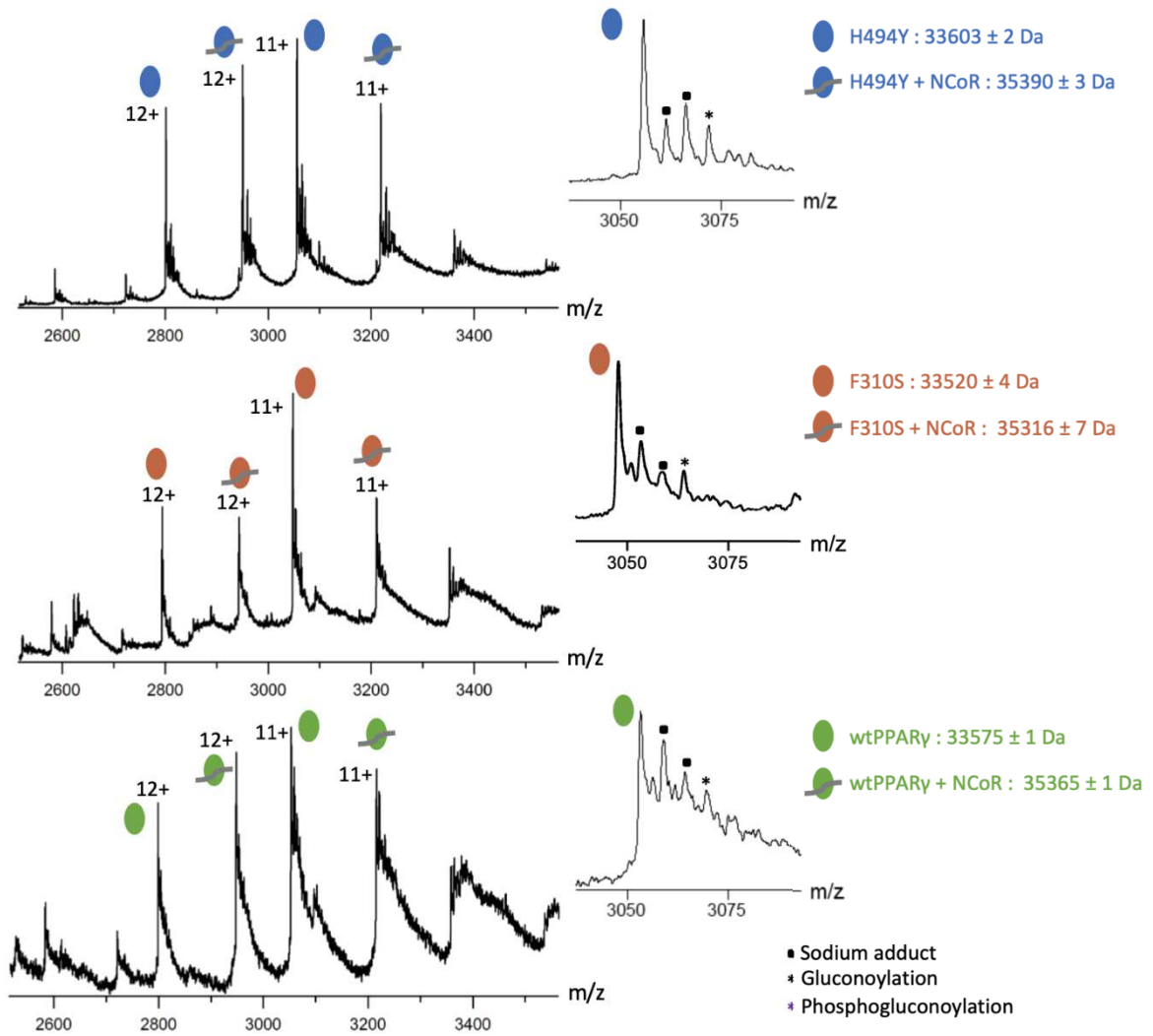
Supplementary Table 1: Surface Plasmon Resonance quality criteria of the fits, SPR measurements for PPAR γ WT and F310S mutant, all measurements were done in duplicate.



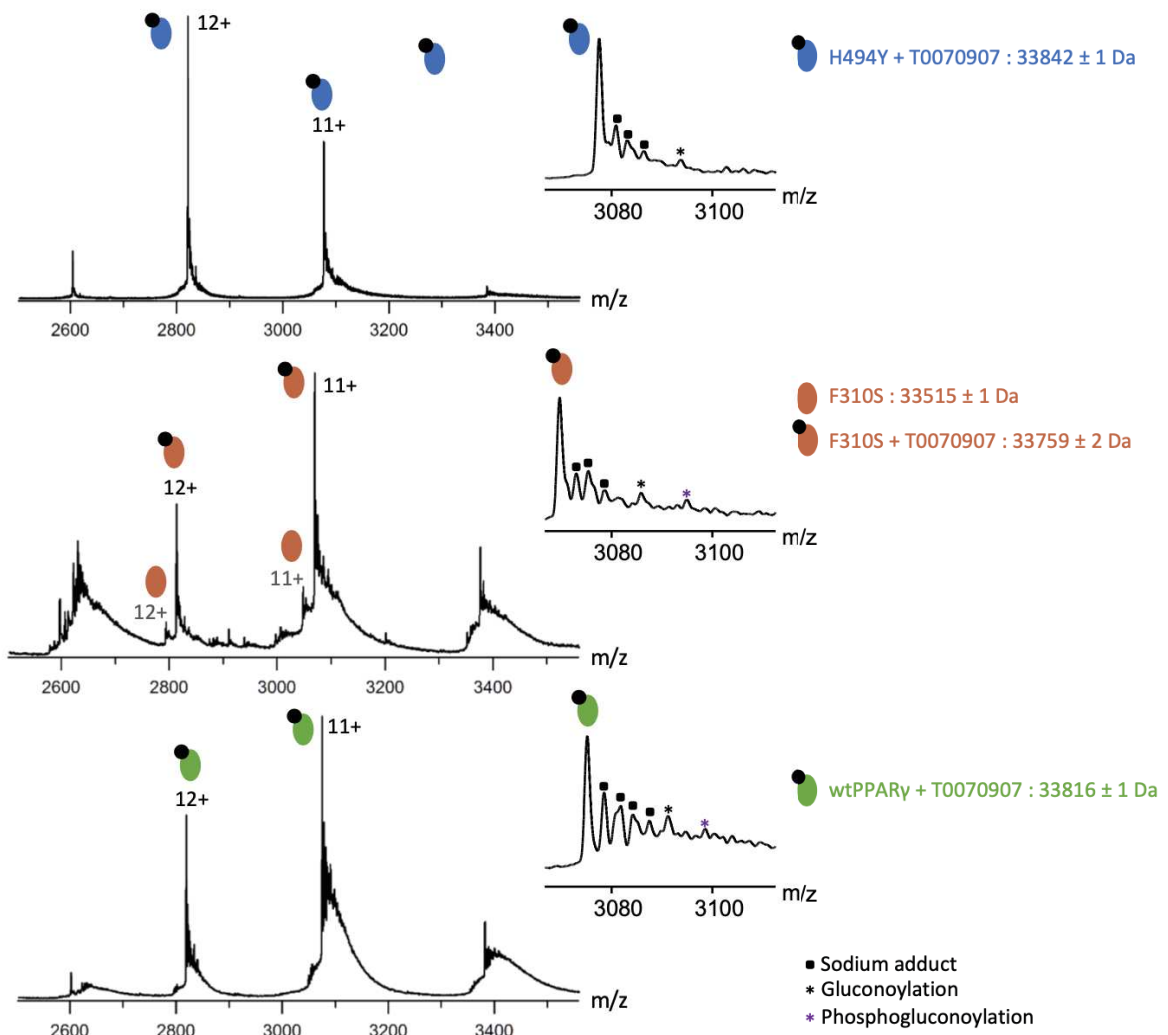
Supplementary figure 2: Denaturing mass spectra of PPAR γ LBD WT, F310S and H494Y. The experimental measured masses of the proteins are depicted.



Supplementary figure 3: Native electrospray ionization mass spectra of PPAR γ LBD WT, F310S and H494Y. Mass spectra of apo condition indicating the absence of any unexpected bound ligand in apo proteins.



Supplementary figure 4: Native electrospray ionization mass spectra of PPAR γ LBD WT, F310S and H494Y. Mass spectra of the complexes obtained after addition of 5-fold excess of NCoR corepressor peptide.

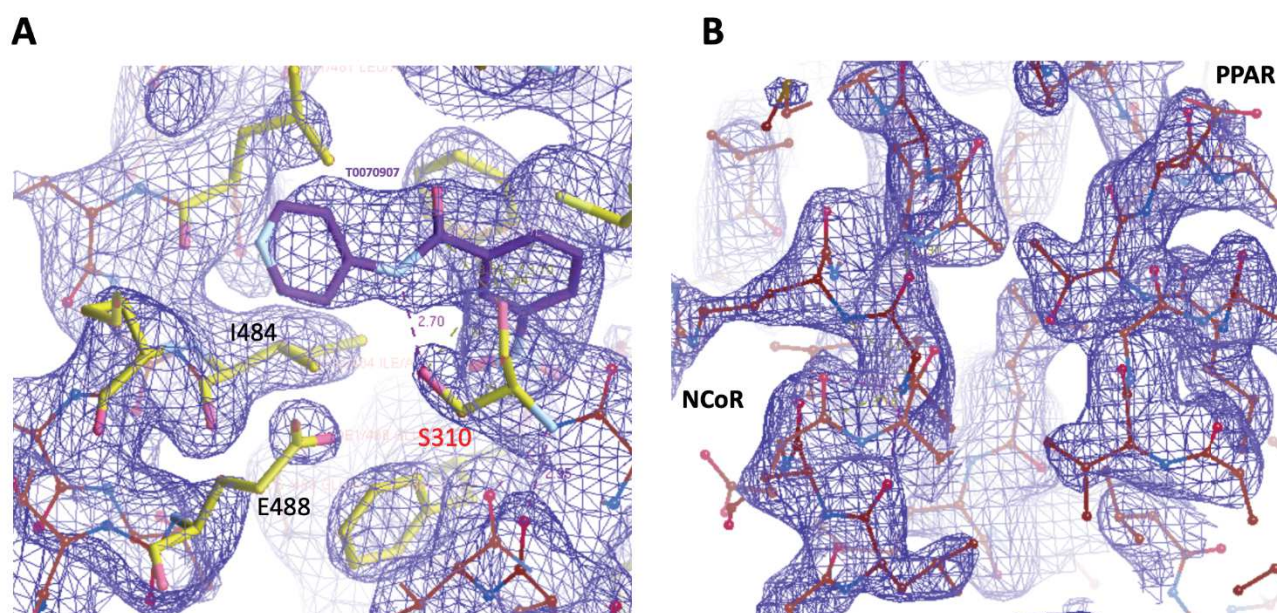


Supplementary figure 5: Native electrospray ionization mass spectra of PPAR γ LBD WT, F310S and H494Y. Mass spectra of the complexes obtained after addition of 1-fold excess of T0070907 inverse agonist ligand.

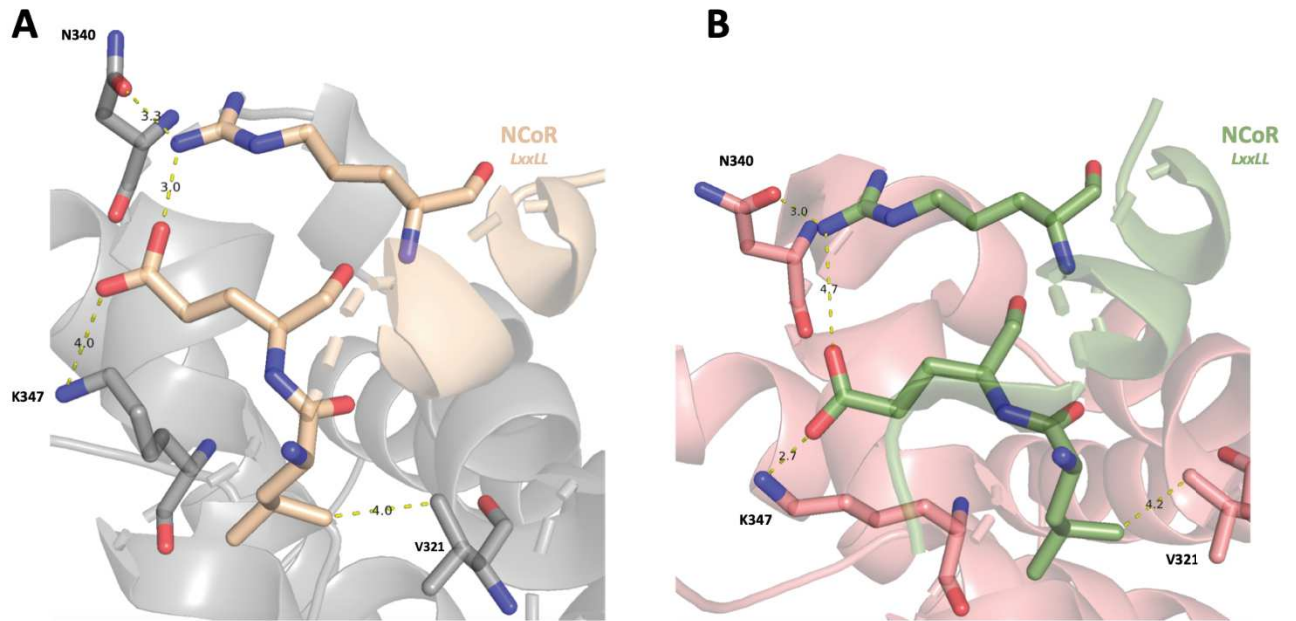
Data collection	T0070907-NCoR peptide-F310S PPAR γ LBD
Source	
Detector	
Wavelength (Å)	0.98013
Resolution (Å)	54.98 - 1.86 (1.92 - 1.86)
Space group	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Cell dimensions	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	40.39, 61.79, 120.52
α , β , γ (°)	90, 90, 90
Total reflections	398080(576)
Unique reflections	19904 (288)
Multiplicity	2 (2)
Completeness (%)	75.72 (11.16)
Mean I/sigma(I)	15.59 (0.81)
Wilson B-factor	44.28
R-meas	0.017(1.12)
R-pim	0.012 (0.796)
CC1/2	1 (0.389)
CC*	1 (0.748)
Anisotropic truncation	
Ellipsoidal resolution (Å) (direction)	2.53 (a*)
	2.53 (0.998 a* + 0.062 c*)
	1.856 (0.579 b* + 0.815 c*)
Best / worst diffraction limits (Å)	1.86 (1.98 1.86) / 2.52
Unique reflections (ellipsoidal)	19960 (998)
Mean I/sigma(I) (ellipsoidal)	14.7 (0.91)
R-meas (ellipsoidal)	0.079 (3.636)
R-pim (ellipsoidal)	0.022 (0.983)
CC1/2 (ellipsoidal)	0.999 (0.346)
Ellipsoidal completeness (%)	93.2 (61.2)
Refinement	
Reflections used in refinement	19902 (288)
Reflections used for R-free	973 (18)
R-work	0.211 (0.393)
R-free	0.252 (0.377)
CC (work)	0.991 (0.526)
CC (free)	0.93 (0.487)
Number of non-hydrogen atoms	2272
Macromolecules	2177

Ligands	20
Solvent	75
Protein residues	269
RMS (bonds)	0.008
RMS (angles)	1
Ramachandran favored (%)	98.47
Ramachandran allowed (%)	1.53
Ramachandran outliers (%)	0
Rotamer outliers (%)	0.41
Clashscore	7.83
Average B-factor	64.97
Macromolecules	65.16
Ligands	79.74
Solvent	55.30

Supplementary table 2: Crystallographic data and refinement



Supplementary figure 6: 2Fo-Fc map contoured at 1 σ of **A:** T0070907 inverse agonist and **B:** NCoR corepressor peptide in PPAR γ LBD F310S mutant crystal structure.



Supplementary figure 7: NCoR corepressor peptide interactions with PPAR γ LBD **A:** F310S mutant compare to **B:** WT 3D structure (6ONI), (Shang et al., 2020).

4. Conclusion et perspectives

Ce chapitre de la thèse a pour objectif principal d'analyser par une approche de biologie intégrative, les mécanismes moléculaires de régulation de la transcription par PPAR γ et RXR α et de comprendre les mécanismes étant à la base de l'activité protumorigénique de PPAR γ -RXR α dans les cancers de vessie, et plus particulièrement les tumeurs appartenant au sous-type basal. Des évidences génétiques au travers de délétions et de mutations inactivatrices/perte de fonction de *PPARG* ont été apportées dans le premier manuscrit présenté à la **Partie 2** (Coutos-Thévenot et al., 2019). Cette étude décrit PPAR γ agissant comme gène suppresseur de tumeurs dans les tumeurs basales de la vessie. Ce constat appuie le rôle dual que peut avoir PPAR γ dans la régulation transcriptionnelle de gènes cibles. En effet, d'une part, PPAR γ présente un rôle protumorigénique dans les tumeurs appartenant au sous-type de tumeurs luminales (Rochel et al., 2019a), et d'une autre part, un rôle suppresseur de tumeurs dans les tumeurs basales. Notre étude apporte des preuves de la spécificité du rôle suppresseur de tumeurs de PPAR γ . En revanche, les mécanismes impliqués dans ce rôle sont encore mal connus. Ces zones d'ombres nous ont donc conduits à étudier le recrutement de corépresseurs par les mutants inactivateurs de PPAR γ présentés dans une seconde partie. Pour cela, un deuxième article en cours de rédaction a été présenté en **Partie 3** répondant au second objectif de thèse. Cette partie 3 a pour objectif principal d'identifier l'impact des mutations perte de fonction sur le recrutement des corégulateurs, et l'effet de ligands qui modulent cette structure/activité. Pour se faire, l'étude du recrutement d'un peptide corépresseur (NCoR) médié par la liaison d'un ligand inverse agoniste a été réalisée.

Les mutations inactivatrices de PPAR γ , particulièrement celles étudiées dans ce chapitre de thèse, F310S et H494Y présentent une diminution de l'expression transcriptionnelle de PPAR γ , ainsi qu'un impact négatif sur l'expression de gènes cibles, tels que *FABP4* et *ACSL5* dans les tumeurs basales de vessie. Ces mutants présentent une affinité plus grande pour le recrutement des corépresseurs NCoR et SMRT que la protéine sauvage, et ce phénomène est observé tant *in vitro* qu'*in vivo*. De plus, les K_D apparents mesurés sont inférieurs en présence du peptide corépresseur NCoR qu'en présence du coactivateur PGC1 α , ce qui démontre une

meilleure affinité de recrutement de NCoR par les deux mutants inactivateurs F310S et H494Y. La présence du ligand inverse agoniste T0070907 renforce cet effet. L'étude structurale du mutant F310S par cristallographie aux rayons-X montre une nouvelle conformation répressive de PPAR γ LBD avec une hélice- α 12 étendue. De par son haut degré de flexibilité, l'hélice H12 est sujette au « *packing* » cristallin dans un grand nombre de structures résolues par cristallographie. Néanmoins, la mutation S310 présente une interaction électrostatique supplémentaire avec le ligand inverse agoniste T0070907, interaction absente pour la protéine sauvage. Cela engendre un positionnement différent de ce ligand dans la poche, gênant ainsi l'hélice H12 et empêchant cette dernière d'être insérée et pointée vers la poche de fixation du ligand aboutissant à sa fermeture dans les conformations répressives connues à ce jour.

Les données fonctionnelles présentées dans cette étude décrivent les délétions et les mutations inactivatrices de PPAR γ . Néanmoins, ces dernières n'expliquent la diminution de l'expression et de l'activité de PPAR γ que dans le sous-type basal des tumeurs de vessie. Des études plus approfondies des modifications épigénétiques et des événements conduisant à ces modifications seraient essentielles à la compréhension de ces variations d'expression génétiques et d'affinités de recrutement des corégulateurs. Les données structurales obtenues n'expliquent pas pourquoi la mutation inactivatrice F310S de PPAR γ LBD en condition *apo* non ligandée recrute le corépresseur avec une affinité plus accrue que la protéine sauvage. C'est pourquoi, il sera nécessaire de poursuivre l'étude afin d'approfondir certains aspects pour une meilleure compréhension des modalités de régulation de l'expression et de l'activité de PPAR γ dans les tumeurs de vessie.

Chapitre 3

Caractérisation du complexe PPAR γ 2/RXR α et le coactivateur MED1 par cryo-microscopie électronique

Chapitre 3 : Caractérisation du complexe hPPAR γ 2/RXR α et le coactivateur MED1 par Cryo-microscopie électronique (Cryo-ME)

1. Introduction et objectifs

Le complexe PPAR γ -RXR α est à la base de la régulation de plusieurs voies métaboliques et ce rôle est bien défini à ce jour. Cependant, une grande part des mécanismes moléculaires impliqués reste encore mal comprise. Pour rappel, PPAR γ forme un hétérodimère permissif avec le récepteur à l'acide rétinoïque RXR α et se lie à leur élément de réponse à l'ADN PPRE de type DR1 (*Direct Repeat 1*), séquences hexanucléotidiques répétées et séparées par une seule paire de base. Une fois le complexe formé, ce dernier permet le recrutement de corégulateurs, de type corépresseurs ou coactivateurs, permettant de réprimer ou d'activer l'expression des gènes cibles. Ces gènes ciblés sont notamment impliqués dans différents métabolismes glucido-lipidiques. Cela conduit donc à l'expression différentielle de gènes et à une réponse biologique distincte en fonction du ligand qui se lie soit à PPAR γ , soit à RXR α . Une fois liés, les ligands engendrent un changement conformationnel de l'hétérodimère permissif ainsi qu'une variation de l'affinité de liaison des différents cofacteurs permettant d'induire des réponses biologiques communes à PPAR γ et RXR α ou des réponses qui leur sont spécifiques respectivement.

De plus, le complexe PPAR γ -RXR α est impliqué dans différents cancers, notamment les tumeurs lumineales de l'urothélium. Il est donc essentiel à l'avenir de mieux comprendre le fonctionnement de cette voie ainsi que le rôle de l'hétérodimère PPAR γ -RXR α dans le mécanisme protumorigénique ainsi que sur le programme transcriptionnel qu'il régule comme décrit précédemment dans le « [Chapitre 1 Introduction](#) ». Il reste donc plusieurs zones d'ombre, et les gènes impliqués dans ces voies restent mal connus à ce jour.

Des données structurales de complexes de récepteurs nucléaires entiers sont difficiles à obtenir de par leur fort degré de flexibilité et les régions intrinsèquement désordonnées qu'ils

contiennent. Des données structurales permettraient de mieux comprendre les mécanismes par lesquels ces complexes interagissent avec leurs corégulateurs, et par conséquent, de mieux comprendre le mécanisme de recrutement de ces derniers ainsi que la spécificité d'interaction à leurs éléments de réponse à l'ADN. Une première structure du complexe PPAR γ -RXR α lié à l'ADN a été résolue par cristallographie aux rayons-X (Chandra et al., 2008) à 3,1 Å en présence de ligands agonistes (rosiglitazone pour PPAR γ et l'acide 9-*cis* rétinoïque pour RXR α) et d'un peptide coactivateur NCoA2 contenant le motif consensus *LxxLL*, décrivant un complexe asymétrique. Parallèlement à cette étude, des données structurales du complexe lié à son élément de réponse PPRE en solution ont été obtenues par SAXS et décrivent une conformation différente des données cristallographiques (Rochel et al., 2011). En outre, ces données structurales contradictoires dans la littérature révèlent des zones d'ombres quant à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des gènes ciblés par l'hétérodimère PPAR γ -RXR α ainsi que sur le mode d'interaction avec les cofacteurs qui le régulent permettant leur spécificité d'action (**Figure 43**).

En effet, à l'heure actuelle, aucune structure à haute résolution, tous récepteurs nucléaires confondus, comprenant tous les domaines d'interactions où on pourrait observer les domaines modulaires qui constituent les récepteurs nucléaires liés à un grand fragment protéique d'un corégulateur n'est disponible. Pour cette étude et tout au long de ma thèse, le corégulateur choisi pour former un complexe avec PPAR γ et RXR α est le coactivateur MED1. En effet, MED1 est l'un des coactivateurs les plus affins connus pour l'hétérodimère PPAR γ /RXR α . Les corégulateurs protéiques sont des macromolécules intrinsèquement désordonnées rendant leurs études structurales très difficiles. Néanmoins, MED1 possède une partie structurée qui peut permettre d'envisager des études structurales. A ce jour, des données structurales impliquant des motifs peptidiques de liaisons ligand-dépendantes du coactivateur MED1 aux récepteurs nucléaires avec lesquels ils interagissent dont PPAR/RXR sont connues et bien documentées (Viswakarma et al., 2010) (Murakami et al., 2017). Néanmoins, la reconnaissance du coactivateur complet ou tronqué (domaine structuré) par PPAR γ /RXR α reste non élucidée aujourd'hui. Récemment, la reconnaissance de MED1 par le complexe VDR/RXR a été décrite et permet une meilleure compréhension de l'interaction établie entre un complexe de RN et un coactivateur (Belorusova et al., 2020).

De plus, le coactivateur MED1 est potentiellement impliqué dans les mécanismes tumorigéniques médiés par PPAR γ /RXR α (Kwon et al., 2016). L'étude du mécanisme moléculaire impliquant PPAR γ /RXR α et MED1 permettrait une meilleure compréhension des voies métaboliques altérées.

MED1 est un corégulateur clé des RNs, et contient deux motifs consensus LxxLL également appelés « NR-boxes » localisés dans un domaine d'interaction des récepteurs nucléaires appelé domaine RID. Les deux motifs LxxLL se lient aux RNs à différents degrés de spécificité. En effet, il est montré dans la littérature que les RNs stéroïdiens se lient préférentiellement au premier motif, tandis que les RNs non-stéroïdiens comme PPAR γ /RXR α se lient plus fortement au second motif LxxLL de MED1 (Ren et al., 2000). Son rôle physiologique clé dans plusieurs pathologies fait de lui une cible thérapeutique potentielle. En effet, il a été suggéré comme ayant un rôle la stéatose hépatique, dans le syndrome métabolique, ainsi que plusieurs cancers tels que le cancer du sein et de la prostate (Weber and Garabedian, 2018).

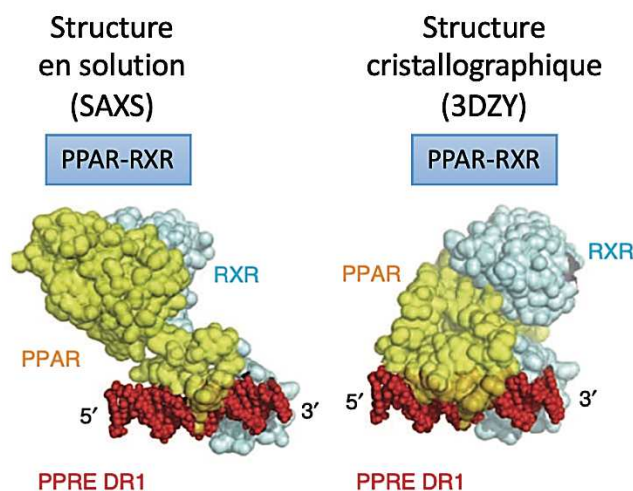


Figure 43 : Analyses et comparaison des données structurales par cristallographie aux rayons-X (PDB 3DZY) et en solution par SAXS du complexe PPAR-RXR lié à son élément de réponse à l'ADN de type DR1, *Adaptée de Rochel et al., 2011.*

Un des objectifs de ma thèse était donc de déterminer la structure du complexe formé entre PPAR γ -RXR α avec leur élément de réponses à l'ADN (PPRE) ainsi qu'avec le coactivateur

MED1, une sous-unité du complexe médiateur chez les eucaryotes afin de mieux caractériser leurs interactions. La flexibilité de cette grande protéine et les importants changements conformationnels qu'elle subit rendent son étude structurale difficile. C'est pourquoi, une région minimale d'interaction (Acides aminés 50 à 660) a été choisie pour les études menées, notée dans ce manuscrit de la manière suivante : MED1_50-660 (Belorusova et al., 2020). Le coactivateur MED1 est un acteur crucial dans la régulation de l'adipogenèse entre autre, de par son interaction avec PPAR γ *via* ses deux motifs consensus LxxLL (Ge et al., 2008).

Dans un premier temps, le travail de ma thèse concernant cette partie a consisté à caractériser biochimiquement le macro-complexe protéique (170 kDa), passant par des étapes d'optimisations de l'expression et de la purification de ce dernier. Différents systèmes d'expression ont été utilisés, notamment les cellules d'insectes utilisant le système *Baculovirus*, ainsi que des cellules mammifères de type BHK21 utilisant le système d'expression de la vaccine MVA (*Modified Vaccinia Ankara*). La seconde partie de ce projet consistait à optimiser les conditions de cryo-congélation en vue de résoudre la structure tridimensionnelle par cryo-microscopie électronique (Cryo-ME) du complexe protéique PPAR γ -RXR α en présence du coactivateur MED1_50-660 et de son élément de réponse à l'ADN de type DR1 identifié dans le gène *FABP4* impliqué dans le métabolisme des acides gras. Malgré les avancées de la cryo-ME, l'étude de ce type de complexe reste difficile. En effet, le complexe hétérodimérique PPAR γ -RXR α lié à son ADN cible ainsi qu'au fragment MED1_50-660 du coactivateur ne fait que 170 kDa de poids moléculaire total. Le défi réside aussi bien dans la préparation de l'échantillon lors de la cryo-congélation sur les grilles de cryo-microscopie électronique, que dans le traitement des données afin de résoudre la structure tridimensionnelle du complexe à moyenne ou haute résolution.

Dans la littérature, des données structurales par cryo-ME ont été obtenues pour des complexes de récepteurs nucléaires composés des domaines LBD, DBD ainsi que des molécules d'ADN correspondant à leur ADN cible : les complexes hétérodimériques VDR-RXR (Orlov et al., 2012) ainsi que le complexe USP/EcR (Maletta et al., 2014). La caméra du microscope (Teknai Polara) utilisé pour ces études, de type Falcon I, ne permettait pas à l'époque d'obtenir des résultats à haute résolution. Des structures atomiques des données cristallographiques des différents domaines ont été utilisées afin d'améliorer les données de

microscopie, pour obtenir des cartes finales pour les deux complexes cités précédemment à des résolutions avoisinant les 10 Å. D'autres structures de complexes de RNs ont depuis été résolues par cryo-ME à basse résolution (13-20 Å), notamment les complexes ER α /SRC-3/p300 (Yi et al., 2017) ou encore AR/SRC-3/p300 (Yu et al., 2020) (Figure 44).

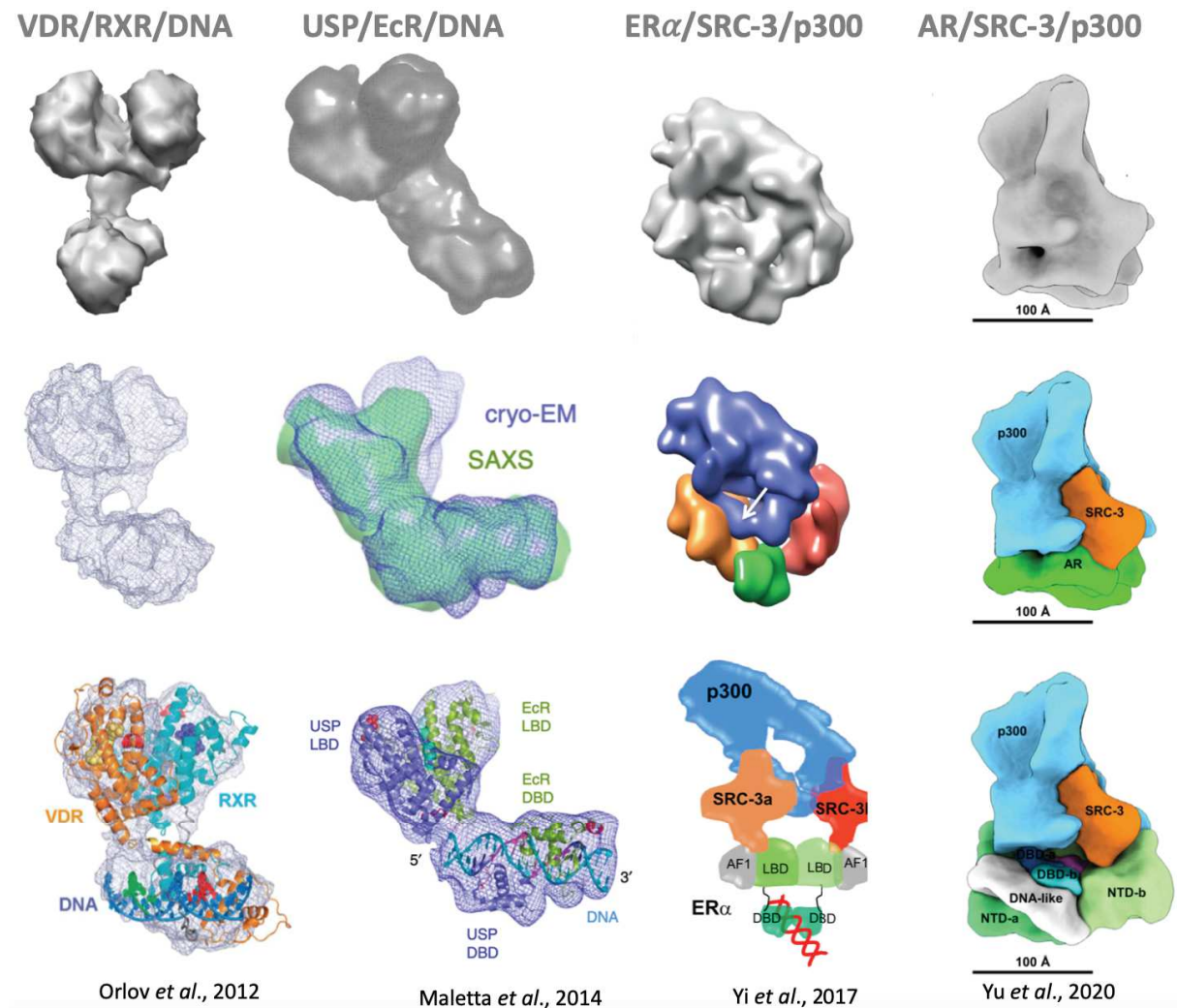


Figure 44 : Structures de complexes de récepteurs nucléaires résolues par cryo-microscopie électronique (Cryo-ME) : VDR/RXR/ADN, USP/EcR/ADN, ER α /SRC-3/p300 et AR/SRC-3/p300.

Dans ce projet, je me suis consacrée à optimiser l'échantillon biologique purifié afin de former un complexe stable et homogène en solution. Toutes les constructions de PPAR-RXR et MED1 pour une expression en cellules d'insectes (SF21 ou SF9) avaient été conçues, clonées et testées au préalable dans l'équipe. Afin d'optimiser la purification du complexe, plusieurs constructions plasmidiques ont été utilisées, différentes stratégies d'expression en cellules

d'insectes ou de mammifères et de purification ont également été testées afin d'améliorer le rendement et la stabilité du complexe en solution. Les détails des phases d'optimisations d'expression, de purification, de préparation des grilles de microscopie ainsi que l'analyse des données de cryo-microscopie électronique seront développés dans la prochaine partie.

2. Caractérisation biochimique du complexe PPAR γ -RXR α : Résultats et discussion

Plusieurs stratégies d'expressions et de purifications ont été adoptées afin d'améliorer l'intégrité et la stabilité du complexe en solution.

Les constructions pour l'expression en cellules d'insectes de PPAR-RXR ont été conçues et clonées par Judit Osz dans l'équipe en collaboration avec l'équipe d'Arnaud Poterszman (Olga Kolesnikova) et le service de biologie moléculaire (IGBMC), et leurs expressions et purifications ont été testées (Kolesnikova et al., 2020). La construction de MED1 a été générée dans l'équipe et son expression et purification a été décrite (Belorusova et al., 2020).

a. Expression et purification du complexe PPAR γ -RXR α -MED1

i. Le système d'expression BEVS ou Baculovirus

Un **baculovirus** est un virus bi-caténaire enveloppé d'ADN appartenant à la famille de *Baculoviridae* affectant les insectes. Le système de vecteur d'expression de *Baculovirus* ou BEVS (*Baculovirus Expression Vector Systems*) est un système eucaryote d'expression de protéines recombinantes facilitant la co-expression de gènes hétérologues et permettant de produire en grande quantité des complexes protéiques difficiles à obtenir avec d'autres systèmes biologiques tel que le système bactérien.

Le complexe entier humain PPAR γ -RXR α est co-exprimé dans des cellules d'insectes de type SF21, alors que le coactivateur MED1 est quant à lui exprimé séparément dans des cellules d'insectes de type SF9, tous deux *via* le système BEVS où les cellules d'insectes sont infectées par le virus recombinant. Sous l'influence de promoteurs viraux forts tels que les promoteurs p10 (gène de la protéine 10) ou PH (gène de la polyhédrine, protéine majeure dans la matrice des polyèdres formant les corps d'inclusion des baculovirus), l'expression ou la co-expression

de protéines recombinées sont possibles. Le but de l'utilisation de ces promoteurs est de remplacer le gène de la polyhédrine (PH) ou de la protéine 10 (p10) par le gène d'intérêt dans l'ADN du baculovirus par recombinaison homologue (RH).

Plusieurs stratégies de purification ont été testées afin d'optimiser la stabilité protéique du complexe et d'assurer une stœchiométrie cohérente pour les expériences de cryo-ME :

♣ **Première stratégie :**

Les gènes codant le complexe humain hPPAR γ 2-RXR α entier seul ont été clonés dans un premier vecteur pMF-TwinStrep (Construction génétique 1 ici, déjà disponible au laboratoire au début de ce projet (Kolesnikova et al., 2020). Cette construction génétique permet de sur-exprimer la protéine de fusion hPPAR γ 2-RXR α avec une étiquette de purification Twin-Strep dans la partie N-terminale de PPAR γ 2 en cellules d'insectes de type SF21. Les deux protéines co-exprimées dans cette « construction 1 » ont ensuite été purifiées en 2 étapes : (i) une première étape par chromatographie d'affinité à la Streptactine (étiquette Twin-Strep de hPPAR γ 2), suivie d'une (ii) chromatographie d'exclusion de taille (Superdex S200 10/300 Increase). Le rendement de purification était d'environ 1 mg par litre de culture.

Après la dernière étape de purification du complexe, un problème récurrent de stœchiométrie du complexe est notable, où hPPAR γ 2 est en excès par rapport à la protéine RXR α , ce qui est problématique pour des études structurales par cryo-ME (voir Gel SDS-PAGE **Figure 45**).

Parallèlement à l'expression et à la purification du complexe hPPAR γ 2-RXR α , le fragment contenant les acides aminés 50 à 660 du coactivateur MED1 (MED1_50-660) est quant à lui exprimé dans des cellules d'insectes de type SF9, purifié par deux étapes de chromatographies également : (i) une première étape de chromatographie d'affinité au Nickel Ni²⁺-NTA (MED1 possède une étiquette 6xHistidines à l'extrémité N-terminale) puis par (ii) une deuxième étape de chromatographie d'exclusion de taille (Superdex S200 10/300 GL). La protéine MED1_50-660 purifiée à un poids moléculaire de 70 kDa attendu est visible sur un gel dénaturant SDS-PAGE (**Figure 46**). Une fois purifié, MED1 est incubé en présence de l'hétérodimère hPPAR γ 2-RXR α toute la nuit à un mélange équimolaire de l'ordre de 1,5 (1,5

équivalents, noté 1,5 éq). Une fois incubés, les trois partenaires sont soumis à une ultime étape de purification par gel filtration analytique (Superose 6 Increase 3.2) (**Figure 46**) avant les essais de cryo-congélation de l'échantillon sur les grilles de microscopie électronique pour des études structurales ultérieures. Une dégradation du complexe est observée pour cette première stratégie de purification. De plus, des concentrations trop faibles après un processus de purification constitué de plusieurs étapes se rajoute au problème de dégradation, compromettant une analyse structurale.

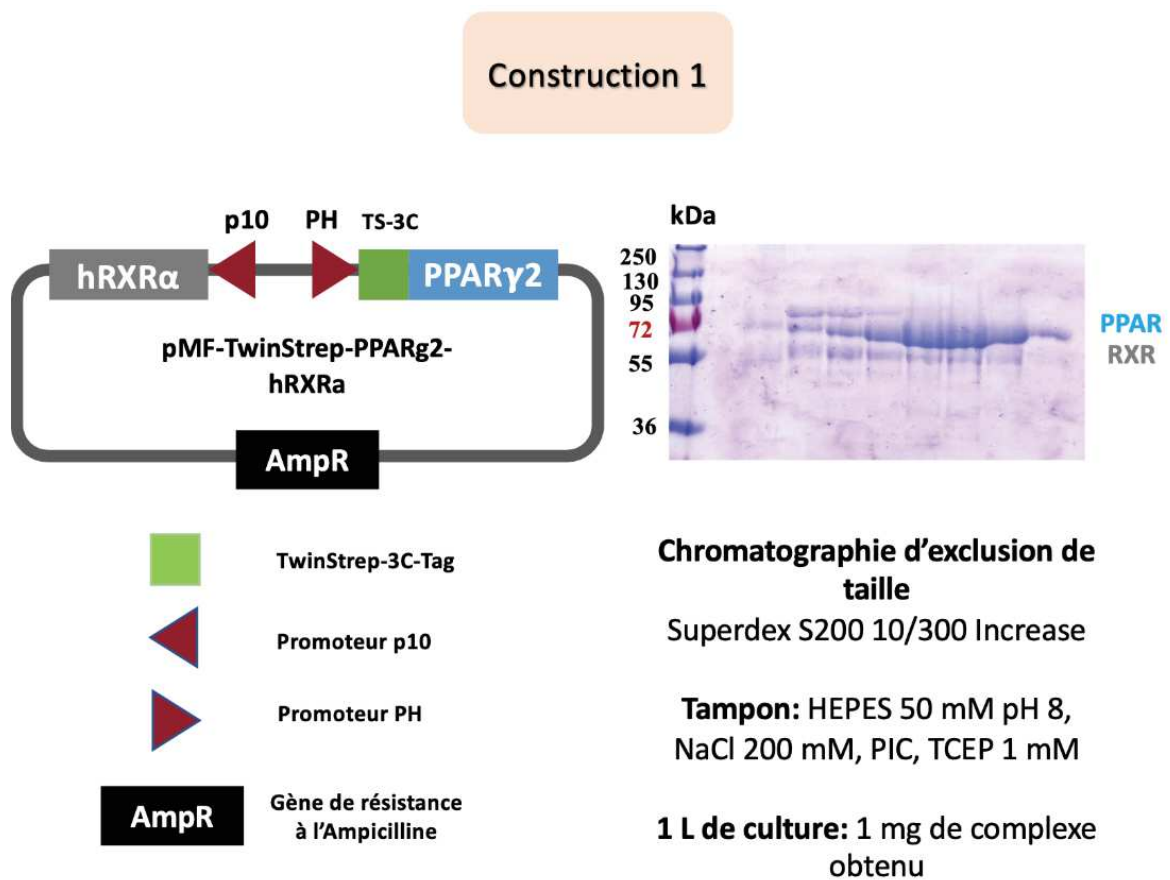


Figure 45 : Récapitulatif des différentes étapes de purification du complexe PPAR γ 2-RXR α humain exprimé avec la construction 1 (N-Ter-Twin-Strep-PPAR γ 2).

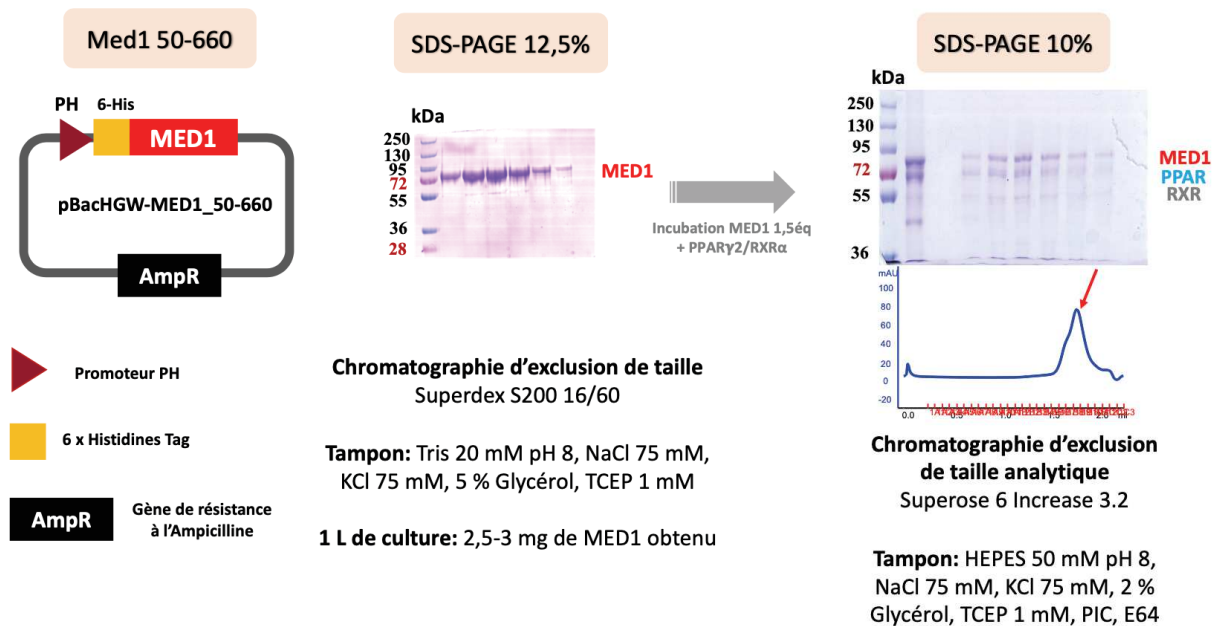


Figure 46 : Récapitulatif des différentes étapes de purification du complexe PPAR γ 2-RXR α humain exprimé avec la construction 1 en présence du coactivateur MED1_50-660.

♣ **Deuxième stratégie :**

Dans un second temps, le complexe humain hPPAR γ 2-RXR α entier a été co-exprimé avec le fragment 6His-MED1_50-660 dans une même culture de cellules d'insectes de type SF21. Les mêmes vecteurs que ceux utilisés dans la stratégie 1 sont ici employés. La multiplicité d'infection (ou MOI pour *Multiplicity Of Infection*) testée au préalable par N. Troffer-Charlier (Service Baculovirus de l'IGBMC) est de 2/0,5 pour hPPAR γ 2-RXR α et DRIP205/MED1 respectivement. Après l'étape de lyse cellulaire par sonication, le complexe est purifié en deux étapes : (i) une première étape de chromatographie d'affinité à la StrepTactine (étiquette Twin-Strep sur hPPAR γ 2-RXR α), puis (ii) par une seconde étape de chromatographie d'exclusion de taille analytique (Superose 6 Increase 3.2) (**Figure 47**). Lors de cette stratégie de purification, le nombre d'étapes est réduit (2 étapes au lieu de 5 dans la stratégie précédente), réduisant ainsi par deux le temps d'expérience nécessaire à la purification du complexe entier. On peut observer que le complexe est maintenant stœchiométrique et intègre (**Cf gel SDS-PAGE 10 % et chromatogramme Figure 47**). Cependant, le rendement de purification est inférieur au rendement attendu (0,03 mg de protéine pour un volume de 1 mL) pour cette deuxième stratégie de purification. Des essais

de microscopie par coloration négative, ainsi que des essais de criblage de grilles par le microscope Teknai Polara ont été réalisés. Les résultats des données de microscopie seront détaillés dans une partie ultérieure.

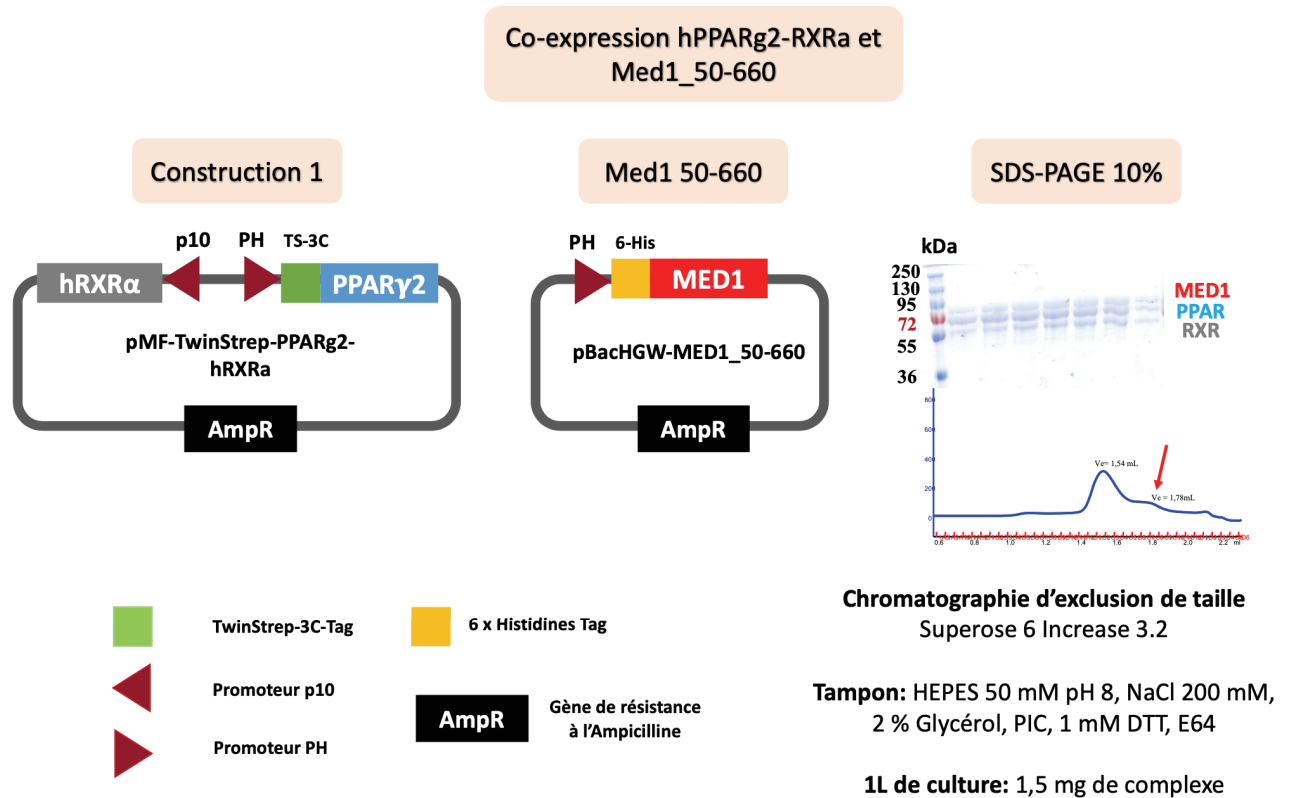


Figure 47 : Récapitulatif des deux étapes de purification du complexe PPAR γ 2-RXR α humain co-exprimé avec le coactivateur MED1_50-660 en cellules d'insectes SF21.

♣ **Troisième stratégie :**

Une troisième stratégie a consisté à l'utilisation d'un vecteur optimisé pour l'expression de hPPAR γ 2-RXR α pour le système d'expression de type baculovirus (Construction 2, déjà disponible au laboratoire au début de ce projet (Kolesnhikova et al., 2020). Les deux gènes codant pour hPPAR γ 2 et hRXR α sont sous le contrôle du même promoteur PH et l'expression est réalisée dans des cellules d'insectes de type SF21. Le gène codant pour une protéine fluorescente rouge appelée DsRed est ajouté à cette construction et son expression est sous le contrôle du promoteur p10. Cette protéine, une fois exprimée

permet de valider et de visualiser à l'œil nu l'efficacité de l'expression du complexe dès l'étape de culture par une coloration rougeâtre du milieu de culture.

En parallèle, le coactivateur 6His-MED1_50-660 est exprimé de manière distincte dans des cellules d'insectes de type SF9 selon le protocole décrit précédemment.

La purification optimisée de cette nouvelle construction se déroule maintenant comme suit : l'hétérodimère hPPAR γ 2-RXR α est purifié par (i) une première étape de chromatographie d'affinité Ni²⁺-NTA où PPAR γ 2 est fusionné à une étiquette 6xHis à sa partie N-terminale, puis par une (ii) deuxième étape de purification par chromatographie d'exclusion de taille avec une colonne Superdex S200 10/300 Increase permettant d'éliminer les contaminants ainsi que la fraction de précipités de plus petits poids moléculaire.

Le rendement de purification est amélioré et avoisine les 2-3 mg par litre de culture, et les fractions les plus concentrées atteignent 0,6 mg/mL (contre 0,05-0,1 mg/mL dans les deux stratégies décrites précédemment). L'optimisation de la purification ainsi que de l'emploi de la nouvelle construction n°2 ont permis d'augmenter 3 fois le rendement de purification du complexe humain entier hPPAR γ 2-RXR α (Figure 48).

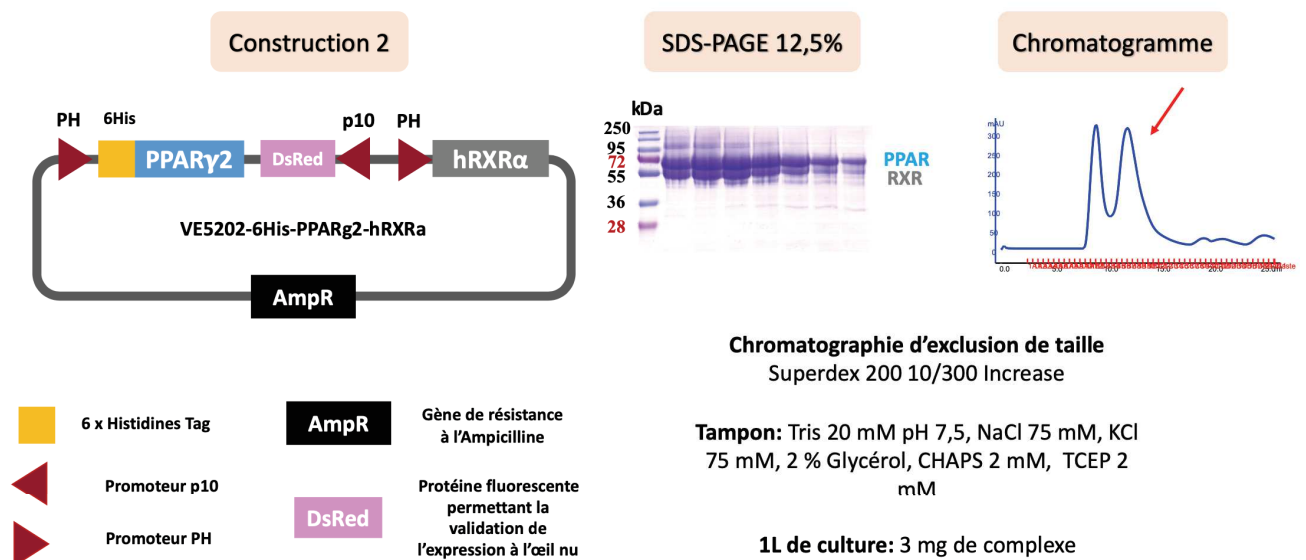


Figure 48 : Récapitulatif des deux étapes de purification du complexe PPAR γ 2-RXR α exprimé avec la construction 2.

Distinctement, le coactivateur 6His-MED1_50-660 purifié suivant les mêmes étapes décrites précédemment est ajouté à un mélange équimolaire de l'ordre de 1,5 éq au complexe purifié hPPAR γ 2-RXR α afin d'être incubés et purifiés lors d'une dernière étape de purification par chromatographie d'exclusion de taille analytique par une colonne Superose 6 Increase 3.2 (Figure 49).

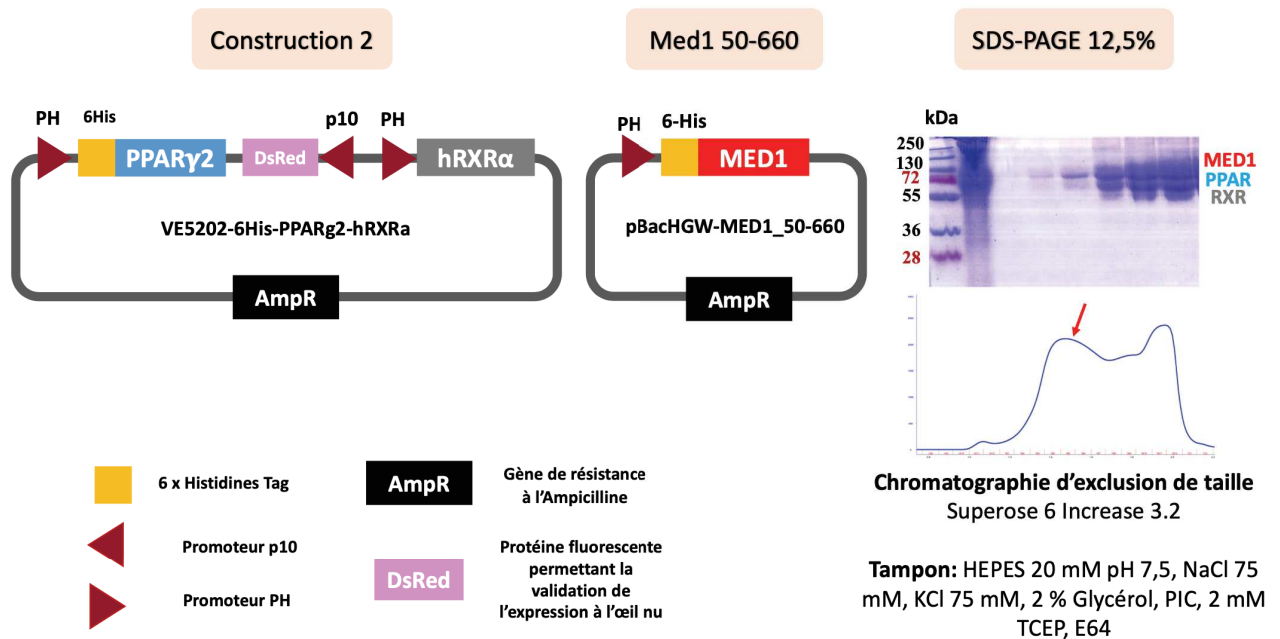


Figure 49 : Formation du complexe stœchiométrique PPAR γ 2-RXR α humain exprimé dans la nouvelle construction n°2 et co-purifié en présence du coactivateur MED1_50-660 en cellules d'insectes dans le système Baculovirus.

La formation du complexe de PPAR-RXR avec MED1 nécessite la présence des ligands agonistes spécifiques de PPAR γ 2 et de RXR α , soit le ligand agoniste GW1929 et l'acide 9-*cis* rétinolique respectivement, ajoutés à 2 équivalents molaires au cours de la purification, dans les fractions collectées après la première étape de chromatographie d'affinité au nickel. Ces ligands sont nécessaires à la stabilité du complexe hétérodimérique et le coactivateur MED1. De plus, afin de stabiliser le complexe il est ajouté aux fractions finales purifiées du complexe une molécule d'ADN correspondant à l'élément de réponse PPRE de type DR1 (1,05 équivalents molaires), soit ici l'ADN du gène *FABP4* impliqué dans le métabolisme des acides gras. Les ligands et l'ADN ont un rôle dans la stabilisation du complexe, permettant ainsi de favoriser l'obtention d'un complexe stable et homogène en solution.

La dernière stratégie de purification a permis d'obtenir un complexe formé et stœchiométrique en présence des ligands et de l'élément de réponse à l'ADN (*FABP4*), aboutissant à la deuxième tentative d'étude structurale du complexe par cryo-microscopie électronique. L'optimisation des conditions de congélation du complexe entier sera détaillée dans une partie ultérieure du manuscrit.

ii. Tests qualitatifs de l'échantillon protéique

Pour l'une des purifications suivant la troisième stratégie décrite ci-dessus, une expérience de SEC-MALS (*Size Exclusion Chromatography - Multi-Angle Light Scattering*) a été réalisée pour vérifier l'intégrité du complexe. Le SEC-MALS est une chromatographie d'exclusion de taille couplée « en ligne » à un appareil de mesure de diffusion de la lumière à angles multiples : diffusion de la lumière laser (LS), l'indice de réfraction (RI), et enfin l'absorbance UV. Cette méthode rapide permet de déterminer le poids moléculaire des protéines et des complexes multi-protéiques en solution. La diffusion statique de la lumière est ainsi mesurée, permettant d'avoir des informations précises sur le rayon de giration, directement proportionnel au rayon hydrodynamique des molécules en solution. Cette méthode permet donc de vérifier la stœchiométrie des interactions protéine/protéine en solution, permettant ainsi de déterminer une échelle de poids moléculaire indépendamment de la forme ou de la taille des protéines ou complexes étudiés.

Il faut savoir que l'effet de la concentration est très important pour visualiser la formation d'un complexe en solution par cette technique. Une meilleure concentration du complexe est obtenue après purification du complexe selon la stratégie n°3. Après l'étape de chromatographie d'exclusion de taille ou SEC (**Figure 50A**), une courbe de diffusion de la lumière est obtenue et décrit un mélange de population protéique allant d'une échelle de 70 à 50 kDa de poids moléculaires graduellement (**Figure 50B**).

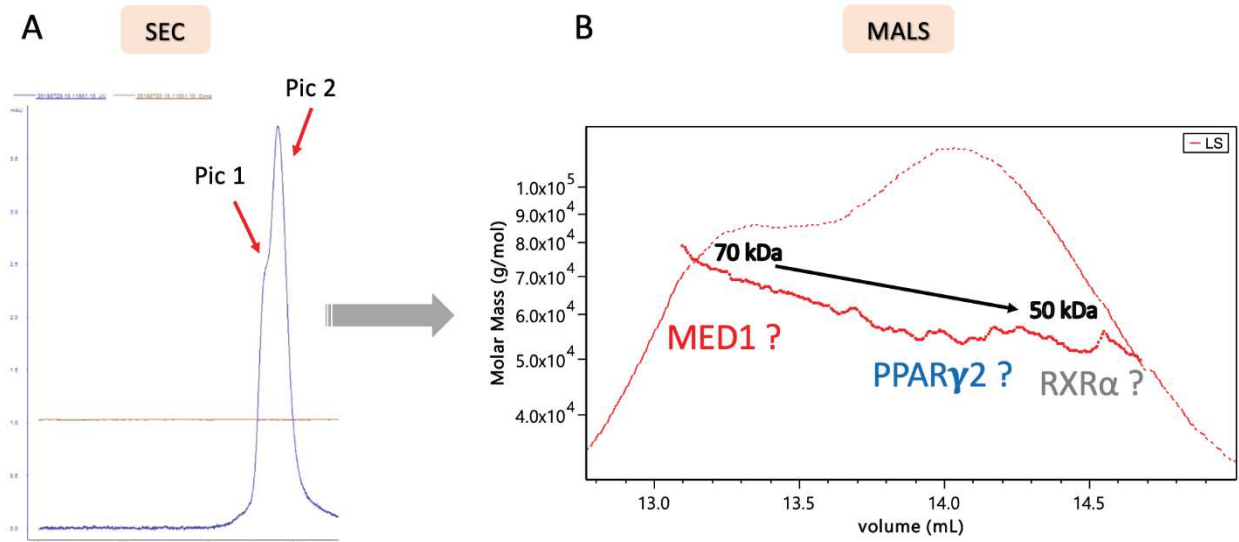


Figure 50 : Récapitulatif des expériences de SEC-MALS réalisées sur un échantillon protéique du complexe entier purifié hPPAR γ 2-RXR α -MED1 d'après la stratégie n°3

A : Chromatogramme après élution du complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1₅₀₋₆₆₀

B : Diffusion de la lumière statique (LS) des protéines dissociées.

L'analyse des données (**Figure 50B**) indique un mélange des 3 protéines qui constituent le complexe d'intérêt (70 kDa pour MED1₅₀₋₆₆₀, 55 kDa pour PPAR γ 2 et 50 kDa pour RXR α), mais ni l'hétérodimère ni le complexe avec MED1 ne sont observés dans les conditions expérimentales utilisées. Néanmoins, les masses moléculaires semblent correspondre aux masses attendues des protéines isolées.

La difficulté de concentrer le complexe et la dissociation rapide du complexe en solution dans les conditions testées, ont limité la poursuite de l'étude structurale. Dans l'objectif de stabiliser le complexe, une nouvelle stratégie d'expression en cellules de mammifères a été mise en place.

iii. Système d'expression de la vaccine en cellules de mammifères BHK21

Le système d'expression MVA (*Modified Vaccine Ankara*) utilise le virus de la vaccine modifié. C'est un virus de la famille *poxviridae* possédant un génome à ADN double brin qui se réplique dans le cytoplasme de la cellule hôte infectée. Le génome de ce virus a été modifié pour permettre la surexpression de protéines recombinantes d'intérêt dans la cellule infectée à un rendement élevé. Il est constitué du gène *lacl*, de l'opérateur *lacO*, du gène codant pour

l'ARN polymérase T7. Il est sous le contrôle du promoteur T7 en amont de la cassette de clonage d'un seul gène d'intérêt ou d'une construction polycistronique (Hebben et al., 2007a). Cela permet donc l'induction de l'expression protéique à l'IPTG, analogue de l'allolactose. Les gènes cibles sont insérés dans le site HA remplaçant les gènes neoR-mCherry et gyr-PKR (Figure 51). Ces gènes sont placés en avant du promoteur du bactériophage T7 sous le contrôle de l'opérateur lacO permettant l'induction à l'IPTG aboutissant à la levée de l'inhibition de l'expression par lacI suite à un changement conformationnel.

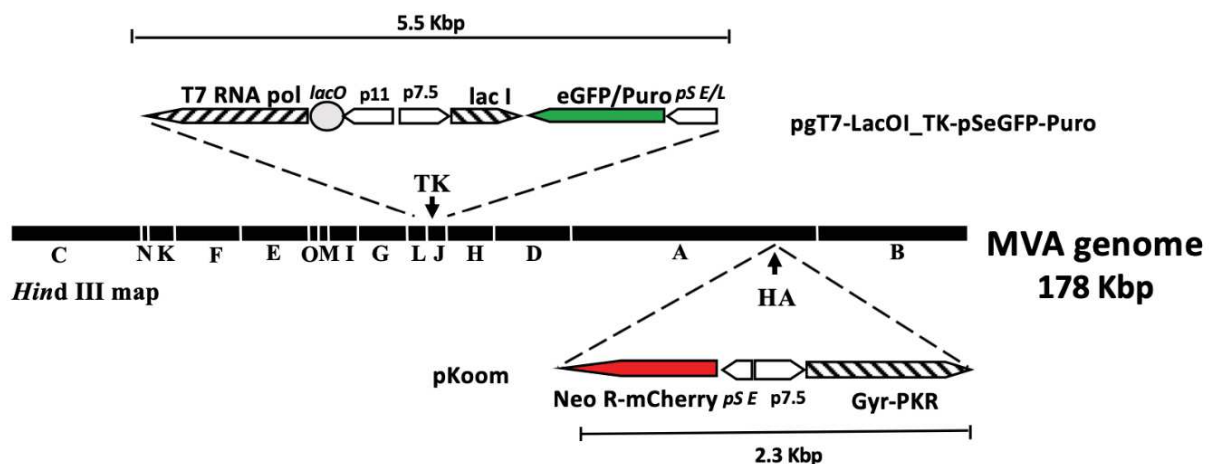


Figure 51 : Carte génomique du virus modifié de la vaccine (MVA) contenant les régions modifiées, Adaptée de Hebben et al., 2007.

Pour intégrer le gène d'intérêt ou d'une cassette polycistronique contenant plusieurs gènes d'intérêts dans le génome viral du virus de la vaccine (MVA), une première étape de clonage du gène d'intérêt dans un plasmide pVOTE est nécessaire où l'intégration du génome se fait par recombinaison homologue, puis une seconde étape qui consiste à sélectionner et à purifier le virus recombinant par un système de double sélection (Figure 52).

L'intégration du gène codant pour une protéine d'intérêt ou de plusieurs gènes codant pour un complexe protéique se fait par : (i) une première sélection positive par l'acide mycophénolique ayant sa cassette de résistance intégrée dans le plasmide, (ii) le génome viral contient un gène codant pour une protéine de fusion Gyr-PKR (Gyrase B pour Gyr et dsRNA dependent Potein Kinase pour PKR) ainsi qu'un gène codant la protéine mCherry. Les cellules de mammifères de type BHK21 (*Baby Hamster Kidney*) sont ensuite infectées par le virus MVA, puis transfectées dans le plasmide pVOTE. C'est alors qu'une double sélection est réalisée : (i)

l'ajout d'acide mycophénolique dans le milieu de culture permet la première sélection des virus, (ii) l'ajout de coumermycine-A1 permet la deuxième sélection négative, provoquant la dimérisation de la protéine GyrB, ce qui a pour effet d'activer sa protéine de fusion PKR. Une fois active, la PKR inhibe la réplication virale et doit être éliminée du génome viral pour permettre la survie du virus. La présence du gène codant la protéine mCherry permet un contrôle visuel de l'efficacité de la recombinaison homologe (couleur rougeâtre visible). Enfin, le virus recombinant obtenu doit comporter le/les gènes codant(s) pour la protéine/complexe d'intérêt, ainsi que la cassette de résistance à l'acide mycophénolique. Quant aux gènes codant pour GyrB-PKR et la protéine mCherry, ils ne doivent plus être présents. Un processus de sélection itératif est ensuite nécessaire jusqu'à l'obtention des virus complètement recombinants et n'exprimant plus la mCherry (**Figure 53**).

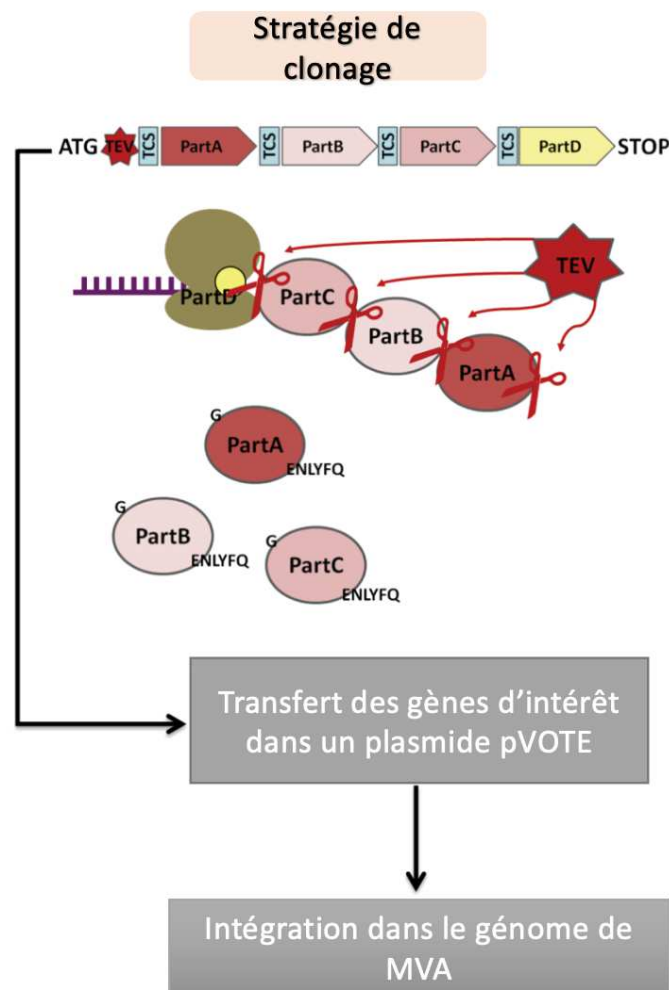


Figure 52 : Schéma récapitulatif de la stratégie de clonage d'une cassette polycistronique dans le génome viral de MVA afin d'exprimer un complexe multi-protéique d'intérêt.

Une fois la sélection des virus recombinants réalisée, les cellules de mammifères BHK21 sont infectées par ces derniers et l'expression est induite pendant 24 à 48 h après l'ajout d'IPTG. Un marqueur de type GFP ou un analogue comme la YFP permettent de visualiser les cellules qui ont exprimé ou non la protéine d'intérêt.

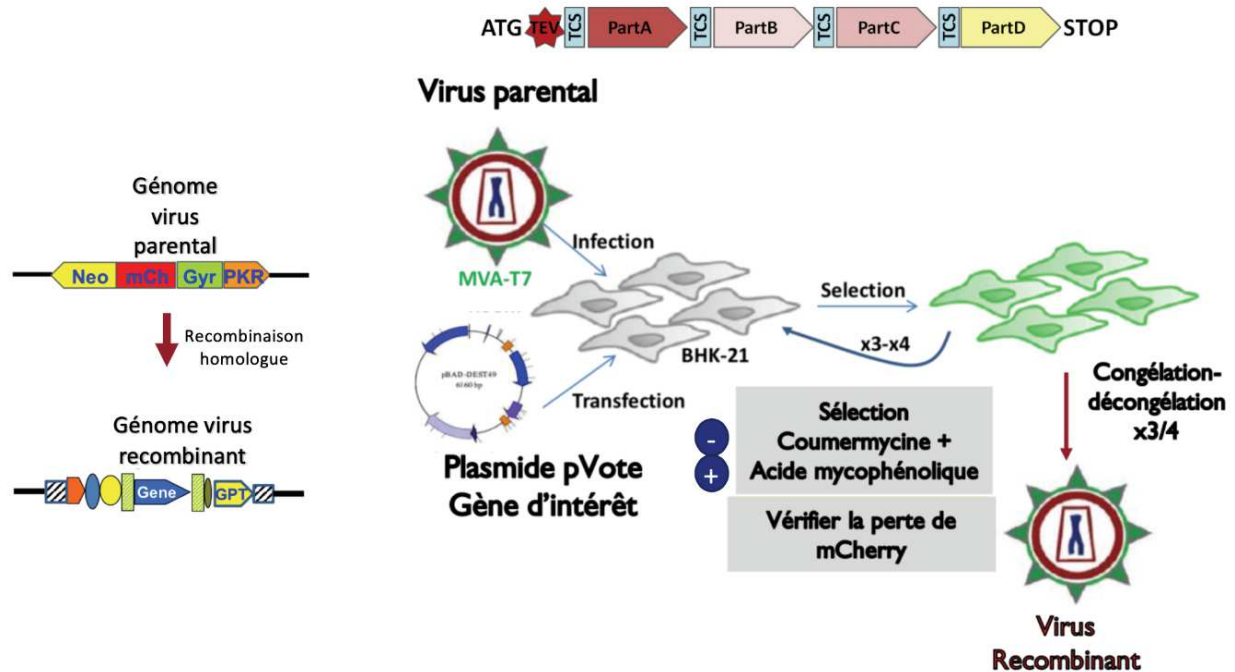


Figure 53 : Schéma récapitulatif de l'étape de sélection du/des gène(s) d'intérêt(s) et de son intégration dans le virus MVA qui permettra la surexpression du gène d'intérêt dans les cellules BHK21.

Quatre constructions différentes ont été réfléchies, optimisées et réalisées par le Service de Biologie Moléculaire de l'IGBMC (Paola Rossolillo) et de l'équipe de Marc Ruff (Robert Drillien et Julien Batisse). Les constructions générées contiennent : (i) soit le complexe entier hPPAR γ 2-RXR α -MED1 avec le coactivateur MED1 entier (Construction 1), (ii) soit le complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660 contenant le fragment de MED1 (Construction 2), (iii) soit l'hétérodimère hPPAR γ 2-RXR α entier (Construction 3), (iv) soit le corégulateur MED1 entier seul dans une construction distincte (Construction 4) (**Figure 54**).

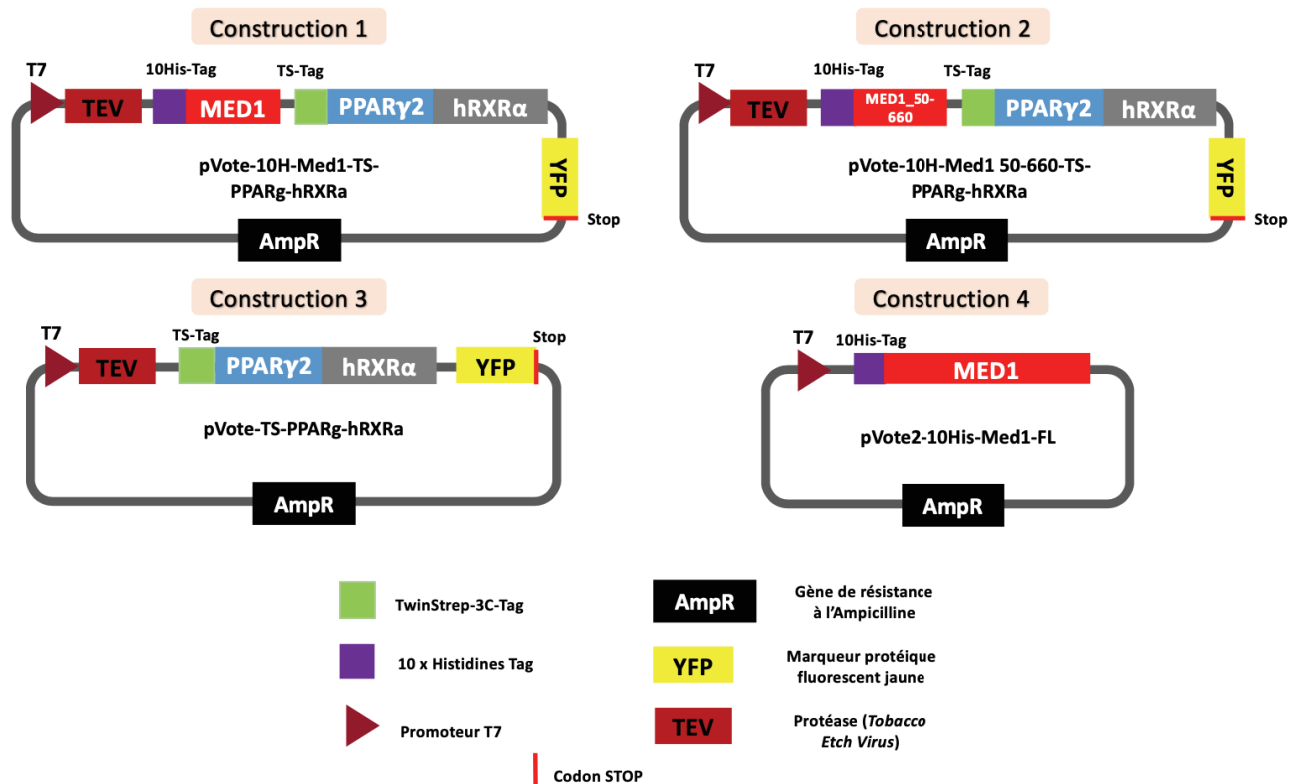


Figure 54 : Schémas récapitulatifs des différentes constructions générées pour l'expression protéique du complexe hPPAR γ 2-RXR α et leur coactivateur MED1 dans le système MVA.

Des essais de purifications par chromatographie d'affinité en « batch » sur une résine StrepTactine à micro-échelle sur des cultures de 350 mL de volume ont été réalisés pour vérifier l'expression des protéines pour les Constructions 1 et 2 (Figure 54). Des doutes subsistent quant à l'intégrité du complexe : en effet, il semblerait que seul le fragment 50-660 soluble et partiellement structuré de MED1 soit visible quel que soit la construction utilisée (bande protéique sur le gel dénaturant SDS-PAGE à 75 kDa pour 10xHis-MED1 entier ou le fragment 50-660). De plus, RXR α semble absent ou à l'état de traces dans les conditions expérimentales testées. Un problème de stœchiométrie concernant RXR α semble à nouveau être observé (Figure 55).

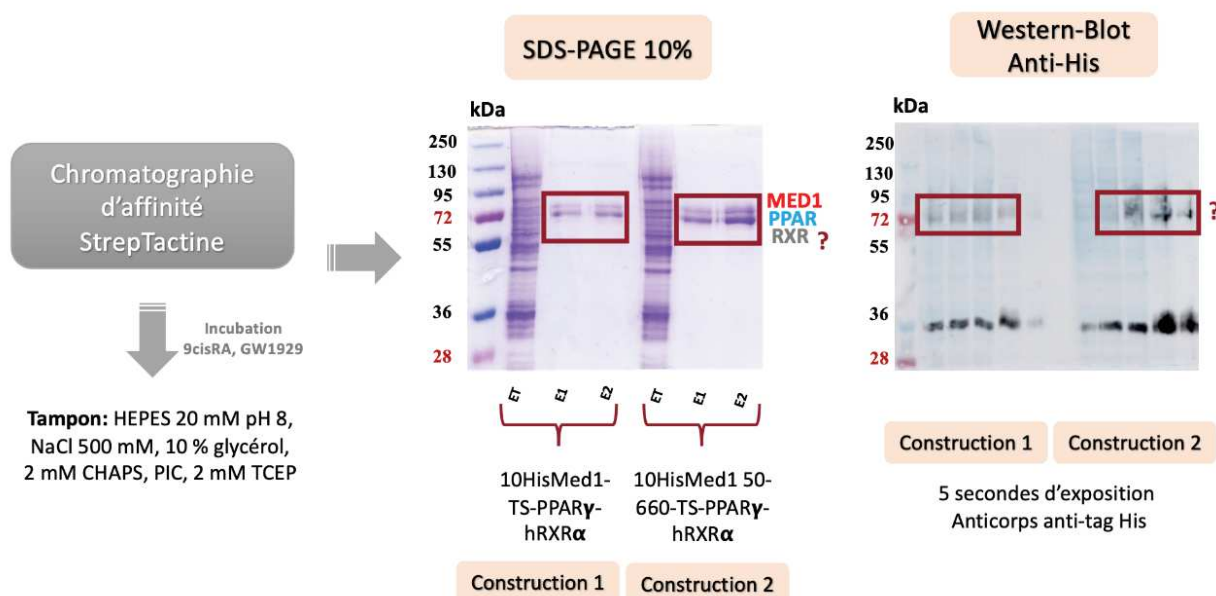


Figure 55 : Récapitulatif des étapes préliminaires des essais de purifications à micro-échelle du complexe hPPAR γ 2-RXR α et leur coactivateur MED1 dans le système MVA de deux constructions différentes (Constructions 1 et 2).

Parallèlement, des essais de purifications à micro-échelle dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment, sur un volume de culture de 350 mL ont été faites pour les constructions 3 et 4 afin de vérifier l'expression de l'hétérodimère PPAR γ 2-RXR α d'une part, et du coactivateur MED1 entier d'autre part. Pour la construction 3, l'hétérodimère est exprimé, mais un problème de stœchiométrie persiste pour le partenaire RXR α (Figure 56). Il faut noter que dans la construction 3, PPAR γ 2 possède une étiquette TwinStrep, rajoutant ainsi 28 acides aminés, expliquant la migration à plus haut poids moléculaire observé sur le gel dénaturant SDS-PAGE Figure 56 (Construction 3). L'identité des protéines exprimées reste néanmoins à être confirmée.

Concernant le coactivateur MED1 entier (construction 4), l'analyse des bandes (Figure 56, Construction 4) par spectrométrie de masse indique que MED1 entier est bien exprimé mais les bandes de plus petit poids moléculaire correspondent également à MED1, indiquant une dégradation de celui-ci.

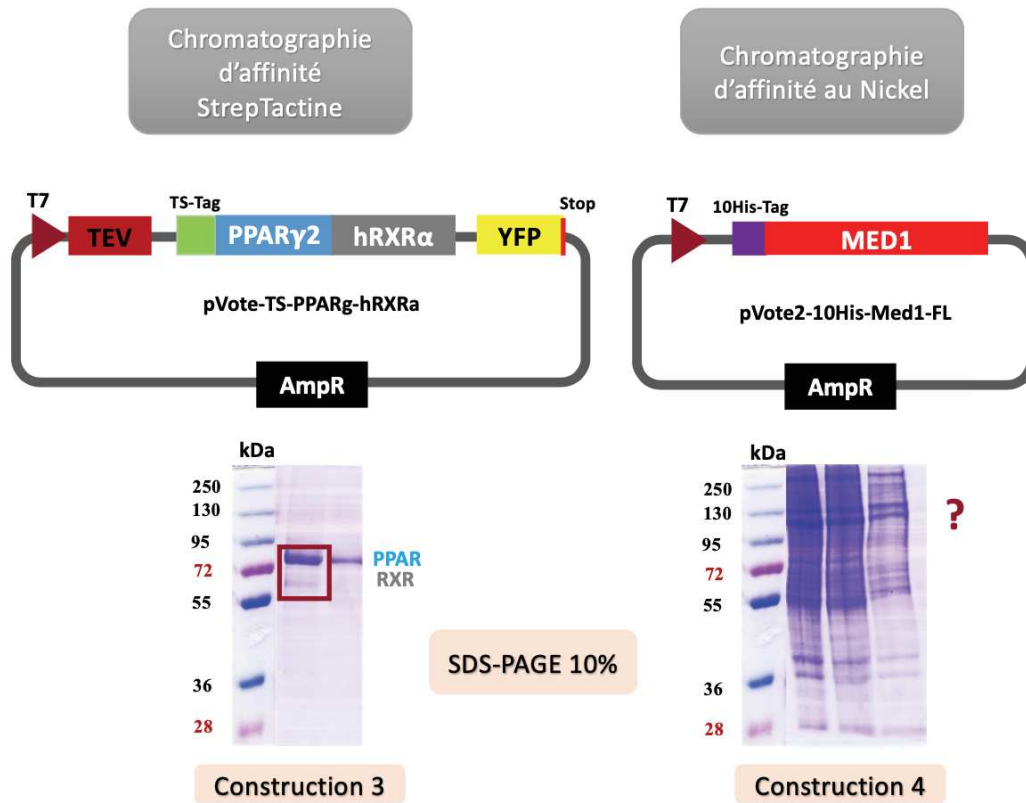


Figure 56 : Récapitulatif des étapes préliminaires des essais de purifications à micro-échelle du complexe hPPAR γ 2-RXR α et le coactivateur MED1 dans le système MVA de deux constructions distinctes (Constructions 3 et 4).

3. Caractérisation structurale d'un échantillon biologique par microscopie électronique

a. La microscopie électronique à transmission (MET) : Généralités et principes

i. Progrès scientifique au cours du XX^{ème} siècle

Depuis la moitié du XIX^{ème} siècle, de nombreux progrès scientifiques animent le monde de la physique et de la microscopie électronique. Les deux premiers microscopes avaient été construits dans les années 1931, notamment par des pionniers comme Max Knoll et Ernst Ruska, permettant un grossissement x100 des objets observés. Une fois amorcée, la course au progrès technique est lancée, et à partir des années 50, la production industrielle de

microscopes électroniques débute et le développement des techniques progresse rapidement. Les microscopes sont alors produits par plusieurs groupes tels que Zeiss, Philips (devenu FEI puis FEI ThermoFisher Scientific récemment), Hitachi ou encore JEOL. Parallèlement aux progrès techniques, l'amélioration de la préparation des échantillons biologiques se poursuit, permettant d'observer des premières images de bactéries, ou encore de virus. Dès les années 1980, un autre pionnier du monde de la biophysique, Jacques Dubochet met au point une nouvelle technique appelée « cryo-microscopie électronique » dans le but d'étudier des objets biologiques à haute résolution, et ses études font l'objet du prix Nobel de Chimie en 2017, en compagnie de ses collègues Joachim Frank et Richard Henderson. Au cours du siècle passé, les progrès scientifiques connus en MET permettent l'amélioration de la résolution allant de quelques dizaines de nanomètres au début, jusqu'à la résolution atomique aujourd'hui. Cela permet à ce jour l'étude de complexes macromoléculaires permettant d'élucider leurs mécanismes d'action et de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui les animent.

ii. Introduction à la technique de MET : Principes physiques

L'étude d'un échantillon biologique par MET consiste à irradier ce dernier par un faisceau d'électrons accélérés par un haut voltage (une différence de potentiel élevée) dans le but d'obtenir une image agrandie de la matière qui constitue l'échantillon étudié. En effet, la MET est une technique d'imagerie permettant d'observer les objets biologiques d'intérêts. Une source d'électrons est nécessaire, des lentilles électromagnétiques sont présentes ainsi que des diaphragmes permettant de bloquer les électrons diffusés hors du faisceau souhaité (**Figure 57**). Les électrons sont issus d'un courant électrique circulant dans une pointe métallique provoquant des collisions entre électrons. Le potentiel électrique de ces électrons dépend du métal utilisé, dont plusieurs ont connu le jour tout au long du développement de la technique de MET. Tout d'abord un filament de tungstène en forme de V était utilisé (**Figure 58A**), puis un cristal d'hexaborure de lanthane (LaB₆) (**Figure 58B**), et enfin, plus récemment un canon à émission de champs sous forme de cristal de tungstène (FEG pour *Field Emission Gun*) permettant l'émission des électrons (**Figure 58C**). Ce dernier type de métal utilisé permet une meilleure cohérence spatiale et temporelle et équipe tous les microscopes électroniques

à haute résolution de dernière génération. On retrouve des microscopes permettant d'accélérer les électrons émis à une tension allant de 80 à 300 kV.

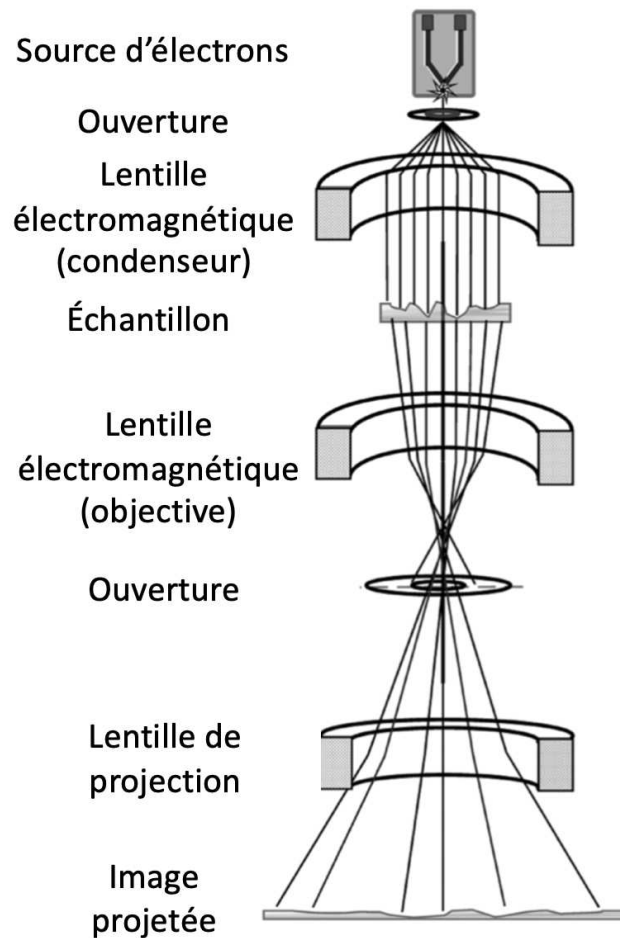


Figure 57 : Représentation schématique simplifiée d'un microscope électronique, *Adaptée de Orlova and Saibil, 2011.*

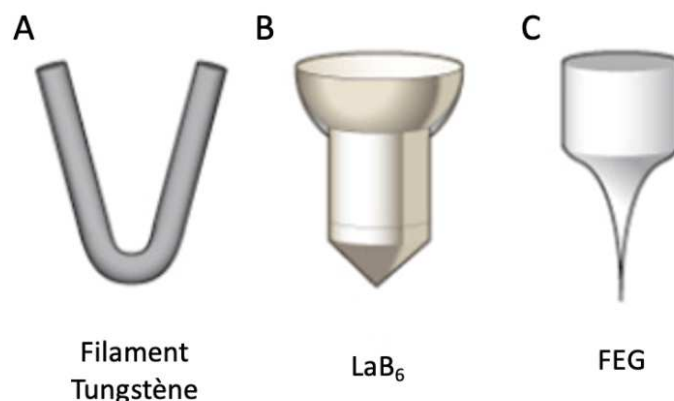


Figure 58 : Représentation schématique simplifiée des différentes sources d'électrons utilisées au cours du temps pour les microscopes électroniques à transmission (MET)

<http://www.geology.wisc.edu>.

Une fois les électrons émis par la source, ils sont dirigés vers les lentilles électromagnétiques décrites précédemment, permettant de générer un champ électromagnétique modifiant ainsi la trajectoire des électrons. Cela permet la focalisation du faisceau d'électrons possédant une longueur d'onde et une phase.

Les électrons passent ensuite à travers l'échantillon biologique d'intérêt, et ces interactions permettant l'obtention d'une image de contraste. Les électrons se comportent selon trois schémas : (i) ils sont diffusés non élastiquement quand les électrons interagissent avec l'échantillon et dévient de leur trajectoire initiale en perdant de l'énergie, (ii) soit diffusés élastiquement quand ils interagissent avec un atome de l'échantillon déviant ainsi de leur trajectoire mais sans perdre d'énergie, (iii) soit ils ne sont pas diffusés car n'interagissent pas avec l'échantillon, et dans ce cas, ils ne sont pas déviés et ne subissent aucune perte d'énergie (**Figure 59**).

Dans le cas (i) où les électrons subissent une diffusion inélastique, l'énergie perdue induit la formation de radicaux libres conduisant à la dégradation de l'échantillon biologique observé et sont indispensables à la détection du signal. Quant aux électrons diffusés élastiquement (ii), ils contribuent à générer l'image de contraste. La formation de l'image dépend d'une part de la diffusion des électrons à travers l'échantillon biologique étudié, (principalement composé d'atomes d'hydrogènes, de carbones, d'oxygènes et d'azotes), et d'une autre part de la capacité des lentilles à refocaliser le flux d'électrons. Ainsi, la lentille objective pourra converger le faisceau d'électrons pour permettre la formation de l'image en deux étapes : (i) l'obtention d'un spectre de diffraction grâce au rassemblement des électrons au niveau du plan focal de la lentille, (ii) les électrons sont recombinaés pour former l'image de l'objet étudié. Le premier spectre obtenu peut être décrit mathématiquement par la transformée de Fourier de l'objet, et l'image obtenue à partir du spectre de diffraction est décrite par la transformée de Fourier inverse de l'objet.

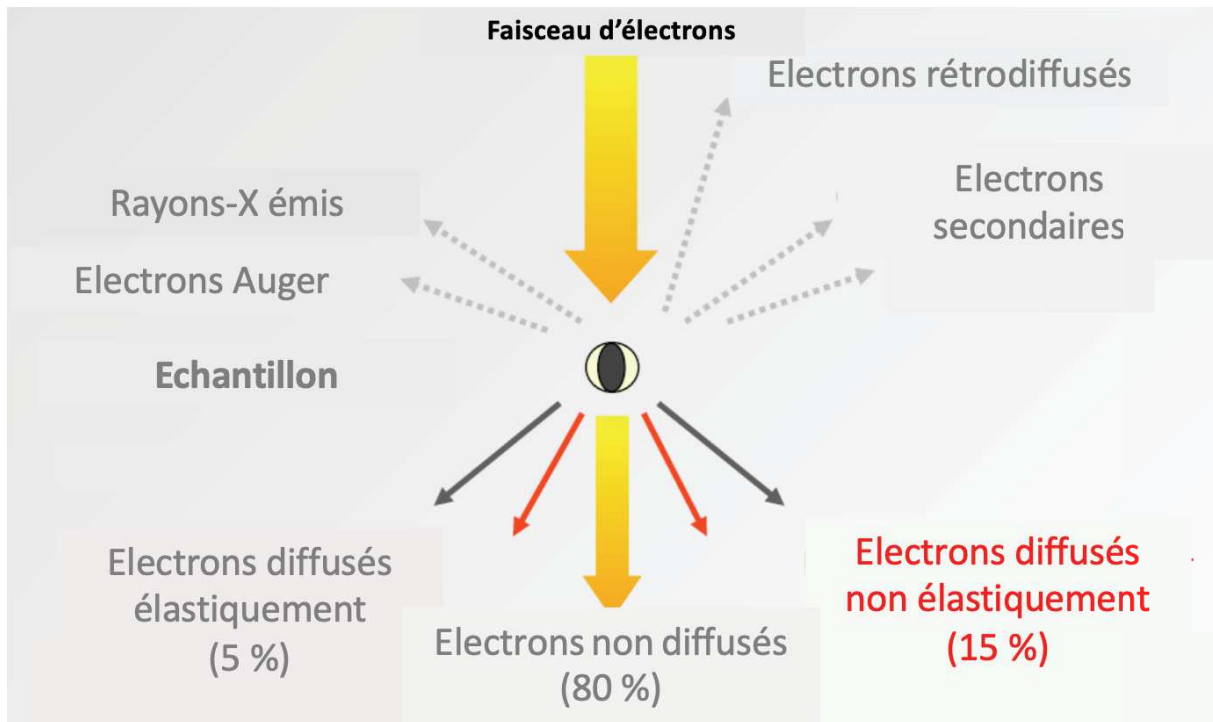


Figure 59 : Schéma des interactions observées entre les électrons émis et l'échantillon biologique étudié par MET, **Adaptée de Grant Jensen – Caltech.**

Il faut noter que la transmission de l'information par le microscope électronique à transmission n'est pas parfaite puisqu'il introduit des modifications de l'information qu'il est nécessaire de corriger. Cela correspond donc à la fonction de transfert de l'instrument modélisable mathématiquement par la fonction FTC pour « Fonction de Transfert de Contraste ». L'image générée est donc modifiée par la FTC du microscope, ce qui engendre que la transformée de Fourier de l'image obtenue résulte du produit de convolution de la fonction FTC et de la transformée de Fourier de l'échantillon biologique étudié. La correction de la FTC est aujourd'hui facilitée puisqu'elle se fait par le biais de plusieurs logiciels utilisés (CTFFIND, GCTF...).

De plus, la fonction FTC a une amplitude d'oscillation comprise entre -1 et 1, et cette valeur de contraste inversé -1 définit l'image contrastée observée (**Figure 60**). La défocalisation permet de faire varier la fréquence d'oscillation, et par conséquent, le contraste est créé.

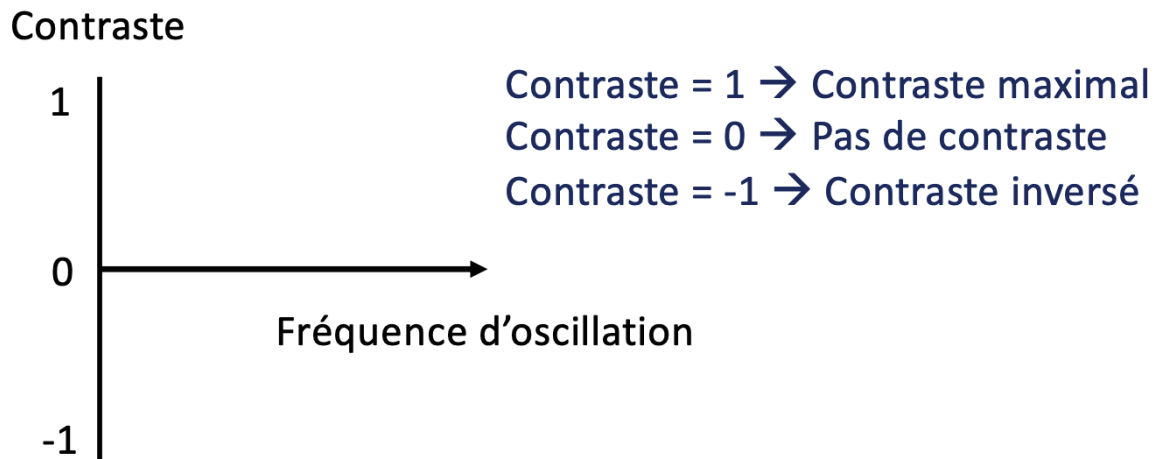


Figure 60 : Schéma décrivant la variation de la fonction de transfert de contraste (FTC) dépendante de la fréquence d'oscillation.

b. L'étude d'un échantillon biologique par MET

La microscopie électronique à transmission, contrairement à la cristallographie aux rayons-X permet l'étude des complexes macromoléculaires hétérogènes dans des conditions plus proches des conditions physiologiques. Elle ne nécessite pas l'obtention critique de cristaux de protéine pour les études structurales tridimensionnelles. Le défi permanent est donc la préservation de l'intégrité de l'échantillon biologique étudié afin de conserver la forme native du complexe protéique d'intérêt. Pour pouvoir observer l'intégrité de l'échantillon dans le but d'une étude structurale détaillée, deux techniques sont couramment utilisées : (i) la coloration négative, et (ii) la cryo-microscopie électronique (Cryo-ME).

i. Par coloration négative

Cette technique a été développée par Brenner et Horne en 1959 pour leurs études des virus. Le principe de cette méthode est d'enrober l'échantillon biologique d'une solution de sels d'atomes lourds comme l'uranium permettant de préserver la structure et d'augmenter le contraste (**Figure 61**).

La coloration négative est une technique rapide et facile à mettre en œuvre. Elle permet de valider les conditions expérimentales de préparations de l'échantillon biologique d'intérêt,

notamment l'étape de purification, le tampon choisit ou encore la concentration de l'échantillon. Elle permet donc de définir les conditions expérimentales optimale à une étude structurale par cryo-ME à plus haute résolution.

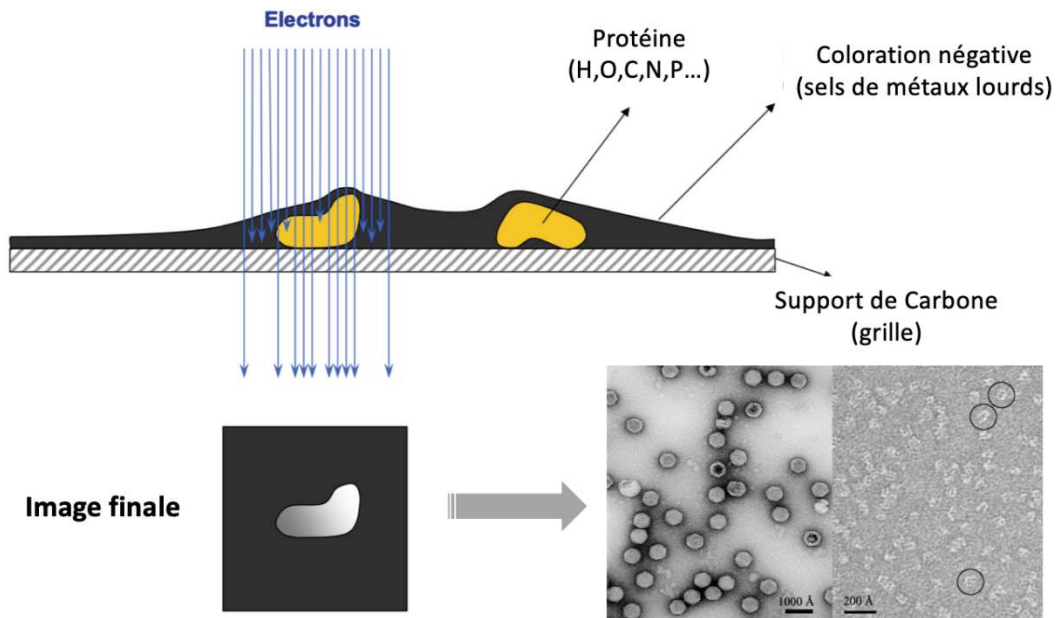


Figure 61 : Schéma global décrivant le principe et le contraste obtenu pour l'étude d'un échantillon biologique par la technique de coloration négative.

Les échantillons sont déposés sur un support de carbone correspondant à des grilles de microscopie de Cuivre ou de Rhodium (Cu/Rh) recouvertes d'un film fin de carbone et possédant différentes tailles de maille puisque les grilles sont perforées et sont appelées « grilles à trous ». L'agent contrastant est ajouté une fois l'échantillon adsorbé : le plus communément utilisé est l'acétate d'uranyle. L'excès d'échantillon et d'agent de contraste sont absorbés par un papier filtre. L'acétate d'uranyle se fixe sur les particules qui composent notre échantillon. Une fois séchées, les grilles peuvent être introduites dans un microscope à coloration négative pour visualiser le complexe protéique étudié. De par la présence d'atomes lourds dans l'agent contrastant et par leur forte masse atomique, ces derniers dévient les électrons du faisceau émit et l'échantillon biologique apparait donc plus clair que ce qui l'entoure (**Figure 61**).

Néanmoins, cette technique présente des limites puisque l'échantillon est adsorbé sur une couche de carbone, ce qui peut déformer et déstabiliser le complexe étudié. De plus, des agrégats de métaux lourds peuvent se former autour de l'échantillon biologique. Pour ces raisons, la limite de résolution de cette technique est atteinte entre 15 et 20 Å.

ii. Par cryo-microscopie électronique (Cryo-ME)

Le piégeage de l'échantillon biologique concernant la technique de Cryo-ME est différent de celui décrit précédemment. Contrairement à la coloration négative, l'échantillon étudié doit être piégé dans une fine couche de glace amorphe afin de préserver l'état natif et l'intégrité de la protéine ou du complexe étudié en solution. En effet, l'échantillon peut être piégé dans différents types de couches d'eau solide : elle peut être (i) hexagonale, (ii) cubique, ou (iii) amorphe ou encore dite vitreuse (**Figure 62**). Seule cette dernière permet de visualiser le complexe et d'acquérir des données de microscopie. L'obtention d'une « bonne glace » fait partie intégrante des étapes d'optimisations de l'échantillon. Cette étape s'appelle aussi « Vitrification » où l'échantillon est « *flash-congelé* » ou « *cryo-congelé* » dans son tampon de purification.

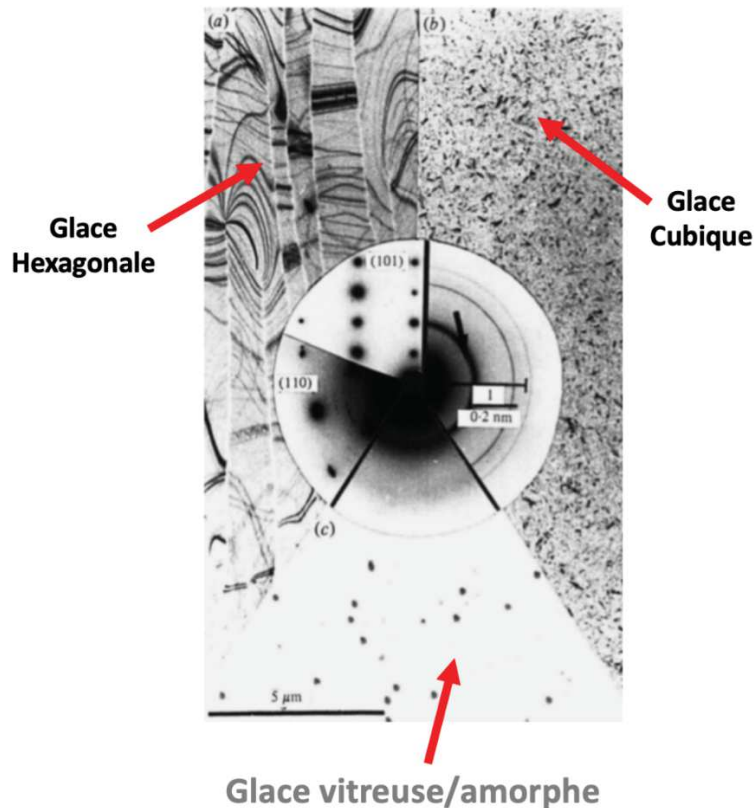


Figure 62 : Les différents états de glace obtenus suite à la cryo-congélation d'un échantillon biologique, *Adaptée de Dubochet et al., 1988.*

Pour préparer une grille de microscopie, l'échantillon y est déposé et l'excédent est absorbé par un papier filtre. Les grilles sont nettoyées au préalable par un solvant (acétate d'éthyle), puis rendues hydrophiles dans le but d'améliorer l'adsorption de l'échantillon sur la surface de la grille par la technique de la décharge lumineuse (« *Glow Discharge* » ou « *Plasma Cleaner* »). Deux types d'appareils existent et permettent de rendre une grille hydrophile : (i) Un premier appareil utilise l'air atmosphérique en dépression de 200 mbar où la grille est placée dans une chambre connectée à un générateur électrique permettant d'ioniser l'air ambiant (ELMO™ Cordouan) (**Figure 63**), (ii) le second appareil est plus récent (Fischione modèle 1070 NanoClean) et permet de définir des pourcentages précis d'un mélange de gaz, notamment l'oxygène et l'argon, pour des expériences plus reproductibles. Les deux types d'appareils sont présents à l'IGBMC/CBI. Dans ce dernier cas de figure, l'ionisation du gaz interne va créer du plasma aboutissant à l'accumulation de charges négatives à la surface des grilles, et ces ions interagissent avec des contaminants organiques de la surface des grilles rendant ainsi le support hydrophile. Toutes les grilles préparées lors de ma thèse pour l'optimisation de la vitrification du complexe purifié hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660 ont subi une ionisation de 30 à 40 secondes à un courant électrique de 2,5 à 3 mA. D'autres types de molécules peuvent être utilisées permettant d'altérer la surface des grilles hydrophobes tel que l'amylamine.

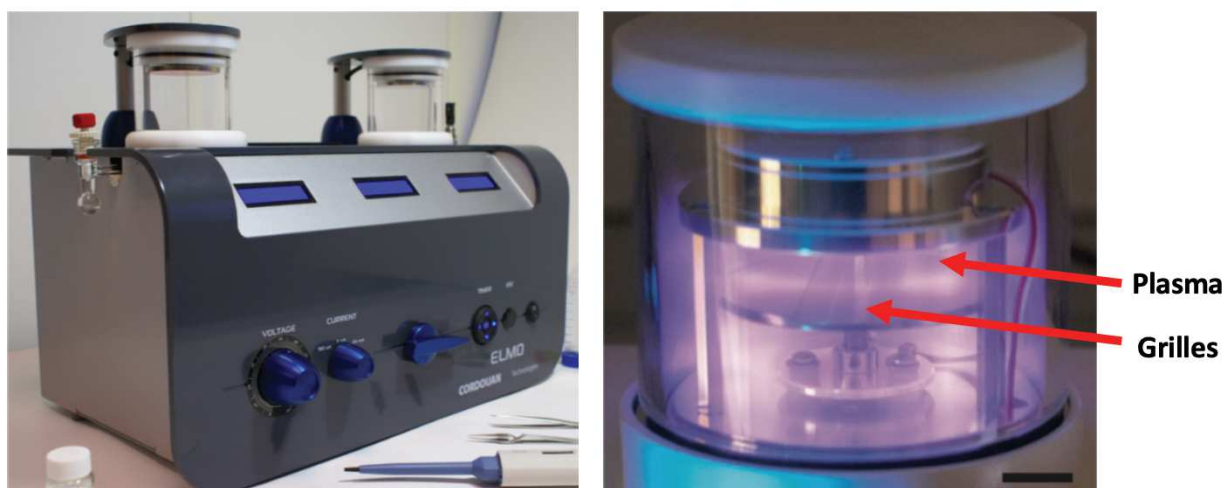


Figure 63 : Exemple d'appareil de décharge lumineuse ou « *Glow Discharge* » permettant l'ionisation de la surface des grilles de microscopie (Appareil ELMO™ Cordouan), présent à l'IGBMC/CBI.

Une fois l'échantillon biologique déposé sur les grilles de microscopie (2 à 5 μ L déposés), ces dernières sont plongées dans l'éthane liquide à -196 °C. Cette étape de cryo-congélation (ou vitrification) est très rapide et de l'ordre de 10^{-4} sec, et se fait grâce à un plongeur semi-automatique nommé Vitrobot crée par FEI. Il existe actuellement d'autres types de plongeurs, notamment celui crée par Leica (EM GP) (**Figure 64**). Ces systèmes semi-automatiques permettent une meilleure reproductibilité des expériences puisque tous les paramètres des plongeurs sont variables et contrôlables (Force de *Blot*, temps de *Blot*, température et taux d'humidité de la chambre...) Ces paramètres font partie intégrante de l'optimisation des conditions de cryo-congélation de l'échantillon étudié. La rapidité de la vitrification dans le tampon de purification de l'échantillon prévient de la formation de glace cristalline et permet de préserver un environnement « hydraté », proche de l'état natif de l'échantillon biologique (glace amorphe formant une couche fine). Si l'échantillon n'est pas vitrifié dans les bonnes conditions de température et de rapidité, cela entraîne la formation de glace hexagonale ou cubique comme décrit précédemment. Une fois congelé, l'échantillon est minutieusement manipulé dans l'azote liquide afin de préserver l'intégrité de la glace amorphe formée avec l'échantillon pour que l'observation de l'échantillon par un cryo-microscope électronique soit possible.

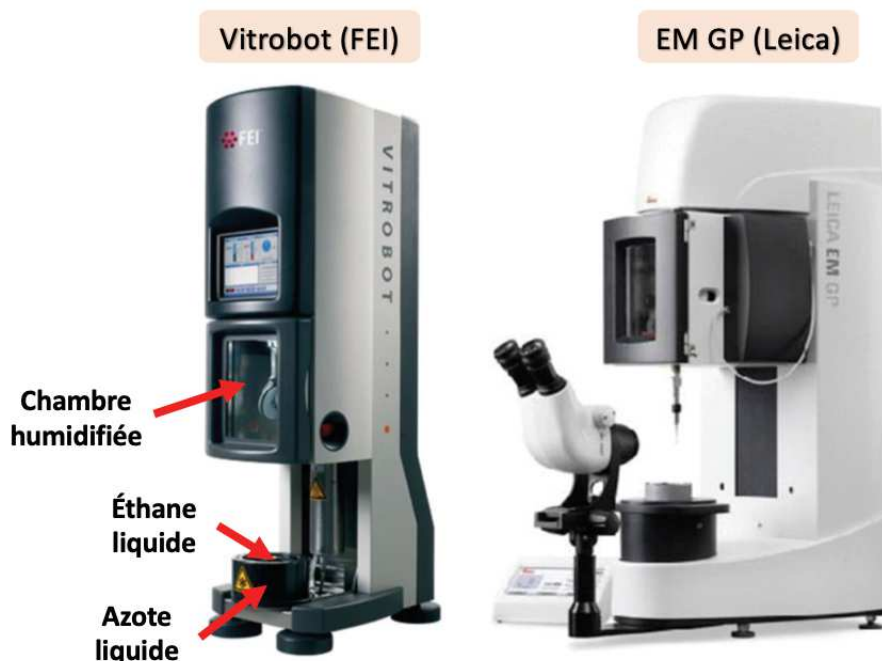


Figure 64 : Deux types de plongeurs semi-automatiques utilisés actuellement pour la cryo-congélation des échantillons biologiques (Vitrobot FEI à gauche et Leica EM GP à droite).

L'étape de la préparation des grilles et de l'obtention d'une couche de glace amorphe et fine est essentielle à l'obtention d'une résolution supérieure à celle observée en coloration négative. L'obtention de bonnes conditions de congélation nécessite plusieurs étapes d'optimisations des conditions expérimentales. Il est essentiel que la glace vitreuse obtenue soit fine, à défaut de dégrader le contraste observé par le microscope. La concentration de l'échantillon, le tampon de purification, la présence ou non de détergents ainsi que la préparation des grilles sont des étapes tout aussi importantes pour l'acquisition des données de microscopie à haute résolution. Ces paramètres conditionnent le contraste, le nombre de particules observées ainsi que leur bonne distribution et homogénéité dans l'espace (surface de la grille). Il faut noter que tous ces paramètres variables sont échantillon-dépendants. Contrairement à la technique de coloration négative, l'échantillon biologique apparaît donc plus sombre que l'environnement qui l'entoure (**Figure 65**).

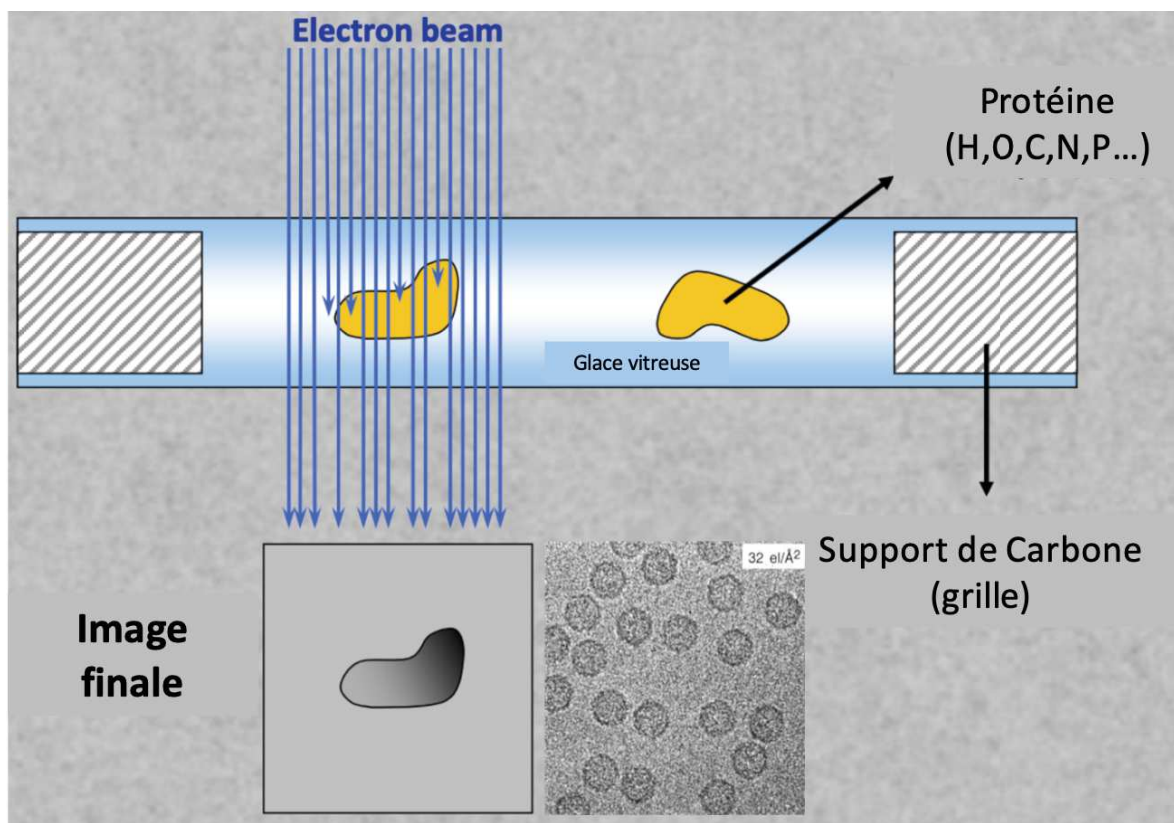


Figure 65 : Schéma global décrivant le principe et le contraste obtenu pour l'étude d'un échantillon biologique par la technique de cryo-microscopie électronique.

Une fois les images de microscopie enregistrées (appelées « micrographes »), plusieurs étapes de traitements sont nécessaires afin d’avoir des informations structurales du complexe étudié et d’obtenir un modèle structural contenant des informations dans les trois dimensions de l’espace. En effet, les particules observées sont empilées afin de former des classes 2D contenant des informations à différentes orientations, et par des projections de ces orientations dans l’espace 3D, on peut générer une structure 3D (**Figure 66**).

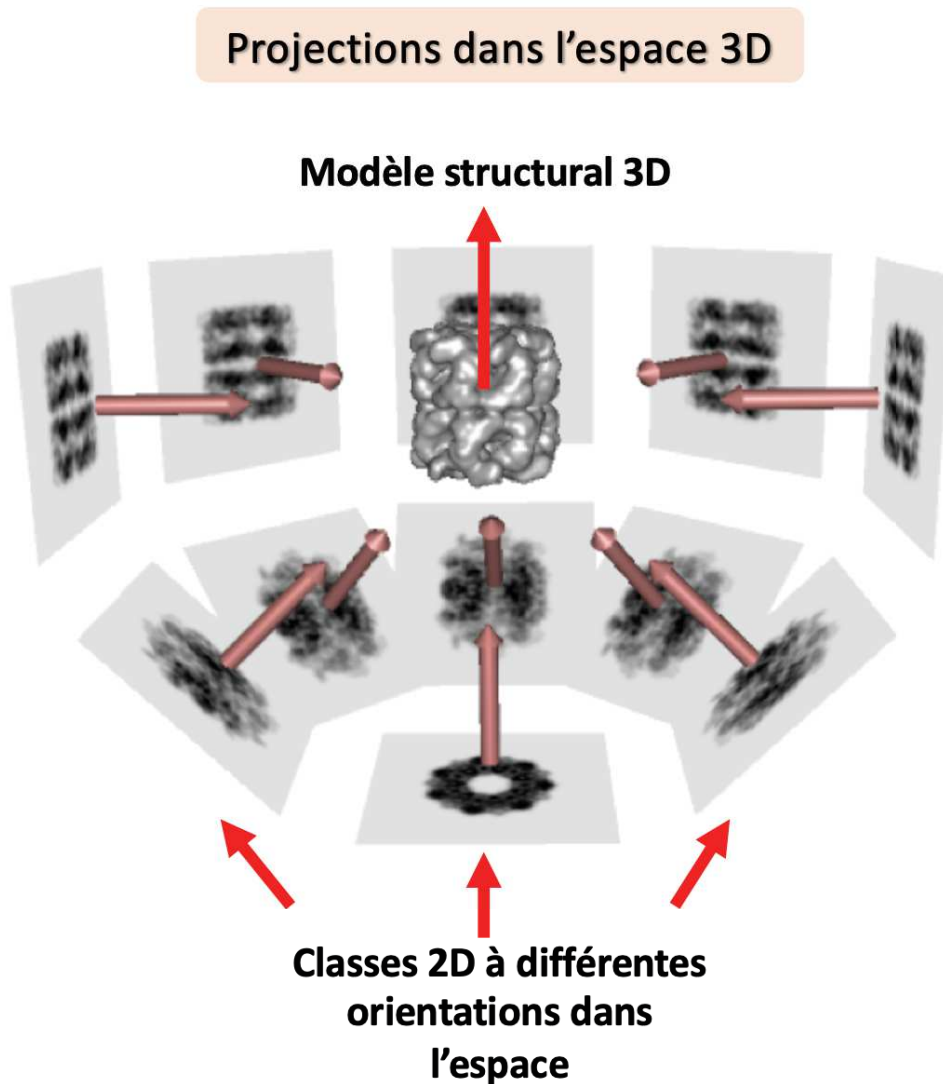


Figure 66 : Schéma du processus de projections des classes 2D dans différentes orientations de l’espace permettant de générer un modèle 3D contenant des détails structuraux dans les 3 directions de l’espace.

4. Caractérisation structurale du complexe entier hPPAR γ 2-RXR α -MED1 : Résultats et discussion

a. La coloration négative

Des essais de coloration négative ont été réalisés pour le complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660 dont la purification a été décrite p.265, **Annexe 1**. Un microscope de type CM120 (Philips) de l'IGBMC/CBI a été utilisé pour l'acquisition de micrographes et des grilles en cuivre supportées par un film de carbone ont été utilisées (de différentes tailles de maille). L'agent de contraste utilisé est l'acétate d'uranyle. De plus, diverses conditions expérimentales ont été testées : (i) de réticulation ou « *crosslinking* » au glutaraldéhyde à concentration finale de 0,1 % (stabilisant les interactions protéiques en créant des ponts artificiels entre les groupements aminés libres), (ii) la présence ou non de détergent de type DDM (gradient de 0,001 à 0,005 %), ou encore (iii) différentes concentrations du complexe. Seule la présence de détergent semble améliorer le contraste et l'homogénéité du complexe sur les grilles (**Figure 67**). Cependant, quel que soit la condition, le complexe ne semble pas intègre dans les conditions expérimentales de la coloration négative. Il est très difficile de conclure quant à la stabilité du complexe en solution et aux conditions de purifications en utilisant cette méthode.

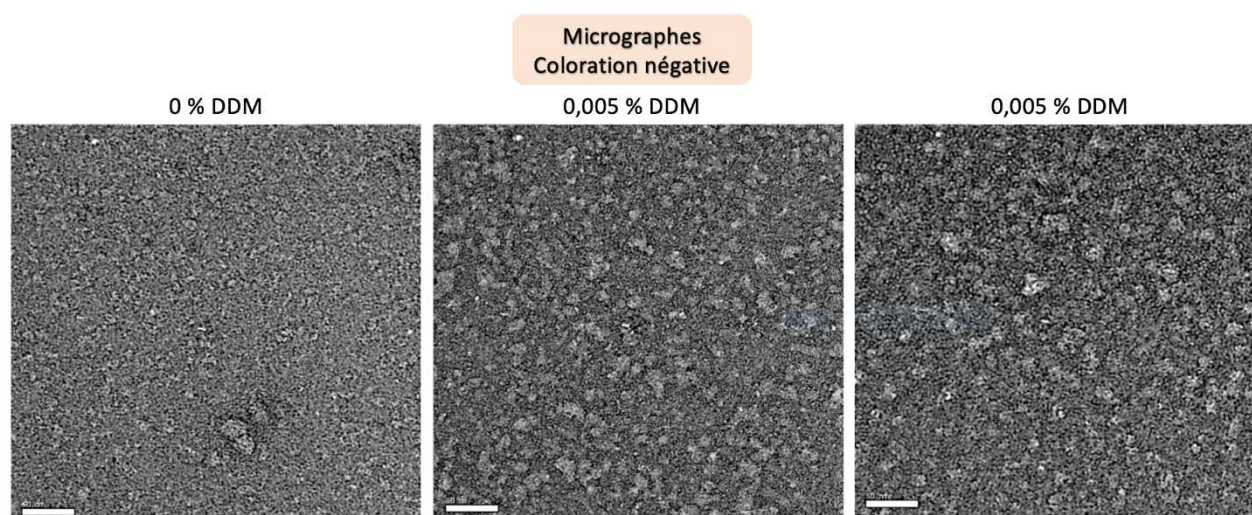


Figure 67 : Différents micrographes obtenus du complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660 dans des conditions variables par la méthode de coloration négative à l'acétate d'uranyle par le microscope de coloration négative CM120 de l'IGBMC.

b. La Cryo-ME

La microscopie en coloration négative ne permettant pas de conclure quant à la stabilité du complexe, nous sommes directement passés à des tests de criblages de l'échantillon biologique par cryo-microscopie électronique.

i. Les grilles :

Le choix des grilles utilisées pour une acquisition de données de cryo-microscopie électronique est une étape à part entière en termes d'optimisations des conditions expérimentales. Une grande partie a été consacrée à l'optimisation de ce choix pour le complexe étudié hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660. Ces essais ont été faits avec la construction n°2 de l'hétérodimère hPPAR γ 2-RXR α exprimé dans les cellules d'insectes de type SF21, où l'hétérodimère est co-purifié avec le fragment du coactivateur MED1/TRAP220/DRIP205 50-660 exprimé parallèlement en cellules d'insectes de type SF9 dans une construction distincte comme décrit dans la stratégie 3, **Partie 2 « Caractérisation biochimique du complexe PPAR-RXR »**.

Le choix des grilles a un effet sur la distribution des particules sur le support solide, ainsi que sur l'état d'agrégation du complexe. Différents types de grilles commerciales sont disponibles sur le marché et ont une organisation générale similaire (**Figure 68**) ; certaines sont plus adéquates que d'autres dépendamment de l'échantillon étudié et du microscope utilisé.

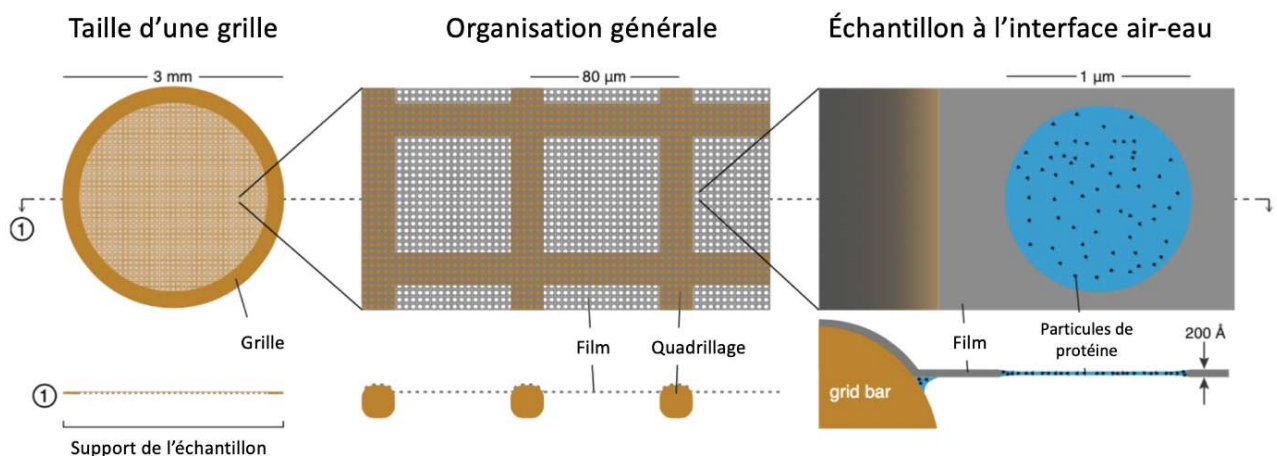


Figure 68 : Schéma en coupe de l'organisation générale d'une grille de microscopie à maille métallique et quadrillée servant de support à l'échantillon étudié, **Adaptée de Russo and Passmore, 2016.**

Les grilles Quantifoil de cuivre et de rhodium (Cu/Rh) ont été les plus utilisées lors de la phase d'optimisation des grilles de l'échantillon purifié hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660. De nombreuses variantes de ces grilles existent dont trois types préférentiellement utilisés : (i) Quantifoil R1.2/1.3, (ii) les Quantifoil R2/2 et enfin (iii) les Quantifoil R3.5/1 où le premier chiffre correspond à la taille du trou perforé sur les grilles, et le second, à l'espacement entre les trous en μm . Des versions de ces grilles en or existent et ont également été testées pour stabiliser le complexe dans les conditions de cryogénéisation. En effet, les grilles en or permettent une moindre déviation du faisceau d'électrons et donc une meilleure stabilité lors de l'acquisition. Enfin, des grilles de type *C-flat* ont également été utilisées et sont recouvertes d'une feuille de carbone mais plus plates que les grilles Quantifoil, même si elles restent similaires. Elles ne contiennent pas de film plastique de protection et ne nécessitent pas d'étapes de lavages au solvant, l'acétate d'éthyle.

Afin d'apprécier la qualité de la préparation des grilles, des étapes de criblages ont été nécessaires et réalisées à l'aide d'un microscope disponible à l'IGBMC : le Teknai Polara équipé d'une caméra de type Falcon II. Cette étape cruciale permet d'apprécier plusieurs paramètres : l'épaisseur et la phase de la glace, l'uniformité et l'homogénéité du complexe sur le support des grilles, la concentration protéique ou encore la stabilité et l'intégrité du complexe après l'étape de cryo-congélation. Les grilles retenues après l'étape de criblage pour le complexe permettant l'obtention d'une bonne épaisseur de glace amorphe sont les grilles de types Quantifoil Cu/Rh R1.2/1.3 et R2/2.

C'est une étape clé avant le passage à l'ultime phase d'acquisition de données à haute résolution par le microscope Titan Krios disponible à l'IGBMC/CBI.

ii. La cryogénéisation du complexe purifié

Les deux plongeurs de types Vitrobot de FEI et EM GP de Leica décrits précédemment ont été utilisés afin d'optimiser et d'augmenter la reproductibilité de la préparation des grilles de microscopie. Ces derniers possèdent un compartiment contenant l'éthane liquide dans lequel sont plongées les grilles après le dépôt de l'échantillon biologique. Ce compartiment est entouré d'azote liquide permettant le maintien de la température optimale à la cryo-congélation de l'éthane liquide. L'échantillon est déposé sur les grilles situées dans la chambre

des plongeurs où la température et le taux d'humidité sont contrôlés. Pour le complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660, un taux d'humidité compris entre 90 et 100 % est appliqué, et le dépôt d'échantillon est réalisé à une température de 4 à 10 degrés Celsius. L'échantillon est déposé en une seule ou plusieurs fois sur la grille à un volume variant de 2 à 5 μ L.

Certaines études ont démontré l'amélioration de la densité des particules observées sur les micrographes en appliquant et en absorbant par « *blotting* » plusieurs fois l'échantillon purifié (Snijder et al., 2017), notamment pour les complexes de petit poids moléculaire comme hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660 (170 kDa). Cette méthode permet donc de reconcentrer l'échantillon directement sur la grille de microscopie (Figure 69). En effet, très peu de particules étaient présentes à l'interface air-eau (glace vitreuse), et cette méthode a été testée lors de l'optimisation de l'étape de vitrification. Néanmoins, un fort taux d'agrégation de l'échantillon est observé, ainsi que la présence de contaminants supérieure à la normale. Les conditions expérimentales seraient plus optimales et plus reproductible à l'aide d'un système robotisé plutôt que le biais introduit par l'expérimentateur lors de ces manipulations minutieuses. Un système de ce type n'est pas encore disponible au laboratoire.

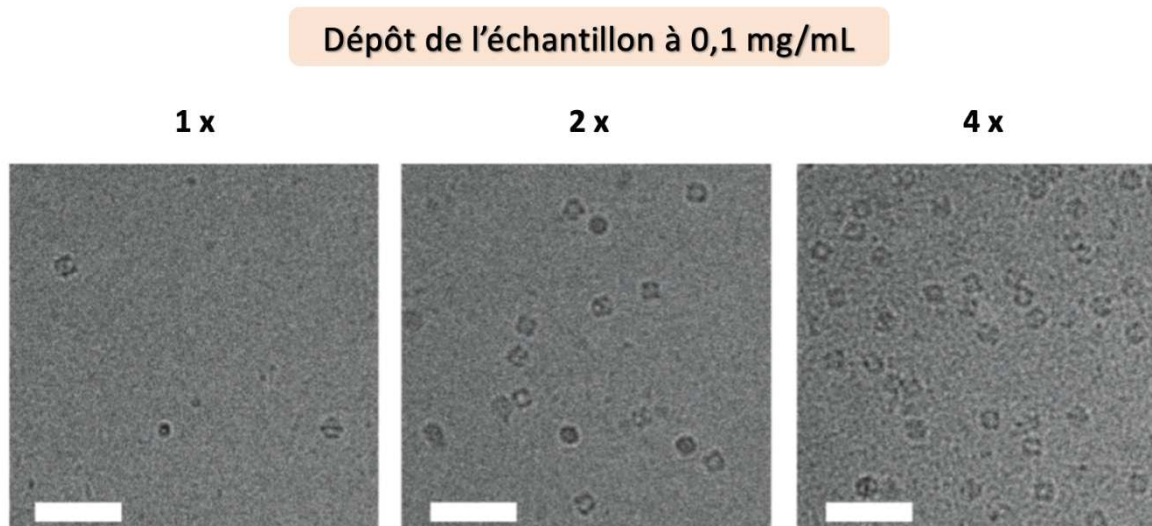


Figure 69 : Effet de multiples étapes de dépôts de l'échantillon protéique sur les grilles et les micrographes obtenus de l'échantillon concentré à 0,1 mg/mL, **Adaptée de Snijder et al., 2017.**

Les meilleures conditions retenues après plusieurs étapes d'optimisations de la préparation de l'échantillon et de sa vitrification avant l'étape d'acquisition sont les suivantes :

- Grilles Quantifoil Cu/Rh R2/2
- Ionisation de 30 sec des grilles à une tension appliquée de 2,5 mA
- Ajout de 0,005 % de détergent DDM à l'échantillon purifié
- Taux d'humidité de la chambre du plongeur (Vitrobot) : 95 %
- Température : 10 °C
- Temps d'absorption de l'échantillon (Temps de *Blot*) : 1,5 sec
- Force d'absorption de l'échantillon (Force de *Blot*) : 8

Un premier criblage de grilles de microscopie est réalisé sur un microscope présent à l'IGBMC/CBI : un microscope Teknai F30 Polara de FEI, équipé d'une caméra de type Falcon II. Toutes les conditions sont reproduites sur deux grilles différentes : un premier essai au microscope Teknai F30 Polara (**Figure 70A**) (tension de 100 kV pour augmenter le contraste), puis le second essai si les conditions sont optimales est réalisé sur le microscope de type Titan Krios (tension 300 kV) pour une acquisition à haute résolution (**Figure 70B**).

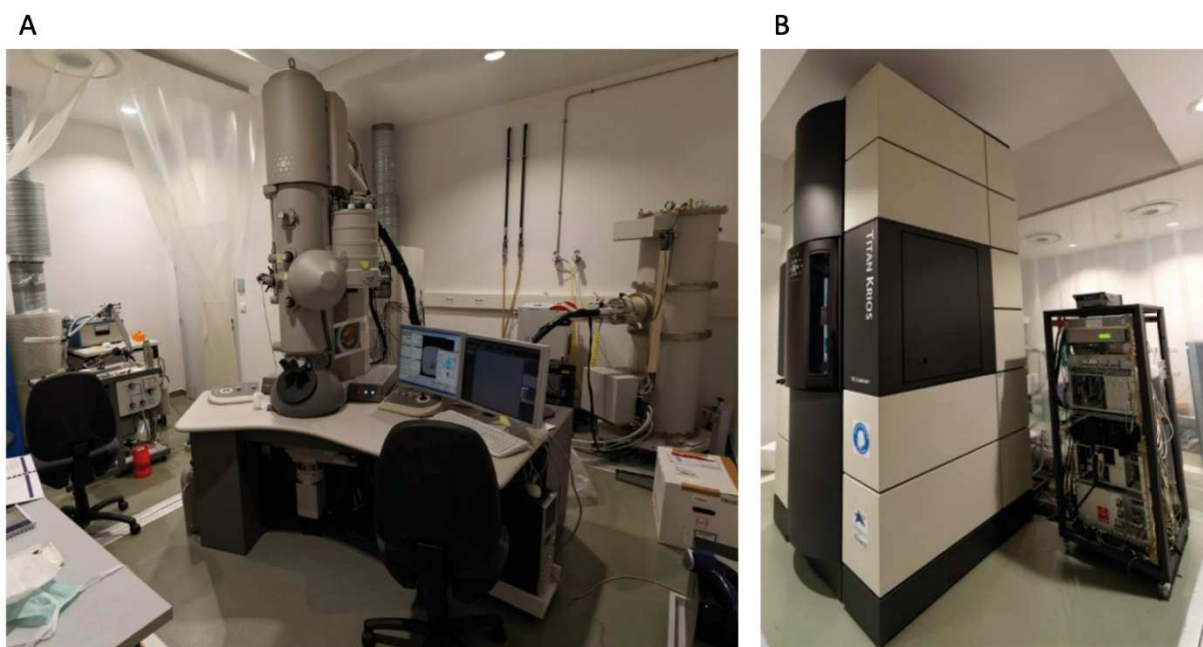


Figure 70 : Cryo-microscopes électroniques présents à l'IGBMC/CBI, **A** : Teknai F30 Polara, **B** : Titan Krios, photographies prises au sein de l'institut IGBMC.

iii. L'acquisition des images de microscopie électronique du complexe étudié

Un échantillon biologique est sensible aux dommages causés par le faisceau d'électrons émis par le microscope. L'exposition prolongée de l'échantillon induit la formation de radicaux libres aboutissant à la destruction progressive de l'échantillon étudié. Pour répondre à cette limite, les acquisitions sont réalisées dans un mode dit de « faible dose », permettant l'irradiation douce de l'échantillon à une dose totale d'électrons contrôlée. Afin de ne pas irradier l'échantillon inutilement, plusieurs étapes sont nécessaires avant de choisir une zone à irradier et une valeur de défocalisation adéquate à l'observation des particules d'intérêt. Néanmoins, l'utilisation de ce mode à faible dose d'irradiation impose un faible rapport signal/bruit (SNR ou *Signal to Noise Ratio*) dans les micrographes enregistrés lors de l'acquisition. Pour répondre à ce problème, un grand nombre d'images contenant un nombre élevé de particules sont nécessaires au traitement des données qui aboutiront à l'obtention d'un modèle tridimensionnel à haute résolution.

Toutes les conditions lors des étapes d'optimisations sont observées au préalable sur le microscope Teknai F30 Polara afin de choisir la condition adéquate à l'acquisition de données à plus haute résolution. Il est possible d'obtenir un premier modèle structural à basse résolution après une acquisition de données sur ce microscope, mais cela n'a pas pu être réalisé pour le complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1₅₀₋₆₆₀. Le complexe possède un poids moléculaire relativement bas, et la caméra Falcon II ne permet pas d'observer à fort contraste les particules et de pouvoir obtenir un premier modèle 3D du complexe. En effet, cette étape permettait d'apprécier la qualité et l'homogénéité de l'échantillon, ainsi que la dispersion et la densité des particules à la surface des grilles. Lors des étapes de criblages sur ce microscope, la tension appliquée était toujours de 100 kV afin d'augmenter le contraste et pouvoir observer des particules très petites à différents grossissements (56 000 et 93 000 fois). Plusieurs valeurs de défocalisation sont appliquées afin de visualiser au mieux les particules (plage de - 0,5 à -5 μ m). Le montage et le criblage des grilles se fait manuellement, et le logiciel d'automatisation du microscope utilisé est EPU (logiciel appartenant à FEI).

Une fois qu'une condition paraît optimale, une acquisition de données sur le microscope Titan Krios est réalisée. Lors de ma thèse, le microscope était équipé d'une caméra

de type Falcon III et d'une deuxième caméra de type Gatan K2 Summit. Il est aussi équipé d'un correcteur Cs et d'une phase plate (VPP pour *Volta Phase Plate*) permettant d'améliorer le contraste des images enregistrées en induisant un décalage de phase des électrons (Danev et al., 2017) (von Loeffelholz et al., 2018). Ce microscope est uniquement destiné à l'acquisition de données à haute résolution et utilisé à une tension de 300 kV. Un ordinateur de pilotage du microscope est utilisé afin de limiter les manipulations manuelles, et le logiciel de pilotage utilisé lors de ma thèse est le logiciel Serial EM. Deux acquisitions de données du complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660 ont été réalisées sur le microscope Titan Krios. Il faut noter que le complexe purifié est au préalable incubé avec les ligands agonistes GW1929 et l'acide 9-*cis* rétinoïque, ainsi que de l'élément de réponse à l'ADN du gène *FABP4*. La présence des ligands et de l'ADN permet d'augmenter la stabilité du complexe en solution. De plus, la présence d'ADN permet d'augmenter le contraste des images de microscopie.

Les principaux paramètres retenus pour l'acquisition des données à haute résolution sur le microscope Titan Krios pour le complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660 sont résumées dans le **Tableau 3**. La première acquisition a permis d'obtenir 900 micrographes.

Paramètres	
Microscope	Titan Krios
Voltage (keV)	300
Grossissement	105 000
Dose d'électrons (e ⁻ /Å ²)	50
Détecteur/caméra	Gatan K2 Summit (mode super-résolution)
Taille de Pixel (Å/pixel)	1,1 (0,55)
Défoc (μm)	- 0,5
VPP <i>Volta Phase Plate</i>	Active

Tableau 3 : Paramètres des données enregistrées au microscope Titan Krios pour le complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660, ses ligands (GW1929 et 9*cis*-RA) et son élément de réponse à l'ADN (*FABP4*).

Cette première acquisition m'a permis d'apprendre le traitement de données de microscopie et de pouvoir me former à plusieurs logiciels utilisés. Néanmoins, les données n'étaient pas

exploitables à cause d'un problème d'hétérogénéité de l'échantillon observé, et d'un fort taux d'agrégation (**Figure 71**).

Pour répondre à ce problème, des étapes d'optimisations supplémentaires ont été nécessaires. Pour ce faire, des grilles de microscopie du complexe purifié ont été préparées suite à la purification d'un nouvel échantillon du complexe entier plus concentré. Les grilles optimales sont de type R2/2, et ionisées 30 secondes à 2,5 mA. La vitrification par le plongeur de type Vitrobot a été réalisée à 10 °C, à 95 % d'humidité, un temps de *blot* de 1,5 sec, et enfin une force de *blot* de 8. Des premiers tests de criblage réalisés par le microscope Teknai F30 Polara montrent une meilleure répartition des particules, une glace vitreuse fine, ainsi qu'une densité à la surface des grilles de ces derniers supérieure aux essais précédents. Une seconde acquisition est réalisée sur le microscope Titan Krios suite à l'optimisation des conditions expérimentales de la cryogénéisation des grilles.

Des fractions de plus haute concentration (0,5-0,6 mg/mL) du complexe purifié (**p. 265, Annexe 1**) et des grilles R2/2 ainsi que R1.2/1.3 sont préparées par le plongeur Vitrobot pour une acquisition de données. Parmi les grilles observées au microscope Titan Krios, des images rapides sont enregistrées permettant de visualiser l'état général de la grille entière, l'état de la glace ainsi que son épaisseur : cette étape correspond à l'enregistrement d'une image de la grille de microscopie à faible grossissement appelée « Atlas ». Quand l'atlas est de bonne qualité, le choix des trous des grilles dans lesquels les images vont être enregistrées est la prochaine étape. Pour cette étape, 668 trous ont été sélectionnés pour l'acquisition.

Les paramètres définis pour l'acquisition des données au microscope Titan Krios correspondent aux mêmes paramètres cités lors de la première acquisition (**Tableau 3**).

Deux jours d'acquisition sont nécessaires pour enregistrer 3425 images ou encore des « *movie frames* » (multiples sous-images enregistrées pendant l'acquisition d'un micrographe) par un logiciel automatique nommé Serial EM. Les micrographes extraits de ces « *movie frames* » permettent d'observer une meilleure répartition des particules à l'interface air-eau de la glace vitreuse obtenue, un taux d'agrégation du complexe nettement inférieur que précédemment, ainsi qu'une densité de particules un peu plus élevée, mais néanmoins toujours insuffisante

(Figure 72). Les particules d'intérêt semblent en forme de L allongé comme lors de la première session (Figure 71 et 72).

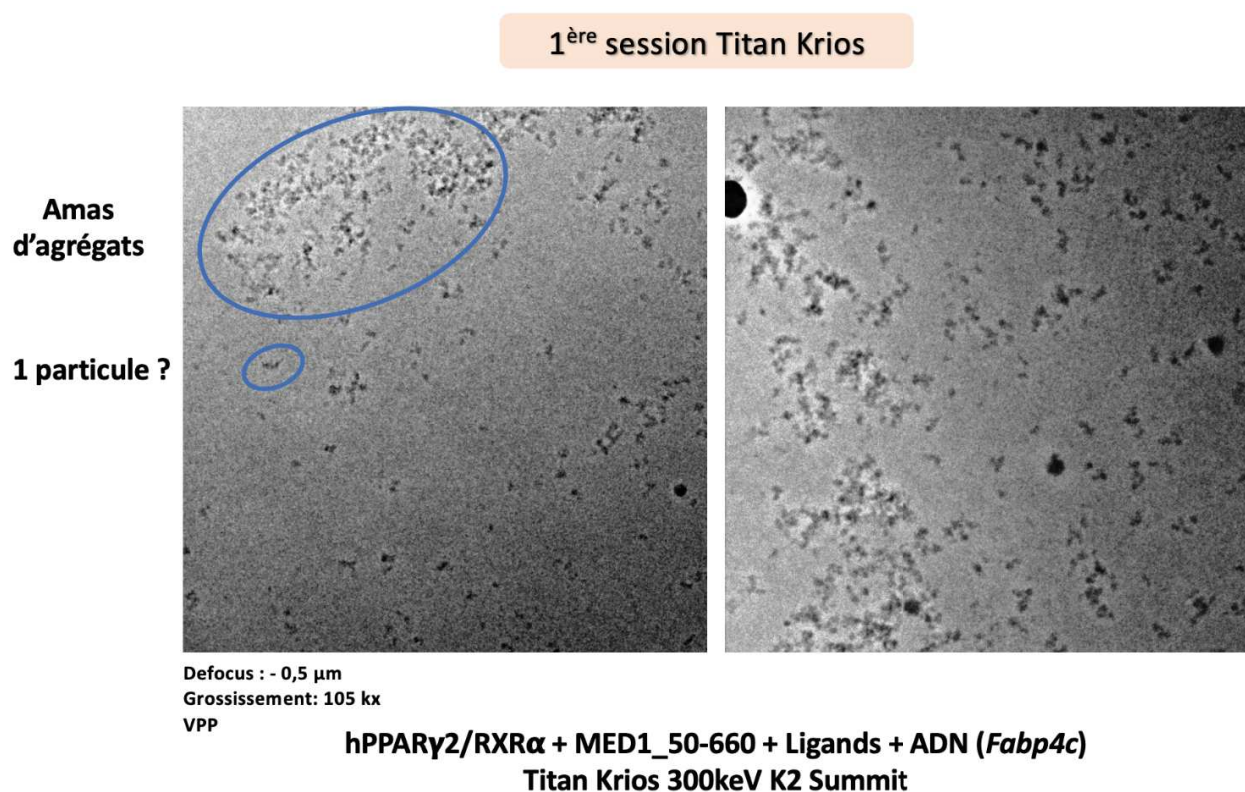


Figure 71 : Exemples de micrographes obtenus après la première session d'acquisition de données pour le complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660 par le cryo-microscope électronique Titan Krios à un grossissement de 105 kx.

c. Traitement des images et reconstruction 2D/3D

i. Tri des micrographes et sélection des particules

Ces « *movie frames* » sont alignées et empilées les unes sur les autres avec un logiciel (MotionCor2) automatiquement lors de l'acquisition des données par le microscope (Zheng et al., 2017). Le défocus ainsi que le décalage de phase engendré par l'utilisation de la phase plate VPP sont calculés pour la correction qui doit être réalisée de la Fonction de Transfert de Contraste (FTC). Pour se faire, le logiciel CTFIND (Mindell and Grigorieff, 2003) (Rohou and Grigorieff, 2019) et GCTF (Zhang, 2016) ont été testés distinctement afin d'optimiser la

correction (**Figure 73**). On observe un nombre de particules relativement bas, le ratio signal sur bruit reste faible (SNR) ce qui signifie que le contraste observé est faible, la correction de cette FTC est donc difficile dans ce cas.

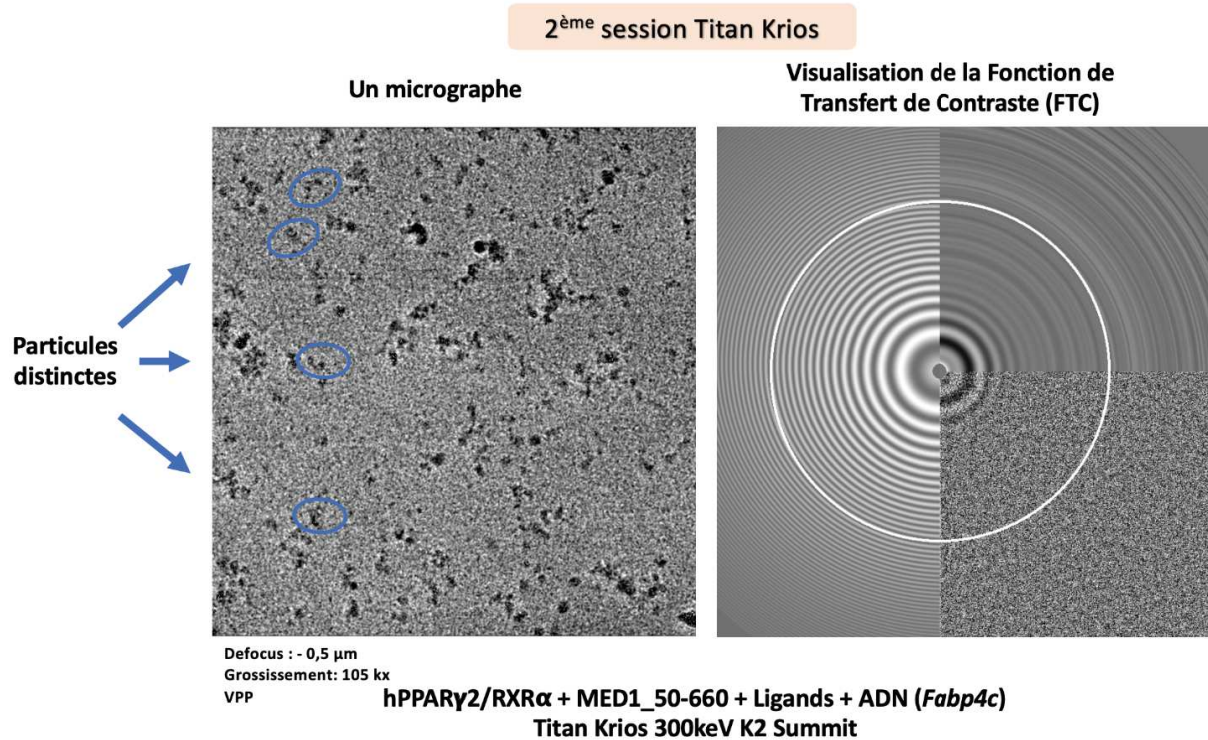


Figure 72 : Exemple d'un micrographe obtenu après la deuxième session d'acquisition de données pour le complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660 par le cryo-microscope électronique Titan Krios à un grossissement de 105 kx, à droite le micrographe, à gauche la visualisation de la fonction de Transfert de Contraste corrigée par MotionCor2.

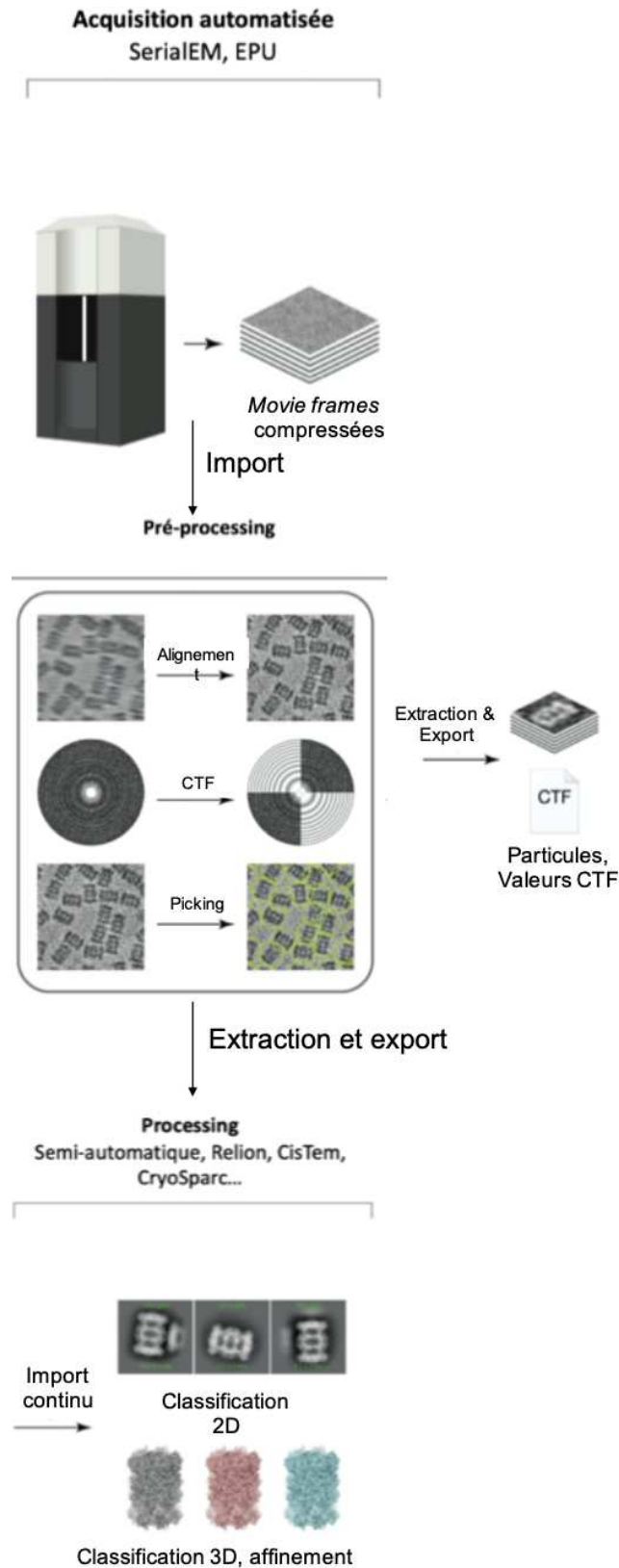


Figure 73 : Pipeline utilisé pour le traitement de données de microscopie de l'étape d'acquisition au Titan Krios jusqu'à l'étape de reconstruction de la structure 3D de l'objet étudié, **Adaptée de Tegunov and Cramer, 2018.**

La qualité de chaque micrographe est inspectée manuellement et visuellement dans l'espace réel ainsi que dans l'espace réciproque ou espace Fourier, par un logiciel nommé EMAN2, un logiciel de traitement de données de microscopie semi-automatique adapté aux données de cryo-ME (Ludtke et al., 1999) (Tang et al., 2007). Seuls les micrographes exploitables pour les prochaines étapes de traitement des données sont gardés. Les particules sont sélectionnées dans un premier temps automatiquement par le logiciel EMAN2 mais cela n'a pas correctement fonctionné (toutes les particules sélectionnées ne sont pas homogènes ni en taille ni en forme). Cette étape est aussi appelée « *picking* » et fait partie de l'étape de prétraitement de données ou encore « *pre-processing* ». Pour répondre à ce problème, j'ai procédé manuellement à la sélection des particules en forme de L allongé qui correspondent potentiellement à la forme attendue du complexe entier hPPAR γ 2-RXR α lié au fragment du coactivateur MED1_50-660. La sélection des particules manuellement a permis d'observer que le complexe se dissociait lors de la cryogénération puisque toutes les particules ne sont pas de forme ni de taille similaire. Seules les particules allongées en forme de L ont été sélectionnées pour l'étape de « *processing* » puisque cela est en accord avec la topologie d'un complexe de récepteurs nucléaires ([Cf Introduction Chapitre 1](#)). Seules 49 225 particules sur 135 000 sélectionnées au préalable automatiquement par EMAN2 ont pu être utilisées pour l'étape de classification 2D.

ii. La classification 2D et modèle 3D initial

Comme dit précédemment, une sélection de 49 225 particules a été réalisée manuellement grâce au logiciel EMAN2 pour un meilleur centrage par rapport à la procédure automatique. Une fois les particules « *pickées* », les données liées aux particules sont extraites et exportées pour calculer la valeur de la FTC de chaque image obtenues (corrigées au préalable) afin de générer des classes 2D (**Figure 73**). Pour se faire, plusieurs logiciels ont été utilisés lors de ma thèse pour obtenir les meilleures classes 2D. Tout d'abord, la version du logiciel Relion 2.0.3 (Scheres, 2012) a été testée pour une analyse en mode « semi-automatique ». D'autres logiciels de traitement de données de microscopie ont été inaugurés lors de ma thèse tels que le logiciel cisTEM (Grant et al., 2018) ou encore CryoSparc (Punjani et al., 2017).

Ces particules une fois triées, sont fragmentées en plusieurs groupes afin d'optimiser la phase de calculs. L'analyse a été réalisée en 25 cycles itératifs pour 100 classes 2D demandées. Seules 40 classes paraissent exploitables pour les prochaines étapes. Ces étapes de « *processing* » ont parallèlement été réalisées par deux logiciels : Relion 2.0.3 et cisTEM. Le logiciel Relion 2.0.3 en mode semi-automatique permet de définir tous les paramètres à chaque étape du traitement des données. Des optimisations des différents paramètres étaient nécessaires de par la difficulté et la complexité du jeu de données du complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660. Dû à l'hétérogénéité et à la dissociation du complexe dans les conditions expérimentales établies, le traitement des données par le logiciel Relion est compromis. Malgré plusieurs essais et plusieurs optimisations, les classes 2D obtenues ne permettent pas d'aller plus loin dans le processus d'analyses. Il est donc impossible de générer un modèle tridimensionnel initial.

Parallèlement au traitement des données par le logiciel Relion, un autre logiciel a permis quant à lui d'obtenir des classes 2D de meilleures qualités : cisTEM. Pour se faire, une première étape de « *picking* » d'une centaine de particules manuellement est nécessaire pour aider le logiciel à choisir la bonne forme de particules souhaitées. Puis, basé sur ce modèle de particules, le logiciel continue l'étape de « *picking* » automatique. Le logiciel cisTEM permet de sélectionner 94 021 particules pour générer 100 classes 2D (**Figure 74**).

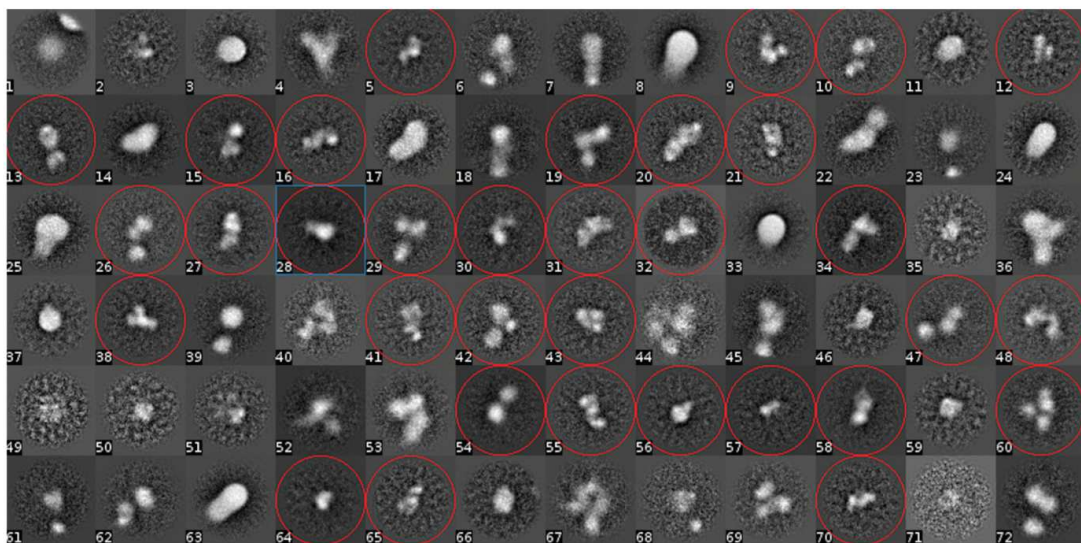


Figure 74 : Exemples de classes 2D obtenues par le logiciel cisTEM à partir de 94 021 particules sélectionnées au départ pour générer 100 classes 2D, Relion2.0.3.

On peut visualiser la forme globale allongée en L du complexe des classes 2D obtenues où le complexe semble adopter plusieurs orientations (**Figure 75**). Seules certaines classes sont sélectionnées pour générer un modèle 3D initial. Néanmoins, trop peu de « bonnes » particules après un tri drastique sont utilisées pour ces classes, et un nombre réduit de classes 2D a permis d'obtenir un premier modèle 3D initial (**Figure 75**), mais ce dernier permet de visualiser la forme de l'enveloppe globale du complexe à basse résolution, mais ne permet pas d'aller plus loin dans le traitement des données, notamment l'étape d'affinement 3D nécessaire. Une série de cycles itératifs a néanmoins été réalisée, mais une structure lissée sous forme de « blob » sans aucun détail structural a été obtenu, et donc sans succès. On ne peut donc pas déterminer de façon certaine que ce modèle initial 3D obtenu correspond au complexe entier constitué de trois partenaires protéiques ainsi que d'une séquence d'acides nucléiques correspondant à l'élément de réponse PPRE du gène *FABP4*.

L'absence d'informations structurales plus précises est probablement due d'une part (i) à la trop faible proportion de particules et de classes 2D obtenues au préalable, et d'autre part (ii) à l'alignement des particules qui n'est pas encore assez précis en vue du faible nombre de particules exploitables extraites précédemment.

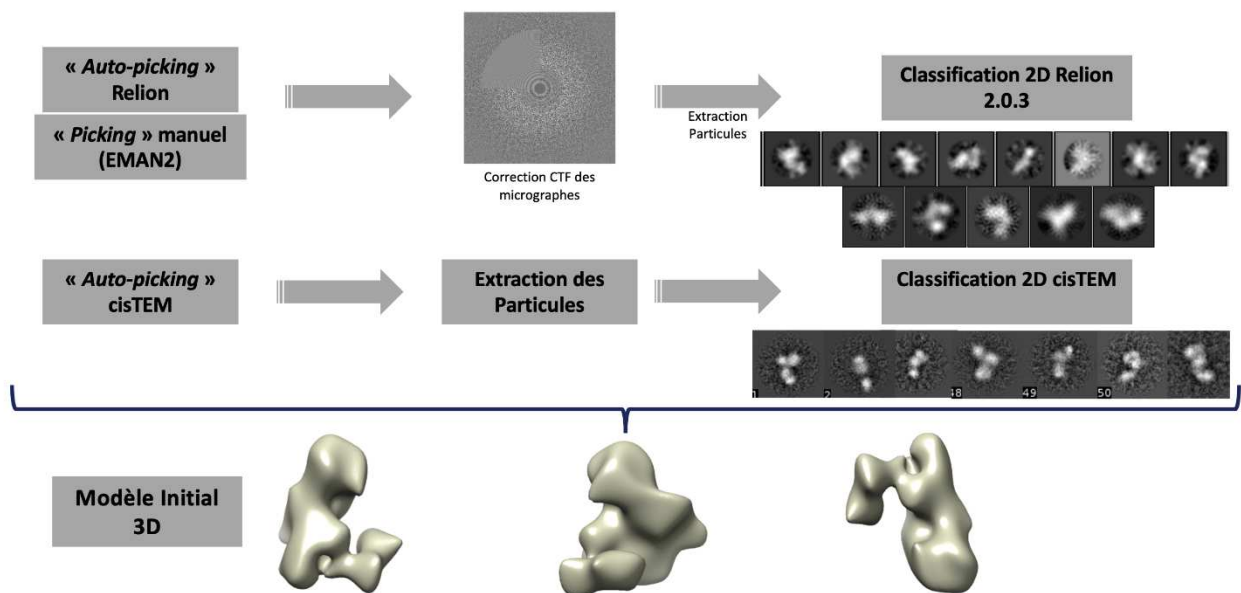


Figure 75 : Traitement des données après la deuxième acquisition au cryo-microscope électronique Titan Krios parallèlement par deux logiciels : Relion 2.0.3 et cisTEM pour générer des classes 2D du complexe étudié.

iii. Limites de l'étude par cryo-microscopie électronique du complexe

Un problème de stabilité du complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660 a été rencontré dans les différentes conditions expérimentales testées. Cette instabilité est due à la fois à (i) la dissociation du complexe en solution d'une part, (ii) et la dissociation lors de sa vitrification d'autre part. C'est pourquoi, les images enregistrées présentent une hétérogénéité accrue et ne permettant pas d'aller plus loin dans l'analyse structurale attendue.

Néanmoins, il a été intéressant d'essayer le traitement des données malgré les difficultés rencontrées. Cela a permis d'appréhender les étapes nécessaires à l'analyse des données de microscopie ainsi que les logiciels utilisés par la communauté scientifique. Ainsi, j'ai pu découvrir les nouvelles technologies utilisées tel que la « *Volta Phase Plate* » (VPP) ou phase plate qui permet d'apprendre à traiter les données autrement puisque son utilisation modifie les étapes d'analyses à cause du décalage de phase induit par son utilisation.

5. Conclusions et perspectives

a. Caractérisation biochimique

i. Conclusions

L'expression et la purification du complexe protéique composé de l'hétérodimère hPPAR γ 2-RXR α appartenant à la famille des récepteurs nucléaires lié au coactivateur transcriptionnel MED1/DRIP205/TRAP220 (entier ou le fragment 50-660) a nécessité une optimisation faisant appel à l'utilisation de plusieurs vecteurs et différents systèmes d'expressions protéiques confrontant (i) le système *Baculovirus* en cellules d'insectes (SF9 et SF21) à celui du (ii) système impliquant le virus de la vaccine (MVA) en cellules de mammifères (BHK21). Cette phase avait pour but l'obtention d'un complexe formé et stable en solution à des fins d'études structurales par cryo-microscopie électronique à haute résolution.

La stratégie la plus efficace testée a été celle où l'hétérodimère hPPAR γ 2-RXR α exprimé en cellules SF21 est co-purifié avec le coactivateur MED1_50-660 quant à lui exprimé en cellules d'insectes SF9. Le complexe de PPAR-RXR est purifié en présence de ligands agonistes

spécifiques de hPPAR γ 2 (GW1929) et à RXR α (Acide 9-*cis* rétinoïque). Pour stabiliser et limiter la flexibilité du complexe, celui-ci a été préparé avec son élément de réponse sur l'ADN, le PPRE du gène *FABP4* (Figure 76).

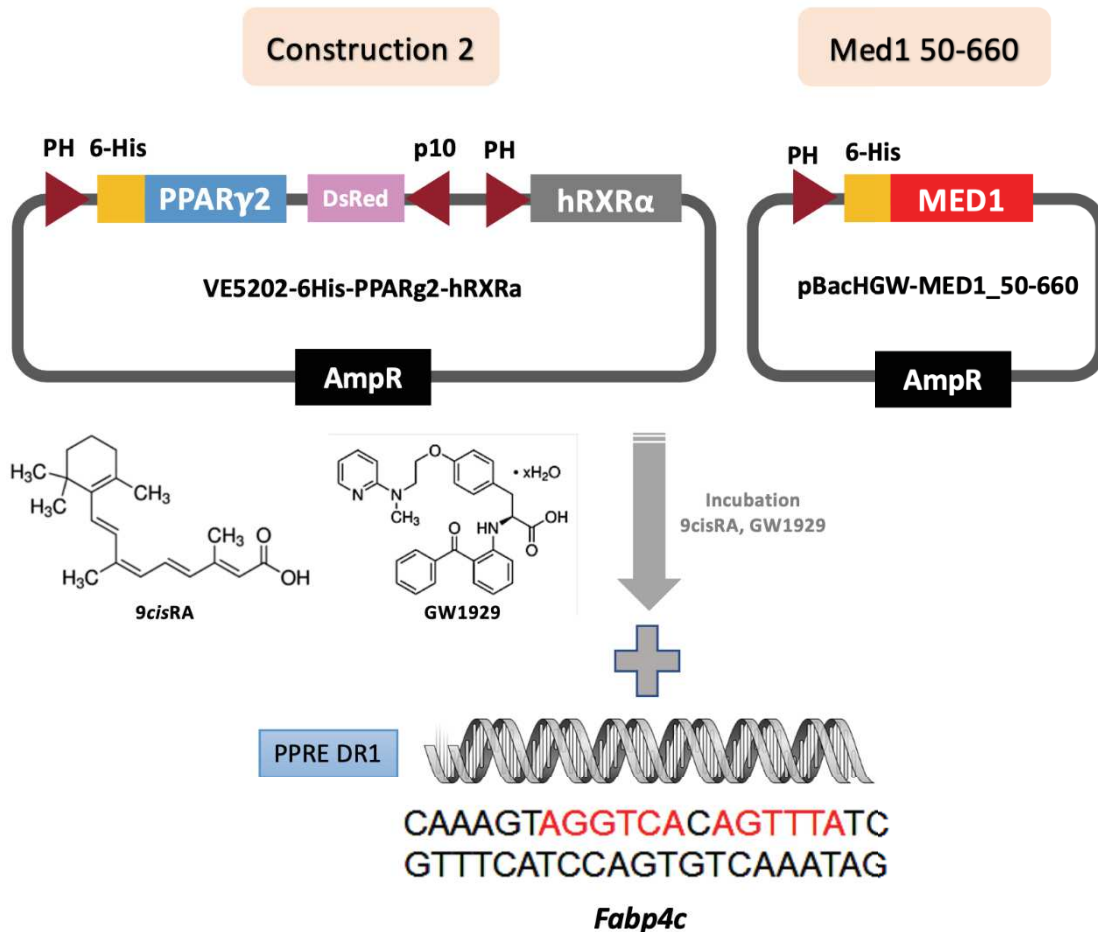


Figure 76 : Schéma récapitulatif de la stratégie choisie pour les études structurales du complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660.

Les différentes purifications, caractérisations biochimiques et essais de microscopie cryo-électronique (criblages et acquisitions) réalisés au cours de ma thèse mènent à un même constat : le complexe n'est pas suffisamment stable en solution dans les conditions testées et sujet à une dissociation sur les grilles. Les complexes de récepteurs nucléaires entiers, toutes familles confondues, forment des structures flexibles et dynamiques, et très peu de données structurales sont disponibles dans la littérature à ce jour. Il n'est donc pas anodin de rencontrer des difficultés de stabilisation des complexes étudiés en solution.

ii. Perspectives

Pour répondre aux problèmes de stabilité et d'obtention d'un complexe intègre en solution, plusieurs solutions sont envisagées.

Concernant les essais préliminaires de l'expression en cellules de mammifères BHK21 dans le système *Vaccina*, une purification à plus grande échelle des différentes constructions sera nécessaire pour conclure quant à l'expression et à l'homogénéité du complexe.

Une fois le complexe obtenu, une solution serait l'utilisation d'agents de réticulation tels que le glutaraldéhyde ou encore l'agent chimique BS3 (bis(sulfosuccinimidyl)suberate) permettant de réticuler les amines entres-elles. Des essais préliminaires de réticulation au BS3 ont été réalisés et n'ont pas été concluants dans les conditions expérimentales utilisées. Il est nécessaire de renouveler l'expérience après l'optimisation de ces dernières.

De plus, une autre méthode peut être utilisée pour augmenter la stabilité du complexe en solution : Un gradient de fixation ou méthode Graftix (Stark, 2010). C'est une étape de purification supplémentaire dans un gradient de glycérol en présence d'un agent de fixation chimique pour un « *crosslink* » au glutaraldéhyde. Cette méthode contient une étape d'ultracentrifugation qui permet de sédimenter les différentes populations du complexe présentes en solution, et par conséquent de les séparer, ce qui peut répondre au problème de l'hétérogénéité de l'échantillon que l'on observe de manière récurrente pour le complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660. Les différentes fractions peuvent être déposées sur gel pour sélectionner la fraction la plus homogène (et une stœchiométrie respectée du complexe) qui serait utilisée pour la préparation de grilles de microscopie électronique.

b. Caractérisation structurale

i. Conclusions

Malgré les différentes stratégies adoptées pour le traitement des données des deux acquisitions sur le cryo-microscope électronique Titan Krios, ainsi que les différents logiciels utilisés (EMAN2, Relion 2.0.3, cisTEM, CryoSPARC), aucune structure tridimensionnelle du complexe entier hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660 n'a été obtenue. Néanmoins, ces études ont permis d'avoir une première idée de la topologie générale du complexe après l'obtention d'un premier modèle initial 3D à basse résolution. On peut observer un complexe asymétrique,

allongé en forme de L et des particules de petites tailles. Malgré la présence de nouvelles technologies permettant l'étude structurale de petits complexes tel que le nôtre en enregistrant des micrographes en mode « super-résolution », l'utilisation de la caméra à détection directe d'électrons comme la K2 Summit ainsi que l'utilisation de la phase plate (VPP) n'ont pas suffi à visualiser les structures secondaires lors de la classification 2D pour l'enregistrement effectué.

Les données de microscopie obtenues ne sont pas suffisantes : un faible nombre de particules totales engendre l'obtention d'un petit nombre de classes 2D. Ces données ne permettent donc pas d'obtenir un modèle 3D initial contenant suffisamment de données structurales.

De plus, les logiciels utilisés pour le traitement des données sont tous basés sur le même principe : le maximum de vraisemblance. Il y a vraisemblablement un problème qui se pose pour ces logiciels de traitement des données de petites particules comme le complexe étudié d'un poids moléculaire total de 170 kDa.

ii. Perspectives

Les perspectives apportées par cette étude sont nombreuses. Tout d'abord, il faut remédier au nombre insuffisant de particules après l'acquisition de deux jeux de données au cryo-microscope Titan Krios. Cela permettra l'obtention d'un meilleur ratio signal/bruit (SNR) et faciliterait le calcul de la fonction de transfert de contraste (FTC). Pour y remédier, il faut procéder à l'acquisition de plusieurs jeux de données et les regrouper afin de les traiter simultanément et d'obtenir un nombre de particules suffisamment élevé pour générer des meilleures classes 2D et ainsi, avoir des informations structurales plus détaillées pour le calcul d'un premier modèle 3D d'un complexe fonctionnel. L'obtention d'une structure à haute résolution d'un complexe entier fonctionnel avec un ou des corégulateurs qui complémentera les données déjà disponibles de cristallographie des domaines isolés des récepteurs, est cruciale pour la compréhension des mécanismes d'action et le développement de nouvelles molécules inhibitrices qui pourraient cibler les récepteurs nucléaires à des fins thérapeutiques.

De plus, comme dit précédemment, les logiciels utilisés pour le traitement des données sont tous basés sur le maximum de vraisemblance (*Maximum Likelihood*), alors

qu'une autre méthode existe : la méthode d'analyse statistique multivariée (MSA pour *Multivariate Statistical Analysis*). Cette approche est notamment utilisée par le logiciel IMAGIC. A terme, des nouvelles acquisitions du complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1_50-660 à haute résolution permettant d'obtenir un plus grand nombre de particules devraient être réalisées et traitées par ce type de logiciel pour pouvoir évaluer de la qualité du traitement et décrypter quelle méthode est la plus adaptée pour les particules de petites tailles. L'enjeu principal est donc d'améliorer la qualité du traitement d'images afin d'atteindre une résolution quasi atomique qu'il est très difficile d'atteindre à l'heure actuelle, notamment pour des petits complexes flexibles et asymétriques tel que hPPAR γ 2-RXR α lié à leur coactivateur MED1_50-660.

Afin d'obtenir un complexe de poids moléculaire supérieur à celui actuel, et par conséquent, générer des données où les particules seraient plus grandes pour un traitement de données facilité et stabiliser le complexe, il serait intéressant de rajouter un ou des partenaires du complexe Médiateur, notamment la sous-unité MED14 qui a été montrée stabiliser le complexe PPAR-RXR. D'autres corégulateurs potentiellement impliqués dans les mécanismes tumorigéniques médiés par PPAR γ tels que LSD1 ou ARA70, seraient également intéressants à étudier.

Les progrès technologiques concernant les nouveaux détecteurs à détection directe d'électrons ont été développés : une caméra K3 (Gatan) et une caméra Falcon III (FEI). Ces caméras sont disponibles sur le microscope Titan Krios de l'IGBMC et permettent une détection plus sensible. Cela ouvre de nouvelles perspectives quant à l'amélioration des acquisitions de données futures et la résolution des images obtenues pour la détermination de structures 3D à haute résolution. Ces nouvelles technologies, qui n'étaient pas présentes lors de mon étude du complexe hPPAR γ 2-RXR α -MED1 par cryo-ME, permettront peut-être de passer outre les problèmes de taille des complexes rencontrés lors de ma thèse.

Conclusions générales & Perspectives

Conclusions générales et perspectives

Un rôle dual de PPAR γ dans les tumeurs de vessie a été mis en évidence ces dernières années : un rôle protumorigénique d'une part dans les tumeurs lumineales justifié par l'amplification de PPAR γ et la mise en évidence de mutations activatrices récurrentes (Rochel et al., 2019a), et une rôle suppresseur de tumeurs dans le sous-type de tumeurs basales, dans ce cas, porté par des délétions et des mutations inactivatrices de PPAR γ (Coutos-Thévenot et al., 2019). Dans le premier cas, PPAR γ est surexprimé et cela a pour conséquence la sur-activation de la voie de PPAR γ favorisant ainsi le microenvironnement tumoral et par conséquent, la croissance des tumeurs lumineales. Dans le deuxième cas, une diminution de l'expression et de l'activité de PPAR γ sont observées, favorisant dans ce cas la progression des tumeurs basales.

Ce travail de thèse a combiné des approches structurales et fonctionnelles intégratives en collaboration étroite avec l'équipe d'oncologie de François Radvanyi (Institut Curie) dans le but de mieux comprendre les mécanismes de progression tumorale des cancers de vessie. Pour ce faire, des mutations inactivatrices du domaine de liaison au ligand LBD de PPAR γ impliquées dans les tumeurs basales de la vessie ont été identifiées et étudiées dans un premier temps. Dans un second temps, l'optimisation de la production et la purification du complexe entier humain PPAR γ -RXR α lié au domaine structuré du coactivateur MED1_50-660 à des fins d'études structurales par cryo-microscopie électronique ont été réalisés.

- ♣ Dans une première partie (*Chapitre 2*), les structures des domaines LBDs de PPAR γ contenant les mutations perte de fonction F310S et H494Y ont été résolues par cristallographie aux rayons-X. Ces structures à haute résolution révèlent l'organisation structurale des LBD mutés en complexe avec des ligands et en présence d'un corégulateur. De plus, des analyses biophysiques complètent cette étude afin de mieux comprendre l'impact de ces mutations de tumeurs basales urothéliales sur le recrutement des corégulateurs. En effet, très peu de données sont connues sur le rôle

des corégulateurs dans le contexte de l'urothélium, qu'il soit sain ou tumoral, ni sur l'impact de ces derniers sur l'expression de PPAR γ .

La structure à haute résolution du mutant F310S de PPAR γ LBD en présence du peptide corépresseur NCoR médié par la liaison d'un ligand inverse agoniste T0070907 a été obtenue. Elle révèle une nouvelle forme inactive du domaine LBD, où l'hélice-alpha H12 présente une conformation étendue. L'affinité du recrutement de peptides corépresseurs (NCoR et SMRT) a été étudiée et révèle une meilleure affinité pour les mutants en forme *apo* non ligandée que la protéine sauvage. A l'inverse, ces mutations interagissent avec une moins bonne affinité aux coactivateurs transcriptionnels. Les modifications conformationnelles induites par la mutation S310 impactent les hélices H3, H11 et H12, ainsi que les interactions établies entre PPAR γ et le ligand inverse agoniste T0070907. La déstabilisation structurale du domaine LBD engendrée par la mutation peut expliquer la perte d'affinité de liaison de PPAR γ F310S LBD à RXR α . De plus, la perte d'affinité de liaison des peptides corépresseurs en présence du ligand est observée par rapport à la protéine sauvage. Ces observations peuvent donc expliquer la perte d'expression et d'activité de PPAR γ dans les tumeurs basales de vessie où les mutations perte de fonction ont été identifiées.

Ces travaux ont pour objectif de clarifier les mécanismes par lesquels PPAR γ et RXR α ont une action protumorigénique dans les cancers de vessie. La compréhension des mécanismes d'action de PPAR γ et de RXR α , de leurs ligands et des protéines associées impliqués dans la progression de cancer de vessie présente à la fois un intérêt fondamental mais aussi un intérêt médical. Le cancer de vessie est un problème de santé publique majeur dans le monde, avec une haute fréquence de récurrence pour les tumeurs n'envahissant pas le muscle et un fort taux de mortalité pour les tumeurs envahissant le muscle. Ces connaissances devraient également permettre à terme, de développer des ligands synthétiques capables de moduler l'activité de PPAR γ et qui présenteraient un intérêt thérapeutique majeur, seuls ou en combinaison avec d'autres composés, dans le traitement des cancers de vessie. De plus, le sous-type tumoral n'est que très peu pris en compte dans les différentes études à ce jour. En effet, au cours des dernières années, les

études sur le rôle de PPAR γ dans le cancer de la vessie ne prennent souvent pas compte des sous-types de tumeurs. La mise en évidence du rôle dual de PPAR γ et l'importance du contexte tumoral dans la spécificité de ce rôle devrait conduire à l'avenir à une meilleure prise en charge et une meilleure prise en compte des différents sous-types de tumeurs identifiées récemment (Kamoun et al., 2020). Enfin, la mise en évidence du rôle dual de PPAR γ pourrait se révéler essentielle à la compréhension d'autres types de cancers et s'appliquer à des cancers autres que celui de la vessie.

- ♣ Dans une seconde partie (*Chapitre 3*), nous nous sommes intéressées à l'étude du complexe humain entier PPAR γ -RXR α -MED1 lié à son élément de réponse à l'ADN (PPRE de type DR1) pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels il régule la transcription de gènes cibles. Mon travail de thèse a consisté à optimiser la production et la purification d'un complexe homogène protéine/ADN en solution en quantité et qualité compatibles avec une étude structurale par cryo-ME. Finalement, des résultats préliminaires ont été obtenus et seule une enveloppe globale du complexe à basse résolution est obtenue.

De multiples étapes d'optimisations à différentes échelles ont été nécessaires : l'expression du complexe dans différents systèmes, la caractérisation biochimique et enfin, les essais de cryo-congélation de l'échantillon purifié. Ces étapes d'optimisations sont primordiales à l'obtention d'un complexe homogène et stable en solution en vue de son étude structurale par cryo-microscopie électronique. Suite aux différents essais de criblages et d'acquisitions de données de microscopie réalisés au cours de ma thèse, il n'a pas été possible d'obtenir un complexe suffisamment stable dans nos conditions expérimentales. En effet, le complexe humain entier PPAR γ -RXR α -MED1_50-660 en présence de l'élément de réponse du gène *FABP4* régulé par ce complexe est sujet à une dissociation ainsi qu'une dégradation rapide. Ces complexes sont de nature flexible et dynamique, rendant leurs études structurales difficiles. Les perspectives restent néanmoins nombreuses. D'une autre part, des agents de réticulation chimiques comme le glutaraldéhyde ou encore la BS3 peuvent être utilisés afin de stabiliser le complexe par le « *crosslink* » afin d'éviter sa dissociation rapide en solution. Des méthodes de purification tel que le Grafix par gradient de glycérol combinées aux agents de

réticulation peuvent aussi être utilisée afin d'améliorer l'homogénéité de l'échantillon purifié et d'augmenter sa stabilité afin d'aboutir à l'étude structurale du complexe, permettant la compréhension du mécanisme moléculaire qui régit la régulation des gènes ciblés par le complexe PPAR γ -RXR α . D'une part de nouvelles avancées technologiques en microscopie électronique à particule unique émergent. Ces nouvelles technologies telles que les nouveaux détecteurs (caméras K3 de FEI ThermoFisher et Falcon 3 de Gatan opérationnelles) ou encore l'automatisation du criblage des grilles de microscopie vont permettre l'acquisition de données à plus haute résolution et répondent aux limites de taille des complexes étudiés. Depuis l'utilisation de ces nouveaux outils, plus de 150 structures de complexes ayant un poids moléculaire inférieur à 200 kDa ont été résolues par cryo-ME ces deux dernières années.

Bibliographie

Bibliographie

- Aagaard, M.M., Rasmus Siersbæk, and Mandrup, S. (2011). Molecular basis for gene-specific transactivation by nuclear receptors. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1812, 824–835.
- Ahmadian, M., Suh, J.M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A.R., Downes, M., and Evans, R.M. (2013). PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med.* 19, 557–566.
- Aprile, M., Ambrosio, M.R., D'Esposito, V., Beguinot, F., Formisano, P., Costa, V., and Ciccodicola, A. (2014). PPAR γ in Human Adipogenesis: Differential Contribution of Canonical Transcripts and Dominant Negative Isoforms. *PPAR Res.* 2014, 1–11.
- Aranda, A., and Pascual, A. (2001). Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiol. Rev.* 81, 1269–1304.
- Azoulay, L., Yin, H., Fillion, K.B., Assayag, J., Majdan, A., Pollak, M.N., and Suissa, S. (2012). The use of pioglitazone and the risk of bladder cancer in people with type 2 diabetes: nested case-control study. *BMJ* 344, e3645–e3645.
- Balint, B., and Nagy, L. (2006). Selective Modulators of PPAR Activity as New Therapeutic Tools in Metabolic Diseases. *Endocr. Metab. Immune Disord. - Drug Targets* 6, 33–43.
- Barish, G.D. (2006). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Liver X Receptors in Atherosclerosis and Immunity. *J. Nutr.* 136, 690–694.
- Batista, M.R.B., and Martínez, L. (2013). Dynamics of Nuclear Receptor Helix-12 Switch of Transcription Activation by Modeling Time-Resolved Fluorescence Anisotropy Decays. *Biophys. J.* 105, 1670–1680.
- Belorusova, A.Y., Osz, J., Petoukhov, M.V., Peluso-Iltis, C., Kieffer, B., Svergun, D.I., and Rochel, N. (2016). Solution Behavior of the Intrinsically Disordered N-Terminal Domain of Retinoid X Receptor α in the Context of the Full-Length Protein. *Biochemistry* 55, 1741–1748.
- Belorusova, A.Y., Bourguet, M., Hessmann, S., Chalhoub, S., and Kieffer, B. Molecular determinants of MED1 interaction with the DNA bound VDR–RXR heterodimer. 15.
- Biton, A., Bernard-Pierrot, I., Lou, Y., Krucker, C., Chapeaublanc, E., Rubio-Pérez, C., López-Bigas, N., Kamoun, A., Neuzillet, Y., Gestraud, P., et al. (2014). Independent Component Analysis Uncovers the Landscape of the Bladder Tumor Transcriptome and Reveals Insights into Luminal and Basal Subtypes. *Cell Rep.* 9, 1235–1245.

- Borggreve, T., and Yue, X. (2011). Interactions between subunits of the Mediator complex with gene-specific transcription factors. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 759–768.
- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . 375, 6.
- Brelivet, Y., Kammerer, S., Rochel, N., Poch, O., and Moras, D. (2004). Signature of the oligomeric behaviour of nuclear receptors at the sequence and structural level. *EMBO Rep.* 5, 423–429.
- Bugge, A., Grøntved, L., Aagaard, M.M., Borup, R., and Mandrup, S. (2009). The PPAR γ 2 A/B-Domain Plays a Gene-Specific Role in Transactivation and Cofactor Recruitment. *Mol. Endocrinol.* 23, 794–808.
- Burke, T.W., and Kadonaga, J.T. (1997). The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes Dev.* 11, 3020–3031.
- Burris, T.P., Solt, L.A., Wang, Y., Crumbley, C., Banerjee, S., Griffett, K., Lundasen, T., Hughes, T., and Kojetin, D.J. (2013). Nuclear Receptors and Their Selective Pharmacologic Modulators. *Pharmacol. Rev.* 65, 710–778.
- Chandra, V., Huang, P., Hamuro, Y., Raghuram, S., Wang, Y., Burris, T.P., and Rastinejad, F. (2008). Structure of the intact PPAR- γ -RXR- α nuclear receptor complex on DNA. *Nature* 456, 350–356.
- Chen, J.D., and Evans, R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454–457.
- Chinetti, G., Fruchart, J.-C., and Staels, B. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm. Res.* 49, 497–505.
- Chiu, M., McBeth, L., Sindhwani, P., and Hinds, T.D. (2017). Deciphering the Roles of Thiazolidinediones and PPAR γ in Bladder Cancer. *PPAR Res.* 2017, 1–9.
- Chrisman, I.M., Nemetchek, M.D., de Vera, I.M.S., Shang, J., Heidari, Z., Long, Y., Reyes-Caballero, H., Galindo-Murillo, R., Cheatham, T.E., Blayo, A.-L., et al. (2018). Defining a conformational ensemble that directs activation of PPAR γ . *Nat. Commun.* 9, 1794.
- Conaway, R.C., Sato, S., Tomomori-Sato, C., Yao, T., and Conaway, J.W. (2005). The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* 30, 250–255.

Coutos-Thévenot, L., Beji, S., Neyret-Kahn, H., Pippo, Q., Fontugne, J., Osz, J., Krucker, C., Groeneveld, C.D.S., Dufour, F., Kamoun, A., et al. (2019). PPAR γ is a tumor suppressor in basal bladder tumors offering new potential therapeutic opportunities (Cancer Biology).

Danev, R., Tegunov, D., and Baumeister, W. (2017). Using the Volta phase plate with defocus for cryo-EM single particle analysis. *ELife* 6, e23006.

Deblois, G., and Giguère, V. (2013). Oestrogen-related receptors in breast cancer: control of cellular metabolism and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 13, 27–36.

Delerive, P., Furman, C., Teissier, E., Fruchart, J.-C., Duriez, P., and Staels, B. (2000). Oxidized phospholipids activate PPAR α in a phospholipase A2-dependent manner. *FEBS Lett.* 471, 34–38.

Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J.-J., Homo, J.-C., Lepault, J., McDowell, A.W., and Schultz, P. (1988). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.* 21, 129–228.

Duran-Sandoval, D., Thomas, A.-C., Bailleul, B., Fruchart, J.-C., and Staels, B. (2003). Pharmacologie des agonistes de PPAR α et PPAR γ et des activateurs PPAR α/γ mixtes en développement clinique. *médecine/sciences* 19, 819–825.

Earl, J., Rico, D., Carrillo-de-Santa-Pau, E., Rodríguez-Santiago, B., Méndez-Pertuz, M., Auer, H., Gómez, G., Grossman, H.B., Pisano, D.G., Schulz, W.A., et al. (2015). The UBC-40 Urothelial Bladder Cancer cell line index: a genomic resource for functional studies. *BMC Genomics* 16, 403.

Egea, P.F., Klaholz, B.P., and Moras, D. (2000). Ligand-protein interactions in nuclear receptors of hormones. *FEBS Lett.* 476, 62–67.

Escriva, H. Amphioxus RA signaling. 12.

Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2014). Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* 157, 255–266.

Evans, R.M., Barish, G.D., and Wang, Y.-X. (2004). PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.* 10, 355–361.

Fajas, L., Fruchart, J.-C., and Auwerx, J. (1998). PPARQ3 mRNA: a distinct PPARQ mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* 6.

Finck, B.N. (2006). PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J. Clin. Invest.* 116, 615–622.

Fletcher, O., Easton, D., Anderson, K., Gilham, C., Jay, M., and Peto, J. (2004). Lifetime Risks of Common Cancers Among Retinoblastoma Survivors. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 96, 357–363.

Fondell, J.D., Ge, H., and Roeder, R.G. (1996). Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 8329–8333.

Forman, B.M., Tontonoz, P., Brun, P., and Evans, M. 15Deoxy-A 12g14-Prostaglandin J2 Is a Ligand for the Adipocyte Determination Factor PPAR γ . 10.

Ge, K., Cho, Y.-W., Guo, H., Hong, T.B., Guermah, M., Ito, M., Yu, H., Kalkum, M., and Roeder, R.G. (2008). Alternative Mechanisms by Which Mediator Subunit MED1/TRAP220 Regulates Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ -Stimulated Adipogenesis and Target Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1081–1091.

Germain, P., Altucci, L., Bourguet, W., Rochette-Egly, C., and Gronemeyer, H. (2003). Nuclear receptor superfamily: Principles of signaling. *Pure Appl. Chem.* 75, 1619–1664.

Goldstein, J.T., Berger, A.C., Shih, J., Duke, F.F., Furst, L., Kwiatkowski, D.J., Cherniack, A.D., Meyerson, M., and Strathdee, C.A. (2017). Genomic Activation of PPARG Reveals a Candidate Therapeutic Axis in Bladder Cancer. *Cancer Res.* 77, 6987–6998.

Grant, T., Rohou, A., and Grigorieff, N. (2018). cisTEM, user-friendly software for single-particle image processing. *ELife* 7, e35383.

Gronemeyer, H., Gustafsson, J.-Å., and Laudet, V. PRINCIPLES FOR MODULATION OF THE NUCLEAR RECEPTOR SUPERFAMILY. *DRUG Discov.* 16.

Guiochon-Mantel, A., Delabre, K., Lescop, P., and Milgrom, E. (1994). Nuclear localization signals also mediate the outward movement of proteins from the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 7179–7183.

He, F., Mo, L., Zheng, X.-Y., Hu, C., Lepor, H., Lee, E.Y.-H.P., Sun, T.-T., and Wu, X.-R. (2009). Deficiency of pRb Family Proteins and p53 in Invasive Urothelial Tumorigenesis. *Cancer Res.* 69, 9413–9421.

Hebben, M., Brants, J., Birck, C., Samama, J.-P., Wasyluk, B., Spehner, D., Pradeau, K., Domi, A., Moss, B., Schultz, P., et al. (2007a). High level protein expression in mammalian cells using a safe viral vector: Modified vaccinia virus Ankara. *Protein Expr. Purif.* 56, 269–278.

Hebben, M., Brants, J., Birck, C., Samama, J.-P., Wasyluk, B., Spehner, D., Pradeau, K., Domi, A., Moss, B., Schultz, P., et al. (2007b). High level protein expression in mammalian cells using a safe viral vector: Modified vaccinia virus Ankara. *Protein Expr. Purif.* 56, 269–278.

Huang, W., Greene, G.L., Ravikumar, K.M., and Yang, S. (2013). Cross-talk between the ligand- and DNA-binding domains of estrogen receptor: ER α Domain Cross-Talk. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 81, 1900–1909.

- Jia, Y., Viswakarma, N., and Reddy, J.K. (2014). Med1 Subunit of the Mediator Complex in Nuclear Receptor-Regulated Energy Metabolism, Liver Regeneration, and Hepatocarcinogenesis. *Gene Expr.* 16, 63–75.
- Kamoun, A., de Reyniès, A., Allory, Y., Sjödaahl, G., Robertson, A.G., Seiler, R., Hoadley, K.A., Groeneveld, C.S., Al-Ahmadie, H., Choi, W., et al. (2020). A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur. Urol.* 77, 420–433.
- Khorasanizadeh, S., and Rastinejad, F. (2016). Visualizing the Architectures and Interactions of Nuclear Receptors. *Endocrinology* 157, 4212–4221.
- Kliewer, S.A., Umesono, K., Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (1992). Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* 355, 446–449.
- Kogevinas, M., Mannetje, A. 't, Cordier, S., Ranft, U., González, C.A., Vineis, P., Chang-Claude, J., Lynge, E., Wahrendorf, J., Tzonou, A., et al. (2003). Occupation and bladder cancer among men in Western Europe. *Cancer Causes Control* 14, 907–914.
- Kojetin, D.J., and Burris, T.P. (2013). Small Molecule Modulation of Nuclear Receptor Conformational Dynamics: Implications for Function and Drug Discovery. *Mol. Pharmacol.* 83, 1–8.
- Kolesnikova O, Pichard S, Osz J, Rochel N, Bensaude O, Rossolillo P, Kolb I, Troffer-Charlier N, Berger I, Poterszman A. HR-Bac, a toolbox based on homologous recombination for expression screening and production of multiprotein complexes using the baculovirus expression system. 2020,
- Koppen, A., and Kalkhoven, E. (2010). Brown vs white adipocytes: The PPAR γ coregulator story. *FEBS Lett.* 584, 3250–3259.
- Korpai, M., Puyang, X., Jeremy Wu, Z., Seiler, R., Furman, C., Oo, H.Z., Seiler, M., Irwin, S., Subramanian, V., Julie Joshi, J., et al. (2017). Evasion of immunosurveillance by genomic alterations of PPAR γ /RXR α in bladder cancer. *Nat. Commun.* 8.
- Kwon, K.A., Yun, J., Oh, S.Y., Seo, B.-G., Lee, S., Lee, J.-H., Kim, S.-H., Choi, H.J., Roh, M.S., and Kim, H.-J. (2016). Clinical Significance of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and TRAP220 in Patients with Operable Colorectal Cancer. *Cancer Res. Treat.* 48, 198–207.
- Laudet, V., Hänni, C., Coll, J., Catzeflis, F., and Stéhelin, D. (1992). Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J.* 11, 1003–1013.

- Lefterova, M.I., Steger, D.J., Zhuo, D., Qatanani, M., Mullican, S.E., Tuteja, G., Manduchi, E., Grant, G.R., and Lazar, M.A. (2010). Cell-Specific Determinants of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Function in Adipocytes and Macrophages. *Mol. Cell. Biol.* 30, 2078–2089.
- Lengqvist, J., Mata de Urquiza, A., Bergman, A.-C., Willson, T.M., Sjövall, J., Perlmann, T., and Griffiths, W.J. (2004). Polyunsaturated Fatty Acids Including Docosahexaenoic and Arachidonic Acid Bind to the Retinoid X Receptor α Ligand-binding Domain. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 692–703.
- Lenhard, B., Sandelin, A., and Carninci, P. (2012). Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nat. Rev. Genet.* 13, 233–245.
- Lewis, J.D., Ferrara, A., Peng, T., Hedderson, M., Bilker, W.B., Quesenberry, C.P., Vaughn, D.J., Nessel, L., Selby, J., and Strom, B.L. (2011). Risk of Bladder Cancer Among Diabetic Patients Treated With Pioglitazone: Interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes Care* 34, 916–922.
- Li, D., Li, T., Wang, F., Tian, H., and Samuels, H.H. (2002). Functional Evidence for Retinoid X Receptor (RXR) as a Nonsilent Partner in the Thyroid Hormone Receptor/RXR Heterodimer. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5782–5792.
- Li, H., Weiser-Evans, M.C.M., and Nemenoff, R. Anti- and Protumorigenic Effects of PPAR γ in Lung Cancer Progression: A Double-Edged Sword. *PPAR Res.* 13.
- von Loeffelholz, O., Papai, G., Danev, R., Myasnikov, A.G., Natchiar, S.K., Hazemann, I., Ménétret, J.-F., and Klaholz, B.P. (2018). Volta phase plate data collection facilitates image processing and cryo-EM structure determination. *J. Struct. Biol.* 202, 191–199.
- Loomis, D., Huang, W., and Chen, G. (2014). The International Agency for Research on Cancer (IARC) evaluation of the carcinogenicity of outdoor air pollution: focus on China. *Chin. J. Cancer* 33, 189–196.
- Ludtke, S.J., Baldwin, P.R., and Chiu, W. (1999). EMAN: Semiautomated Software for High-Resolution Single-Particle Reconstructions. *J. Struct. Biol.* 128, 82–97.
- Luisi, B.F. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. 352, 9.
- Maletta, M., Orlov, I., Roblin, P., Beck, Y., Moras, D., Billas, I.M.L., and Klaholz, B.P. (2014). The palindromic DNA-bound USP/EcR nuclear receptor adopts an asymmetric organization with allosteric domain positioning. *Nat. Commun.* 5, 4139.
- Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841–850.

- Mansure, J.J., Nassim, R., Chevalier, S., Szymanski, K., Rocha, J., Aldousari, S., and Kassouf, W. (2013). A Novel Mechanism of PPAR Gamma Induction via EGFR Signalling Constitutes Rational for Combination Therapy in Bladder Cancer. *PLoS ONE* 8, e55997.
- Mindell, J.A., and Grigorieff, N. (2003). Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 142, 334–347.
- Murakami, S., Nagari, A., and Kraus, W.L. (2017). Dynamic assembly and activation of estrogen receptor α enhancers through coregulator switching. *Genes Dev.* 31, 1535–1548.
- Näär, A.M., Lemon, B.D., and Tjian, R. (2001). Transcriptional Coactivator Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 475–501.
- Nagy, L., Kao, H.-Y., Love, J.D., Li, C., Banayo, E., Gooch, J.T., Krishna, V., Chatterjee, K., Evans, R.M., and Schwabe, J.W.R. (1999). Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev.* 13, 3209–3216.
- Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J.G.A., Chen, H., and Evans, R.M. Oxidized LDL Regulates Macrophage Gene Expression through Ligand Activation of PPAR γ . 12.
- Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., and Rosenfeld, M.G. (1998a). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ . 8. 395, 9.
- Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., and Rosenfeld, M.G. (1998b). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ . 8. 395, 7.
- Nozawa, K., Schneider, T.R., and Cramer, P. (2017). Core Mediator structure at 3.4 Å extends model of transcription initiation complex. *Nature* 545, 248–251.
- Orlov, I., Rochel, N., Moras, D., and Klaholz, B.P. (2012). Structure of the full human RXR/VDR nuclear receptor heterodimer complex with its DR3 target DNA: Structure of the RXR/VDR DNA complex. *EMBO J.* 31, 291–300.
- Orlova, E.V., and Saibil, H.R. (2011). Structural Analysis of Macromolecular Assemblies by Electron Microscopy. *Chem. Rev.* 111, 7710–7748.
- Osz, J., Brelivet, Y., Peluso-Iltis, C., Cura, V., Eiler, S., Ruff, M., Bourguet, W., Rochel, N., and Moras, D. (2012). Structural basis for a molecular allosteric control mechanism of cofactor binding to nuclear receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E588–E594.

- Osz, J., McEwen, A.G., Poussin-Courmontagne, P., Moutier, E., Birck, C., Davidson, I., Moras, D., and Rochel, N. (2015). Structural Basis of Natural Promoter Recognition by the Retinoid X Nuclear Receptor. *Sci. Rep.* 5, 8216.
- Osz, J., McEwen, A.G., Wolf, J., Poussin-Courmontagne, P., Peluso-Iltis, C., Chebaro, Y., Kieffer, B., and Rochel, N. (2019). Modulation of RXR-DNA complex assembly by DNA context. *Mol. Cell. Endocrinol.* 481, 44–52.
- Penvose, A., Keenan, J.L., Bray, D., Ramlall, V., and Siggers, T. (2019). Comprehensive study of nuclear receptor DNA binding provides a revised framework for understanding receptor specificity. *Nat. Commun.* 10, 2514.
- Pérez, E., Bourguet, W., Gronemeyer, H., and de Lera, A.R. (2012). Modulation of RXR function through ligand design. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1821, 57–69.
- Perissi, V., Aggarwal, A., Glass, C.K., Rose, D.W., and Rosenfeld, M.G. (2004). A Corepressor/Coactivator Exchange Complex Required for Transcriptional Activation by Nuclear Receptors and Other Regulated Transcription Factors. *Cell* 116, 511–526.
- Plaschka, C., Larivière, L., Wenzek, L., Seizl, M., Hemann, M., Tegunov, D., Petrotchenko, E.V., Borchers, C.H., Baumeister, W., Herzog, F., et al. (2015). Architecture of the RNA polymerase II–Mediator core initiation complex. *Nature* 518, 376–380.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell* 92, 829–839.
- Punjani, A., Rubinstein, J.L., Fleet, D.J., and Brubaker, M.A. (2017). cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat. Methods* 14, 290–296.
- Rachez, C., Suldan, Z., Ward, J., Chang, C.-P.B., Burakov, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Freedman, L.P. (1998). A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system. *Genes Dev.* 12, 1787–1800.
- Rastinejad, F. (2001). Retinoid X receptor and its partners in the nuclear receptor family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 33–38.
- Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R.M., and Sigler, P.B. (1995). Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* 375, 203–211.
- Reddy, E.P., Reynolds, R.K., Santos, E., and Barbacid, M. (1982). A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300, 149–152.

- Ren, Y., Behre, E., Ren, Z., Zhang, J., Wang, Q., and Fondell, J.D. (2000). Specific Structural Motifs Determine TRAP220 Interactions with Nuclear Hormone Receptors. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5433–5446.
- Renaud, J.P., and Moras*, D. (2000). Structural studies on nuclear receptors: *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 1748–1769.
- Robinson-Rechavi, M., Carpentier, A.-S., Duffraisse, M., and Laudet, V. (2001). How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet.* 17, 554–556.
- Rochel, N., Ciesielski, F., Godet, J., Moman, E., Roessle, M., Peluso-Iltis, C., Moulin, M., Haertlein, M., Callow, P., Mély, Y., et al. (2011). Common architecture of nuclear receptor heterodimers on DNA direct repeat elements with different spacings. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 564–570.
- Rochel, N., Krucker, C., Coutos-Thévenot, L., Osz, J., Zhang, R., Guyon, E., Zita, W., Vanthong, S., Hernandez, O.A., Bourguet, M., et al. (2019). Recurrent activating mutations of PPAR γ associated with luminal bladder tumors. *Nat. Commun.* 10.
- Rohou, A., and Grigorieff, N. (2019). CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. 18.
- Rosenfeld, M.G. (2006). Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev.* 20, 1405–1428.
- Russo, C.J., and Passmore, L.A. (2016). Progress towards an optimal specimen support for electron cryomicroscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 37, 81–89.
- Sainsbury, S., Bernecky, C., and Cramer, P. (2015). Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 129–143.
- Sarraf, P., Mueller, E., Smith, W.M., Wright, H.M., Kum, J.B., and Aaltonen, L.A. Loss-of-Function Mutations in PPAR α Associated with Human Colon Cancer. *Mol. Cell* 6.
- Scheres, S.H.W. (2012). RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J. Struct. Biol.* 180, 519–530.
- Schwabe, J.W.F., Chapman, L., Rhodes, D., and Finch, J.T. The Crystal Structure of the Estrogen Receptor DNA-Binding Domain Bound to DNA: How Receptors Discriminate between Their Response Elements. 12.
- Shang, J., Mosure, S.A., Zheng, J., Brust, R., Bass, J., Nichols, A., Solt, L.A., Griffin, P.R., and Kojetin, D.J. (2020). A molecular switch regulating transcriptional repression and activation of PPAR γ . *Nat. Commun.* 11, 956.

- Shao, D., and Lazar, M.A. (1999). Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J. Clin. Invest.* 103, 1617–1618.
- Sher, T., Yi, H.F., McBride, O.W., and Gonzalez, F.J. (1993). cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry* 32, 5598–5604.
- Shulman, A.I., Larson, C., Mangelsdorf, D.J., and Ranganathan, R. (2004). Structural Determinants of Allosteric Ligand Activation in RXR Heterodimers. *Cell* 116, 417–429.
- Simons, S.S., Edwards, D.P., and Kumar, R. (2014). Minireview: Dynamic Structures of Nuclear Hormone Receptors: New Promises and Challenges. *Mol. Endocrinol.* 28, 173–182.
- Snijder, J., Borst, A.J., Dosey, A., Walls, A.C., Burrell, A., Reddy, V.S., Kollman, J.M., and Veesler, D. (2017). Vitrification after multiple rounds of sample application and blotting improves particle density on cryo-electron microscopy grids. *J. Struct. Biol.* 198, 38–42.
- Soutourina, J. (2018). Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 262–274.
- 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). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389, 194–198.
- Spitz, F., and Furlong, E.E.M. (2012). Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat. Rev. Genet.* 13, 613–626.
- Stark, H. (2010). GraFix: Stabilization of Fragile Macromolecular Complexes for Single Particle Cryo-EM. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 109–126.
- Sundvold, H., and Lien, S. (2001). Identification of a Novel Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) γ Promoter in Man and Transactivation by the Nuclear Receptor ROR α 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 383–390.
- Tang, G., Peng, L., Baldwin, P.R., Mann, D.S., Jiang, W., Rees, I., and Ludtke, S.J. (2007). EMAN2: An extensible image processing suite for electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 157, 38–46.
- Tegunov, D., and Cramer, P. (2018). Real-time cryo-EM data pre-processing with Warp (Biophysics).
- Thompson, P.D., Jurutka, P.W., Haussler, C.A., Whitfield, G.K., and Haussler, M.R. (1998). Heterodimeric DNA Binding by the Vitamin D Receptor and Retinoid X Receptors Is Enhanced by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and Inhibited by 9-*cis*-Retinoic Acid: EVIDENCE FOR ALLOSTERIC RECEPTOR INTERACTIONS. *J. Biol. Chem.* 273, 8483–8491.

- Viswakarma, N., Jia, Y., Bai, L., Vluggens, A., Borensztajn, J., Xu, J., and Reddy, J.K. (2010). Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression. *PPAR Res.* 2010, 1–21.
- Voegel, J.J. (1998). The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* 17, 507–519.
- Watanabe, M., and Kakuta, H. (2018). Retinoid X Receptor Antagonists. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2354.
- Weatherman, R.V., Fletterick, R.J., and Scanlan, T.S. (1999). Nuclear-Receptor Ligands and Ligand-Binding Domains. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 559–581.
- Weber, H., and Garabedian, M.J. (2018). The mediator complex in genomic and non-genomic signaling in cancer. *Steroids* 133, 8–14.
- Williams, S.V., Hurst, C.D., and Knowles, M.A. (2013). Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Hum. Mol. Genet.* 22, 795–803.
- Wilson, T.E., Fahrner, T.J., and Milbrandt, J. (1993). The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol. Cell. Biol.* 13, 5794–5804.
- Wu, X.-R. (2005). Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat. Rev. Cancer* 5, 713–725.
- Wurtz, J.-M., Bourguet, W., Renaud, J.-P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., and Gronemeyer, H. (1996). A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat. Struct. Biol.* 3, 87–94.
- Yang, D.-R., Lin, S.-J., Ding, X.-F., Miyamoto, H., Messing, E., Li, L.-Q., Wang, N., and Chang, C. (2013). Higher Expression of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ or Its Activation by Agonist Thiazolidinedione-rosiglitazone Promotes Bladder Cancer Cell Migration and Invasion. *Urology* 81, 1109.e1-1109.e6.
- Yi, P., Wang, Z., Feng, Q., Chou, C.-K., Pintilie, G.D., Shen, H., Foulds, C.E., Fan, G., Serysheva, I., Ludtke, S.J., et al. (2017). Structural and Functional Impacts of ER Coactivator Sequential Recruitment. *Mol. Cell* 67, 733-743.e4.
- Yoshinaga, S., Peterson, C., Herskowitz, I., and Yamamoto, K. (1992). Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science* 258, 1598–1604.
- Yu, X., Yi, P., Hamilton, R.A., Shen, H., Chen, M., Foulds, C.E., Mancini, M.A., Ludtke, S.J., Wang, Z., and O'Malley, B.W. (2020). Structural Insights of Transcriptionally Active, Full-Length Androgen Receptor Coactivator Complexes. *Mol. Cell* 79, 812-823.e4.

Zhang, K. (2016). Gctf: Real-time CTF determination and correction. *J. Struct. Biol.* 193, 1–12.

Zhang, X., Jeyakumar, M., Petukhov, S., and Bagchi, M.K. (1998). The Population Council and The Rockefeller University New York, New York 1002. 12, 12.

Zheng, S.Q., Palovcak, E., Armache, J.-P., Verba, K.A., Cheng, Y., and Agard, D.A. (2017). MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nat. Methods* 14, 331–332.

Zhu, Y., Qi, C., Jain, S., Rao, M.S., and Reddy, J.K. (1997). Isolation and Characterization of PBP, a Protein That Interacts with Peroxisome Proliferator-activated Receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 25500–25506.

Annexe 1

**Protocole de purification du complexe
PPAR γ /RXR α et le coactivateur MED1**

Annexe 1

Protocole général de Purification du Complexe PPAR/RXR (VE5202 Construction 2) + MED1_50-660 (DRIP205/TRAP220)

Purification VE5202 (hPPAR γ 2/RXR α)

Nickel affinity HisTRAP FF Crude 1 mL Step

Lysis Buffer: Tris 50mM pH 8, NaCl 500mM, CHAPS 2mM, 5% Glycerol, 5mM Imidazole

➔ Lysis 1L by 50mL lysis Buffer + 1 PIC tablette (PIC: Protease Inhibitor Cocktail)

- **Sonication** : 2 x 1 min 30 %, cycle 0,5
- **Ultra-Centrifugation** : 1 h 30 40 000 g
- **Supernatant filtration** : 5 μ m filter

- **Step 1 : Nickel affinity HisTrap FF 1 mL : method**

- Non-specific peak : 4 % Buffer B (1M Imidazole)
- Elution : 15 % Buffer B

Buffer B 1M Imidazole ➔ X g Imidazol powder, Tris 50 mM, NaCl 500 mM, Glycerol 5 %, CHAPS 2 mM ➔ Filtered

- 1) **Wash 1 column Ni HisTrap** : 50 mL Buffer B, flow rate 2 mL/min, Pressure limit 0.5 MPa
- 2) **Remark Binding** : running at 0.5 mL/min (Flow rate)
- 3) **Wash 2** : column equilibration ➔ 30 mL Water, then 20 mL Buffer A
- 4) **P960 pump equilibration** : simple load (50 mL) ➔ wash with buffer A
- 5) **Protocol for Ni affinity** : 5 steps ➔ 0 mM Imidazol (0 % B Buffer), 40 mM (4 % B), 150 mM (15 % B), 500 mM (50 % B), 0mM (0 % B)

Nickel Pool : X fractions ➔ X mL (specific peak : 150 mM Imidazol step)

- **Nickel Pool** : dilution 2x with Gel Filtration buffer (5 mL Ni Pool + 5 mL GF buffer for example) + TCEP 2 mM: ice overnight
- Bradford Nickel Pool: X mL at X mg/mL ➔ **X mg of PX (yield)**

- Ligands to add: GW1929 and 9cisRA (10^{-2} M in EtOH 100 %) → 2 eq + PX Complex
- → + 15 µL 9cisRA, 15 µL GW1929 : Incubation on ice 45 min

Gel Filtration (GF) Buffer: Tris 20 mM pH 7.5, KCl 75 mM, NaCl 75 mM, CHAPS 2 mM, 2 % glycerol

- **Concentration:** Amicon 30 kDa Cut Off 15 mL → several steps 4000 g 4 °C (every 5 min)
- **Inject :** X mL → Concentration measurement

GF S200 Increase 10/300 : VE5202

Gel filtration Buffer: Tris 20 mM pH 7.5, KCl 75 mM, NaCl 75mM, CHAPS 2 mM, 2 % glycerol

- **Loop :** 2 mL
- GF buffer + TCEP 2 mM
- Flow rate 0.5 mL/min, Pressure limit 3.5 MPa, fractions 0.5 mL, deepwell 96
- + DNA PPRE DR1 response element of *Fabp4c* gene ($5 \cdot 10^{-4}$ M) at 1.05 eq

Purification MED1 50-660/DRIP205

Ni affinity : Nickel Roche Resine → BATCH Step

Step 1 : Lysis

- Cell lysis :

Lysis Buffer: Tris 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, 5 % Glycerol, 2 mM CHAPS

➔ Pellet + 50mL Lysis Buffer + 2 PIC Tablette, 5 mM DTT, 1 mM PMSF (stock at 200 mM, 100% EtOH)

- Dounce homogeneisation 10x
- Sonication : 2 x 1 min40 sec, 30 % amplitude, cycle 0,3
- Dounce homogeneisation 10x again
- Ultra-Centrifugation : 1 h₃₀, 40 000 rpm, 4 °C (Ti 45 Rotor)

Step 2 : Nickel Affinity (Nickel resin) → Batch step

- Supernatant (SN) + 1 mL Roche Ni Complete Resin (2 mL total)

- WASH resin: 3 x 1 mL H₂O, 2 x 1 mL Lysis buffer before incubation
- **Incubation:** Overnight, cold room 4°C (Under agitation)

DAY 2 : WASHES

- 1st : 20 mL lysis buffer + 5 mM DTT, 1/1000 PIC
- 2nd : 20 mL lysis buffer + 5 mM DTT, 1/1000 PIC
- 3rd : 10 mL lysis buffer + 5 mM Imidazol (stock 1M), 5 mM DTT , 1/1000 PIC
- 4th : 5 mL lysis buffer

Remark: Roche resin → centrifugation 300 g 2min 4°C for each step!

ELUTION:

Elution Buffer: 5 mL lysis Buffer 500 mM Imidazole + 5 mM DTT, PIC

- **Elution 1 (E1)** : 5 mL elution buffer, 15 min incubation (Under agitation)
- Diluted 2x with GF Buffer !

GF Buffer : Tris 20mM pH 8, 75 mM NaCl, 75 mM KCl, 5% Glycerol, 1mM TCEP

Bradford : X mg/mL x X ml : **X mg of MED1 (Yield)**

- **Elution 2 (E2)** : 2 mL elution buffer, incubation 1 h
- + 1 mL Wash out

Bradford → X mg/mL x X mL → **X mg of MED1 (Yield)**

Total Nickel elution: X mg MED1 (15 mg E1+E2 approximately)

Step 3 : Concentration

- Amicon 30 kDa Cut Off: until 2,5 mL final volume to inject (steps 10 min/3000 g 4 °C)
- Bradford : X mg/mL x X mL → **X mg of MED1**
- **Inject** : X mL

GF S200 16/60 OR S200 10/300 GL (depends on the yield)

GF Buffer : Tris 20mM pH 8, 75 mM NaCl, 75 mM KCl, 5% Glycerol, 1mM TCEP

- X mL concentrated Nickel elution injected (Pool)
- 12.5 % SDS-PAGE Gel to check fractions

- Fractions : 2 mL of each
- **Concentration measurement by Bradford** : X mg/mL

Complex formation : VE5202/MED1 50-660 (PXD)

GF Pool MED1 X mL (X mg) + X mL of VE5202 (X mg) → Incubation, overnight

→ **1.5 eq of MED1 to add**

- **Bradford Complex** → X mg/mL
- **Concentration PXD** : Concentration of the complex : PXD + ligands (GW1929/9cisRA), + PPRE DR1 DNA (*Fabp4c* gene) : Amicon 15 mL Cut Off 30 kDa
- Several steps: 5 min 3000 g 4 °C (slow concentration: 2-3 h approximately) until 100 µL to inject

Complex Epsilon value = 114.47 mol⁻¹/L/cm⁻¹ & 170 kDa Molecular Weight

- **Nanodrop PXD** : inject X mg/mL
- **Bradford PXD** : X mg/mL

Analytical Gel filtration Superose 6 Increase 3.2/300

GF Buffer: HEPES 50 mM pH 7.5, KCl 75 mM, NaCl 75 mM, CHAPS 2 mM, 2 % glycerol:

Then, add **DTT 1 mM, PIC, E64** protease → FILTRED

- Wash column before usage: 6 mL GF buffer 0.05 mL/min 3 MPa
- Inject 100 -150 µL PXD sample and use the 250 µL loop
- 10 % SDS-PAGE Gel to check fractions and complex integr

Mécanismes moléculaires du rôle protumorigénique de PPARgamma et RXRalpha dans les cancers de vessie

Résumé

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes, PPARs, sont des facteurs de transcription membres de la famille des récepteurs nucléaires. *PPARG* est un régulateur clé de la différenciation des adipocytes, l'homéostasie du glucose, la sensibilisation de l'insuline, ainsi que la différenciation urothéliale. Il a été montré comme suppresseur de tumeurs mais il présente également un rôle protumorigénique dans les cancers de vessie. Afin d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de régulation de la transcription par PPAR γ -RXR α et de comprendre les mécanismes étant à la base de l'activité protumorigénique de PPAR γ -RXR α dans ces cancers, mes travaux ont porté sur l'étude de structure-fonction de mutants de PPAR γ inactivateurs identifiés dans des tumeurs basales de cancers de vessie. Les résultats obtenus par l'utilisation de la cristallographie aux rayons-X et de méthodes biophysiques, nous ont permis de caractériser les interactions du récepteur avec des peptides de coactivateur et de corépresseur afin de révéler comment les mutations étudiées déstabilisent la conformation active du récepteur. La seconde partie s'intéresse à la caractérisation structurale par microscopie électronique du complexe humain entier PPAR γ -RXR α avec un fragment du coactivateur MED1 lié à son élément de réponse à l'ADN. Ces données de thèse fournissent des informations pour la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Mots-clés : PPAR γ , RXR α , Cancer de vessie, Biologie Structurale, Biophysique.

Résumé en anglais

The peroxisome-proliferator-activated receptors, PPARs are non-steroidal nuclear receptors that are ligand-dependent transcription factors. They bound to their hormone responses elements on target DNA, as heterodimers with the retinoid X receptor (RXR). While *PPARG* has mainly been shown to be involved in adipogenesis and glucose homeostasis, more recent data indicate anti-proliferative and differentiation functions of *PPARG* notably it regulates urothelial differentiation. It has mainly been described as tumor suppressor but it also displays a protumorigenic role in bladder cancer. For a better understanding of the molecular mechanisms regulating PPAR γ -RXR α transcription and protumorigenic activity of PPAR γ -RXR α in these cancers, my work focused on the structure-function study of inactivating PPAR γ mutants identified in basal bladder tumors. The results obtained by X-ray crystallography and biophysical methods allowed us to characterize the interactions of the nuclear receptor with coactivator and corepressor peptides, and to reveal how the studied mutations affect the active conformation of the receptor. The second part focuses on the structural characterization by electron microscopy of the whole human PPAR γ -RXR α complex with a fragment of the MED1 coactivator linked to its DNA response element. These thesis data provide information for the design of new therapeutic strategies.

Key words: PPAR γ , RXR α , Bladder cancer, Structural Biology, Biophysics.