

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé
IGBMC - CNRS UMR 7104 - Inserm U 1258

THÈSE présentée par :
Sandra CHALHOUB

soutenue le : **12 Juin 2020**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

**Études structurales et fonctionnelles
des complexes de corégulation du
récepteur nucléaire de la Vitamine D**

THÈSE dirigée par :

Dr. ROCHEL Natacha

DR, CNRS, IGBMC, Illkirch

RAPPORTEURS :

Dr. BOURGUET William

DR, CNRS, CBS, Montpellier

Dr. LEROMANCER Muriel

DR, Inserm, CRCL, Lyon

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Dr. CERALINE Jocelyn

MCU-PH, IGBMC, Illkirch

REMERCIEMENTS

De prime abord, je tiens à remercier vivement Natacha Rochel de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné l'opportunité d'explorer le domaine des récepteurs nucléaires, tout au long de ces trois belles années ; Natacha, ton encadrement, ta disponibilité et tes conseils ont été fort appréciés. Je voudrai te témoigner ici de toute ma reconnaissance.

Je tiens à remercier également les membres du jury le Dr. William Bourguet, le Dr. Muriel LeRomancer et le Dr. Jocelyn Céraline pour avoir accepté de juger mon travail.

Ce travail réalisé est à la frontière de plusieurs disciplines et a largement bénéficié de l'expertise du Dr. Daniel Metzger et son équipe ; mes pensées vont à Gilles et Daniela pour leur aide inestimable et surtout les discussions scientifiques quotidiennes, dans le « coin café » du laboratoire. Merci Daniel d'avoir rendu cela possible.

Merci à notre cheffe d'équipe Annick Dejeagere d'avoir été toujours là, surtout pour ces apports lors des réunions de laboratoire, mais aussi de son écoute attentive.

Merci à tous les membres de l'équipe, notamment Carole et Judith pour leurs précieux conseils. A toi Syrine pour ton amitié, dynamisme et tous ces moments passés ensemble à refaire le monde. A tous les autres membres de l'équipe notamment Roland, Yasmine, Laurent, Wayne et Louis.

Merci à toutes les personnes des différentes plateformes de l'IGBMC, qui ont contribué de près ou de loin à cet aboutissement, notamment la plateforme de culture cellulaire, de cytométrie en flux, de protéomique, et d'imagerie et microscopie. Je tiens à remercier tout particulièrement Paola de la plateforme de biologie moléculaire, Catherine et Pierre de la plateforme de Biologie structurale et génomiques et Isabelle de la plateforme de Bacculovirus.

Merci au Dr. Sarah Cianferani et à Maxime Bourguet du LSMBO pour les expériences de spectrométrie de masse.

Merci à toutes les personnes du département de biologie structurale intégrative, notamment à Camille, Anna, Auguste, Christophe, Pernelle, Pauline, Alastair, Eduardo, Irina et bien d'autres...

Merci à tous mes amis Daniela, Annabella, Amar, Marguerita, Mohamad A.M, Valentina, Giovanni, Nicla, Ghina, Sarah, Naima et Mohamad R. pour les moments inoubliables qu'on a passé ensemble...

Ces années ont été marquées par des rencontres inoubliables, notamment Gabriel, Najwa, Elsa, Farouk, Youssef, Pamela, Alexa, Roland, Gisèle et bien d'autres...

Je remercie l'Association de la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP) pour m'avoir accordé un financement supplémentaire pour les derniers six mois de thèse.

Enfin, je tiens à remercier mes parents pour leur soutien sans limite, année après année. À mon frère et mes sœurs qui ont su toujours m'épauler. À toute ma famille proche, merci de tout ce que vous avez fait pour moi.

À toi mon amour, je t'adore....

Liste des publications

1. **Chalhoub, S.**, Rovito, D., Belorusova, A.Y., Laverny, G., Metzger, D., Rochel, N. *Exploring the effect of 9-cis retinoic acid, a retinoid X receptor agonist, on vitamin D receptor activities*. En cours de préparation.
2. Rovito, D., Belorusova, A.Y., **Chalhoub, S.**, Rerra, A.I., Guiot, E., Molin, A., Linglart, A., Rochel, N., Laverny, G., Metzger, D. *Cytosolic sequestration of the Vitamin D Receptor as a therapeutic option for vitamin D-induced hypercalcemia*. Soumis à Nature Communications. En cours de révision.
3. Belorusova, A.Y., **Chalhoub, S.**, Rochel, N. *Structural analysis of VDR complex with ZK168281 antagonist*. Soumis à Journal of Medical Chemistry. En cours de révision.
4. Belorusova, A., Bourguet, M., Hessmann, S., **Chalhoub, S.**, Kieffer, B., Sanglier-Cianferani, S., Rochel, N. *Molecular determinants of MED1 interaction with the DNA bound VDR-RXR heterodimer*. Soumis à Nucleic Acid Reserch Journal.

Communications affichées (Posters)

1. Biophysical characterization of Vitamin D receptor activities modulated by RXR ligands. **Chalhoub, S.**, Rovito, D., Rerra, A.I. Laverny, G., Rochel, N. *Meeting on Molecular Biophysics*, Hünfeld, Allemagne, 2019.
2. Biophysical characterization of Vitamin D receptor activities modulated by RXR ligands. **Chalhoub, S.**, Rovito, D., Rerra, A.I. Laverny, G., Rochel, N. *Journées du campus d'Illkirch* (JCI), Illkirch, 2019.
3. Biophysical characterization of Vitamin D receptor activities modulated by RXR ligands. **Chalhoub, S.**, Rovito, D., Rerra, A.I. Laverny, G., Rochel, N. *1st French congress on Integrative Structural Biology* (BSI-2019), Toulouse, 2019.
4. Nouvelle perspective de traitement pour les hypercalcémies secondaires à de forts taux de vitamine D. Rovito, D., Belorusova, A.Y., **Chalhoub, S.**, Rerra, A.I., Guiot, E., Molin, A., Linglart, A., Rochel, N., Metzger, D., Laverny, G. *Colloque régional scientifique "La recherche dans les maladies rares"*, Strasbourg 28 février 2020.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	8
LISTE DES ABRÉVIATIONS	10
APERÇU GÉNÉRAL	13
CHAPITRE 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE	15
1.1. HISTOIRE ET DÉCOUVERTE DE LA VITAMINE D	15
1.2. DONNÉES FONCTIONNELLES SUR LA VITAMINE D.....	15
1.2.1. <i>Métabolisme physiologique</i>	15
1.2.1.1 Synthèse de la vitamine D	15
1.2.1.2 Activation et transport	18
1.2.1.3 Catabolisme	18
1.2.2. <i>Homéostasie osseuse et minéralisation</i>	19
1.2.3. <i>Effets biologiques de la vitamine D</i>	20
1.2.4. <i>Pathologies liées à la vitamine D</i>	21
1.2.4.1 Dérégulation de l'homéostasie phosphocalcique	21
1.2.4.2 Le rachitisme et l'ostéomalacie	22
1.2.4.3 L'ostéoporose	23
1.2.5. <i>Pathologies génétiques</i>	23
1.2.5.1 Le rachitisme héréditaire lié à la résistance à la vitamine D	24
1.2.5.2 Le rachitisme lié à la déficience d'hydroxylation de vitamine D de type 1A.	24
1.2.5.3 Le rachitisme lié à la déficience d'hydroxylation de vitamine D de type 1B.....	25
1.2.5.4 L'hypercalcémie idiopathique infantile.	25
1.3. LE RÉCÉPTEUR NUCLÉAIRE DE LA VITAMINE D.....	26
1.3.1. <i>Données structurales du VDR et son mécanisme d'action</i>	26
1.3.2. <i>Hétérodimérisation VDR/RXR</i>	29
1.3.3. <i>Interaction avec l'ADN</i>	31
1.3.4. <i>La poche de fixation du ligand, LBP</i>	31
1.4. DÉVELOPPEMENT DES ANALOGUES DE LA VITAMINE D	32
1.4.1. <i>Ligands naturels du VDR</i>	33
1.4.2. <i>Analogues synthétiques de la vitamine D3</i>	33
1.4.2.1 Agonistes synthétiques	34
1.4.2.2 Antagonistes.	37
1.5. REGULATION DE LA TRANSCRIPTION ET CORÉGULATEURS	40
CHAPITRE 2. CARACTÉRISATION DE L'EFFET DU LIGAND DE RXR SUR L'ACTIVITÉ DU RÉCÉPTEUR VDR/RXR.....	45
2.1. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	45
2.2. INTRODUCTION SUR LES RÉCÉPTEURS X DES RÉTINOÏDES	46
2.2.1. <i>Généralités et rôle biologique</i>	46
2.2.2. <i>Ligands naturels</i>	47
2.2.2.1 Les rétinoïdes.....	47
2.2.2.2 Les acides gras.....	48
2.2.2.3 Les extraits de plantes.....	49
2.2.3. <i>Contradiction dans la littérature sur l'effet du ligand de RXR dans l'activité du VDR</i>	51
2.3. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	53
2.3.1. <i>Production et purification des protéines</i>	53
a. VDR/RXR	53
b. Médiateur 1.....	57
c. Domaine de liaison du ligand de VDR humain.....	58
d. Domaine de liaison du ligand de VDR du poisson-zèbre	59
e. Domaine de liaison du ligand du RXR α	60
2.3.2. <i>Caractérisation biophysique de l'effet du ligand de RXR</i>	61

2.3.2.1	Caractérisation de l'effet du ligand de RXR sur la liaison du VDR/RXR avec les éléments de réponse des gènes cibles (VDRE DR3) par anisotropie de fluorescence	61
2.3.2.2	Hétérodimérisation par la résonance des plasmons de surface (SPR)	63
2.3.2.3	Stabilité de l'hétérodimère par fluorimétrie différentielle à balayage (nano-DSF)	64
2.3.2.4	Caractérisation de l'effet du ligand de RXR sur la liaison avec les co-activateurs par MST	65
2.3.2.5	Caractérisation de l'effet des mutations de RXR sur la liaison de l'hétérodimère avec Med1 par SPR	66
2.3.3.	<i>Caractérisation fonctionnelle de l'effet du ligand de RXR</i>	67
2.3.3.1	Effet sur la transcription de gènes cibles par transactivation transitoire	67
2.3.3.1.1	Culture des cellules IEC18	67
2.3.3.1.2	Transfection des cellules	68
2.3.3.1.3	Traitement des cellules	68
2.3.3.1.4	Récolte et lyse des cellules	69
2.3.3.1.5	Test β -galactosidase	69
2.3.3.1.6	Test de la luciférase	69
2.3.3.2	Mesure de l'expression des gènes par qRT-PCR	70
2.3.3.3	Effet sur la prolifération des cellules LNCaP et MCF-7	70
2.4.	RÉSULTATS	72
2.4.1.	<i>Publication 1: Exploring the effect of 9-cis retinoic acid, a retinoid X receptor agonist, on vitamin D receptor activities</i>	73
2.4.2.	<i>Résumé des principaux résultats supplémentaires de la caractérisation biophysique de RXR et de son ligand sur l'activité de l'hétérodimère VDR/RXR</i>	87
2.4.2.1	Caractérisation biophysique de l'effet du ligand de RXR sur la stabilité de l'hétérodimère par nano-DSF	88
2.4.2.2	Caractérisation de l'effet de RXR sur l'interaction avec Med1	90
2.4.2.3	Caractérisation de l'effet du ligand de RXR sur la prolifération cellulaire	91
2.5.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	93

CHAPITRE 3. CARACTÉRISATION BIOPHYSIQUE ET FONCTIONNELLE DU MÉCANISME ANTAGONISTE DU ZK168281

97

3.1.	GÉNÉRALITÉS SUR LES ANTAGONISTES DE LA SERIE ZK	97
3.2.	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	98
3.3.	MATERIELS ET METHODES	99
3.3.1.	<i>Production et purification des protéines</i>	99
3.3.2.	<i>Caractérisation biophysique de l'effet du ZK168281</i>	100
3.3.2.1	Caractérisation de l'effet du ZK168281 sur l'interaction du VDR/RXR avec les peptides des co-régulateurs SRC1 NR2 et NCoR ID2 par MST	100
3.3.2.2	Caractérisation de l'interaction entre zVDR LBD avec le peptide fluoresceine-SRC1 NR2 par MST	101
3.3.2.3	Caractérisation de l'affinité de fixation du ZK168281 pour VDR par MST	102
3.3.2.4	Caractérisation de l'interaction hVDR/hWBP4 par MST	102
3.3.2.5	Caractérisation de l'effet de ZK168281 sur l'affinité d'hétérodimérisation entre VDR et RXR α par SPR	103
3.3.2.6	Caractérisation des complexes de zVDR et hVDR en présence du ZK168281 et du peptide co-activateur SRC1 NR2, par spectrométrie de masse, en conditions natives	104
3.3.3.	<i>Expériences de transactivation par la technique du gène-rapporteur</i>	105
3.3.3.1	Culture des cellules IEC18	105
3.3.3.2	Transfection des cellules	105
3.3.3.3	Traitement des cellules	105
3.4.	RÉSULTATS	106
3.4.1.	<i>Publication 2: Cytosolic sequestration of the Vitamin D Receptor as a therapeutic option for vitamin D-induced hypercalcemia</i>	107
3.4.2.	<i>Publication 3: Structural analysis of VDR complex with ZK168281 antagonist</i>	138
3.4.3.	<i>Résumé des principaux résultats supplémentaires de la caractérisation biophysique de l'effet du ZK168281</i>	151
3.4.3.1	Caractérisation de l'affinité de liaison du ZK168281 pour le VDR	151
3.4.3.2	Effet du ZK168281 sur l'hétérodimérisation du VDR avec le RXR α	152
3.4.3.3	Effet du ZK16281 sur le recrutement de peptides co-régulateurs par VDR	153
3.4.3.4	Caractérisation des complexes de zVDR et hVDR en présence du ZK168281 et du peptide co-activateur SRC1 NR2, par spectrométrie de masse, en conditions natives	155
3.4.3.5	Caractérisation de l'effet du ZK168281 sur la liaison du VDR avec la protéine WBP4	157
3.5.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	159

CONCLUSION GÉNÉRALE	162
RÉFÉRENCES.....	164

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1. Structures de la vitamine D2 (ergocalciférol) et de la vitamine D3 (cholécalférol).	16
Figure 2. Principales voies de synthèse, d'activation et d'inactivation de la vitamine D3.	17
Figure 3. Schéma des voies de dégradation de la vitamine D3.	19
Figure 4. Schéma montrant la dérégulation phosphocalcique à l'origine du rachitisme.	22
Figure 5. Organisation modulaire du VDR	26
Figure 6. Changement structural au cours de l'activation du RXR.	28
Figure 7. Demi-sites hexamériques d'un élément de réponse de type DR3 reconnu par VDR/RXR.	29
Figure 8. Structure du complexe VDR/RXR/ADN obtenue par cryo-microscopie électronique.	30
Figure 9. Structure 3D du LBD de hVDR en complexe avec le calcitriol.	32
Figure 10. Structures chimiques des analogues et des métabolites de la vitamine D3.	35
Figure 11. Classification des ligands antagonistes du VDR.	38
Figure 12. Schéma du mécanisme de régulation de la transcription par VDR.	39
Figure 13. Schéma représentant les corépresseurs de la transcription de VDR.	41
Figure 14. Schéma représentant les co-activateurs de la transcription de VDR.	42
Figure 15. Structure chimique de l'acide 9-cis rétinolique.	48
Figure 16. Structures chimiques des ligands naturels de RXR provenant des plantes.	50
Figure 17. Chromatogramme de la protéine his-hVDR obtenu après exclusion de taille sur colonne Superdex 200 10/300.	54
Figure 18. Chromatogramme de la protéine his-hRXR α ANTD obtenu après exclusion de taille sur colonne Superdex 200 16/60.	55
Figure 19. Gel SDS-PAGE 10 % montrant la migration des fractions issues des deux chromatographies de hVDR et hRXR α ANTD.	55
Figure 20. Chromatogramme du complexe protéique his-hVDR/his-RXR α ANTD obtenu après exclusion de taille sur colonne Superdex 200 16/60.	56
Figure 21. Gel SDS-PAGE 10 % montrant la migration des fractions issues de la chromatographie d'exclusion de taille pour Med1(50-660), his-hVDR/his-RXR α ANTD wt et his-hVDR/his-RXR α ANTD (289-458).	57
Figure 22. Chromatogramme de la protéine hMed1(50-660) obtenu après exclusion de taille sur colonne Superdex 200 10/300	58
Figure 23. Chromatogramme de la protéine hVDR LBD après coupure à la thrombine de l'étiquette poly-histidines, obtenu après exclusion de taille sur colonne Superdex 200 26/60.	59
Figure 24. Chromatogramme de la protéine zVDR LBD après coupure à la thrombine de l'étiquette poly-histidines, obtenu après exclusion de taille, sur colonne Superdex 200 10/300.	60
Figure 25. Chromatogramme de la protéine RXR LBD après coupure à la thrombine de l'étiquette poly-histidines, obtenu après exclusion de taille, sur colonne Superdex 200 10/300.	61
Figure 26. Courbes de dénaturation thermique obtenues par nano-DSF pour caractériser l'effet du RXR et des ligands sur la stabilité du complexe VDR/RXR.	88
Figure 27. Caractérisation de l'effet du RXR sur la liaison avec Med1 par SPR.	91
Figure 28. Caractérisation de l'effet des ligands du VDR et de RXR sur la prolifération des lignées MCF-7 et LNCaP.	92
Figure 29. Structures chimiques du ZK168281 et ZK159222.	98
Figure 30. Chromatogramme de la protéine WBP4 après coupure à la TEV de l'étiquette GST, obtenu après exclusion de taille sur colonne Superdex 200 10/300.	100

Figure 31. Courbes sigmoïdales permettant la détermination des constantes de dissociation (K_D) caractérisant l'interaction entre le VDR LBD et 1,25D3 (en bleu) ou le ZK168281 (en rouge).	153
Figure 32. Caractérisation par MST de l'effet du ZK168281 sur l'interaction du VDR avec les peptides corégulateurs.	155
Figure 33. Spectres de spectrométrie de masse en conditions natives du zVDR/ZK168281 seul et en présence du co-régulateur SRC1 NR2.....	156
Figure 34. Spectres de spectrométrie de masse en conditions natives du hVDR/ZK168281 seul et en présence du co-régulateur SRC1 NR2.....	157
Figure 35. Caractérisation de l'interaction du VDR avec la protéine WBP4.....	159
Tableau 1. Séquences des éléments de réponse de type DR3 utilisés	62
Tableau 2. Séquences des oligonucléotides (rat) utilisés pour quantifier l'expression des transcrits par RT-qPCR.	70
Tableau 3. Valeurs de T_m (°C) des complexes VDR et RXR en présence de différentes combinaisons de ligands et d'ADN (<i>slc37a2</i> , <i>sema5</i> et <i>s100g</i>)..	89
Tableau 4. Caractérisation de l'effet du ZK168281 sur l'hétérodimérisation entre les LBDs de VDR et RXR par SPR.....	154

LISTE DES ABRÉVIATIONS

1,25D3 : 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3

25D3 : 25-hydroxyvitamine D3

7DHC: 7-déhydrocholestérol

9-cis RA : 9-cis Retinoic Acid

A : Adénine

ADN: Acide désoxyribonucléique

AF-2: Activating function- 2

ATP: Adénosine tri-phosphate

ARC: Activator-Recruited Cofactor

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: Acide ribonucléique messenger

CAR: Constitutive Androstane Receptor

C: cytosine

CBP: CREB binding protein

CREB: Cyclic AMP response element-binding

CDK8: Cycline kinase 8

CHAPS: 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate

DBD: DNA Binding Domain

DBP: Vitamin D Binding protein

DO: Densité optique

DRIP: Vitamin D Receptor-Interacting Protein

DMO: Densité Minérale Osseuse

DR : Direct Repeat

FXR: Récepteur farnésoïde X

G: Guanine

h: fait référence à l'espèce humaine

HAT: histone acétyl-transférase

HDX-MS: hydrogen deuterium exchange coupled with mass spectrometry

IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

ISWI: Imitation Switch

K_D : Constante de dissociation

LCoR : Corépresseur nucléaire ligand-dépendant

LBD: Ligand Binding Domain

LBP: Ligand Binding Pocket

LXR: Liver X Receptor/ récepteur X du foie

MAPK: Mitogen activated protein kinase

MST: Micro-scale thermophoresis

MW: Molecular Weight

MWCO: Molecular Weight Cut-off

Nano-DSF: Differential scanning fluorimetry

NCoA: Nuclear-receptor coactivator

NCoR: Nuclear-receptor corepressor

NTD: N-Terminal Domain

NR : récepteur nucléaire

ONPG: Orthonitrophényl- β -D-galactopyrannoside

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis

PCAF: Poly-bromo associated factor

PCR: Polymerase Chain Reaction

PBS: Phosphate Buffered Saline

PDB: Protein Data Bank

PGC1 α : PPAR-Gamma Coactivator 1 α

PIC: Pre-Initiation Complex

Pol: RNA Polymerase

PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

PRAME: Preferentially Expressed Antigen of Melanoma

PXR: Pregnane X Receptor

PTH: Hormone Parathyroïde

RAR: Retinoic Acid Receptor

REA: Répresseur de l'activité des récepteurs des œstrogènes

RIP140 : Protéine d'interaction des récepteurs 140

RAR: Retinoic Acid Receptor
RXR: Retinoid X receptor
SAXS: Small-Angle X-ray Scattering
SDS: Sodium dodecyl sulfate
SMRT: Silencing Mediator for Retinoid or Thyroid hormone receptors
SPR: Surface Plasmon Resonance
SRC: Steroid receptor co-activator
SWI / SNF: switch/sucrose non-fermentable
T : Thymine
TCEP : Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TF : Transcription Factor
TR : récepteur de l'hormone thyroïde
TRAP : Thyroid Receptor-Associated Protein
UVB : rayons ultraviolets B
VDR: Vitamin D Receptor
VDRE: Vitamin D Response Elements
WBP4: WW Domain Binding Protein 4
WINAC: WSTF including nucleosome assembly complex
z : fait référence à l'espèce de poisson-zèbre

APERÇU GÉNÉRAL

Le VDR (*Vitamin D Receptor*, récepteur de la vitamine D) est un facteur de transcription qui appartient à la famille des récepteurs nucléaires. Le VDR agit sous forme d'hétérodimère avec le partenaire obligatoire RXR (*Retinoid X Receptor*, récepteur X de l'acide rétinoïque) pour contrôler la transcription de gènes cibles. Le RXR est aussi le partenaire hétérodimérique pour d'autres récepteurs nucléaires (Evans and Mangelsdorf, 2014) et l'effet du ligand du RXR est alors variable. En effet, certains hétérodimères sont permissifs et peuvent donc être activés par le ligand du RXR (DiRenzo et al., 1997; Kojetin et al., 2015; Wang et al., 2018; Zheng et al., 2018), alors que d'autres sont non-permissifs (Li et al., 2002) ou permissifs conditionnels (le Maire et al., 2019; Westin et al., 1998). Pour VDR/RXR, des données contradictoires existent dans la littérature sur le rôle des ligands du RXR sur l'activité transcriptionnelle du VDR. Alors que certaines études montrent que le RXR est silencieux (Forman et al., 1995), d'autres montrent que le ligand du RXR présente un effet inhibiteur (Thompson et al., 1998), ou un effet activateur suggérant que VDR/RXR serait un hétérodimère permissif conditionnel (Bettoun et al., 2003; Sanchez-Martinez et al., 2006).

Mon projet de thèse porte sur les mécanismes d'action du VDR. La première partie concerne l'étude du rôle du RXR et de son ligand dans l'activité de régulation de la transcription du VDR. Ce travail combine une approche fonctionnelle et biophysique des effets du ligand de RXR sur l'hétérodimérisation avec le VDR, la liaison avec l'ADN, le recrutement des co-activateurs et la transcription des gènes cibles. Pour cela, des expériences de culture cellulaire, complétées par des expériences de transactivation transitoire, de caractérisation biophysique par anisotropie de fluorescence, mais également par résonance des plasmons de surface et de thermophorèse à microéchelle, ont été réalisées. La deuxième partie porte sur la caractérisation biophysique et fonctionnelle du mécanisme d'action d'un ligand antagoniste du VDR, ZK168281. Ce projet a été mené en collaboration avec l'équipe du Dr. Daniel Metzger à l'IGBMC.

Le manuscrit de thèse est composé de trois chapitres. Dans **le chapitre 1**, j'ai décrit l'état des connaissances concernant le mécanisme d'action du VDR, ses ligands agonistes et antagonistes et son rôle en physiologie normale et dans les pathologies associées à son

altération. En outre, j'ai présenté un aperçu des données structurales connues du complexe VDR/RXR et son rôle dans la transcription des gènes et le recrutement des différents corégulateurs.

Le **chapitre 2** porte sur l'étude des bases moléculaires de l'effet du ligand du RXR 9-cis RA (*Retinoic Acid*) sur l'activité de l'hétérodimère VDR/RXR. L'objectif est d'étudier les effets du 9-cis RA sur les activités transcriptionnelles induites par divers ligands du VDR et de déterminer si le ligand de RXR peut synergiser les activités des ligands du VDR pour des applications thérapeutiques. Après une introduction générale sur les données structurales de RXR et de ses différents ligands, j'ai décrit les effets de la caractérisation du ligand de RXR sur l'activité de l'hétérodimère VDR/RXR. Les données sont présentées dans la **publication 1** ainsi que dans la section des résultats supplémentaires. Il s'en suit une section où je discute les résultats et perspectives pouvant en découler.

Le **chapitre 3** porte sur l'étude du mécanisme moléculaire du ligand antagoniste du VDR, ZK168281, grâce à une combinaison d'approches biophysique et cellulaire. En effet, alors que le potentiel antagoniste de ZK168281 a été décrit dans la littérature, son mécanisme de signalisation n'a jamais été élucidé. Après un résumé de l'état des connaissances cet antagoniste, et une partie présentant les protocoles et les expériences réalisées, j'ai conclu avec la présentation des résultats sous la forme de deux publications (**publication 2** et **3**) avec une description de quelques résultats supplémentaires ne figurant pas dans les publications. Enfin, une section concernant la discussion des résultats et les perspectives clôture cette partie.

Ces travaux contribueront à une meilleure compréhension des mécanismes d'action du complexe VDR/RXR et des ligands régulant leurs activités et enfin au développement de médicaments sélectifs à applications thérapeutiques diverses.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Histoire et découverte de la vitamine D

Le rachitisme est connu depuis l'antiquité mais n'a été décrit qu'au XVe siècle. Whistler a été le premier à décrire des cas de rachitisme chez des sujets présentant des squelettes mal minéralisés et déformés. A la fin du XIXe siècle, la révolution industrielle a eu lieu et la population rurale s'est urbanisée et la fumée des usines industrielles a pollué l'atmosphère, diminuant l'ensoleillement. Ainsi, le rachitisme est apparu dans certains pays comme l'Angleterre, et a été nommé la maladie anglaise. Quelques rapports sur les avantages de l'action de l'huile des foies de morue sont apparus, mais ils n'étaient pas validés scientifiquement. Suite à la découverte des vitamines, le Dr. Anglais Edward Mellanby a réalisé des expérimentations sur des chiens, l'amenant à conclure que le rachitisme est causé par une carence en vitamine liposoluble (Windaus A, 1928). Par la suite, La vitamine D a été identifiée par le Dr. Elmer McCollum qui a montré que l'huile de foie de morue prévient le rachitisme via l'existence d'une substance qu'il désigna vitamine D (McCollum E.V., 1922). Finalement, Adolf Windaus a isolé la vitamine D2 en 1932, puis la vitamine D3 en 1934 (Windaus A, 1932).

1.2 Données fonctionnelles sur la vitamine D

1.2.1 Métabolisme physiologique

1.2.1.1 Synthèse de la vitamine D

Chez l'homme, la vitamine D existe sous deux formes : (1) la vitamine D2 ou ergocalciférol, produite par les végétaux et provenant de l'alimentation, et (2) la vitamine D3 ou cholécalciférol ; cette dernière provient de l'alimentation d'origine animale et est synthétisée

dans la peau, à partir du 7-déhydrocholestérol (7-DHC), sous l'action des rayons ultraviolets B (UVB) (Figure 1). Les vitamines D2 et D3 sont considérés comme des sécostéroïdes.

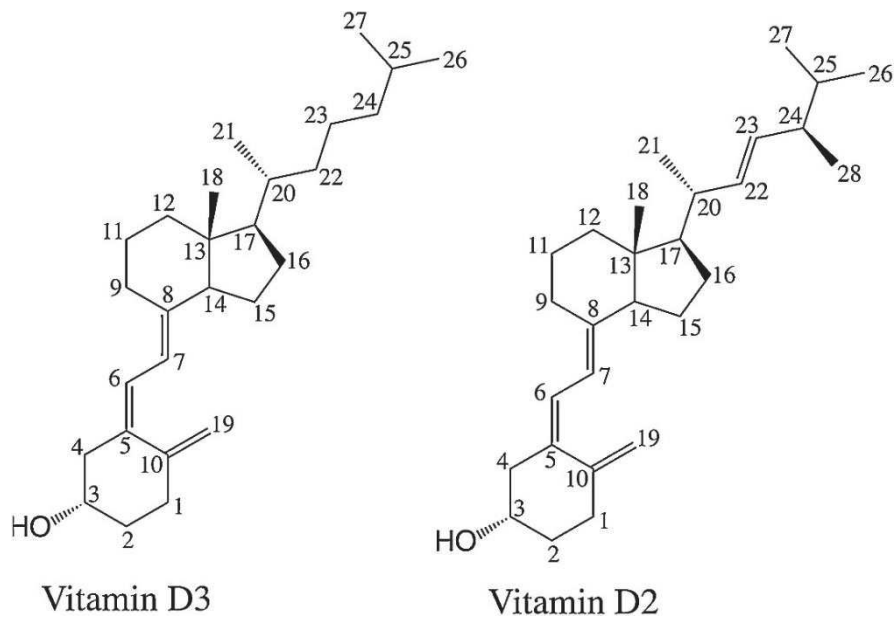


Figure 1 : Structures de la vitamine D2 (ergocalciférol) et la vitamine D3 (cholécalférol) (Tuckeya R.C., 2019)

La vitamine D2 est produite par l'action des rayons UVB sur la membrane fongique (Holick, 2007). Le 7-DHC correspond à la pré-vitamine D3 initialement synthétisée au niveau de la peau ; il subit une isomérisation thermique lente pour former la vitamine D3 (Figure 2) (Holick, 2003; Wacker and Holick, 2013). En effet, sous l'action d'un rayonnement UVB prolongé, la majorité de la pré-vitamine D3 subit d'autres réactions photochimiques produisant le lumistérol 3 et le tachistérol 3 ; on note aussi l'isomérisation des doubles liaisons dans le système triène de la prévitamine D3 (Wacker and Holick, 2013).

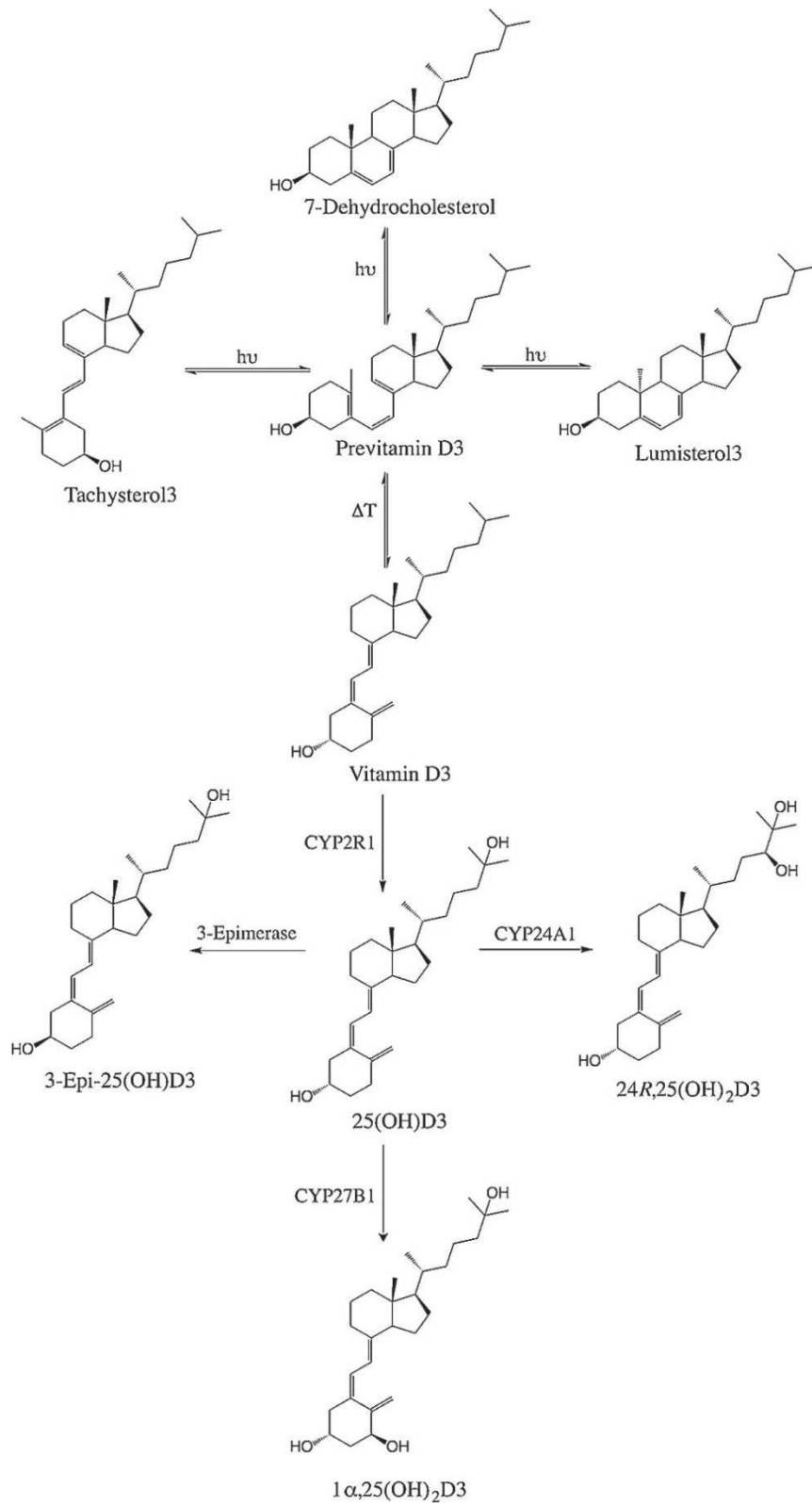


Figure 2 : Principales voies de synthèse, d'activation et d'inactivation de la vitamine D3. (Tuckeya R.C., 2019)

1.2.1.2 Activation et transport

La vitamine D3 est une pro-hormone activée par deux hydroxylations séquentielles en C1 α et C25 par des enzymes de la famille du cytochrome P450 (CYP) et conduisant à la 1 α ,25-dihydroxyvitamine D3 [1,25D3] ou calcitriol (Figure 2). L'hydroxylation en C25 est principalement catalysée par le CYP2R1 dans le réticulum endoplasmique du foie avec une contribution du CYP27A1, présent dans les mitochondries hépatiques (Al Mutair et al., 2012; Cheng et al., 2004; Christakos et al., 2016; Jones et al., 2014; Zhu and DeLuca, 2012; Zhu et al., 2013). La 25-hydroxyvitamine D3 [25D3] ou calcidiol est la forme circulante de la vitamine D3, généralement utilisée pour surveiller le niveau sanguin en vitamine D3. Le calcidiol circulant est dans une deuxième étape hydroxylé au niveau du C1 α dans les mitochondries des cellules rénales, par l'enzyme CYP27B1 (nommée aussi 1 α -hydroxylase), produisant le calcitriol qui est ensuite libéré dans la circulation sanguine. Le CYP27B1 est présent à des niveaux inférieurs dans de nombreux autres tissus, tels que la peau et le placenta, permettant une synthèse du calcitriol dans ces derniers. Alors que seulement 10% du 25D3 circulant sera transformé en calcitriol au niveau de ces tissus, 90% du métabolite 25D3 est transporté dans le plasma sous une forme liée à la protéine de liaison à la vitamine D (*Vitamin D Binding Protein ou DBP*) (Adams and Hewison, 2012). En effet, la DBP est une protéine de transport spécifique pour les formes de vitamine D3 circulantes alors que la partie majeure du 25D3 reste liée à l'albumine sérique (Herrmann et al., 2017; Tsuprykov et al., 2018).

1.2.1.3 Catabolisme

L'enzyme d'inactivation du calcitriol CYP24A1 est une 24-hydroxylase mitochondriale de la famille des cytochromes P450 (Figures 2 et 3). Elle est prédominante dans le rein et l'intestin mais aussi localisée dans toutes les cellules, contrôlant ainsi le taux de la vitamine D3 actif à l'échelle de l'organisme. CYP24A1 reconnaît à la fois le calcitriol et le calcidiol et agit

spécifiquement au niveau de la chaîne latérale aliphatique. L'hydroxylation sur le C24 aboutit au $1\alpha,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ et au $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ et constitue la première étape dans la voie d'inactivation qui se termine par la formation d'acide calcitroïque inactif (Jones G, 2012). Une autre voie aboutit à la formation du $1,23,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ et du $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ -26,23-lactone (Figure 3). De plus, CYP24A1 contrôle les concentrations locales en calcitriol dans les différents tissus cibles et diminue l'association du 25D_3 disponible pour la 1α -hydroxylase. Il existe une voie de désactivation de la vitamine D non catalysée par ces cytochromes mais qui induit une épimérisation sur le carbone 3 du $25(\text{OH})\text{D}_3$ en 3-épi- $25(\text{OH})\text{D}_3$ (figure2) (Tuckey R.C., 2019).

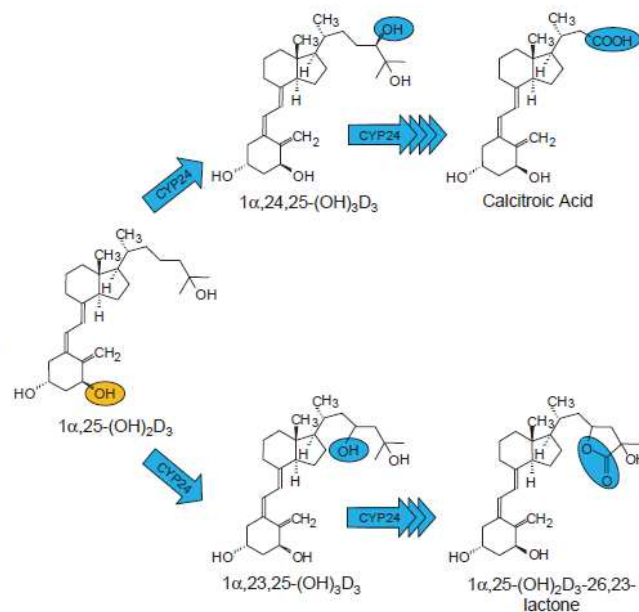


Figure 3 : Schéma des voies de dégradation de la vitamine D3 (Prosser and Jones, 2004)

1.2.2 Homéostasie osseuse et minéralisation

Le calcitriol, la forme active de la vitamine D3, est une hormone qui régule l'homéostasie du calcium et du phosphate, en coopération avec les hormones phosphocalciques (PTH et FGF-23). Le calcitriol augmente l'absorption intestinale ainsi que la réabsorption rénale du calcium et du phosphore et favorise la résorption osseuse (Courbebaisse and Souberbielle,

2011). Au niveau rénal, il participe à sa propre régulation par l'inhibition de la 1 α -hydroxylase et la stimulation de la 24-hydroxylase (Briot K, 2009). L'effet principal du calcitriol au niveau du tissu osseux consiste à mobiliser le calcium osseux en favorisant la résorption ostéoclastique. La libération extracellulaire du calcium et du phosphate favorise par la suite la minéralisation des matrices osseuses et cartilagineuses.

1.2.3 Effets biologiques de la vitamine D

Le calcitriol agit en se fixant à son récepteur nucléaire, le VDR, qui appartient à la famille des récepteurs nucléaires. Le VDR agit en tant que facteur de transcription et régule l'expression des gènes (effets génomiques). De plus, des effets non-génomiques ont été décrits impliquant les canaux ioniques, les protéines kinases et d'autres voies de signalisation (Jurutka et al., 2001).

En plus de son rôle essentiel dans l'homéostasie phosphocalcique (Christakos et al., 2016; Holick, 2007), le calcitriol contrôle également certaines fonctions telles que la prolifération et la différenciation, l'apoptose, la sénescence, la migration et les mécanismes de protection et de réparation des cellules. Le calcitriol présente des propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices ayant des effets préventifs et thérapeutiques pour les maladies auto-immunes (Hewison, 2011; Vanherwegen et al., 2017). Récemment, une étude a démontré que la supplémentation en vitamine D pouvait réduire le risque d'infections des voies respiratoires, notamment sur l'épidémiologie de la grippe et du COVID-19 (Grant W.B., 2020). Il joue un rôle important au cours de la grossesse et le développement fœtal et infantile (Berridge, 2018; Ganguly et al., 2018) ainsi que dans le développement neurologique (Berridge, 2018; Di Somma et al., 2017). Il inhibe également la progression tumorale y compris celles d'origine gastro-intestinale, génito-urinaire, mammaire, prostatique et pulmonaire (Fleet et al., 2012; Masuda and Jones, 2006) ou le mélanome (Slominski et al., 2018). Au niveau de la peau, le

calcitriol joue un rôle important dans la formation de la barrière épidermique et du cycle capillaire.

1.2.4. Pathologies liées à la vitamine D

1.2.4.1 Dérégulation de l'homéostasie phosphocalcique

Les concentrations normales sanguines recommandées du 25D3 chez l'enfant et l'adulte, doivent être situées entre 30 et 50 nmol/L. Des concentrations supérieures à 50 nmol/L sont considérées comme étant exedantaires et celles inférieures à 30nmol/L comme déficientes (Ross et al., 2011).

Les conséquences d'une carence en vitamine D3 ou d'une perte d'action de la vitamine D3 (par un déficit de son approvisionnement, une activation métabolique ou une inactivation de son récepteur) est à l'origine de nombreuses pathologies dont le rachitisme, l'ostéomalacie et l'ostéoporose.

Le déficit en vitamine D3 entraîne une hypocalcémie par baisse de l'absorption calcique intestinale et de la réabsorption rénale. La diminution de la calcémie est responsable d'une augmentation de synthèse et de sécrétion de la PTH, tout en augmentant l'hydroxylation du 25D3 en 1,25D3. Ainsi, une carence est liée au déséquilibre de la concentration sérique des formes 1,25D3 et 25D3. L'hyperparathyroïdie secondaire maintient la calcémie en mobilisant les réserves de l'os ce qui engendre notamment une déminéralisation osseuse.

Le rôle principal de la vitamine D est de maintenir directement et par l'intermédiaire de la PTH, une bonne homéostasie du métabolisme osseux, et ceci tout au long de la vie. La calcémie sanguine est ainsi maintenue dans une fourchette très étroite par les hormones calciotropes. Par conséquent, une altération du métabolisme phosphocalcique peut avoir des répercussions importantes sur les processus de minéralisation des os et des dents.

1.2.4.2 Le rachitisme et l'ostéomalacie

Le rachitisme a été associé à un manque d'apport nutritionnel en vitamine D3 ou bien une exposition insuffisante au soleil, ou un manque d'apport alimentaire en calcium avec un taux normal de vitamine D. Le rachitisme est un syndrome clinique chez l'enfant, résultant d'un retard de minéralisation et de croissance des os. Trois grandes catégories peuvent être décrites: le rachitisme entraînant une incapacité à maintenir une homéostasie normale du calcium (calciopénique), le rachitisme qui affecte principalement l'homéostasie du phosphate (phosphopénique) et le rachitisme qui inhibe directement le processus de minéralisation. Globalement, le rachitisme dû à la nutrition reste la forme plus fréquente de la maladie.

Les changements biochimiques classiques des carences en vitamine D chez les enfants qui présentent un rachitisme sont des symptômes d'hypocalcémie, d'hypophosphatémie et d'élévation des concentrations de phosphatase alcaline et de PTH (Thacher, 2018).

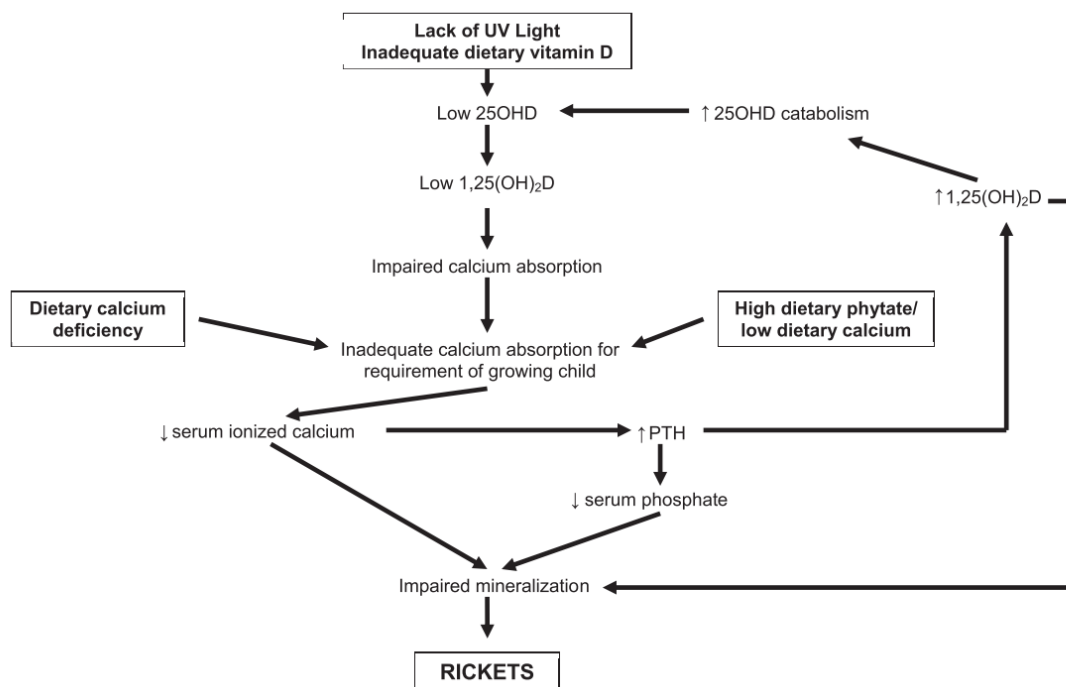


Figure 4 : Schéma montrant la dérégulation phosphocalcique à l'origine du rachitisme (Thacher, 2018)

L'ostéomalacie, une autre maladie osseuse liée à un taux insuffisant de vitamine D3, est une ostéopathie étendue à l'ensemble du squelette chez l'adulte. Elle est généralement caractérisée par une diminution des concentrations extracellulaires de calcium et phosphate, conduisant à un retard de minéralisation de la matrice avec un excès de tissu ostéoïde (hyperostéoïdose). Les patients présentent ainsi un tissu osseux fragile et ont un risque de fracture majoré au niveau du bassin, du thorax et des membres inférieurs.

1.2.4.3 L'ostéoporose

L'étude des polymorphismes du gène du VDR ont figurés parmi les premiers candidats de gènes explorés dans le domaine de l'ostéoporose, en plus des facteurs héréditaires tels que la densité minérale osseuse (DMO) et la taille. Ainsi, une carence en vitamine D induit une mauvaise minéralisation de la matrice osseuse. En effet, des données épidémiologiques ont montrées que des taux sériques bas de 25D3 sont corrélés avec une baisse de la densité osseuse chez les hommes et les femmes. Enfin, une étude chez les femmes et les hommes âgés de plus que 50 ans a montré que le traitement combiné associant la vitamine D avec du calcium aide à diminuer de 5% à 30% le risque fracturaire (Ebeling et al., 2018).

1.2.5 Pathologies génétiques

Certaines pathologies héréditaires liées à une altération du métabolisme de la vitamine D ont été identifiées. La base génétique de ces pathologies implique soit des mutations génétiques du VDR ou des gènes codants des enzymes impliqués dans le métabolisme du calcitriol. Parmi les quelques pathologies héréditaires identifiés, on note le rachitisme rachitisme héréditaire lié à la résistance à la vitamine D, le rachitisme lié à la déficience d'hydroxylation de la vitamine D de type 1A, le rachitisme lié à la déficience d'hydroxylation de la vitamine D de type 1B et l'hypercalcémie idiopathique infantile.

1.2.5.1 Le rachitisme héréditaire lié à la résistance à la vitamine D

Le rachitisme héréditaire lié à la résistance à la vitamine D est une maladie génétique récessive rare, causée par des mutations hétérogènes du gène du VDR, affectant les domaines fonctionnels du récepteur, et qui se traduisent par une résistance à l'action du calcitriol au niveau des organes. Le rachitisme héréditaire lié à la résistance à la vitamine D se caractérise par un VDR défectueux affectant le système endocrinien de la vitamine D. Une diminution de l'absorption intestinale du calcium et du phosphate entraîne une diminution de la minéralisation osseuse, une hyperparathyroïdie secondaire ainsi qu'une alopecie, dans certains cas. En outre, des anomalies squelettiques profondes ont été trouvées chez certains patients (Malloy et al., 2018). Sur le plan mécanistique, les mutations faux-sens identifiées dans le domaine de liaison à l'ADN (DBD) empêchent le VDR de se lier au niveau des promoteurs de l'ADN, bloquant son activité (Sone T, 1989). Enfin, des mutations affectant le LBD ont également été identifiées ; celles-ci peuvent perturber la liaison avec le ligand, la dimérisation avec RXR (Malloy et al., 2001; Whitfield G.K., 1996) ou la liaison avec les coactivateurs (Malloy et al., 2002).

1.2.5.2 Le rachitisme lié à la déficience d'hydroxylation de vitamine D de type 1A

Le rachitisme lié à la déficience d'hydroxylation de vitamine D de type 1A est une maladie autosomique récessive rare, provoquée par des mutations affectant le gène codant la 25-hydroxyvitamine D-1 α hydroxylase (*CYP27B1*), conduisant à une incapacité à synthétiser le calcitriol. Cette maladie se caractérise par une hypocalcémie persistante qui déclenche une hyperparathyroïdie secondaire et une hyperaminoacidurie (Arnaud C., 1970). Une diminution de l'absorption intestinale du calcium conduit à une basse teneur urinaire en calcium et une élévation du calcium fécal. La concentration de phosphate sérique peut être normale ou faible. Les patients atteints du rachitisme lié à la déficience d'hydroxylation de la vitamine D de type 1A sont traités par des doses élevées de vitamine D₃, afin de surmonter la carence en

CYP27B1 (Arnaud C., 1970; Hamilton R., 1970). De plus, les doses thérapeutiques sont proches des doses toxiques et risquent d'exposer le patient à une néphrocalcinose ou à une insuffisance rénale.

1.2.5.3 Le rachitisme lié à la déficience d'hydroxylation de vitamine D de type 1B

Des mutations affectant le gène *CYP2R1* réduisent l'expression ou la fonction de l'enzyme CYP2R1 et ont été associées au rachitisme, avec des faibles niveaux circulants de 25D3 (Al Mutair et al., 2012; Cheng et al., 2004; Thacher et al., 2015). Cela conduit à une forme unique de rachitisme dépendant de la vitamine D (VDDR) de type 1B. Les bases du traitement consiste en une supplémentation accrue en vitamine D ou une supplémentation en calcium. Ces mutations ont également été associées à d'autres pathologies telles que l'obésité, l'asthme et la sclérose en plaques (Roizen and Levine, 2018).

1.2.5.4 L'hypercalcémie idiopathique infantile

L'hypercalcémie idiopathique infantile (HII) a été initialement décrite en 1953 par Lightwood (Lightwood R., 1953). En 2011, une étude a identifié des mutations récessives résultant d'une perte de fonction de l'enzyme CYP24A1, métabolisant le calcitriol (Schlingmann et al., 2011). L'HII est caractérisée par une hypersensibilité à la vitamine D et elle est associée à des taux anormalement élevés du calcitriol. Des études physiologiques ont indiqué que l'hypercalcémie serait expliquée par une l'augmentation de l'absorption intestinale de calcium et à une augmentation de son excrétion rénale (Morgan H.G., 1956). Les patients présentent des lésions rénales de type néphrocalcinose, néphrolithiase et également une ostéoporose liée à l'augmentation de la résorption osseuse, secondaire à l'élévation du taux de calcitriol. Les dérivés azolés tels que le kétoconazole et le fluconazole sont utilisés dans le traitement de l'HII (Sayers et al., 2015). Cependant, plusieurs études ont révélées des toxicités au kétoconazole, après un traitement au long court (Sayers et al., 2015).

1.3 Le récepteur nucléaire de la vitamine D

1.3.1 Données structurales du VDR et son mécanisme d'action

Le VDR présente comme les autres récepteurs nucléaires, une structure modulaire constituée de 4/5 domaines (Figure 5A). Le domaine N-terminal ou A/B est très court et dépourvu de la fonction de transactivation du ligand AF-1, présente chez d'autres récepteurs nucléaires (Sone T., 1991). Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) ou domaine C, contient des motifs en doigts de zinc permettant la reconnaissance avec les éléments de réponse de l'ADN. Le domaine de fixation du ligand (LBD) ou domaine E, permet la fixation du ligand et des co-régulateurs et contient la fonction de transactivation ligand-dépendante AF-2. Le DBD est lié au LBD par le domaine D, une région charnière qui permet l'orientation des deux domaines. Le domaine F est absent du VDR.

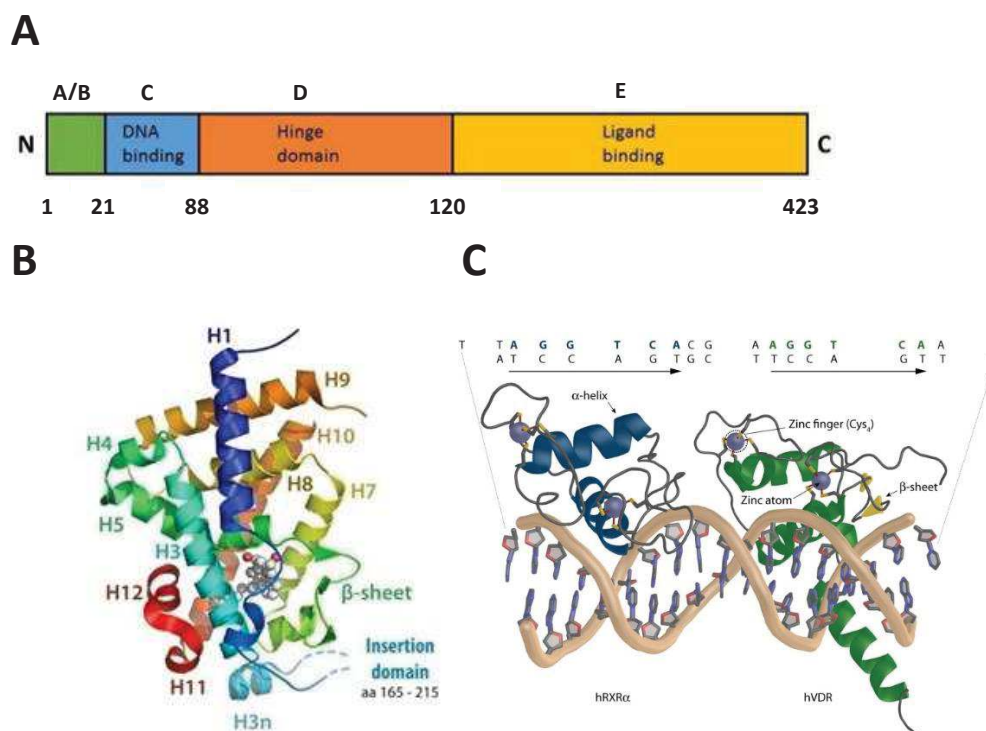


Figure 5: (A) Organisation modulaire du VDR (B) Structure cristallographique du LBD de hVDR (Rochel et al., 2000a) (C) Structure cristallographique des DBDs de RXR et VDR sur un élément de réponse d'ADN (Molnar, 2014).

La structure cristallographique du LBD du VDR humain en complexe avec le calcitriol (Rochel et al., 2000a) a montré une conformation similaire à d'autres LBD des récepteurs nucléaires (Figure 5B). Le LBD du VDR se compose d'un sandwich hélicoïdal α composé de 13 hélices (H1 à H12 et H3n) et d'un feuillet β . Le site de liaison au ligand est formé par les hélices H2, H3, H5, H6, H7, H10 et H12. Chaque brin β forme également des contacts avec le ligand. Les structures du LBD de VDR d'autres espèces, comme le rat (r) (Rochel et al., 2000a; Vanhooke et al., 2004) et le poisson zèbre (z) (Ciesielski F., 2007), en complexe avec le calcitriol, ont également été résolues et montrent une fixation identique du ligand.

Le mécanisme moléculaire d'activation du VDR par le calcitriol est semblable aux autres récepteurs nucléaires, notamment son partenaire RXR dont les structures non ligandées et en complexe avec l'acide rétinoïque, ont été résolues (Bourguet et al., 1995; Egea et al., 2000) (Figure 6). Sur cette structure, les éléments structuraux importants pour la fonction d'activation 2 (AF2) sont représentés sous forme d'hélices colorées (H3, H4 et H11 / H12). Lors de la liaison d'acide 9-cis-rétinoïque ou d'un agoniste synthétique, l'hélice H12 se relocalise dans la position dite active, permettant la formation d'une surface de récepteur spécifiquement reconnue par des motifs LXXLL (hélice orange) contenus dans le domaine d'interaction des coactivateurs (CoA) (Perez et al., 2012).

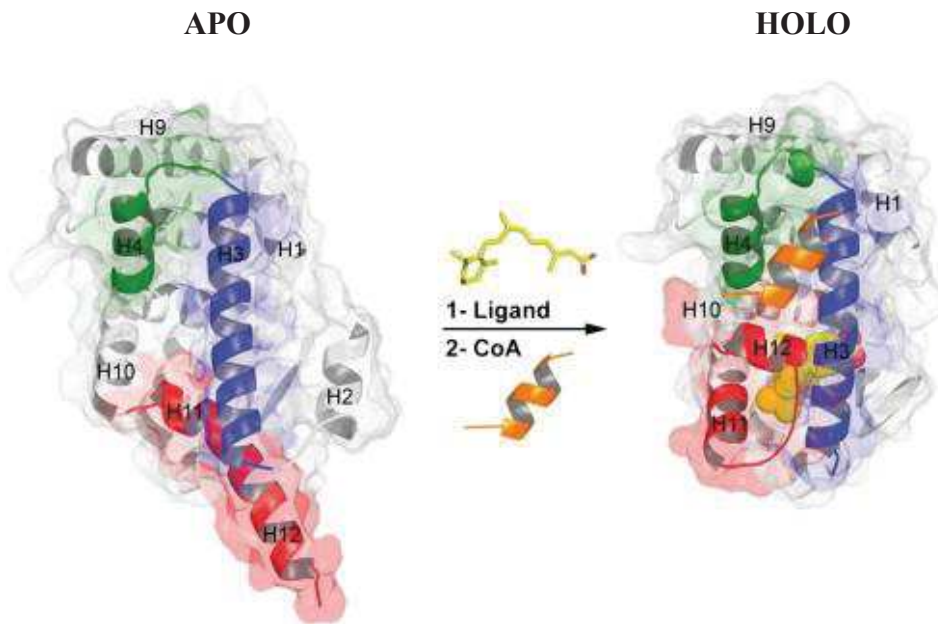


Figure 6 : Changement structural au cours de l'activation du RXR (Bourguet et al., 1995; Egea et al., 2000)

Le DBD du VDR composé de 66 résidus d'acides aminés hautement conservé, contient deux motifs en « doigt de zinc » qui permettent la reconnaissance des éléments régulateurs de l'ADN appelés VDRE (Figure 5 C) (Molnar, 2014). Les VDRE sont généralement constitués de deux demi-sites hexamériques dont la séquence consensus est 5'-AGGTCA-3' (Figure 7). Les demi-sites peuvent être disposés dans diverses orientations formant le plus souvent une répétition directe avec trois paires de base, séparant les demi-sites (DR3)(Umesono et al., 1991). Sous forme hétérodimérique, le RXR est lié au site en 5' et le VDR au site en 3'. Le VDR non ligandé sous forme d'homodimère peut également se lier aux éléments de réponse (Carlberg et al., 1993).

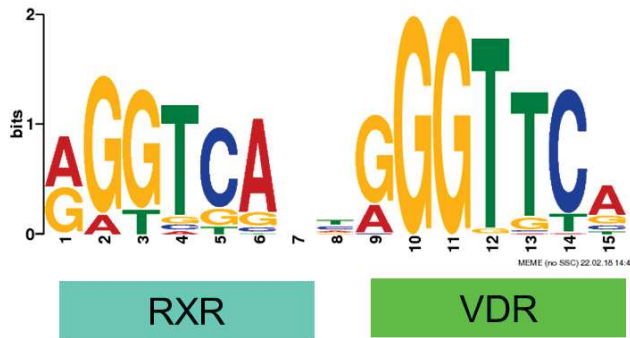


Figure 7: Demi-sites hexamériques d'un élément de réponse de type DR3 reconnu par VDR/RXR.

1.3.2 Hétérodimérisation VDR/RXR

Le VDR agit sous forme d'hétérodimère avec RXR qui existe sous trois isoformes RXR α , β et γ (Li, 2002). Le RXR est également le partenaire dimérique d'autres récepteurs nucléaires, dont lui-même et les récepteurs hormonaux classiques comme les récepteurs thyroïdiens (TR), les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR α , β , γ), les récepteurs activés par le proliférateur du peroxysoxe (PPAR α , β/δ , γ), les récepteurs des oxystéols (LXR α , β), le récepteur farnésoid X (FXR) ou le récepteur de pregnane X (PXR). Le RXR interagit aussi avec des récepteurs orphelins comme Nur77, Nurr1 et le récepteur constitutif des androgènes (CAR). L'acide 9-cis-rétinoïque (9-cisRA) est l'un des ligands physiologiques du RXR qui seront décrit dans le chapitre 2 (Krężel W., 2019).

Les récepteurs nucléaires formant des hétérodimères avec le RXR peuvent être classés en trois catégories selon l'effet du ligand de RXR sur l'activité transcriptionnelle: les récepteurs permissifs dont les complexes peuvent être activés à la fois par les ligands de RXR seul ou de son partenaire, les récepteurs non-permissifs dont RXR est « partenaire silencieux » ne pouvant pas être activés par le ligand de RXR, et les récepteurs permissifs conditionnels dont le ligand du RXR seul n'est pas capable d'activer l'hétérodimère mais présente un effet synergique avec celui du partenaire pour augmenter sa transactivation.

Le RXR forme un hétérodimère non permissif avec le TR dont l'activité est dépendante du ligand du TR et dont RXR agit en tant que partenaire silencieux (Forman et al., 1995; Thompson et al., 1998). Le RXR forme un hétérodimère conditionnel avec RAR (Li, 2002; Lin et al., 2016). PPAR, LXRs, FXR, Nur1 et Nur77 forment des dimères permissifs, dont l'activité peut être induite par l'un des ligands, respectivement (Forman et al., 1995; Giner et al., 2015; Li, 2002). Pour VDR/RXR, les données de la littérature sont contradictoires avec des données indiquant que l'hétéro-dimère VDR/RXR est non-permissif et que le ligand de RXR n'induit aucune activité (Forman et al., 1995). D'autres données suggèrent que l'hétérodimère VDR/RXR est permissif et que le ligand de RXR module la transcription (Bettoun et al., 2003).

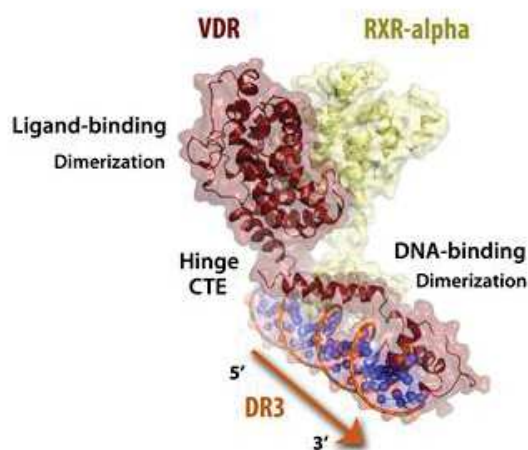


Figure 8: Structure du complexe VDR/RXR/ADN obtenue par cryo-microscopie électronique (Orlov et al., 2012)

La structure 3D du complexe entier VDR/RXR avec une séquence d'ADN de type DR3 a également été déterminée par cryo-microscopie électronique à une résolution de 10–12 Å (Figure 8). La structure montre une architecture en forme de L ouverte, avec les domaines du LBD orientés presque perpendiculairement à la partie DBD liée à l'ADN. Les LBDs sont positionnés asymétriquement avec le RXR compact et le VDR dans une configuration étendue entre le LBD et le DBD. La combinaison d'une géométrie rigide de la région charnière du

VDR et plus flexible pour le RXR permet au récepteur de lier spécifiquement les éléments de réponse de type DR3.

1.3.3 Interaction avec l'ADN

Le VDR se lie de manière préférentielle et coopérative aux éléments de réponse de type DR3 (Freedman and Towers, 1991; Umesono et al., 1991). De nombreux gènes régulés par le VDR ont un ou plusieurs VDRE dans leur promoteur, et parfois loin de la région codante (Meyer M.B., 2006). De nombreux éléments de réponse contrôlés par VDR ont été identifiés par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençages de nouvelle génération (ChIP-seq) et FAIRE-seq (formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements sequencing) (Osburn et al., 2001; Thompson et al., 2001; Zhang et al., 1999). Citons quelques gènes régulés par le VDR, comme les gènes impliqués dans la calcémie tels que *CYP24A1* (Dusso et al., 2005), *S100G* codant pour la calbindin CaBP-9K (Calcium Binding Protein) (Christakos S., 1996) et le transporteur de glucose *SLC37A2* (Wilfinger J., 2014). Le gène de la semaphorin 3B (*SEMA5A*) régulé par le VDR et exprimé dans les ostéoblastes, a été impliqué dans l'homéostasie squelettique et la régulation de la masse osseuse (Sutton A.L., 2008).

1.3.4 La poche de fixation du ligand, LBP

Le ligand, le calcitriol dans sa poche de fixation (LBP) est maintenu par des interactions hydrophobes avec les résidus tapissant le LBP et des liaisons hydrogènes formées entre les résidus polaires et les trois groupes hydroxyles du ligand (Figure 9). Le groupement hydroxyle du C1 interagit avec la Sérine 237 (H3) et l'Arginine 274 (H5) du VDR humain. Le groupement hydroxyle du C3 forme une liaison hydrogène avec la Sérine 278 (H5) et la Tyrosine 143 (boucle H1-H2). Le groupement hydroxyle du C25 interagit avec l'Histidine 305 (boucle H6-H7) et l'Histidine 397 (H11) (Rochel et al., 2000a).

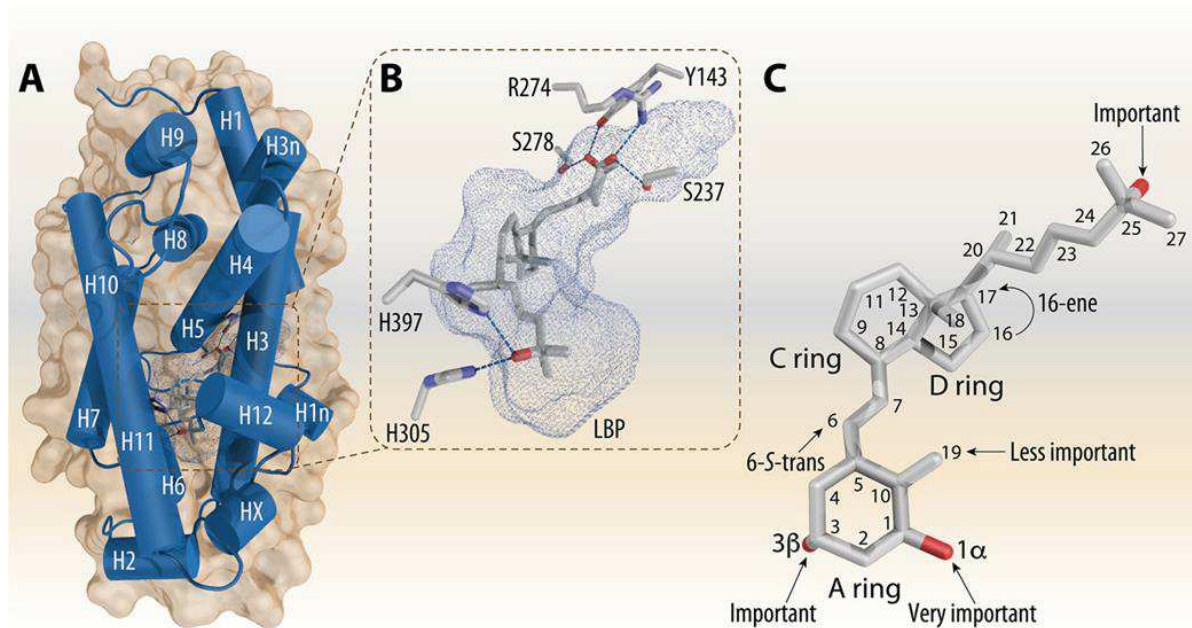


Figure 9 : (A) Structure 3D du LBD de hVDR en complexe avec le calcitriol. (B) Représentation des interactions avec les groupements hydroxyles du LBP du VDR en présence du calcitriol. (C) Numérotation des atomes de carbone du calcitriol. La figure est basée sur la structure PDB 1DB1 (Rochel et al., 2000a) et adaptée de la publication (Maestro et al., 2019).

1.4 Développement des analogues de la vitamine D

Il a été démontré qu'un statut suffisant en vitamine D est important pour le maintien de la minéralisation osseuse, par contre le surdosage du calcitriol ou de ses analogues synthétiques peut entraîner une calcification des tissus (Cheskis et al., 2006). Les analogues de la vitamine D ont été utilisés pour le traitement de l'ostéoporose, le psoriasis et l'hyperparathyroïdie secondaire (Leyssens et al., 2014). Néanmoins, des doses plus élevées du calcitriol ne sont pas recommandées comme compléments nutritionnels pour atteindre les effets non squelettiques de la vitamine D3. L'objectif principal du développement des analogues de la vitamine D3 est d'identifier des composés efficaces, mais à faible effet calcémique. Plus de 4000 analogues synthétiques de 1,25D3 ont été synthétisés dans le but d'augmenter la puissance physiologique et la spécificité du ligand naturel.

1.4.1 *Ligands naturels de VDR*

En plus de 1,25D3, d'autres ligands naturels de VDR ont été identifiés. La curcumine est parmi de nombreux composés lipophiles nutritionnels qui ont été identifiés comme des ligands potentiels du VDR (Haussler et al., 2008). Elle permet la formation de l'hétérodimère du VDR/RXR, le recrutement de coactivateur ainsi que la transcription de gènes contrôlés par VDR (Bartik et al., 2010), mais aucune information sur le mécanisme de reconnaissance par VDR n'est disponible. Plusieurs analogues de la curcumine halogénée ont été développés pour améliorer sa faible biodisponibilité (Batie et al., 2013).

Les acides biliaires secondaires tels que l'acide lithocholique (LCA) et le 3-céto-LCA ont également été identifiés, comme des ligands de VDR non stéroïdes endogènes (Makishima et al., 2002). Les acides biliaires sont les principaux détergents cataboliques nécessaires à l'ingestion et à l'absorption intestinale de nutriments hydrophobes tels que le cholestérol, le triacylglycérol et les vitamines liposolubles, dont la vitamine D. Bien que le rôle physiologique du VDR dans le métabolisme des acides biliaires soit toujours à l'étude, des preuves de plus en plus nombreuses suggèrent que le VDR agit à la fois comme récepteur d'acide biliaire et comme récepteur endocrinien pour la signalisation de la vitamine D (Nehring J.A., 2007). Ils possèdent des effets directs sur l'absorption de la vitamine D, par contre il n'a pas été démontré que les acides biliaires régulent le métabolisme du calcium.

1.4.2 *Analogues synthétiques de la vitamine D3*

Les analogues de la vitamine D3 peuvent être classifiés (DeLuca and Plum, 2016; Leyssens et al., 2014):

- Selon leurs activités agonistes activant la transcription et favorisant le recrutement des co-activateurs. Ils peuvent être agonistes partiels, ayant un effet inférieur à celui du ligand naturel ou super-agonistes induisant l'activation du récepteur avec des

concentrations inférieures par rapport au ligand naturel, ou antagonistes inhibant l'activité du récepteur en favorisant le recrutement des corépresseurs.

- Selon leurs structures, en analogues stéroïdiens ou non-stéroïdiens.

De nombreuses structures cristallographiques des complexes du VDR avec des ligands synthétiques ont été résolues (Carlberg et al., 2012). En général, les analogues agonistes stabilisent le LBD dans une conformation similaire que le ligand naturel, puisque les trois groupements hydroxyles de chaque composé de vitamine D prennent une position presque identique. Cela suggère qu'il n'y a qu'une seule conformation agoniste du LBD pour laquelle les interactions entre le groupement hydroxyle en C25 du ligand et les acides aminés Histidine 305 et Histidine 397 du LBP sont les plus importants (Figure 9).

1.4.2.1 Agonistes synthétiques

Les ligands agonistes synthétiques du VDR synthétisés peuvent être de type stéroïdien ou non-stéroïdien. Trois parties différentes peuvent être distinguées dans la structure de 1,25D3: une partie centrale rigide formé des cycles aromatiques C et D, à laquelle sont connectés la chaîne latérale flexible en C-17 et le cycle A en C-8 (Figure 9). De nombreuses modifications chimiques ont été introduites dans la chaîne latérale du calcitriol telles que l'allongement, la désaturation, l'épimerisation, ou des altérations du cycle A comme la modification 19-nor, qui a eu comme conséquence une activité calcémique diminuée de dix fois par rapport à celle du calcitriol (Figure 10) (Perlman K.L., 1991).

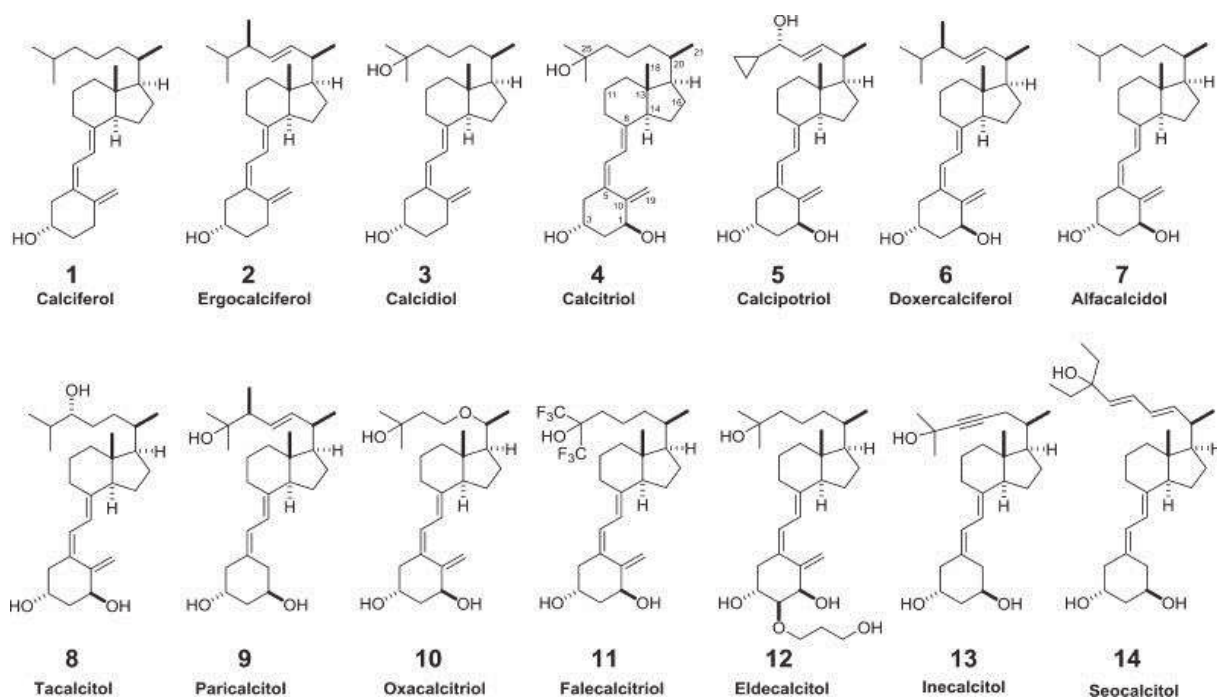


Figure 10 : Structures chimiques des analogues et des métabolites de la vitamine D3(Maestro et al., 2019)

Parmi le grand nombre d'analogues synthétisés, quelques analogues de la vitamine D ont été mis sur le marché (Figure 10). Le calciférol (1) et l'ergocalciférol (2) sont utilisés pour la prévention contre la déficience en vitamine D et rachitisme. Le calcidiol (3) est utilisé pour le traitement d'hypocalcémie chronique, le rachitisme et l'ostéodystrophie rénale. Le calcitriol (4), calcipotriol (5), tacalcitol (8) et oxacalcitriol (10) sont utilisés pour le traitement du psoriasis. Le doxercalciférol (6), paricalcitol (9) et le falécalcitriol (11) sont prescrits pour le traitement de l'hyperparathyroïdie secondaire. L'eldécaltitol (12) est prescrit au Japon pour le traitement de l'ostéoporose. L'alfalcidol (7) est utilisé pour le traitement de l'ostéodystrophie rénale, l'ostéoporose, le rachitisme et l'hyperparathyroïdie secondaire.

Les superagonistes sont des analogues pouvant se lier au récepteur et l'activer avec des concentrations inférieures à celles du calcitriol et présentant un effet significativement supérieur. Ces composés agissent *in vivo* principalement en augmentant l'activité transcriptionnelle du VDR, suite à une meilleure affinité de liaison pour le récepteur. De nombreuses revues (Carlberg et al., 2012; Lieve Verlinden, 2019; Maestro et al., 2019)

décrivent des superagonistes synthétiques, parmi lesquels l'inecalcitol (Maestro et al., 2019) qui présente un potentiel antiprolifératif 5 à 17 fois plus élevé et une calcémie 400 fois moins comparé au calcitriol (Figure 10). Malgré des résultats prometteurs *in vitro*, des analogues tels que l'inecalcitol (13) ou le seocalcitol (14) ont échoués en phase II d'essais cliniques pour le traitement des leucémies myéloïdes aiguës (Maestro et al., 2019).

D'autres analogues synthétiques présentent des modifications en 14-epi, ou des modifications des cycles C et D, entre autres, parmi les nombreuses modifications décrites dans la littérature (Eelen G., 2005; Maestro et al., 2019). Généralement les superagonistes sont des stéréoisomères de la vitamine D.

Une autre classe d'analogues de la vitamine D est celle de ligands non-stéroïdiens. Relativement, très peu de ligands non-stéroïdiens ont été décrits dans la littérature par rapport aux analogues stéroïdiens (Ryan E. Stites, 2019). LG 190178 a été le premier ligand agoniste non stéroïdien décrit dans la littérature (Boehm, 1999). Ensuite, des ligands basés sur le LG190178 ont été décrits qui montrent une activité de pro-différenciation 2 fois plus élevée que le calcitriol (Ciesielski et al., 2012; Kashiwagi, 2013). D'autres ligands non stéroïdiens montrant une activité semblable au calcitriol ont également été décrits (Ciesielski et al., 2012).

1.4.2.2 Antagonistes

La majorité des analogues synthétiques de la vitamine D3 sont des ligands agonistes, cependant quelques ligands synthétiques présentent une activité antagoniste. Les antagonistes peuvent être classés en sept classes: Série ZK, Dérivés TEI, Dérivés lactames, Dérivés adamantyls, Dérivés amides, et Dérivés 22-butyl. Les deux premiers antagonistes du VDR qui ont été décrits dans la littérature sont le ZK159222 (Herdick M, 2000) et le TEI-9647 (Miura D., 1999) (Figure 11).

Parmi les antagonistes de la série ZK, ZK159222 et ZK168281 ont été décrits pour leur effet agoniste partiel et antagoniste du VDR, respectivement (Bury et al., 2000; Herdick M, 2000). Ces composés sont des dérivés du calcipotriol (Figure 10), qui est utilisé comme agent thérapeutique contre le psoriasis. La structure chimique caractéristique est un ester carboxylique dans la partie terminale de la chaîne latérale. ZK159222 a un ester butylique dans la chaîne latérale tandis que ZK168281 a un fragment acrylate d'éthyle. En présence de ZK159222 et ZK168221, l'hétérodimère VDR-RXR présente une bonne affinité de liaison au VDRE (respectivement 0,4 et 0,35 nM) comparé à celle en présence du calcitriol (0,18 nM) (Bury et al., 2000).

Le ligand TEI9647 (Figure 11) possède un groupement lactone, moins encombrant que les groupements portés par les composés ZK. Les dérivés de TEI-9647 ont montré une réduction de l'affinité de liaison entre VDR et RXR α et l'interaction entre VDR et SRC-1 dans les cellules SaOs-2, mais pas dans les cellules HeLa. Une déstabilisation similaire de l'hétérodimère VDR-RXR par TEI-9647 a été rapportée dans les cellules MCF-7 (Toell et al., 2001). De plus, d'autres dérivés ont été synthétisés et ont montré une meilleure affinité de liaison de 3 à 11 fois comparé à celle de TEI-9647 (Saito N., 2004, 2005).

Les dérivés lactames (Figure 11) possèdent des groupements lactames au niveau de leur chaîne latérale (Kato Y., 2004). Ils dérivent du métabolite du calcitriol, le 1 α , 25-dihydroxyvitamine D3-26,23-lactone, et se lient au VDR avec une bonne affinité de liaison. Ces dérivés ont montré une inhibition de la différenciation cellulaire HL-60 en présence du calcitriol (Cho K., 2008).

Plusieurs dérivés adamantyl ont été décrits dans la littérature. AD-47 (Figure 11) a été décrit comme étant un agoniste partiel montrant une faible activité transcriptionnelle (Inaba Y., 2007), cependant il permet le recrutement du coactivateur SRC1 et antagonise le recrutement du SRC2 et SRC3. La structure cristallographique du LBD du VDR du rat avec des dérivés

adamantyl montre que la chaîne latérale du dérivé adamantyl n'interfère pas directement avec l'hélice H12 mais affecte les hélices H3 et H11, la boucle H11–H12 et les boucles H6–H7 déstabilisant la forme active et affectant ainsi la liaison des coactivateurs (Nakabayashi M., 2008).

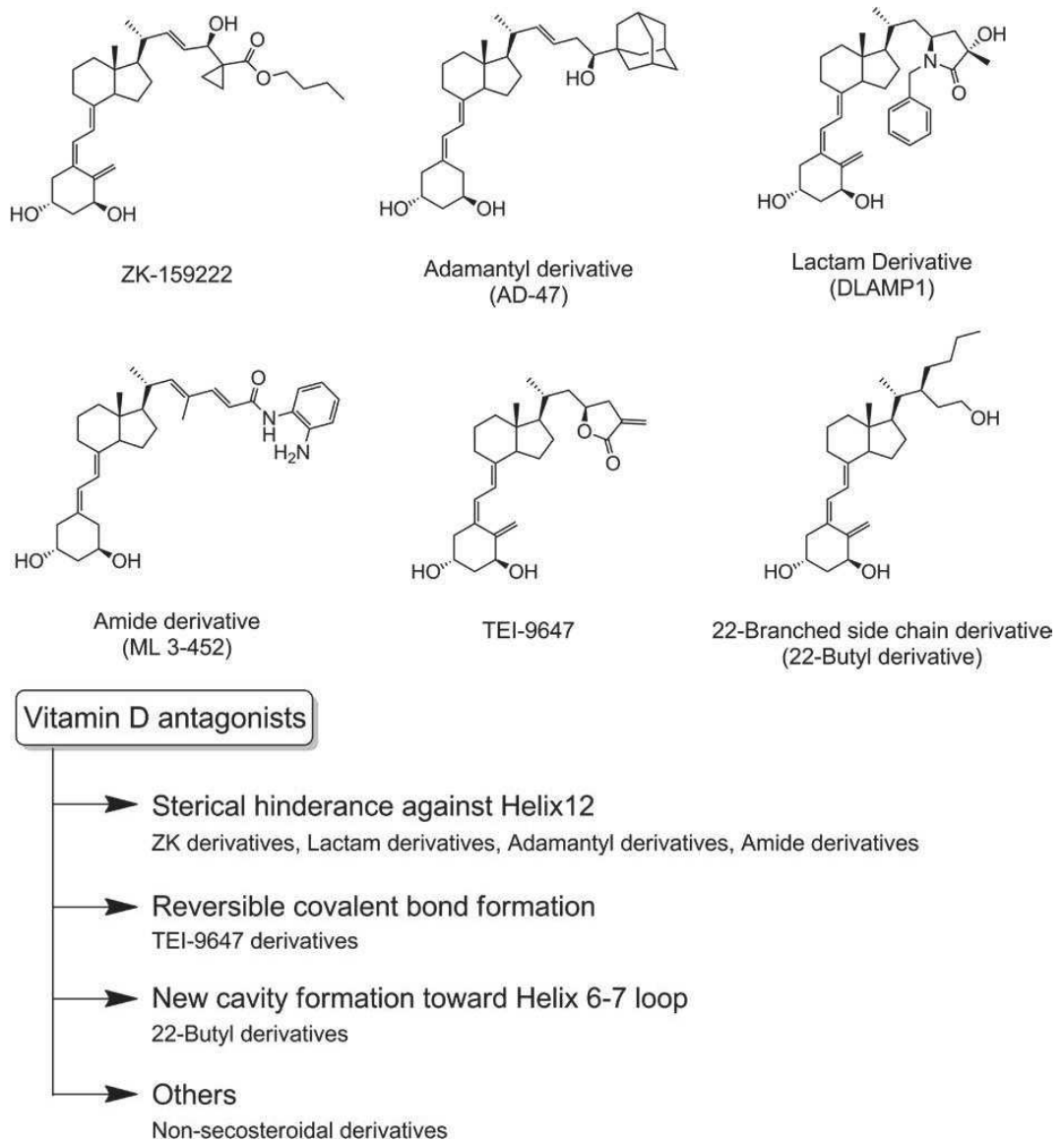


Figure 11 : Classification des ligands antagonistes du VDR (Saitoh, 2017)

Le dérivé amide ML 3-452 est un dérivé du triciférol, un ligand bifonctionnel du calcitriol et un inhibiteur d'histone désacétylase (Figure 11) (Lamblin M., 2010). Il montre une faible affinité de liaison au VDR (IC50 de 107 nM) huit fois moins puissant que celle du calcitriol.

De plus, il inhibe l'expression du gène codant pour le CYP24A1 induit par le calcitriol et le mécanisme antagoniste proposé résulte de l'interférence de sa chaîne latérale rigide avec l'hélice H12.

Les dérivés 22-butyl-vitamine D3 (Inaba Y, 2010; Inaba Y, 2009) et les dérivés alkylés en C-22 de la 2-méthylène-19-nor-vitamine D ont également été étudiés (Figure 11) (Anami Y, 2014; Anami Y, 2015; Sakamaki et al., 2010; Yoshimoto N, 2012). Certains dérivés présentent une activité antagoniste dans les lignées cellulaires Cos-7 et HEK293 (Inaba Y, 2009) (Inaba Y, 2010), et d'autres dérivés dont le dérivé 22-hexyle ont montrés un profil agoniste partiel (Anami Y, 2015; Yoshimoto N, 2012).

1.5 Régulation de la transcription et corégulateurs

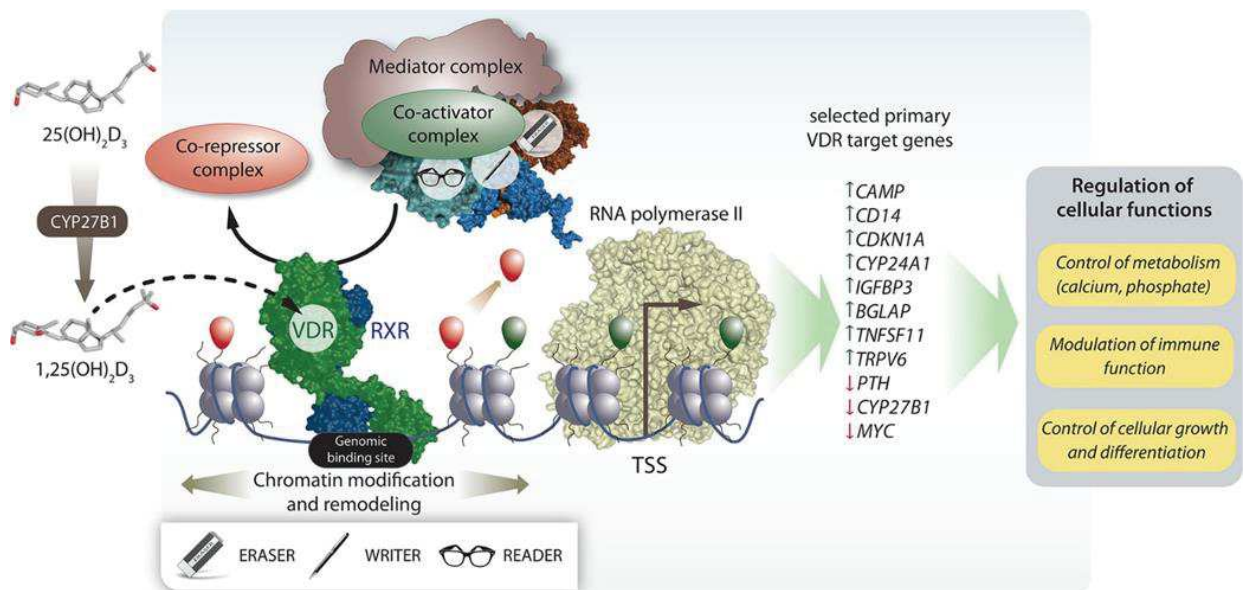


Figure 12 : Schéma du mécanisme de régulation de la transcription par VDR (Maestro et al., 2019)

Les corégulateurs, corépresseurs et coactivateurs, ont été identifiés comme partenaires d'interaction des récepteurs nucléaires ligandés ou sous forme apo (Figure 12) (Baniahmad, 1995; Cavailles et al., 1995; Halachmi et al., 1994). Avec le temps, le nombre de corégulateurs des récepteurs nucléaires découverts a considérablement augmenté, pour

atteindre 320 à ce jour. Un grand nombre de protéines jusqu'à des centaines peuvent être simultanément présentes dans les complexes de corégulation (Foulds, 2013). Les corégulateurs peuvent être classés comme primaires avec une interaction directe avec les récepteurs ou secondaires qui ne forment pas un lien direct. Les motifs de reconnaissance des récepteurs sont souvent situés dans des régions intrinsèquement désordonnées des coactivateurs (LXXLL) et des corépresseurs (LXXH / IIXXXI) (Devarakonda, 2011; Simons, 2014).

Selon leur activités enzymatiques, les corégulateurs peuvent être divisés en plusieurs groupes: les protéines à activité histone acétyltransférases et désacétylases, les peptidylarginine et lysine méthyltransférases et déméthylases, les protéines impliqués dans le remodelage de la chromatine ATP-dépendants et les sous-unités du complexe médiateur.

Le mécanisme d'action de VDR est schématisé sur la figure 12. En l'absence de ligand, le VDR présent dans le noyau interagit avec son partenaire RXR et le complexe VDR/RXR se fixe sur un élément de réponse mais il est maintenu dans un état «silencieux» par un ou plusieurs corépresseurs tels que SMRT, NCoR, Alien, Sin3 (Figure 13) qui déacétylent les histones (Nagy L., 1999). La chromatine dans ce cas reste compacte ce qui la rend inaccessible à la machinerie transcriptionnelle.

Repression

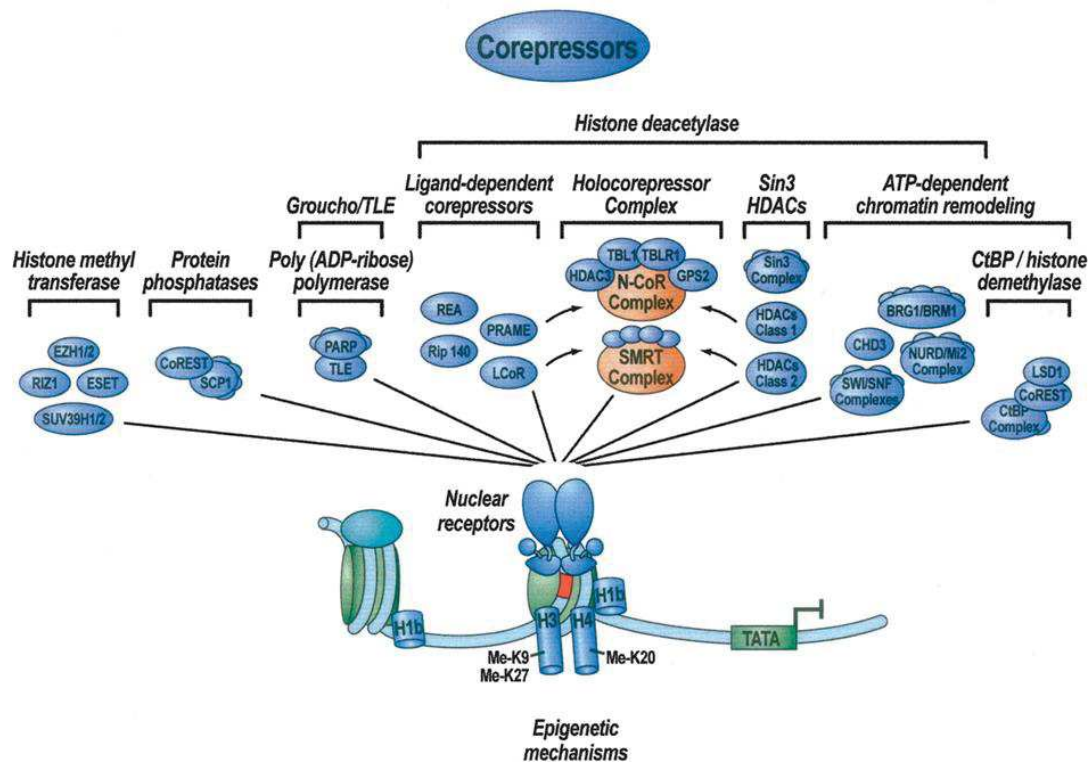


Figure 13 : Schéma représentant les corépresseurs de la transcription de VDR (Rosenfeld et al., 2006)

D'autres corégulateurs sont recrutés par des récepteurs nucléaires de manière dépendante du ligand par reconnaissance du motif LXXLL, mais exercent des fonctions de corépresseurs, tels que LCoR (corépresseur nucléaire ligand-dépendant) (Fernandes I., 2003), RIP140 (protéine d'interaction des récepteurs 140)(Cavailles et al., 1995), REA (répresseur de l'activité des récepteurs des œstrogènes) (Delage-Mourroux R., 2000) et l'antigène tumoral humain PRAME (Epping M.T., 2005).

La fixation du ligand induit un changement conformationnel au niveau du LBD de VDR, ce qui entraîne le départ des corépresseurs. Après la fixation du ligand, l'hélice 12 du VDR se réoriente en conformation active ce qui permet le recrutement des protéines coactivatrices. La fixation des différents coactivateurs se fait de manière séquentielle (Figure 14).

Les coactivateurs ayant une activité intrinsèque histone acétyltransférase (HAT) sont recrutés en premier permettant l'acétylation des histones (Spencer T.E., 1997). Cette famille comprends les protéines CBP/p300 et p160, y compris les coactivateurs des récepteurs stéroïdiens (SRC) (tels que SRC-1) (Chakravarti D., 1996; Kamei Y., 1996). La famille de coactivateurs SRC englobe trois protéines: SRC1 ou NCoA-1, ou NCoA-2 et SRC3 ou NCoA-3 (Halachmi et al., 1994). La région C-terminale des SRC possède également une activité histone acétyltransférase qui est principalement spécifique aux histones H3 et H4 (Spencer T.E., 1997) mais elle n'a aucun élément structural commun avec les domaines catalytiques HAT du CBP / p300 et PCAF.

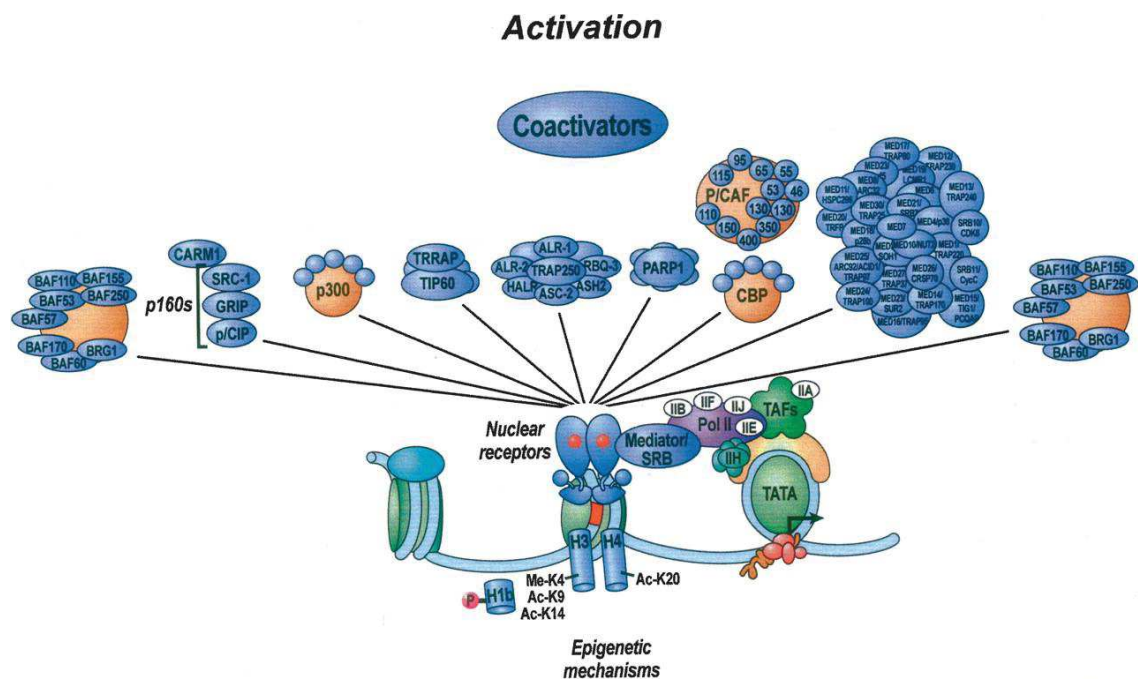


Figure 14 : Schéma représentant les co-activateurs de la transcription de VDR (Rosenfeld et al., 2006)

Finalement, le médiateur est recruté faisant le lien avec la machinerie transcriptionnelle. Le médiateur est un complexe multi-protéique conservé pendant l'évolution ; il a été découvert comme étant un groupe de facteurs nécessaires à l'activité de l'ARN polymérase II chez la levure (Flanagan et al., 1991; Kelleher et al., 1990). Des sous-complexes de médiateurs

similaires mais non identiques associés à divers facteurs de transcription, notamment avec des récepteurs nucléaires, ont été isolés. Le médiateur humain appelé complexe TRAP (Fondell et al., 1996) a été initialement identifié en association avec le récepteur de l'hormone thyroïde (TR) et plus tard, associé au VDR, appelé complexe DRIP (Rachez et al., 1998). L'interaction du médiateur avec VDR se fait par l'intermédiaire de la sous-unité 1 (MED1), localisée dans le module central du Médiateur (Ge et al., 2002; Kang et al., 2002; Malik et al., 2002; Murakami et al., 2017; Rachez et al., 1999; Wang et al., 2002; Whyte et al., 2013; Yuan et al., 1998; Zhu et al., 1997).

Le MED1 contient deux motifs LXXLL présentant chacun une interaction préférentielle avec les différents récepteurs (Burakov et al., 2000; Ren et al., 2000; Yuan et al., 1998), le motif 2 se fixant préférentiellement au VDR. Le MED1 s'est avéré essentiel pour diverses fonctions biologiques du VDR tel que le contrôle du cycle capillaire et la prolifération épidermique (Oda et al., 2012). Par la suite, les facteurs de transcription basale sont recrutés ainsi que l'ARN polymérase II, se fixant au niveau des sites de départ de la transcription et, la transcription des gènes cibles est alors induites (Rachez et al., 2000; Rosenfeld et al., 2006).

L'expression des gènes peut également nécessiter des réarrangements de la chromatine et des nucléosomes. Des complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants, parmi lesquels les complexes de type SWI/SNF et ISWI et le complexe multi-protéique WINAC sont recrutés (Figure 14) (Li B., 2007). D'autres coactivateurs qui interagissent avec le VDR ont été identifiés tels que PGC-1 α (Savkur et al., 2005), NCoA62 (MacDonald P.N., 2004), Ets-1 (Tolon R.M., 2000) et Smad3 (Lekanne Deprez R.H., 1995).

Dans ce premier chapitre d'introduction, j'ai essayé d'apporter les connaissances moléculaires et structurales actuelles sur VDR, ses ligands et les corégulateurs, ainsi que leur implication dans divers processus biologiques. VDR joue un rôle essentiel dans de nombreux processus physiologiques en contrôlant la transcription de gènes. De par les applications thérapeutiques de VDR, l'étude des mécanismes d'action de VDR est d'une grande importance.

Le chapitre suivant est focalisé sur la compréhension de l'effet du ligand de RXR (9-cis RA) sur l'activité de l'hétérodimère VDR/RXR. Au niveau moléculaire, il est important de combiner les méthodes biophysiques, structurales et cellulaires pour caractériser le rôle du ligand de RXR.

Une autre étude portant sur la modulation de VDR par ZK168281 et son mécanisme d'action est décrite dans le chapitre 3.

CHAPITRE 2 :

Caractérisation de l'effet du ligand de RXR sur l'activité du récepteur VDR/RXR

2.1 Objectifs de l'étude

Le VDR forme un hétérodimère fonctionnel avec RXR (Bouillon et al., 2008). Les données de la littérature sur le rôle de RXR et de son ligand, l'acide 9-cis rétinolique, dans la régulation de la transcription contrôlée par le VDR sont contradictoires. Ainsi, certaines données indiquent que l'hétérodimère VDR/RXR est non-permissif et que le ligand de RXR n'induit aucune activité (Forman et al., 1995) alors que d'autres montrent qu'il est permissif conditionnel et que le ligand de RXR a un rôle dans la transcription de VDR (Bettoun et al., 2003).

Les objectifs de cette étude ont été d'approfondir notre compréhension des bases moléculaires de la régulation de la transcription par VDR et d'identifier et caractériser l'effet du ligand de RXR pouvant potentiellement moduler l'activité de VDR.

Ce chapitre porte sur la caractérisation biophysique et fonctionnelle du rôle de RXR et de son ligand dans l'activité de VDR. D'abord, nous avons caractérisé l'effet de RXR et de son ligand sur l'affinité d'hétérodimérisation par résonance plasmon de surface et sur la stabilité du récepteur entier mesuré par fluorimétrie différentielle à balayage (nano-DSF). Puis nous avons caractérisé l'effet du ligand de RXR sur l'affinité de liaison de l'hétérodimère entier avec les éléments de réponses de gènes cible du VDR d'une part et avec un peptide du coactivateur SRC1 d'autre part. Les affinités de liaisons ont été mesurées par anisotropie de fluorescence et par thermophorèse à micro-échelle (MST). Les données fonctionnelles ont

permis de caractériser l'effet de RXR et de son ligand sur la transcription de gènes cibles de VDR et les transcrits. Les résultats de cette étude sont présentés sous forme de manuscrit pour publication. Dans le même contexte, le rôle de RXR dans l'interaction entre VDR/RXR et Med1 a également été étudié.

2.2 Introduction sur les récepteurs X des rétinoïdes

2.2.1 Généralités et rôle biologique

Les récepteurs X des rétinoïdes font partie des récepteurs nucléaires qui ont été découverts au début des années 1990 (Dusso et al., 2005; Pogenberg et al., 2005). Chez les mammifères, ils sont représentés sous trois isotypes $RXR\alpha$, β et γ (Li, 2002). Pour chaque isotype, plusieurs isoformes sont également exprimés. $RXR\beta$ est exprimé au niveau de tous les tissus du corps tandis que $RXR\alpha$ est exprimé au niveau de la peau, du foie, des poumons, des muscles, des reins, de l'épiderme et de l'intestin ; et $RXR\gamma$ se trouve dans le cerveau, le muscle squelettique et le muscle cardiaque (Thompson C.M., 1993). Les deux sous-types $RXR\alpha$ et $RXR\beta$ jouent un rôle essentiel dans l'équilibre énergétique corporel (Allen and Taatjes, 2015); $RXR\alpha$ étant impliqué dans la mobilisation et le stockage des triglycérides (J.W., 2013) et joue un rôle très important au cours du développement (Dalvin et al., 2004; Everts et al., 2005; Kayalar and Oztay, 2014; Sucov et al., 1995).

RXR présente une structure modulaire similaire à celle des autres récepteurs nucléaires (Figure 6). En l'absence du ligand, RXR forme des tétramères (Willy, 1997) alors qu'il a été démontré que la liaison au ligand ou à l'ADN les dissocie (Sone T, 1989). Les tétramères liés à l'ADN ont été proposés pour antagoniser l'activation transcriptionnelle (Vaisanen et al., 2002). Les données de ChipSeq à grande échelle ont montré qu'en l'absence du ligand, RXR sous forme homodimère ou hétérodimères, est liée à l'ADN agissant peut-être comme des

inhibiteurs de la transcription prêts à échanger leur partenaire d'interaction lors de la liaison au ligand (Leid et al., 1992; Mangelsdorf et al., 1992). La liaison du ligand induit des changements de conformation du LBD de RXR (Figure 6) (Germain et al., 2006). La liaison au ligand induit un repositionnement de l'hélice H12 vers les hélices H3 / H5 pour former la surface appelée fonction d'activation AF-2, qui en recrutant des modificateurs de chromatine, mais aussi des cofacteurs interagissent directement sur le mécanisme de transcription, pour inhiber ou activer la transcription de gènes cibles (Rosenfeld et al., 2006). Le domaine AF2 formé par les hélices H3, H4, H11 et H12 du LBD est donc le principal domaine d'activation dépendant du ligand dans les RXR. Le domaine AF1, un domaine de fonction d'activation supplémentaire impliqué dans le recrutement de cofacteurs, est hébergé par la région N-terminale qui en raison de son organisation intrinsèquement non structurée, est moins sujette aux influences des changements conformationnels induits par la liaison du ligand ou de l'ADN (Bourguet et al., 1995; Giner et al., 2015; Lin et al., 2016). Bien que AF1 soit censé agir de manière autonome au niveau du RXR (Thompson et al., 1998), il peut également affecter l'efficacité et la sélectivité de l'expression des gènes ainsi que les réponses aux ligands liés aux LBD dans les récepteurs stéroïdiens (Bouillon et al., 1995; Norman A.W., 1997; Rochel et al., 2007).

2.2.2 *Ligands naturels*

Un grand nombre de ligands naturels ont été identifiés montrant des activités agonistes ou antagonistes, parmi lesquels des substances naturelles et d'autres endogènes. Dans cette partie on cite quelques ligands.

2.2.2.1 Les rétinoïdes

L'acide 9-cis-rétinoïque (9cis RA) a été initialement suggéré comme étant un ligand endogène pour RXR α (Mangelsdorf et al., 1992; Nagulapalli M., 2016; Soutourina, 2018). Par la suite,

de faibles concentrations d'acide 9-cis-rétinoïque ont été détectées chez l'homme, par la spectrométrie de masse hautement sensible (0,03 à 0,003 nM) (Davis et al., 2002; Toth-Petroczy et al., 2008) mais ces concentrations sont insuffisantes pour moduler l'activité du récepteur. En effet, des tests de transactivation de gènes rapporteurs dans diverses lignées cellulaires ont défini une concentration minimale de 10 à 100 nM de 9-cis RA requise pour l'initiation de l'activation transcriptionnelle de RXR (Asturias F.J., 1999; Nagulapalli M., 2016; Soutourina, 2018).

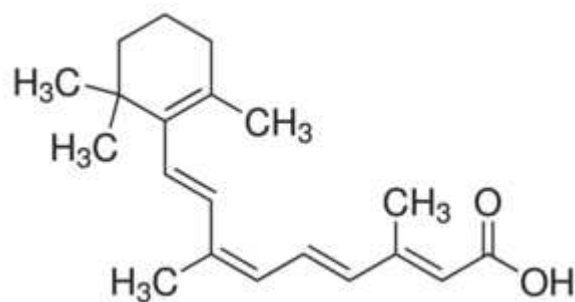


Figure 15: Structure chimique de l'acide 9-cis rétinoïque

Un dérivé de l'acide rétinoïque, l'acide 9-cis-13,14-dihydrorétinoïque (9CDHRA) a été identifié chez la souris dans plusieurs organes (foie, sérum, cerveau), par chromatographie liquide combinée à la spectrométrie de masse (Asturias F.J., 1999). L'analyse de cristallographie du complexe formé avec RXR α a montré que le dérivé 9CDHRA présente une conformation similaire au 9cis RA dans la poche de RXR α . L'affinité de liaison ($K_D=90$ nM) est cependant plus faible que celle du 9cis RA ($K_D=20$ nM) (Taatzes D.J., 2002).

2.2.2.2 Les acides gras

L'acide docosahexaénoïque (DHA) ainsi qu'une série d'acides gras libres ont montrés des capacités différentes d'activation transcriptionnelle du RXR (Hanske et al., 2018). La structure cristallographique du DHA avec le RXR α -LBD a montré une interaction directe (Forman et al., 1995). Cependant, des concentrations relativement élevées de DHA sont

nécessaires pour induire la transcription par RXR (Jeronimo and Robert, 2017; Larivière L., 2012). Harrus *et al.* ont rapportés une valeur d'EC50 de 5 à 10 μM (Harrus et al., 2018).

2.2.2.3 Les extraits de plantes

Plusieurs extraits de plantes ont également été identifiés et caractérisés pour leur affinité pour RXR et leur activité thérapeutique. Parmi ces ligands, on peut citer :

L'honokiol a été le premier à être identifié et probablement le plus étudié (Chen, 1995; Devarakonda, 2011; Foulds, 2013; Horlein et al., 1995). Il a montré une bonne affinité de liaison pour le RXR avec un EC50 de l'ordre de 10 μM (Chen, 1995). L'honokiol a montré des activités anti-inflammatoires et des effets sur le métabolisme du cholestérol (Simons, 2014). La drupanine a été isolée de la propolis verte brésilienne, possédant un profil agoniste PPAR γ / RXR double dans les essais de transactivation et de liaison. Il se lie à tous les isotypes de RXR (EC50 = 2–7 μM) ainsi qu'au PPAR γ (EC50 ~15 μM).

La bigélovine a été isolée des fleurs d'*Inula helianthus-aquatica* et a montré des propriétés anticancéreuses pour le cancer du côlon (Kamei, 1996) et le cancer du foie (Cavailles et al., 1994). Bien que la bigélovine se lie à RXR α -LBD, elle présente des activités transcriptionnelles particulières car elle active la transcription des gènes pour PPAR γ / RXR α , sans avoir aucun effet au niveau de FXR / RXR α et réprime celle de l'homodimères RXR α et de l'hétérodimère LXR/RXR sur leurs éléments de réponse respectifs dans une gamme de concentration de 1 à 10 μM (Kelleher et al., 1990).

L'acide valérénique a été isolé à partir de *Valeriana officinalis* et testé pour son activité agoniste de RXR (Nonet and Young, 1989). Les tests de transactivation effectués dans des cellules HEK293T ont révélé une sélectivité partielle intrigante pour RXR β , car l'acide valérénique a montré une meilleure affinité EC50 (5 μM) et une transactivation environ 10 fois plus élevée de RXR β par rapport à RXR α (EC50 = 27 μM) et RXR γ (EC50 = 43 μM). De

plus, aucune activation des RAR, PPAR, LXR, FXR, CAR, VDR et PXR n'a été observée. Des études de modélisation moléculaire ont suggéré des modes de liaison similaires à RXR α et RXR β aux rexinoïdes classiques (Nonet and Young, 1989).

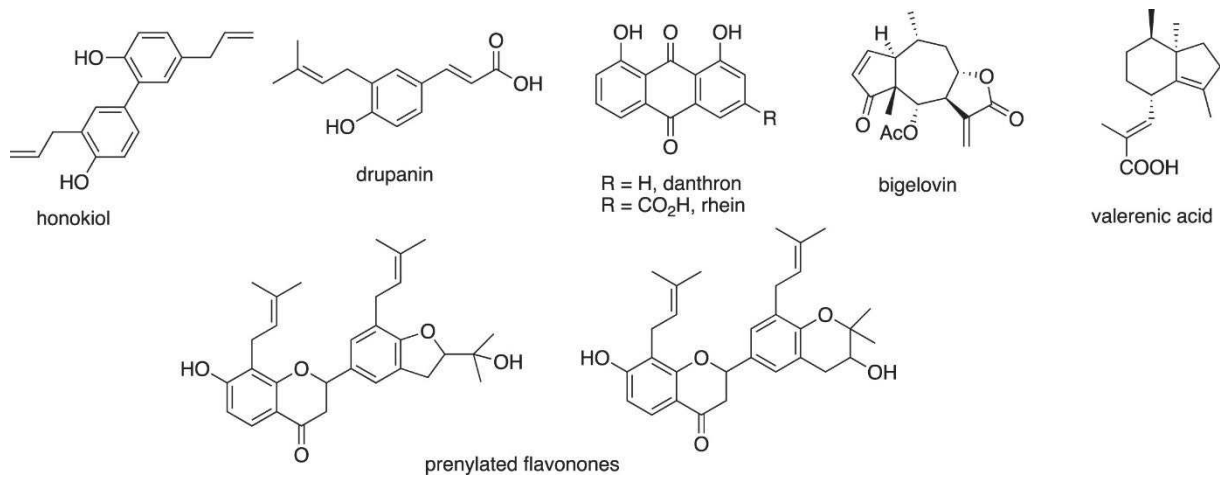


Figure 16: Structures chimiques des ligands naturels de RXR provenant des plantes (Flanagan et al., 1991)

La pertinence biomédicale des ligands de RXR a été soulignée dans de nombreuses études sur les maladies métaboliques puisque plusieurs partenaires permissifs d'hétérodimérisation de RXR agissent comme des capteurs métaboliques. Des études sur des cerveaux de souris ont montrées l'intérêt de la signalisation RXR et de ses ligands dans le contexte de recherche sur la maladie d'Alzheimer et la microglie (Carlberg, 1995). La signalisation du RXR est également pertinente pour d'autres conditions pathologiques, y compris la sclérose en plaques, où le RXR γ est le seul facteur connu stimulant positivement la remyélinisation (Polly P., 2000). Dans la maladie de Huntington, une diminution de l'expression du RXR γ peut potentiellement contribuer à certains aspects physiopathologiques via l'altération du cistrome du RXR (Xu J., 2009).

2.2.3 Contradiction dans la littérature sur l'effet du ligand de RXR dans l'activité de VDR

Dans le contexte de l'hétérodimère VDR/RXR, les données dans la littérature sont contradictoires. Les premières études ont montrées que le RXR est silencieux (Forman et al., 1995), puis des résultats ont montrées une modification allostérique de RXR par VDR ligandé, RXR acquiert alors la conformation holo en l'absence de son ligand et la capacité de recruter des coactivateurs, ainsi qu'ayant un effet sur l'activation de la transcription de gènes médiées par VDR (Baniahmad, 1995). La liaison des ligands respectifs par VDR et RXR a un effet allostérique sur la liaison avec l'ADN ainsi qu'un effet synergique sur le recrutement du co-activateur SRC1, ce qui suggère que la liaison avec SRC1 est médiée par VDR et RXR (Zhang et al., 2011). D'autres études ont montrées que VDR/RXR est un hétérodimère permissif conditionnel. VDR/RXR peut recruter des coactivateurs en réponse au calcitriol ou au 9cisRA et la présence des deux ligands présente une synergie pour l'activité transcriptionnelle du gène rapporteur *Cyp24* du VDR (Bettoun et al., 2003; Sanchez-Martinez et al., 2006).

Les données de Zhang *et al.* ont montré que le profil d'échange hydrogène-deuterium qui permet de caractériser la dynamique des protéines, de VDR/RXR suite à la liaison de 1,25D3 en présence de 9cisRA était similaire à celui observé lors de la liaison de 1,25D3 seulsuggérant que 9cisRA a peu d'effet (Zhang et al., 2011). De plus, cette étude a montré que l'ajout de RXR α au LBD de VDR induit une augmentation statistiquement significative de la protection contre l'échange de solvants dans l'hélice H7 de la sous-unité VDR par rapport au VDR LBD seul indiquant une stabilisation accrue (conformation moins dynamique) dans cette région. En parallèle, l'ajout de VDR à RXR α induit une protection significative contre l'échange de solvants au niveau des hélices H7 et la boucle H10-H11 de la sous-unité RXR α par rapport à RXR α seul (Zhang et al., 2011).

De plus, il a été démontré qu'une suppression de l'hélice H12 du RXR ou une mutation ponctuelle dans la région AF-2 de RXR favorise le recrutement des corépresseurs (Thompson et al., 2001; Zhang et al., 1999), alors que des mutations au niveau de l'hélice H12 de RXR empêchent le recrutement des coactivateurs (p160 et DRIP205) et des corépresseurs (Osburn et al., 2001). Des mutations ponctuelles au niveau de l'hélice H3 et le domaine AF-2 du VDR bloquent le recrutement des coactivateurs SRC1, TIF2 et AIB1 sans affecter la stabilité de l'hétérodimérisation avec RXR (Bettoun et al., 2003).

D'autres études ont montré que la liaison du 9cisRA au niveau de VDR / RXR lié à l'ADN entraîne le recrutement des coactivateurs (p160 et DRIP205/Med1), également en présence des deux ligands (Haussler M.R., 1998). Des résultats similaires ont été obtenus avec les hétérodimères RAR/ RXR (Perlman K.L., 1991) ou TR/RXR (Jurutka et al., 2001).

L'interaction de DRIP205/Med1, l'un des coactivateurs du VDR (Feng W., 1998; Moras and Gronemeyer, 1998) a été montré être affecté par une phosphorylation de RXR α dans le contexte de l'hétérodimère VDR/RXR. En effet, les mutations activant Ras sont parmi les mutations somatiques les plus fréquentes dans les cancers humains (Forman et al., 1995). L'activation de Ras conduit à la stimulation de la voie MAPK et contribue à la progression et au développement du cancer (Bury et al., 2000; Forman et al., 1995; Herdick M., 2000b). Plusieurs groupes ont montré que l'activation de la voie MAPK module l'activité transcriptionnelle du calcitriol (Bouillon et al., 1995; Haussler, 2011). L'activation de Ras conduit à la stimulation de la voie MAPK et contribue à la progression et au développement du cancer (Balananda-Dhurjati K. Puchaa, 2012). Cette résistance est due à la phosphorylation du RXR α humain sur la sérine 260 située à proximité spatiale des régions d'interactions avec les coactivateurs ce qui interfère avec le recrutement et la liaison du DRIP205 (Herdick M., 2000a). En parallèle, il a été montré que la phosphorylation de RXR α sur la sérine 260 réduit la colocalisation de RXR α et de DRIP205 et son interaction (Carlberg

and Polly, 1998). De plus, ces études ont montré que l'interaction du motif LXXLL du DRIP205 est essentielle pour la liaison avec les récepteurs nucléaires et que la phosphorylation de la sérine 260 de RXR α réduit non seulement l'interaction des hétérodimères VDR/RXR α , mais bloque également l'interaction de l'hétérodimère VDR/RXR α avec le coactivateur DRIP205, ce qui entraîne une réduction d'affinité de liaison du complexe VDR/RXR α /DRIP205 avec l'ADN (Carlberg and Polly, 1998).

2.3 Matériels et méthodes

Dans cette partie, les expériences réalisées concernent principalement la production et la purification des protéines ainsi que la caractérisation biophysique et fonctionnelle.

2.3.1 Production et purification des protéines

Les protéines entières de VDR humaine, RXR humaine et celle de souris sauvage ont été utilisées pour tester l'effet du ligand de RXR sur la liaison avec les éléments de réponse de l'ADN, la stabilité et la liaison avec le peptide co-activateur (SRC1 NR2). Les LBD ont été utilisées pour caractériser l'effet des ligands sur l'hétérodimérisation. Les protéines de RXR présentant les mutations Δ H12 et K289A-E458A ont été utilisées pour caractériser l'effet de RXR sur la liaison avec le coactivateur Med1. Toutes les protéines présentent une étiquette poly-histidines pour faciliter leurs purifications.

a) VDR/RXR

Les protéines hVDR entière ou tronquée de son hélice H12 et hRXR α et mRXR α tronqués de leurs domaines NTD, sauvages et mutés, Δ H12 et K289A-E458A ont été produites et purifiées selon un même protocole décrit ci-dessous.

Les ADNc codant pour la protéine entière de VDR (1-427) humaine et His-hVDR Δ H12 (1-415) ont été clonés dans le vecteur pET28b. Les ADNc codant pour His-hRXR α Δ NTD (130-462) ou His-mRXR Δ NTD (132-467) dépourvu du domaine N-terminal, clonés dans pET15b, ont été utilisés pour générer les protéines N-terminales marquées par des étiquettes polyHistidine. Les séquences codantes pour les mutants His-mRXR α Δ NTD K289A,E458A, His-mRXR α Δ NTD Δ H12 (132-449) ont été insérées dans des vecteurs pET15b.

Les protéines correspondantes ont été produites dans *Escherichia coli* BL21 DE3, pendant 4 heures, à 23°C, après induction avec 1 mM d'IPTG, à une DO600 de \sim 0,7.

Les protéines solubles ont été purifiées séparément sur colonne de chromatographie d'affinité (HisTrap FFcrude), suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille sur colonne (HiLoad Superdex 200) équilibrée dans du tampon contenant du Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, 250 mM de NaCl, 5% de glycérol, 2 mM de CHAPS et 1 mM de TCEP. Les protéines purifiées ont été concentrées à 3-6 mg/mL avec un Amicon Ultra 10 kDa MWCO. La pureté et l'homogénéité de toutes les protéines ont été évaluées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS Page). Les figures 17 et 18 montrent les chromatogrammes d'exclusion de taille des protéines hVDR et hRXR α Δ NTD, respectivement. Les protéines présentent un degré de pureté élevée, comme montré sur les gels SDS (Figure 19).

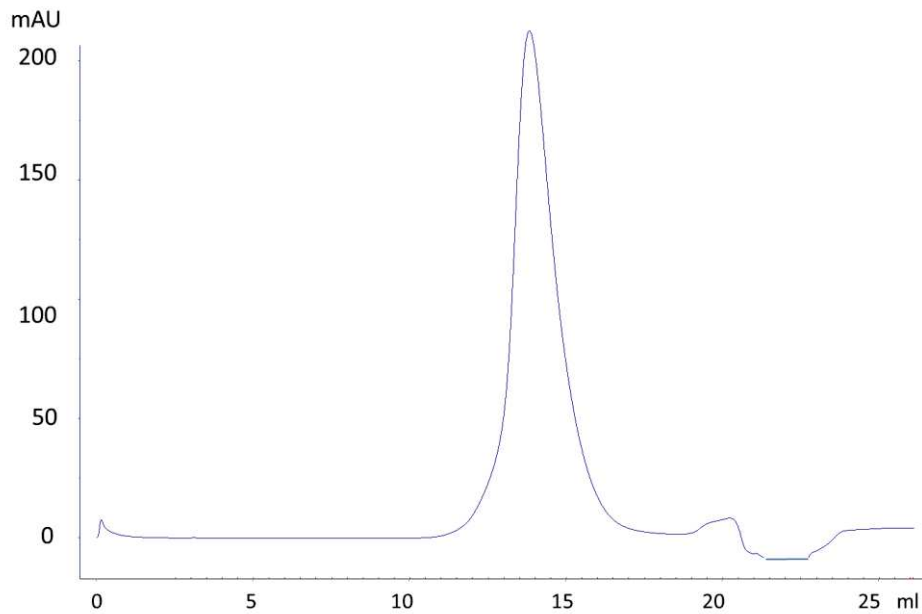


Figure 17 : Chromatogramme de la protéine his-hVDR, obtenu après exclusion de taille sur colonne Superdex 200 10/300. Le pic observé correspond à la protéine VDR humaine fusionnée avec l'étiquette poly-histidines. Le profil d'élution a été contrôlé à 280 nm.

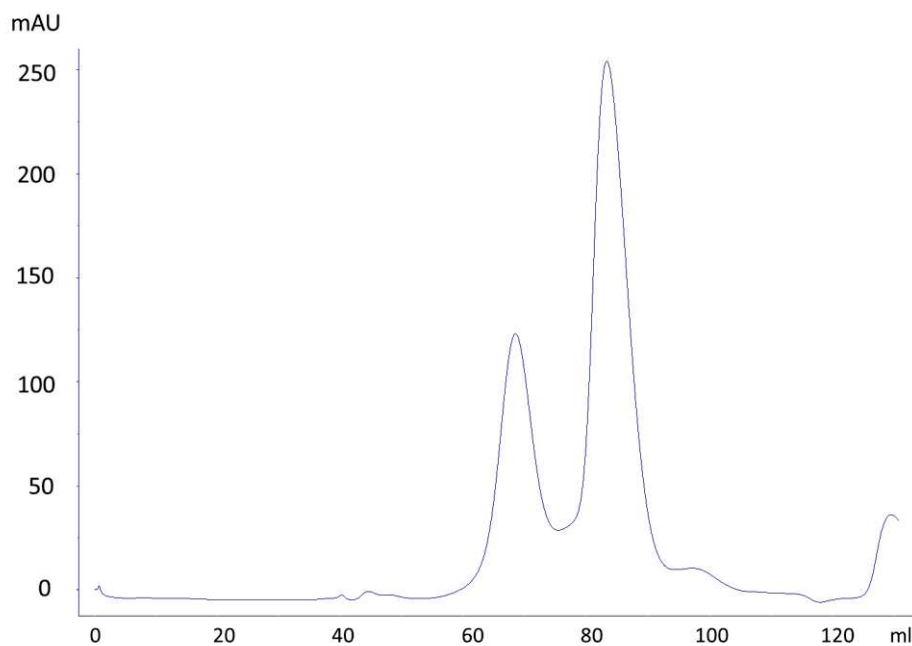


Figure 18 : Chromatogramme de la protéine his-hRXR α Δ NTD, obtenu après exclusion de taille sur colonne Superdex 200 16/60. Le premier pic observé à 65ml correspond à la forme tétramérique de RXR α Δ NTD. Le deuxième pic observé à 85ml correspond à la forme homodimérique de RXR α Δ NTD.

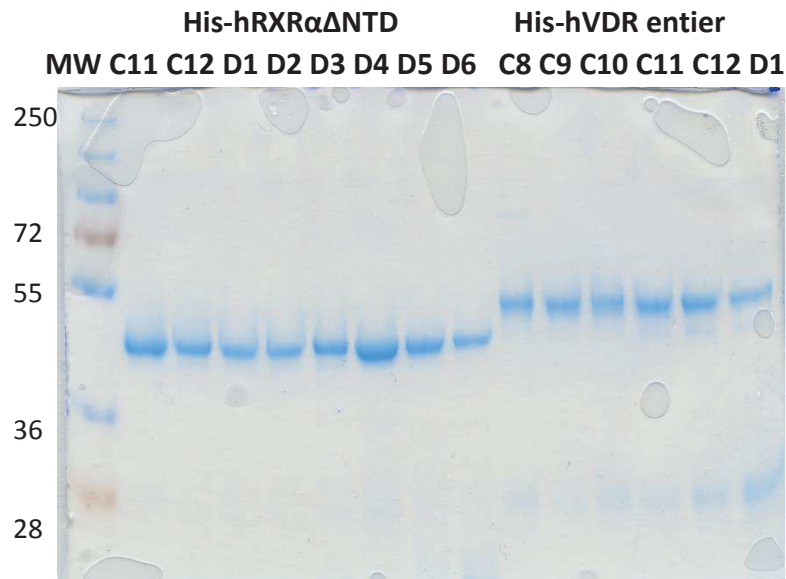


Figure 19 : Gel SDS-PAGE 10 % montrant la migration des fractions issues des deux chromatographies de hVDR et hRXR α Δ NTD. Pour RXR, les fractions déposées correspondent au deuxième pic. MW : gamme du marqueur de poids moléculaire. La protéine RXR α Δ NTD fait 38kDa et his-hVDR entier fait 48 kDa.

La formation de l'hétérodimère se fait par incubation des quantités stœchiométriques des protéines hVDR et hRXR α Δ NTD. L'hétérodimère VDR/RXR est ensuite purifié par chromatographie d'exclusion de taille, sur une colonne Superdex 200, équilibrée dans 20 mM Tris pH 8, 250 mM NaCl, 2 mM CHAPS, 2% Glycérol et 1 mM TCEP. La Figure 20 montre les chromatogrammes de l'hétérodimère formé avec le VDR sauvage.

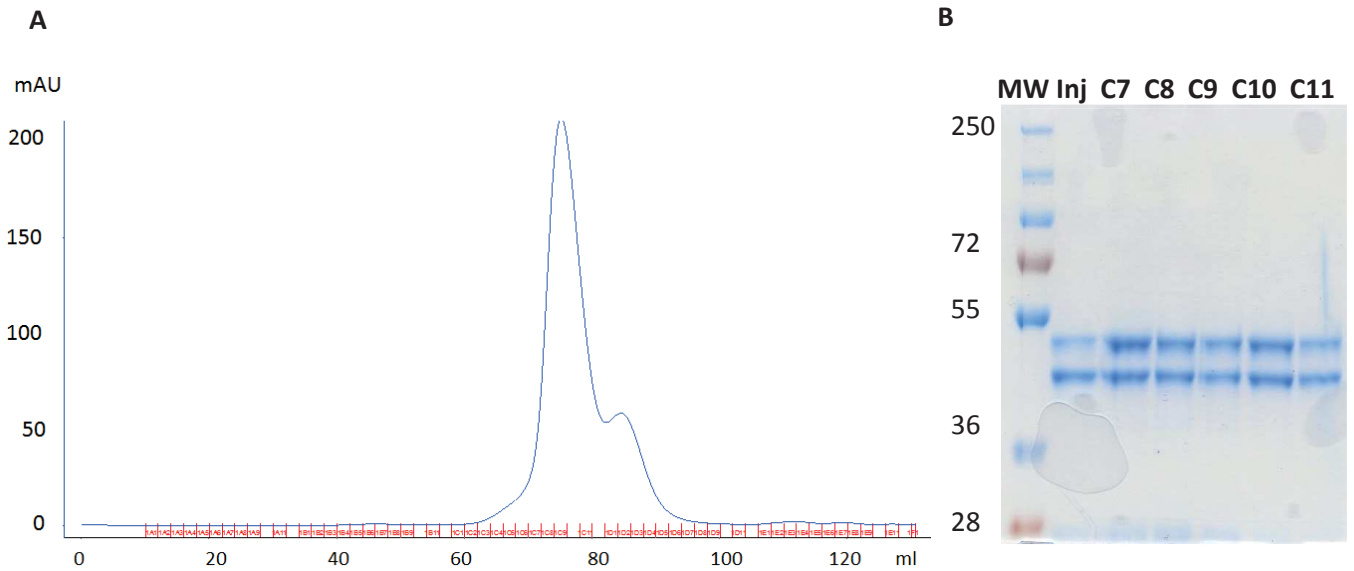


Figure 20 : **A** Chromatogramme du complexe protéique his-hVDR/his-RXR α Δ NTD obtenu après exclusion de taille sur colonne Superdex 200 16/60. Le pic observé correspond au complexe hétérodimérique formé par les protéines ainsi que le léger l'épaulement à côté correspondant à l'excès de RXR α Δ NTD. **B** Gel SDS-PAGE 10 % montrant la migration des fractions issues de la chromatographie d'exclusion de taille du complexe VDR/RXR.

Les chromatogrammes des hétérodimères formés avec les protéines tronquées ou mutées sont semblables. La figure 21 présentent les gels SDS des complexes VDR/RXR et VDR/RXR K289A,E458A.

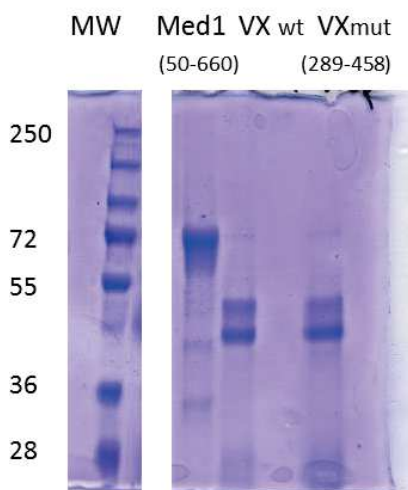


Figure 21 : Gel SDS-PAGE 10 % montrant la migration des fractions issues de chromatographie d'exclusion de taille pour Med1(50-660) 67kDa, his-hVDR/his-RXR α Δ NTD wt et his-hVDR/his-RXR α Δ NTD K289A,E458A.

b) Médiateur 1

La séquence codante pour le Med1 (50-660) humain a été insérée dans un vecteur pBacHGW, utilisé pour la production de la protéine Med1 avec une étiquette polyHistidine en N-ter, dans des cellules d'insectes Sf21. Le choix de la construction de Med1 est basé sur la prédiction de structure secondaire de la protéine, et contient la partie Nterminale prédite comme structurée et le domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires.

Les protéines solubles ont d'abord été purifiées sur colonne de chromatographie d'affinité (HisTrap FFcrude) suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille (Figure 22) sur colonne (HiLoad Superdex 200), équilibrée dans du Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, 250 mM de NaCl, 5% de glycérol, 2 mM de CHAPS et 1 mM de TCEP. La figure 21 montre le gel SDS-PAGE de la fraction de MED1 issue de la chromatographie d'exclusion de taille.

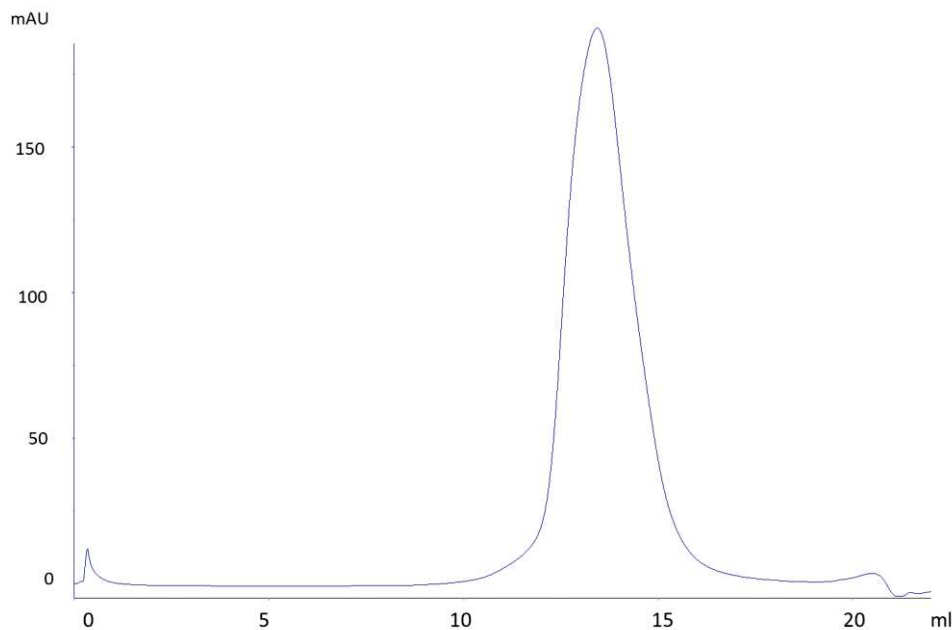


Figure 22 : Chromatogramme de la protéine hMed1(50-660) obtenu après exclusion de taille sur colonne Superdex 200 10/300

c) Domaine de liaison du ligand de VDR humain

La séquence codante pour His-hVDR (118-427) a été insérée dans le vecteur pET28b. Les protéines correspondantes ont été produites dans *Escherichia coli* BL21 DE3 pendant 4 heures à 23°C après induction avec 1 mM d'IPTG à une DO600 de ~ 0,7. Les protéines solubles ont été purifiées sur colonne de chromatographie d'affinité (HisTrap FFcrude, colonne Talon chargée en Cobalt Co^{2+}) suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille sur colonne (HiLoad Superdex 200) équilibrée dans du Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, TCEP 1 mM, Tween 20 0,005%. Les protéines purifiées ont été concentrées à 3-6 mg/mL avec un Amicon Ultra 10 kDa MWCO. La pureté et l'homogénéité des protéines sont évaluées par SDS Page.

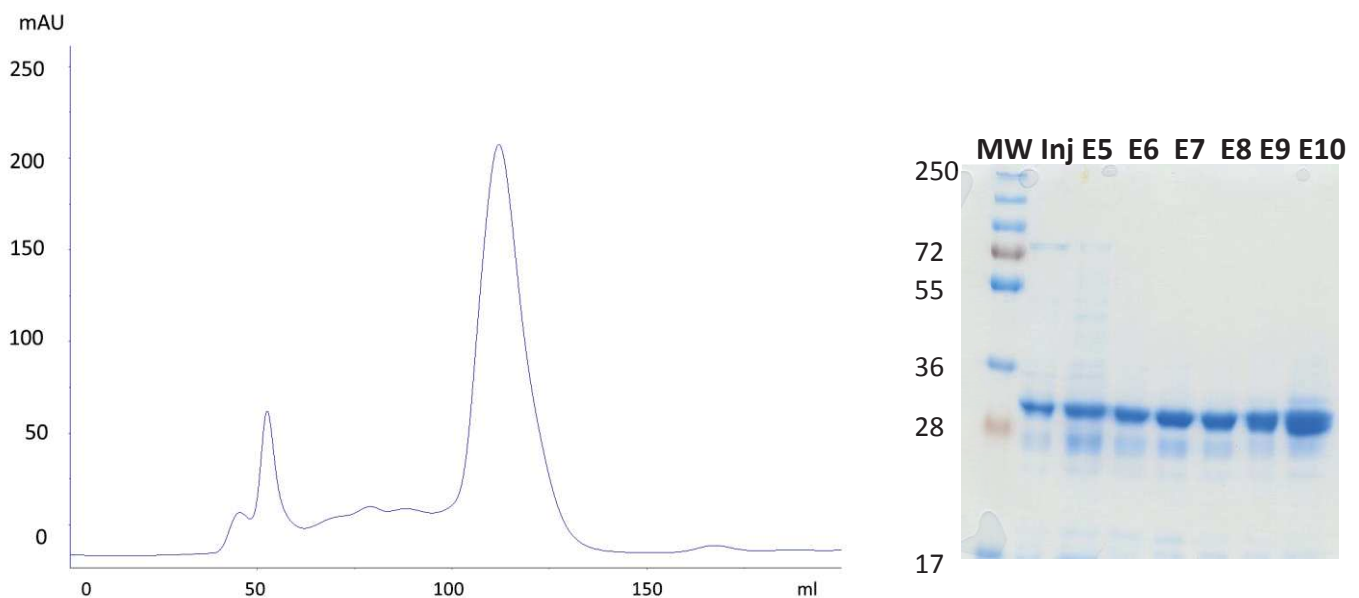


Figure 23 : **A** Chromatogramme de la protéine hVDR LBD après coupure à la thrombine de l'étiquette poly-histidines, obtenu après exclusion de taille sur colonne Superdex 200 26/60. Le pic principal observé à 110ml de volume d'élution correspond à la protéine hVDR LBD. Le profil d'élution a été contrôlé à 280 nm. **B** Gel SDS-PAGE 12 % montrant la migration des fractions issues de la chromatographie d'exclusion de taille de hVDR LBD après coupure à la thrombine de l'étiquette poly-histidines.

d) Domaine de liaison du ligand de VDR du poisson-zèbre

La séquence codante pour His-zVDR (156-453) a été insérée dans le vecteur pET28b. Les protéines ont été produites dans *Escherichia coli* BL21 DE3, pendant 4 heures à 23°C, après induction avec 1 mM d'IPTG, à une DO600 de ~ 0,7. Les protéines solubles ont été d'abord

purifiées sur colonne de chromatographie d'affinité (HisTrap FFcrude) suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille sur colonne (HiLoad Superdex 200) équilibrée dans du Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, TCEP 1 mM et du Tween 20 0,005%. Les protéines purifiées ont été concentrées à 3-6 mg / ml avec un Amicon Ultra 10 kDa MWCO. La pureté et l'homogénéité de toutes les protéines ont été évaluées par SDS Page.

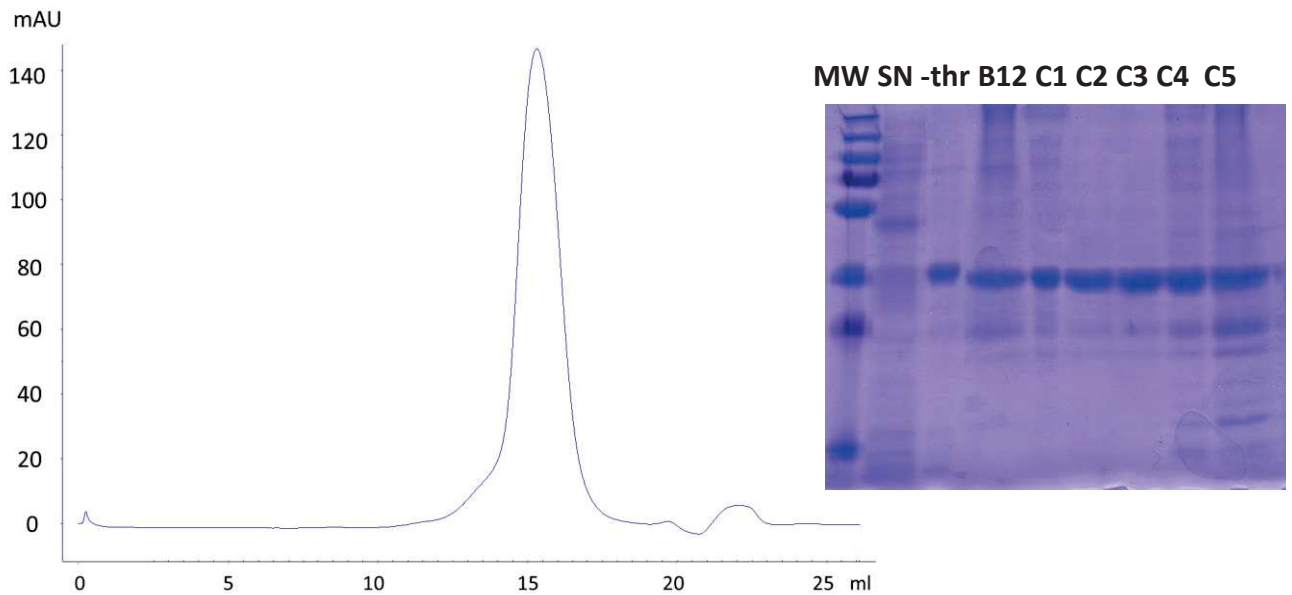


Figure 24 : **A** Chromatogramme de la protéine zVDR LBD, après coupure à la thrombine de l'étiquette poly-histidines, obtenu après exclusion de taille, sur colonne Superdex 200 10/300. Le pic observé à 15ml du volume d'éluion correspond à la protéine zVDR LBD. Le profil d'éluion a été contrôlé à 280 nm. **B** Gel SDS-PAGE 12 % montrant la migration des fractions issues de la chromatographie d'exclusion de taille de zVDR LBD après coupure à la thrombine de l'étiquette poly-histidines.

e) Domaine de liaison du ligand du RXR α

La séquence codante pour le domaine de liaison au ligand de hRXR α (228-462) a été insérée dans le vecteur pET15b. Les protéines ont été produites dans *Escherichia coli* BL21 DE3, pendant 4 heures, à 23°C, après induction avec 1 mM d'IPTG, à une DO600 de $\sim 0,7$. Les protéines solubles ont été purifiées sur colonne de chromatographie d'affinité (HisTrap FFcrude) suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille sur colonne (HiLoad Superdex 200) équilibrée dans du tampon Biacore SPR (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, TCEP 1

mM et Tween 20 0,005%). Les protéines purifiées ont été concentrées à 3-6 mg/ml avec un Amicon Ultra 10 kDa MWCO. La pureté et l'homogénéité de toutes les protéines ont été évaluées par SDS Page.

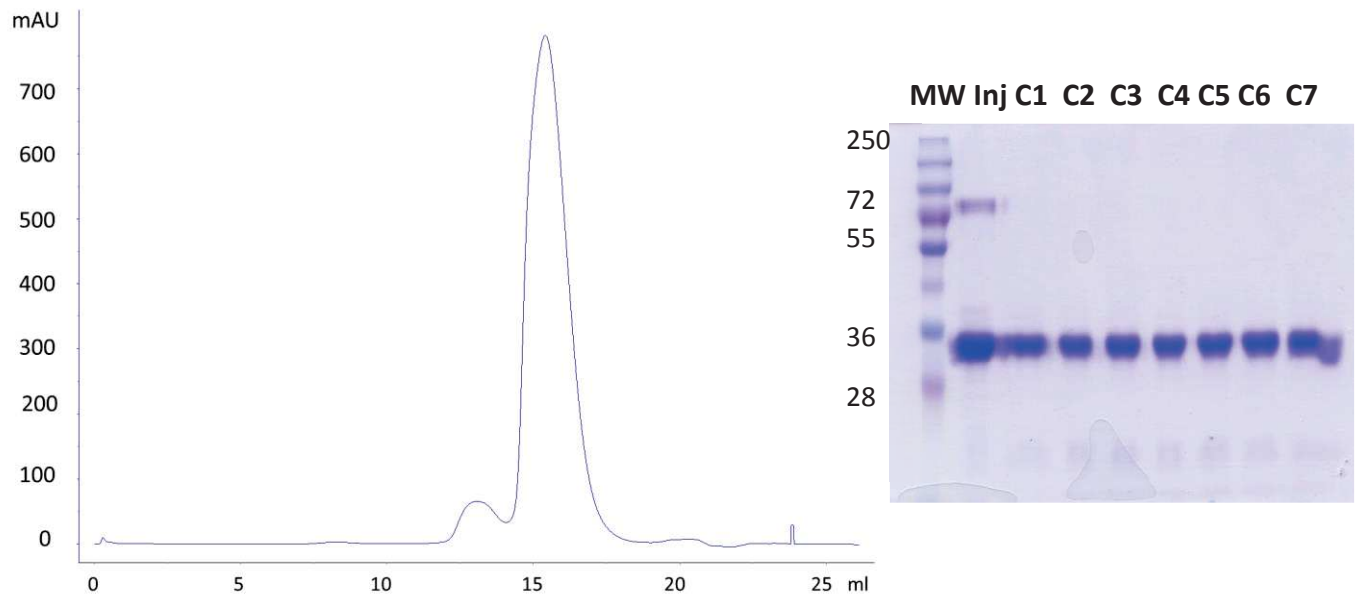


Figure 25 : **A** Chromatogramme de la protéine RXR LBD, après coupure à la thrombine de l'étiquette poly-histidines, obtenu après exclusion de taille, sur colonne Superdex 200 10/300. Le pic observé à 15 ml de volume d'élution correspond à la protéine RXR LBD. **B** Gel SDS-PAGE 12 % montrant la migration des fractions issues de la chromatographie d'exclusion de taille de RXR LBD, après coupure à la thrombine de l'étiquette poly-histidines.

2.3.2 Caractérisation biophysique de l'effet du ligand de RXR

Les compositions des tampons utilisés pour les expériences biophysiques sont les suivantes:

Tampon MST: 20 mM Hepes pH 7.5, 200 mM NaCl, Glycérol 2%, 1 mM TCEP, 0.05% Tween 20

Tampon Anisotropie de Fluorescence: 20 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 50mM KCl, Glycerol 2%, 4mM MgSO₄, 1 mM TCEP, 0.05% Tween 20

Tampon Biacore: Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, TCEP 1 mM, Tween 20 0,005%

Trois équivalents de ligands sont ajoutés pour les conditions ligandées.

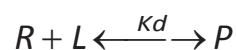
2.3.2.1 Caractérisation de l'effet du ligand de RXR sur la liaison du VDR/RXR avec les éléments de réponse des gènes cibles (VDRE DR3) par anisotropie de fluorescence

Les mesures des affinités de liaison entre l'hétérodimère VDR/RXR α Δ NTD et les différents éléments de réponse de type DR3 (*s100g*, *slc37a2* et *sema5*) ont été réalisées par anisotropie de fluorescence, avec un lecteur de plaque PHERAstar plus (BMG Labtech). Les séquences d'ADN de type DR3, marquées avec la fluorescéine figurent dans le tableau ci-dessous (Tableau 1). Une concentration constante de 10 nM de l'ADN marqué est titrée avec des concentrations croissantes de VDR/RXR variant entre 0,1 nM à 6 μ M.

Tableau 1: Séquences des éléments de réponse de type DR3 utilisés

Promoteurs des gènes comprenant les éléments de réponse étudiés	Séquences nucléotidiques
<i>slc37a2</i> DR3	ACAGGTCGCCAGGTCGTT TGTCCAGCGGTCCAAGCAA
<i>s100g</i> DR3	GAGGGTGAGTGAGTTCAGA CTCCCACTCACTCAAGTCT
<i>sema5</i> DR3	CAGGGTGAGCAGGTCATT GTCCCACTCGTCCAAGTAA

L'affinité d'interaction de l'ADN pour le VDR-RXR a été quantifiée en réponse aux ligands 1,25D3 et 9-cis RA seuls et leur combinaison. La longueur d'onde d'excitation est de 550 nm et la lumière émise a été monitorée par des filtres « high-pass » (550 nm). Le système assure la rotation automatique du polarisateur d'excitation. En considérant que l'ADN DR3 se lie au VDR-RXR avec une stœchiométrie 1:1, le modèle utilisé pour décrire l'expérience est le suivant :



L et R représentent le VDR-RXR/ligand et l'ADN DR3 respectivement, P désigne le complexe VDR-RXR/ligand-ADN.

$$r = r_0 + (r_f - r_0) \left(\frac{(Rt + Lt + Kd) - \sqrt{(Rt + Lt + Kd)^2 - 4RtLt}}{2Rt} \right)$$

Lt et Rt sont les concentrations totales de VDR-RXR/ligand et de l'ADN DR3-fluoresceine, respectivement; rf représente l'anisotropie au plateau, lorsque tout le complexe est formé, tandis que r₀ et r correspondent aux valeurs d'anisotropie de l'ADN DR3 en l'absence et en présence de concentrations données de VDR-RXR/ligand, respectivement. K_D correspond à la constante de dissociation.

Toutes les mesures ont été effectuées à 20 °C et les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Les données d'anisotropie ont été analysées avec le logiciel GraphPad Prism par régression non-linéaire avec l'équation sigmoïdale dose/réponse.

2.3.2.2 Hétérodimérisation par la résonance des plasmons de surface (SPR)

Nous avons mesuré l'affinité d'hétérodimérisation par la méthode de la résonance des plasmons de surface (SPR) en utilisant les domaines de liaison du ligand de VDR et RXR α .

Principe de base du SPR

La SPR permet une détection en temps réel et sans étiquette des interactions biomoléculaires. La SPR se produit lorsque la lumière polarisée frappe une surface électriquement conductrice à l'interface entre deux milieux. Cela génère des ondes de densité de charge d'électrons appelées plasmons, réduisant l'intensité de la lumière réfléchi à un angle spécifique connu sous le nom d'angle de résonance, proportionnellement à la masse sur une surface de capteur. Les molécules cibles, le plus souvent les protéines, sont immobilisées sur une surface de capteur d'or préparée et un échantillon contenant un partenaire potentiel en interaction en solution est injecté sur la surface à travers une série de cellules à écoulement. Au cours de

l'interaction, la lumière polarisée est dirigée vers la surface du capteur et l'angle de lumière réfléchi d'intensité minimale est détecté. Cet angle change à mesure que les molécules se lient et se dissocient et le profil d'interaction est ainsi enregistré en temps réel dans un sensorgramme. Pendant l'injection de l'échantillon, une réponse positive peut être visualisée dans le sensorgramme, car l'analyte (le partenaire en interaction en solution) se lie au ligand (le partenaire d'interaction qui est attaché à la surface du capteur). La réponse diminue lors de la dissociation. Une fois le cycle d'analyse terminé, la solution de régénération est passée sur la puce du capteur, retirant l'analyte lié, se préparant pour le cycle d'analyse suivant.

Le monomère hRXR α LBD a été immobilisé (400 à 500 unités de réponse) sur la surface de la puce de capteur CM5 série S en utilisant un protocole de couplage amino standard dans un tampon acétate de Na 10 mM pH 5,5. L'expérimentation a été réalisée avec l'appareil Biacore SPR T200, dans le tampon Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, TCEP 1 mM et du Tween 20 0,005%. Une solution de chlorure de sodium 1M a été utilisée pour l'étape de régénération. Les interactions entre la protéine RXR α LBD humaine et VDR LBD humaine et/ou zebrafish ont été analysées en utilisant une série de dilutions du VDR LBD à 30 μ M (apo, en présence des ligands 1,25D3 / acide 9-cis rétinolique ou en combinaison). La phase d'association était de 120 secondes et la phase de dissociation de 120 secondes. Les données ont été ajustées à un modèle de liaison en régime permanent à l'aide du logiciel d'évaluation Biacore T200, après avoir soustrait le signal de référence et le signal du tampon.

2.3.2.3 Stabilité de l'hétérodimère par fluorimétrie différentielle à balayage (nano-DSF)

Principe de base de la nano-DSF

La nano-DSF est une méthode de fluorimétrie à balayage différentiel, modifiée pour déterminer la stabilité des protéines, en utilisant la fluorescence intrinsèque du tryptophane ou

de la tyrosine. La stabilité des protéines est généralement traitée par des expériences de dépliage thermique ou chimique. Dans les expériences de dépliage thermique, une rampe de température linéaire est appliquée aux protéines de dépliage, tandis que les expériences de dépliage chimique utilisent des dénaturants chimiques à des concentrations croissantes. La stabilité thermique d'une protéine est généralement décrite par la «température de fusion» ou «Tm», à laquelle 50% de la population protéique est dépliée, correspondant au point d'inflexion de la transition du plié au déplié. L'intensité de fluorescence et le maximum de fluorescence dépendent fortement de l'environnement proche du tryptophane. Par conséquent, le rapport des intensités de fluorescence à 350 nm et 330 nm permet de détecter tout changement dans la structure des protéines.

Les solutions de protéines ont été chargées dans des capillaires de qualité nanoDSF, qui ont ensuite été chargées dans l'appareil Prometheus NT.48. Chaque échantillon a été mesuré en triplicat. Le dépliement des protéines a été détecté pendant le chauffage dans une rampe thermique linéaire (1°C / min, 25-90°C) à faible sensibilité du détecteur et avec une puissance d'excitation de 10%. Les points de transition de dépliement ont été déterminés à partir des changements dans les longueurs d'onde d'émission de fluorescence du tryptophane à 350 et 330 nm, identifiés par le Logiciel de Prometheus NT. Les températures de début de dépliement ont été déterminées, après correction de base et normalisation des données. Le début de dépliement a été défini comme le point, auquel 1% des protéines ont été dépliées. La protéine a été préparée à une concentration de 2mg/mL.

2.3.2.4 Caractérisation de l'effet du ligand de RXR sur la liaison avec les co-activateurs par MST

Principe de base de la MST

La technique de MST est utilisée pour détecter les interactions protéiques en se basant sur un gradient microscopique de température généré par un laser infra-rouge. Tout changement dans la couche d'hydratation, la charge et la forme d'une biomolécule affecte son mouvement thermophorétique. Les mesures d'interactions ont été réalisées avec l'appareil Monolith™ NT.115 (Nanotemper technologies GmbH, Munich) et les données ont été analysées en utilisant la version 2.2.4 du logiciel NanoTemper Analysis. Une espèce marquée par un fluorochrome est titrée par une autre espèce pour en déduire une courbe sigmoïde de dissociation. Les mesures sont réalisées en utilisant des capillaires avec un revêtement standard ou Premium (MST Standard / Premium coated). Ainsi, les constantes de dissociation sont calculées à partir des variations de fluorescence induites par les mouvements de thermophorèse des particules, suite au chauffage localisé produit par le laser infra-rouge.

Expériences réalisées : Les mesures d'interaction entre l'hétérodimère et le 2ème motif du co-activateur SRC1, SRC1 NR2 dont la séquence est RHKILHRLQLQEGS, marqué avec une sonde fluorescéine (ThermoFisher) ont été réalisées par MST. Chaque mesure consiste en 16 dilutions sérielles 1:1 de VDR / RXR, à partir d'une concentration de 10 nM jusqu'à 0.2 nM où la concentration en peptide marqué par une sonde fluorescence est constante (100 nM). Les données ont été enregistrées avec des capillaires en verre standard (Nanotemper), à 25°C, à une excitation de laser de 20% et une puissance MST de 20%, avec un temps d'activation du laser de 30 secondes et un temps d'extinction du laser de 5 secondes. Les mesures ont été reproduites sur 3 expériences indépendantes et les signaux de thermophorèse enregistrés pour chacun des 16 capillaires normalisés. La fluorescence normalisée est représentée en fonction de la concentration de VDR/RXR donnant une courbe sigmoïdale où les écarts-types (SEM pour $n \geq 1$) sont déterminés pour chacun des points. Le logiciel NanoTemper Analysis 2.2.4 a été utilisé pour ajuster les données et déterminer les valeurs de K_D .

2.3.2.5 Caractérisation de l'effet des mutations de RXR sur la liaison de l'hétérodimère avec Med1 par SPR

Afin de caractériser les surfaces d'interaction de RXR dans le complexe VDR-RXR avec le coactivateur Med1, j'ai caractérisé l'affinité de VDR-RXR sauvage et mutés, avec un grand fragment de Med1 par SPR. Dans ce but, j'ai produit et purifié les différents complexes VDR/RXR wt, VDR/RXR Δ H12, VDR/RXR K289A,E458A et VDR Δ H12/RXR ainsi que Med1(50-660). La protéine monomérique de Med1(50-660) a été immobilisée (132 unités de réponse) sur la surface de la puce de capteur CM5 série S, en utilisant un protocole de couplage amine standard, dans un tampon acétate de sodium (10 mM, pH 5,5). L'expérimentation a été réalisée dans un tampon comprenant 50mM hepes, pH 7.5, 400mM NaCl, 1mM TCEP et 0.005% Tween 20. Une solution de 1M chlorure de sodium a été utilisée pour l'étape de régénération. Les interactions entre le complexe VDR/RXR et Med1 ont été analysées en utilisant une série de dilutions du VDR/RXR (en présence des ligands 1,25D3 et acide 9-cis RA) allant de 0.01 à 8 μ M. La phase d'association était de 120 secondes et la phase de dissociation de 120 secondes. Les données ont été ajustées à un modèle de liaison en régime permanent à l'aide du logiciel d'évaluation Biacore T200, après avoir soustraire le signal de référence et le signal du tampon.

2.3.3 *Caractérisation fonctionnelle de l'effet du ligand de RXR*

2.3.3.1 Effet sur la transcription de gènes cibles par transactivation transitoire

Les tests fonctionnels ont été effectués sur la lignée intestinale du rat IEC18. La technique du gène rapporteur permet d'étudier l'activité d'un promoteur et/ou l'efficacité de transfection. Chaque mesure est la moyenne de trois essais indépendants, réalisés en triplicat. L'activité de la luciférase a été normalisée par rapport à l'activité de la β -galactosidase.

2.3.3.1.1 Culture des cellules IEC18

Les cellules IEC18 ont été cultivées et maintenues dans du milieu Dulbecco (DMEM 4.5g/l de glucose), contenant 5 % de sérum de veau foetal, 1mM de pyruvate de sodium, 5 % de gentamycine et 0,6 µg/mL d'insuline. Les cellules ont été maintenues dans un incubateur à 37°C, sous atmosphère humide, contenant 5 % de CO₂.

2.3.3.1.2 Transfection des cellules

Les liposomes ont été formés grâce à l'agent de transfection d'ADN X-tremeGENE HP de Roche, conformément aux instructions du fabricant. Les cellules ont été cultivées dans une plaque de 24 puits (30 000 cellules/puit) et transfectées avec un mélange contenant les vecteurs exprimant les protéines de fusion pSG5-VDR (0.25 µg /puit) et pSG5-RXRα (0.25 µg /puit), ainsi que les plasmides rapporteurs codant pour les gènes (*s100g*, *slc37a2*, *sema5*) couplés à la luciférase, (0.25 µg /puit) et le vecteur pCMV-beta-galactosidase portant le gène LacZ exprimant la β-galactosidase, sous le contrôle de l'opéron lactose. Ce mélange contenant 1 µg d'ADN a été dilué dans 50 µL/puit d'une solution Opti-MEM. La solution ADN/X-tremeGENE HP a été vortexée 10 secondes, brièvement centrifugée et laissée à incuber 5 minutes, à température ambiante. Puis 50 µL de ce mélange ont été ajoutés à chaque puit, contenant 500 µL de milieu (sérum traité au charbon actif) et les cellules qui sont à une confluence de 70 %.

2.3.3.1.3 Traitement des cellules

Vinght-quatre heures après la transfection, les cellules ont été lavées dans du tampon PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM sodium phosphate dibasique, 2 mM potassium phosphate monobasique pH 7.4) frais et stérile, puis les ligands à tester (ou le solvant seul) dilués dans 500 µL de milieu frais, ont été ajoutés aux cellules. Les cellules ont été traitées

respectivement avec le solvant (contrôle), 1 nM 1,25D3, 0.1 et 1 μ M de l'acide 9-*cis* rétinoïque ou bien leur combinaison. Les cellules ont été récoltées 24 heures plus tard.

2.3.3.1.4 Récolte et lyse des cellules

Le milieu de culture est aspiré et les cellules rincées avec du tampon PBS frais. Les cellules ont ensuite lysées avec 100 μ L/puits de tampon « Reporter Gene Assay Lysis Buffer » de Roche et mises sous agitation à température ambiante pendant 10 minutes. Les lysats ont alors transférés en plaque 96 puits et centrifugés dix minutes à 500 g. Les lysats clarifiés ont été transférés dans une nouvelle plaque 96 puits et conservés à -20 °C.

2.3.3.1.5 Test β -galactosidase

Vingt microlitres de lysat ont été transférés dans une plaque 96 puits, auxquels ont été ajoutés 180 μ L d'une solution ONPG (0,2 g d'ONPG pour 50 mL d'eau ultrapure/ tampon β -galactosidase dans un rapport 1/5). Le tampon β -galactosidase contient 60 mM de Na₂HPO₄, 40 mM de Na₂H₂PO₄, 10 mM de KCl, 50 mM de β -mercaptoéthanol et 1 mM de MgSO₄.7H₂O. La plaque a été incubée à 37 °C, jusqu'à l'obtention d'une coloration jaune (environ 30 minutes). La réaction a été stoppée par ajout de 75 μ L d'une solution de Na₂CO₃ à 1 M. La densité optique à 415 nm (DO₄₁₅) a ensuite été mesurée par un spectrophotomètre (EL808 Ultra Microplate Reader; Bio-Tek Instruments Inc.) et les unités galactosidases ont été calculées selon la formule : $U_{\text{galactosidase}} = (100 \times V_{\text{lyse}} \times \text{DO}_{415}) / (V_{\text{test}} \times \text{Tps})$. V_{lyse} étant le volume de tampon de lyse par puit (soit 100 μ L), V_{test} le volume de lysat utilisé pour le test (soit 20 μ L) et Tps le temps de réaction, à 37 °C, exprimé en heure.

2.3.3.1.6 Test de la luciférase

Dix microlitres ont été transférés en plaque luminomètre de 96 puits, auxquels ont été ajoutés 50 μ L de réactif luciférine, préparé extemporanément. Ce réactif contient 530 μ M d'ATP, 470 μ M de luciférine, 270 μ M de coenzyme A et un demi-volume de tampon luciférase 2X. Ce

dernier se compose de 40 mM de tampon TRIS-Phosphate pH 7.8, 2.14 mM de MgCl₂, 5.4 mM de MgSO₄, 0.2 mM d'EDTA et 66.6 mM de DTT. Les mesures des tests de l'activité luciférase ont été réalisées sur un luminomètre LB96P de Berthold Technologies, avec un temps de lecture de 10 secondes.

2.3.3.2 Mesure de l'expression des gènes par qRT-PCR

Les cellules IEC18 ont été cultivées pendant 24 heures dans une plaque de 6 puits (300 000 cellules/puit). Les cellules ont été traitées pendant 18 heures respectivement avec le solvant (contrôle), 1 nM 1,25D3, 0.1 et 1 µM 9-*cis*-RA ou bien leur combinaison. Les cellules ont été lysées et l'ARN a été isolé en utilisant le réactif Trizol (Molecular Research Center, Inc) selon le protocole du fabricant. L'ARN a été quantifié par spectrophotométrie (Nanodrop, Thermo Fisher) et la matrice d'ADN (cDNA) préparée, en utilisant 2 µg de l'ARN total. Enfin, l'inverse transcriptase SuperScriptII (Thermo Fisher) a été réalisée selon le protocole du fabricant. Les réactions de RT-qPCR ont été réalisées à l'aide du kit Light Cycler 480 SYBR Green I Master X2 (Roche) et en utilisant les oligonucléotides décrits dans le tableau 2.

Tableau 2 : Séquences des oligonucléotides (rat) utilisés pour quantifier l'expression des transcrits par RT-qPCR

Gène	Amorce 5'-3'	Amorce antisens 5'-3'
<i>slc37a2</i>	TCCGGGTATCTGGTTCCTCC	GGTGCAAGCGGCTCTTAATG
<i>s100g</i>	GACAGCAAGCAGCACAGAAAA	TGGACAGCTGGTTTGGATCG
<i>sema5</i>	GTGGGAGTGTGATGAAGCCA	GGTACAGACGGGTGTGAAGG
<i>gapdh</i>	AGTGCCAGCCTCGTCTCATA	GGTAACCAGGCGTCCGATAC

2.3.3.3 Effet sur la prolifération des cellules LNCaP et MCF-7

L'effet sur la prolifération du ligand de RXR seul ou en combinaison avec celui du VDR, a été caractérisé dans les deux lignées cellulaires MCF-7 et LNCaP, exprimant VDR et RXR.

Les cellules MCF-7 ont été cultivées et maintenues dans du milieu Dulbecco (DMEM 1g/L de glucose) contenant 10 % de sérum de veau foetal, 5 % de gentamycine et 0,6 µg/mL d'insuline). Les cellules LNCaP ont été cultivées dans du milieu RPMI1640 contenant 10 % de sérum de veau foetal, pénicilline (100 unités/ml) et streptomycine (100µg/mL).

Les cellules ont été cultivées dans des plaques de 96 puits (10 000 cellules/puit) et traitées (une fois/jour) pendant trois jours. Les cellules ont été traitées avec le solvant (contrôle), 1 µM 1,25D3, 0,1 et 1 µM de 9cisRA ou bien leur combinaison. La viabilité cellulaire a été quantifiée par FACS en utilisant le kit Guava® ViaCount™. Les résultats de viabilité cellulaire exprimée en pourcentage de cellules vivantes ont été analysés par le logiciel GraphPad Prism7.

2.4 Résultats

Les résultats de cette partie sont présentés sous forme de manuscrit pour publication, suivi d'un résumé décrivant les principales données supplémentaires, non incluses dans le manuscrit. Le manuscrit (publication 1) intitulé “ Exploring the effect of 9-cis retinoic acid, a retinoid X receptor agonist, on vitamin D receptor activities ” est actuellement en cours de préparation.

2.4.1 Publication 1: Exploring the effect of 9-cis retinoic acid, a retinoid X receptor agonist, on vitamin D receptor activities

Exploring the effect of 9-cis retinoic acid, a retinoid X receptor agonist, on vitamin D receptor activities

Sandra Chalhoub¹⁻⁴, Anna Y. Belorusova¹⁻⁴, Natacha Rochel¹⁻⁴
Daniela Rovito¹⁻⁴, Gilles Laverny¹⁻⁴, Daniel Metzger¹⁻⁴

¹ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, France.

² Centre National de la Recherche Scientifique UMR7104, Illkirch, France.

³ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1258, Illkirch, France.

⁴ Université de Strasbourg, Illkirch, France.

Keywords: Vitamin D receptor, Retinoid X receptor, 1,25D3, 9cisRA, DNA

Introduction

The vitamin D receptor, VDR (NR1H1), regulates the biological actions of the bioactive form of vitamin D₃, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25D₃), controlling mineral ion homeostasis, cell growth and differentiation, immune-regulatory and anti-inflammatory effects (Bouillon et al., 2019; Christakos et al., 2019). Several nuclear receptors, including receptors for peroxisome proliferator activators (PPARs), thyroid hormone (TR), retinoic acid (RAR), require heterodimerization with the common partner RXR (review in (Evans and Mangelsdorf 2014)).

VDR, as a type II nuclear receptor, for efficient DNA binding and activity in response to their cognate ligands, functions as a heterodimer with the retinoid X receptor (RXR) (Belivet et al., 2004). RXRs comprise three members, RXR α (NR2B1), RXR β (NR2B2) and RXR γ (NR2B3), differentially expressed in tissues (Germain et al., 2006). RXRs bind various natural ligands comprising vitamin A and polyunsaturated fatty acids (Germain et al., 2006). Although not being the endogenous RXR ligand, 9cis retinoic acid (9cisRA) binds and activate RXR (Rühl et al., 2015). RXR ligands can regulate activity of some heterodimers including PPAR/RXR (DiRenzo et al., 1997) that are called permissive heterodimers (Forman et al., 1995; Shulman et al., 2004). In contrast the non-permissive heterodimers, like RXR/TR, cannot be activated by RXR ligands alone (Li et al., 2002) and the conditional heterodimers like RXR/RAR, show response to RXR ligands only in the presence of RAR agonist (Westin et al., 1998; LeMaire et al., 2019). For VDR, *in vitro* studies led to contradictory results concerning the role of RXR ligands. Even though early studies indicated that RXR is silent within RXR/VDR heterodimers (Forman et al., 1995), other studies have shown that the RXR ligand, 9cisRA either inhibits (Thompson et al., 1998) or induces (Bettoun et al., 2003; Sanchez-Martinez et al., 2006) VDR activities.

Like the other nuclear receptors, VDR and RXR are modular proteins with an N-terminal domain (NTD) structurally disordered followed by the two-zinc finger-containing DNA binding domain (DBD) and a flexible hinge domain that links the DBD to the ligand-binding domain (LBD). While crystal structures are available for liganded VDR and RXR LBDs (review in (Belorusova and Rochel, 2016; Dominguez et al., 2017)), the structural data of RXR/VDR heterodimer are scarce and only consist of a cryo-electron microscopy study (Orlov et al., 2012) and hydrogen-deuterium exchange coupled to mass spectrometry studies (Zhang et al., 2012; Zheng et al., 2017) of full length RXR/VDR complex. In addition, it remains unknown whether RXR's ligand modulate the expression of specific VDR target genes.

To control gene expression, RXR/VDR bind to DNA sites located in regulatory regions of target genes and called VD response elements (VDREs). Those elements are composed of two hexanucleotide sequences configured into direct repeat separated by 3 nucleotides (DR3), where RXR binds to the 5' motif and VDR the 3' motif (Umesomo et al., 1991; Carlberg et al., 1993). Within the receptor complex, the DBDs of both VDR and RXR and the VDR hinge are the major structural determinants involved in DNA recognition (Shaffer and Gewirth 2004; Orlov et al., 2012). DNA has been shown to act as an allosteric regulator, exerting long-range alterations of the conformational dynamics of the C-terminal region of the LBD impacting receptor interaction with coregulators (Zhang et al., 2012). Thus, binding of RXR/VDR to VDREs promotes the recruitment of coregulatory proteins that are likely to play a major role in VDR-dependent tissue- and gene-selective transcription. Upon agonist binding, VDR change its ligand binding domain conformation allowing the binding of various coactivator proteins to generate large complexes that will modify chromatin organization and recruit basal transcription factors to the promoter region of target genes. Among VDR coactivators, the p160 family, CBP/p300 as well as the Drip/Mediator complex strongly potentiate ligand-dependent VDR transcription (review in (Christakos et al., 2016)).

Here, we investigated the effect of the binding of VDR agonist, 1,25D₃, and RXR agonist, 9cisRA, on RXR/VDR activities by biophysical and functional assays. We determined whether 9cisRA binding by RXR/VDR apo or 1,25D₃-liganded, modify the interaction the heterodimer formation, the interaction of the heterodimer with DNA response elements or with

steroid receptor coactivator 1 (SRC1) peptide. In addition, we evaluated the different ligand combination on transcriptional activity of VDR target genes and transcript levels.

Material and Methods

Chemicals

1,25D3 (17936, Sigma Aldrich) and 9cisRA (MB Biomedicals) were dissolved in absolute ethanol at 10^{-2} M and stored at -20 °C. The fluorescent SRC1 NR2 peptide (683-LTERHKILHRLLEQEGSPSD-701) was purchased from Thermo-Fisher. The single strands unlabeled and fluorescein-labelled were purchased from Sigma Oligos.

Protein production and purification.

DNA segments encoding His-tagged LBD of hRXR α (amino acid 223-462) and His-tagged hRXR α lacking N-terminal domain were inserted into pET15b. The cDNA encoding His-tagged hVDR full length (amino acid 1-427), hVDR LBD (118-427 Δ 166-216), and zVDR LBD (156-453), were cloned into pET28b. The recombinant proteins were produced in *Escherichia coli* BL21 DE3 by 4 hours at 23 °C after induction with 1 mM IPTG at an OD600 of \sim 0.7. Soluble proteins were purified by HisTrap FF crude chromatography (GE) column (17-5286-01) followed by size exclusion chromatography on HiLoad Superdex 200 (GE) column (28-9893-35) equilibrated in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 250 mM NaCl, 5% glycerol, 2mM chaps and 1 mM TCEP. The proteins were concentrated to 3-6 mg/ml with an Amicon Ultra 10 kDa MWCO. RXR/VDR heterodimer was formed by mixing hVDR full-length and hRXR α Δ NTD in stoichiometric amount and purified by size exclusion chromatography (SEC) on a Superdex 200 (GE) column equilibrated in 20 mM Tris pH 8.0, 250 mM NaCl, 2mM Chaps, 5% Glycerol, 1mM TCEP. Purity and homogeneity of all proteins were assessed by SDS and Native Page. The buffer solution for thermal stability, anisotropy and microscale thermophoresis assays was 20 mM Hepes pH 7.5, 50 mM NaCl, 50 mM KCl, Glycerol 2%, 4 mM MgSO₄, 1 mM TCEP, 0.05% Tween 20. Ligands, when added, were at a final concentration of three molar excess relative to the highest concentration of protein.

Thermal stability assay by nano-differential scanning fluorimetry. Fluorescence based thermal experiments were performed using Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies, Germany) with capillaries containing 10 μ L proteins at x mg/mL. The temperature was increased by a rate of 1 °C/min from 25 to 90 °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 . Each sample was measured in triplicate.

Microscale thermophoresis. Measurements were performed with a Monolith NT.115 instrument (NanoTemper Technologies GmbH, Munchen, Germany) monitoring the binding of fluorescein labelled SRC1 NR2 peptide to hRXR α Δ NTD / hVDR full-length in presence and absence of ligand and with or without 2-fold excess of DNAs. Each measurement consists of 16 reaction mixtures where the fluorescent-labelled co-activator SRC1 NR2 was constant (100 nM) and serial dilutions of RXR/VDR from a concentration of 10 μ M down to 0.2 nM. Measurements were made with standard glass capillaries (Nanotemper) at 25°C, at 20% LED excitation and 20% MST power, with a laser-on time of 30 s and a laser-off time of 5s. NanoTemper Analysis 2.2.4 software was used to fit the data and to determine the K_D .

Fluorescence anisotropy. Measurements of the binding affinities of the fluorescent DNAs for RXR/VDR in the presence or absence of ligands were performed using PHERAstar plus microplate reader (BMG Labtech). The DNA sequences labelled at the 5' end with fluorescein were purchased from Sigma Oligos and annealed. Excitation wavelength was set at 470 nm and emission measured at 530 nm. Protein heterodimer, initially at a concentration of 6 μ M, were serially diluted directly into a 96-well black-walled microplate NBS (Corning) in 1:1 sixteen consecutive times into the same protein buffer solution in a volume of 25 μ L until the lowest protein concentration of 0.2 nM. Then, 25 μ L of fluorescent VDREs were added to protein samples at 10 nM. After 30 minutes of incubation in the dark, fluorescence polarization was read. Experimental values are shown as mean \pm standard deviation of three independent experiments and were analyzed by non-linear regression with an equation for sigmoidal dose response (variable slope) in GraphPad Prism.

Small angle x-ray scattering. Synchrotron X-ray data were collected on a Pilatus 1M detector at the ESRF beamline BM29 (ref). About 40 μ L of RXR/VDR/*slc37a2* DR3 at a concentration 5 mg mL⁻¹ in 20 mM Tris, 75 mM NaCl, 75 mM KCl, 5% (v/v) glycerol, 1 mM CHAPS, 4 mM MgSO₄, 1 mM TCEP, pH 8 and 100 μ L onto a GE Healthcare Superdex 200 10/300 column (equilibrated in the same buffer) at a flow rate of 0.5 mL.min⁻¹. A scattering profile was integrated every second. Frames were selected based on the examination of the Size Exclusion profile together with the calculated R_g and D_{max} values. The SAXS data were averaged and processed by standard procedures using PRIMUS (Konarev et al., 2003). The forward scattering $I(0)$ and the radii of gyration R_g were evaluated using the Guinier approximation assuming that at very small angles ($s < 1.3/R_g$) the intensity is represented as $I(s) = I(0) \exp(-sR_g)^2/3$. These parameters were also computed from the entire scattering pattern using the indirect transform package GNOM (Svergun, 1992) which also provides the maximum dimension of the particle D_{max} and the distance distribution function $P(r)$. The program SASREF (Petoukhov and Svergun, 2005) was employed for molecular rigid body modeling of the RXR/VDR/DNA complex, based on SAXS and cryoEM structures (Rochel et al., 2011; Orlov et al., 2012). The final fits of the model scattering to the experimental data were computed using CRY SOL (Svergun et al., 1995).

Surface plasmon resonance. The SPR measurements were performed by Biacore T100 sensitivity enhanced T200 equipment (GE Healthcare) using CM5 series S sensor chip (GE) (29-1496-03). The hRXR α LBD was immobilized on the chip surface using standard amino-coupling protocol in 10 mM Na-acetate buffer pH 5.5. The resulting immobilized RXR was in the range of 400-500 response unit. The running buffer was 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, 0.005%

Tween 20 and for regeneration 1M sodium chloride solution was used. Interactions of the hRXR α LBD with the LBDs of zVDR or hVDR were analyzed in the manner of dose response using twofold dilution series of VDR LBDs ranging from 1 to 37 μ M in absence or presence of ligand. The association phase was 120 s and the dissociation phase was 120 s. After subtracting the reference and buffer signal, the data were fit to a steady state binding model using the Biacore T200 Evaluation software (GE Healthcare).

Cells. IEC-18 rat intestinal epithelial cells (American Type Culture Collection, Rockville, USA) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 4.5 g/l glucose supplemented with 5 % fetal calf serum (FCS), 1 mM Sodium Pyruvate, 0.1 UI/mL insulin and 40 μ g/mL gentamicin. Cells at 80 % confluency were grown in medium supplemented with 5% charcoal-treated FCS for 48 h and treated as indicated.

Luciferase assay transactivation assays. Cells were seeded into 24-well plates (3×10^4 cells per well) and co-transfected with a luciferase reporter plasmid containing three copies of the VDRE (pGL3-3xVDRE, 0.25 μ g per well), an expression vector for human VDR (pSG5-hVDR, 0.25 μ g per well, for human RXR α (pSG5-hRXR α , 0.25 μ g per well) and a plasmid expressing β -galactosidase (pCMV-beta-gal, 0.25 μ g/well) using X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics) following the manufacturer's instructions. After 24 h, cells were treated as indicated. Cells were lysed and 20 μ l of lysates were assayed for luciferase activity as recommended by the supplier (Perkin-Elmer) and β -gal activity was used to normalize the transfection efficiencies.

RNA isolation and RT-qPCR. Rat intestinal IEC18 cells were incubated for 24 hours in 6-well plates at a density of 3×10^5 cells per well. Cells were treated for 18 h, as indicated. Cells were lysed and total RNA isolated using TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc) according to the manufacturer's protocol. RNA was quantified by spectrophotometry (Nanodrop, Thermo Fisher), and cDNA prepared using 2 μ g of total RNA and SuperScriptII reverse transcriptase (Thermo Fisher) following the manufacturer's instructions. RT-qPCR reactions were performed using the Light Cycler 480 SYBR Green I Master X2 Kit (Roche) according to the supplier's protocol and using RT-qPCR (rat) oligonucleotides as follows:

sema5:

Forward primer: GTGGGAGTGTGATGAAGCCA

Reverse primer: GGTACAGACGGGTGTGAAGG

s100g:

Forward primer: GACAGCAAGCAGCACAGAAAA

Reverse primer: TGGACAGCTGGTTTGGATCG

slc37a2:

Forward primer: TCCGGGTATCTGGTTCCTCC

Reverse primer: GGTGCAAGCGGCTCTTAATG

Gapdh:

Forward primer: AGTGCCAGCCTCGTCTCATA

Reverse primer: GGTAACCAGGCGTCCGATAC

Gapdh was used as housekeeping gene.

Chromatin immunoprecipitation. C57BL/6J mice (WT) were fed *ad libitum* and housed in a temperature- and light-controlled animal facility. Mice were administered *per os* (100 μ l/mouse) with the indicated amount of 1,25D3 or vehicle (sunflower oil, Auchan). At the end of the treatment, mice were killed by cervical dislocation and duodenum was harvested and washed twice in ice-cold PBS, incubated in PBS containing 1% paraformaldehyde (PFA, Electron Microscopy Sciences) for 10 min, and quenched with 0.125 M glycine at room temperature for 5 min. Nuclei from cross-linked tissues were isolated in ChIP Buffer (ChIP-IT High Sensitivity, Active Motif) following the manufacturer's procedure and sonicated in 300–400 bp DNA fragments. Thirty μ g of chromatin was immunoprecipitated with anti-VDR antibodies (D2K6W, Cell Signaling) or anti-RXRalpha (D6H10, Cell Signaling) antibodies and DNA was recovered following the manufacturer's directions (ChIP-IT High Sensitivity, Active Motif). qPCR reactions were performed using the Light Cycler 480 SYBR Green I Master X2 Kit (Roche) according to the supplier's protocol using RT-qPCR (mouse) oligonucleotides as follows:

sema5:

Forward primer: AGGGTGAGCAGGTTTCATTTC

Reverse primer: AGGCGGTGACTCAAATCAGA

s100g:

Forward primer: AGGAGGGTGAGTGAGTTCAGA

Reverse primer: AGAATGTGAGGAGACAGCCA

slc37a2:

Forward primer: TCCTGGGTGTGCCGATTCTA

Reverse primer: CCTGGTCTGGTTGTTACCGT

Results

Impact of RXR and its ligand on VDR/RXR heterodimerization

To study the effects of ligands on protein stability, we used nano-differential scanning fluorimetry (nanoDSF) to determine the melting temperature (T_m) (Supplementary Table 1) that corresponds to the temperature where 50% of the proteins are unfolded.

Among the three RXRs, RXR α is reported to be widely expressed and preferentially bound to VDR as heterodimer (Kephart et al., 1996). For this experiment, we used hVDR full-length and mRXR α truncated of its N-terminal domain (Δ NTD). Our results show that RXR α stability is similar in its apo- and in liganded-states ($T_m=55.3^\circ\text{C}$). The melting temperature of

monomeric VDR apo and liganded is lower ($T_m \sim 45^\circ\text{C}$) than that of RXR, indicating that VDR is less stable. This difference is explained by the different oligomeric states of the two proteins, VDR being monomeric and RXR homodimeric (Cheskis and Freedman, 1994). Heterodimer stability ($T_m = 54.2^\circ\text{C}$) is similar to homodimeric RXR, demonstrating that heterodimer form with RXR stabilize VDR conformation. No effect is observed in the presence of 9cisRA but the presence of 1,25D3 slightly stabilized the heterodimer ($T_m = 55.5^\circ\text{C}$).

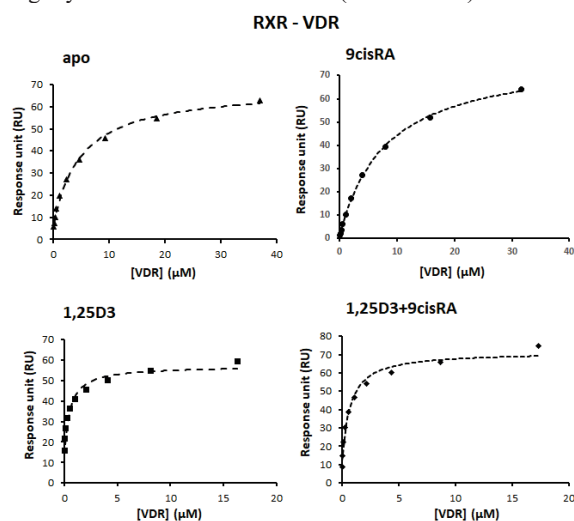


Fig. 1. RXR ligand has no effect on 1,25D3-induced VDR/ RXR α LBD dimerization. Surface Plasmon Resonance data analysis of hVDR LBD interaction with hRXR α LBD in the absence or in the presence of 1,25D3 and/or 9cisRA. Equilibrium responses are plotted as a function of total protein concentration and fit to simple 1:1 binding isotherms. Equilibrium dissociation constants are reported in Table 1.

Next, we investigated the effects of 1,25D3, 9cisRA or their combination on RXR/VDR heterodimer formation by surface plasmon resonance (SPR). In particular, we characterized the interaction between human VDR (hVDR) LBD or zebrafish (zVDR) LBD (Fig. 1 and Fig. S1) and human RXR α (hRXR α) LBD.

Titrated / Immobilized	K_D (μM)	
	hRXR α LBD apo	hRXR α LBD 9cisRA
apo		
zVDR LBD	2.9 ± 0.2	13.5 ± 1.4
hVDR LBD	4.6 ± 0.5	8.3 ± 0.5
1,25D3		
zVDR LBD	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1
hVDR LBD	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.2

Table 1. Summary of the dissociation constants (K_D) of the interaction between VDR and RXR α LBDs.

In the absence of ligand, hVDR and zVDR associated with hRXR with a dissociation constant (K_D) of $4.6 \mu\text{M}$ and $2.9 \mu\text{M}$, respectively (Table 1). In agreement with published data (Cheskis and Freedman, 1994) binding of 1,25D3 to VDR led to an increase in dimer formation with apo RXR ($K_D = 0.7 \mu\text{M}$ and $0.4 \mu\text{M}$ for hVDR and zVDR, respectively). In contrast, in the presence of 9cisRA, a destabilization of the dimer formation is observed (K_D of $8.3 \mu\text{M}$ and $13.5 \mu\text{M}$ for hVDR and zVDR, respectively) (Table 1). Importantly, 9cisRA did not affect 1-25D3-induced VDR/RXR heterodimer formation.

Impact of VDR and RXR α ligands on RXR/VDR DNA complex

To study, the affinity of RXR α /VDR heterodimer for specific VDREs in the absence or presence of 9cisRA and/or 1,25D3 we used fluorescence anisotropy. VDR heterodimer preferentially binds to DR3 elements and we selected DR3 elements identified in the regulatory regions of *s100g* and *slc37a2* genes (Fig. 2A and Fig S2), genes the expression of which are normalized in the intestine of Cyp27b1 $^{-/-}$ null treated by 1,25D3 (Lee et al., 2015) and reduced in mice with a loss of function mutation in VDR LBD (Huet et al., 2015). In addition, we used the DR3 identified in the regulation region of *sema5a*, a gene the expression of which is highly induced by 1,25D3 administration in WT mice (Rovito *et al*, unpublished). To determine RXR binding to these DR3, we performed chromatin immunoprecipitation from chromatin isolated from the duodenum of wild type mice treated with vehicle or $1 \mu\text{g/kg}$ 1,25D3 using antibodies directed against VDR and RXR α (Fig. S2). Q-PCR analyses of DNA regions encompassing the VDRE of *s100g*, *slc37a2* and *sema5a* revealed that VDR is recruited after 1,25D3 administration.

Of note, the binding of VDR and RXR α to the same genomic region was higher in vehicle-treated mice than in VDR null mice. Moreover, RXR is recruited on the tested VDREs. Thus, these DR3 elements represent suitable model to study the role of RXR and its ligand on VDR recruitment and target gene expression. Those DR3 elements exhibit non-identical hexanucleotides sequences in the two sites and various spacer sequences. All three VDREs show similar high binding in the nanomolar range affinity for the apo RXR α /VDR (Fig. 2B, Fig. S3-S4 and Table 2).

Complexes	K_D (nM)		
	<i>slc37a2</i> DR3	<i>s100g</i> DR3	<i>sema5</i> DR3
RXR/VDR apo	43 \pm 2	43 \pm 2	32 \pm 2
RXR/VDR - 1,25D3	32 \pm 1	39 \pm 2	47 \pm 2
RXR/VDR - 9cisRA	75 \pm 4	44 \pm 2	26 \pm 1
RXR/VDR -1,25D3+9cisRA	64 \pm 2	58 \pm 2	25 \pm 1

Table 2. Dissociation constants for the binding of the RXR/VDR heterodimer to the *Sema5*, *Slc37a2* and *S100g* DR3s. The binding constants are expressed as means \pm standard deviation, for at least three experiments.

Whereas 1,25D3 has little effect on the affinity of the RXR/VDR for these DR3s, 9cis RA has no effect on the affinity of RXR/VDR for *s100g* and *sema5* DR3s but decreases the affinity for *slc37a2* DR3 compared to the apo state. However, the presence of both ligands decreases the affinity for *slc37a2* and *s100g* DR3s, and increases for *sema5* DR3. These effects being however modest ($<1.8x$). In summary, these results indicate that RXR α /VDR heterodimer ligands have no effect on the high affinity for the selected VDREs.

As the selected VDREs behave similarly, we further characterize the architecture in solution of the RXR α /VDR complex bound to *slc37a2* DR3 element by small X-ray scattering analysis (SAXS) (Fig. S5). The SAXS parameters and rigid-body refined atomistic model of the RXR/VDR/*slc37a2* DR3 complex (Fig. 2C) suggested a conserved elongated asymmetric conformation where the LBDs are arranged perpendicular to the DNA and are located asymmetrically at the DNA 5'-end of the response element, similar to the complex formed with *BGLAP* DR3 (Rochel et al., 2011). Thus the mechanisms by which their ligands influence coactivator binding should be similar in the two complexes.

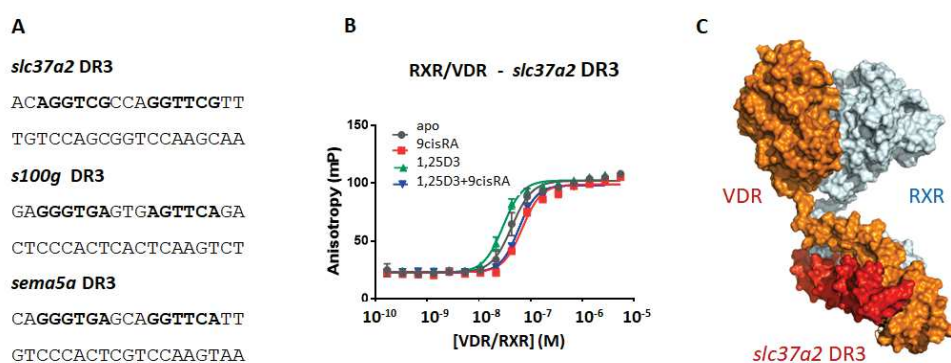


Fig. 2. DNA binding of RXR/VDR heterodimer binding. (A) Sequences of *sema5*, *slc37a2* and *s100g* VDREs. (B) Binding curves of hVDR full-length/RXR α Δ NTD to FAM-labelled *slc37a2* DR3 as measured by fluorescence anisotropy. Experiments were carried out in the absence of ligands or in presence of 1,25D3 and/or 9cisRA. Solid lines correspond to fits of the data points by non-linear regression analysis (sigmoidal dose-response variable slope) using GraphPad Prism with the K_D values given in Table 2 and a number of binding sites $n = 1$. (C) Solution structure model of hVDR full-length/RXR α Δ NTD/*slc37a2* DR3 fully liganded complex.

Impact of RXR α ligand on heterodimer interaction with SRC1 NR2 coactivator peptide

To analyze the effect of ligands on coactivator peptide recruitment by RXR/VDR heterodimer, we monitored the binding of a fluorescently labeled SRC1 peptide encompassing the second LXXLL nuclear receptor interacting motif (NR2) to RXR/VDR in the absence or presence of 1,25D3 and/or 9cisRA by microscale thermophoresis. It has been previously shown that SRC1 NR2 peptide binds with high affinity VDR and RXR LBDs in presence of agonist ligands (Rochel et al., 2011; Sato et al., 2010). In all the tested conditions, SRC1 NR2 binds to the heterodimer with a stoichiometry of one peptide per heterodimer (Fig. 3).

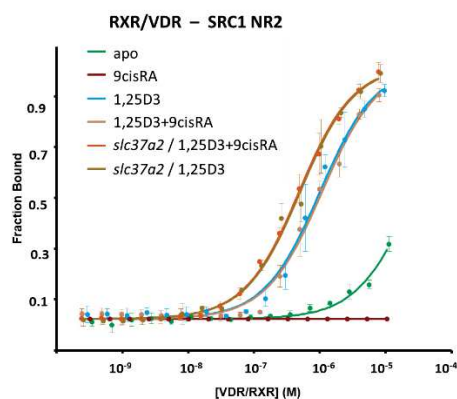


Fig. 3. SRC1 NR2 co-activator recruitment is mediated by VDR ligand independently of RXR ligand. Unlabeled hVDR full-length/RXR α Δ NTD in absence of DNA and in complex of *slc37a2* DR3, were titrated into a fixed concentration of fluorescently labeled SRC1 NR2 peptide in the absence of ligand or in presence of 1,25D3 and/or 9cis RA. Isotherms averaged over three consecutive measurements and fitted according to the law of mass action to yield the apparent K_D (Table 3). Each plot is representative of at least two independent experiments performed with different batches of protein preparation.

Complexes	K_D (μ M)			
	no DNA	<i>slc37a2</i> DR3	<i>sema5</i> DR3	<i>s100g</i> DR3
RXR/VDR apo	-	-	-	-
RXR/VDR - 9cisRA	-	-	-	-
RXR/VDR - 1,25D3	1.0 \pm 0.1	0.45 \pm 0.04	0.70 \pm 0.05	1.0 \pm 0.04
RXR/VDR - 1,25D3+9cisRA	1.0 \pm 0.1	0.43 \pm 0.04	0.70 \pm 0.04	1.2 \pm 0.1

Table 3. Dissociation constants for the binding of the RXR/VDR heterodimer to SRC1 NR2.

As shown in Table 3, the NR box 2 does not bind to apo proteins in agreement with previous studies (Pogenberg et al., 2005; Rochel et al., 2011). In the presence of 9cisRA, no binding was observed to RXR/VDR in contrast to the ability of liganded RXR LBD to interact with SRC1 NR2 (Pogenberg et al., 2005). As expected, SRC1 NR2 peptide is efficiently recruited by RXR/VDR in the presence of 1,25D3, ($K_D=1\mu$ M). Addition of 9cisRA to 1-25D3-liganded dimer has no effect. In addition, we characterized the effect of DNA-binding on the recruitment of SRC1 NR2 by RXR/VDR heterodimer in the presence of ligands (Fig. 3 and Table 3). When bound to *s100g* DR3, similar affinity for SRC1 NR2 is obtained compared to the non-DNA complex. The binding of RXR/VDR to *slc37a2* and *sema5* DR3s led to an increase of 2.2 and 1.4 fold, respectively, of the binding affinity for SRC1 NR2. Together these data demonstrate that the 1,25D3 ligand stabilizes the agonist conformation of VDR in the heterodimer that renders accessible the binding surface for coactivator recruitment, while 9cisRA has no such effect in the RXR/VDR complex. In addition, some DR3s exhibit an allosteric stabilization effect.

Contribution of RXR α ligand to VDR mediated transcription

The biophysical results show that RXR α ligand in context of RXR α /VDR heterodimer has little or no effect on dimerization, DNA binding and SRC1 NR2 recruitment. In order to correlate the biophysical results with functional data, we performed transactivation assays. Rat ileum derived cell line IEC-18 were transfected with expression vectors encoding the full-length hVDR and hRXR α as well as luciferase-reporter plasmids containing three copies of VDREs from *sema5*, *slc37a2* or *s100g* genes and treated for 24 h with 1nM 1,25D3, 0.1 or 1 μ M 9cisRA or combination of both ligands (Fig. 4A). As expected, 1,25D3 increased luciferase activity of the three genes compared to vehicle-treated cells (Fig. 4A). In contrast, 9cisRA has no significant activity alone or in combination with 1,25D3 on the three tested genes. These results consistent with the biophysical data, indicated no effect of 9cisRA and no synergistic effect.

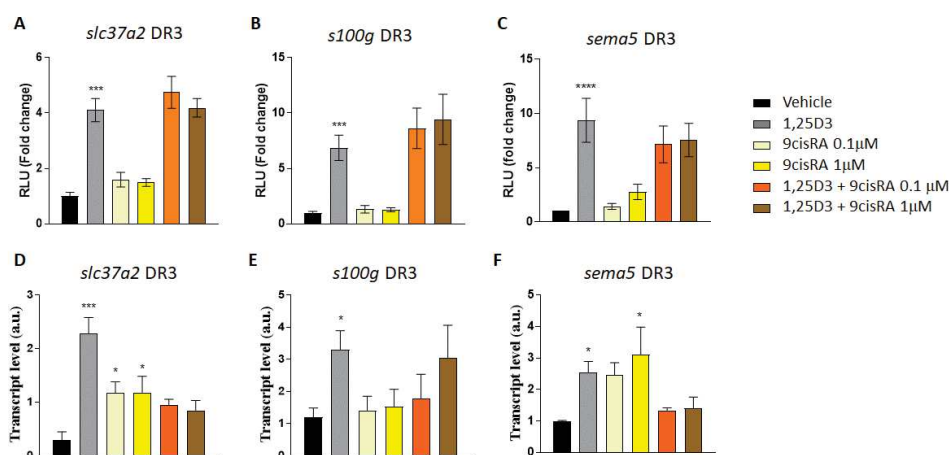


Fig. 4. Effect of 1,25D3 and 9cisRA on VDR/RXR transcriptional activity in IEC-18 cells. (A) IEC-18 cells were transfected with expression vectors encoding the hVDR and hRXR α and a luciferase reported plasmid containing 3 copies of *slc37a2*, *s100g* or *sema5* VDREs, and treated with vehicle or 1nM 1,25D3 or 0.1 and 1mM 9cisRA in the absence or presence of 1nM 1,25D3. Beta-galactosidase, expressed under the control of the CMV promoter, was used to normalize the signal. n=3. (B) The transcript levels of *slc37a2*, *s100g* and *sema5* were determined by RT-qPCR in IEC-18 cells. Cells were treated for 18h with vehicle, 1 nM 1,25D3, or 0.1 or 1 mM 9cisRA in absence or presence of 1nM 1,25D3. n=3. Data were analyzed using prism Graphpad, expressed as fold induction. 1,25D3 and 9cis RA treatments are compared to the vehicle treatment, combined treatments are compared to 1,25D3 treatment. * p < 0.05 vs. vehicle, *** p < 0.001 vs. vehicle

To determine whether these effects held true for endogenous RXR/VDR, we determined *sema5*, *slc37a2* and *s100g* transcript levels in IEC-18 cells treated for 18h with 1 nM 1,25D3 alone or in combination with 0.1 and 1 μM 9cisRA (Fig. 4B). In agreement with the results obtained *in vivo*, 1,25D3 increased by at least 2-fold the transcript levels of the three tested genes. The transcript levels of *sema5* are similar in 9cisRA and 1,25D3-treated cells. In addition, *slc37a2* transcript levels are induced by 1-fold by 9cisRA compared to vehicle, but are also 1-fold lower than in cells treated with 1,25D3. However, *s100g* transcript levels are similar in vehicle and 9cisRA-treated cells. Importantly, 1,25D3-induced transcript level of all the tested genes are impaired by a co-treatment with 9cisRA. Thus, these results indicate that 9cisRA represses 1,25D3-induced VDR target gene expression.

Discussion

We report biochemical and biophysical data on RXR/VDR heterodimer in presence of VDR agonist and/or RXR agonist. As expected, using recombinant proteins, we showed that full-length VDR alone is unstable and that addition of RXR through the formation of a heterodimer stabilizes VDR, (Zhang et al., 2011; Rochel et al., 2011). 1,25D3 stabilizes heterodimer formation between RXR and VDR LBDs. In contrast, 9cisRA has a destabilizing effect when VDR is unliganded and has no effect when VDR is liganded, in agreement with an early study (Cheskis and Freedman, 1994).

We analyzed the effect of ligands on the binding of RXR/VDR to VDREs of three genes identified in the intestine and potentially involved calcium homeostasis. The use of natural VDREs is important to elucidate the molecular mechanism underlying promoter specific activities of VDR and/or RXR ligands (Zheng et al., 2017). The VDR binding sites on three analyzed VDREs is more conserved than the RXR binding sites and their sequences contain the preferential nucleotides that have been shown to be required for optimal specific contacts: RGTTC A and RGGTCA for VDR and RXR, respectively (Nishikawa et al., 1994; Colnot et al. 1995; Penvose et al. 2019). We show that the 3 VDREs from *sema5*, *s100g* and *slc37a2* are bound with high affinity by apo RXR/VDR. Strong binding of apo RXR/VDR to DNA is important for unliganded VDR signaling in calcium homeostasis (Huet et al., 2015). Indeed, we previously have shown by using a point-mutated VDR (VDRgem), that apo-VDRgem binds to VDR response elements of VDR target genes in the mouse duodenum and represses many genes involved (Huet et al., 2015) intestinal unliganded VDR strongly impairs calcium homeostasis. VDR and RXR ligands have minor effect on binding affinity of RXR/VDR to the 3 studied VDREs, (Ligand modulation has been shown to be sequence specific (Toell et al., 2000)). SAXS analysis of RXR/VDR/*slc37a2* DR3 revealed an elongated asymmetric structural model where the DNA binding-induced effects are mediated through stabilizing the conformational mobility of the LBDs and flexible linker with the DBDs.

Agonist binding to the ligand binding pocket of the nuclear receptor through a conformational change of the LBD allows the AF2 region of the receptor to recruit transcriptional co-regulatory proteins that contain α -helical NR motif. We show that SRC1 NR2 co-activator recruitment is mediated by VDR ligand independently from RXR ligand and is enhanced when bound to *slc37a2* and *sema5* DR3s and unaffected when bound to *s100g* DR3, suggesting an allosteric control of VDR activity by the DNA. Few studies support allosteric control

of non-permissive dimer activity by DNA for RXR/TR and RXR/VDR (Putcha et al., 2009; Zhang et al., 2011; Zheng et al., 2017). Ligand and DNA binding has been shown to alter RXR/VDR dynamics (Zhang et al., 2011; Zheng et al., 2017). DNA binding for *Cyp24a1* DR3 has been shown to impact the AF2 helix 12 of VDR only while binding to consensus DR3 impacted both VDR and RXR AF2 (Zhang et al., 2011). Our observation of a recruitment of SRC1 by VDR AF2 confirms previous studies demonstrating that SRC1 RID is recruited by VDR (Rochel et al., 2011) and that 1,25D3-liganded RXR/VDR is sufficient for efficient binding of SRC1 RID whereas RXR AF2 is insensitive to SRC1 binding (Zheng et al., 2017).

We also show in transactivation assay that 9cisRA has no significant transcriptional activity alone or in combination with 1,25D3 on *sema5*, *s100g* and *slc37a2* VDREs. 1,25D3 is the major actor in RXR/VDR activity and RXR remains silent, supporting the non-permissiveness of RXR/VDR heterodimer (Forman et al., 1995; Schulman et al., 2004). However, some effect of 9cisRA could be observed on the transcript levels of the three genes with 9cisRA repressing 1,25D3-induced VDR target gene expression. The difference in ligand response in the same IEC-18 cells may be explained by differential levels of VDR and RXR, alternatively by differences in the promoter context of the gene.

Despite a minor effect of RXR agonist ligand, RXR is a central player in RXR/VDR action as demonstrated by its stabilization effect and its co-incident association to VDR in 1,25D3 treated cells. Binding of 9cisRA to RXR/VDR may only contribute to 1,25D3 dependent gene expression in a promoter-specific manner as revealed by the fact that RXR agonist treatment in monocyte derived dendritic cells only regulate a small portion of VDR target (<8%) (Szeles et al., 2010).

In conclusion this study gives new insight into the complex interplay between ligand, DNA sequences and transcriptional activity of RXR/VDR heterodimer.

Acknowledgments

We thank the IGBMC staff: cell culture service, P. Eberling for peptide synthesis, as well as Camille Camille Kostmann and Yves Nominé (IGBMC) for assistance in SPR. We thank the staff of BM29 (ESRF synchrotron) for their help in SAXS data collection. The work was supported by grant ANR-13-BSV8-0024-01 from ANR and institutional funds from Instruct-ERIC for support and the use of resources of the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (ANR-10-LABX-0030-INRT and ANR-10-IDEX-0002-02). S.C. thanks the ARTP for a doctoral fellowship.

References

- Belorusova AY, Rochel N. Structural Studies of Vitamin D Nuclear Receptor Ligand-Binding Properties. *Vitam Horm.* 2016, 100:83-116.
- Bouillon R, Marcocci C, Carmeliet G, Bikle D, White JH, Dawson-Hughes B, Lips P, Munns CF, Lazaretti-Castro M, Giustina A, Bilezikian J. Skeletal and Extraskelatal Actions of Vitamin D: Current Evidence and Outstanding Questions. *Endocr Rev.* 2019, 40(4):1109-1151.
- Brelivet Y, Kammerer S, Rochel N, Poch O, Moras D. Signature of the oligomeric behaviour of nuclear receptors at the sequence and structural level. *EMBO Rep.* 2004, 5(4):423-429.
- Carlberg C, Bendik I, Wyss A, Meier E, Sturzenbecker LJ, Grippo JF, Hunziker W. Two nuclear signalling pathways for vitamin D. *Nature* 1993, 361:657-660.
- Cheskis B, Freedman LP. Ligand modulates the conversion of DNA-bound vitamin D3 receptor (VDR) homodimers into VDR-retinoid X receptor heterodimers. *Mol Cell Biol.* 1994, 14(5):3329-3338.
- Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev.* 2016, 96(1):365-408.
- Christakos S, Li S, De La Cruz J, Bikle DD. New developments in our understanding of vitamin metabolism, action and treatment. *Metabolism.* 2019, 98:112-120.
- Colnot S, Lambert M, Blin C, Thomasset M, Perret C. Identification of DNA sequences that bind retinoid X receptor-1,25(OH)2D3-receptor heterodimers with high affinity. *Mol Cell Endocrinol.* 1995, 113(1):89-98.
- DiRenzo J, Söderstrom M, Kurokawa R, Ogliastro MH, Ricote M, Ingrey S, Hörlein A, Rosenfeld MG, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Mol. Cell. Biol.* 1997, 17:2166-2176.
- Dominguez M, Alvarez S, de Lera AR. Natural and Structure-based RXR Ligand Scaffolds and Their Functions. *Curr Top Med Chem.* 2017; 17(6):631-662.

Supplementary data for publication 1

Table S1.

Complexes		T _m (°C)
RXR	apo	55.3
	9cisRA	55.4
VDR	apo	45.0
	1,25D3	46.4
RXR/VDR	apo	54.2
	1,25D3	55.6
	9cisRA	54.0
	1,25D3+9cisRA	55.5
RXR/VDR/ <i>sema5</i> DR3	1,25D3	57.4
	9cisRA	55.2
	1,25D3+9cisRA	57.0
RXR/VDR/ <i>s100g</i> DR3	1,25D3	56.0
	9cisRA	54.3
	1,25D3+9cisRA	56.0
RXR/VDR/ <i>slc37a2</i> DR3	1,25D3	56.0
	9cisRA	55.0
	1,25D3+9cisRA	55.5

Figure S1. Surface Plasmon Resonance data analysis of zVDR LBD interaction with hRXR α LBD in absence of ligand or in presence of 1,25D3 and/or 9cisRA. Equilibrium responses are plotted as a function of total protein concentration and fit to simple 1:1 binding isotherms.

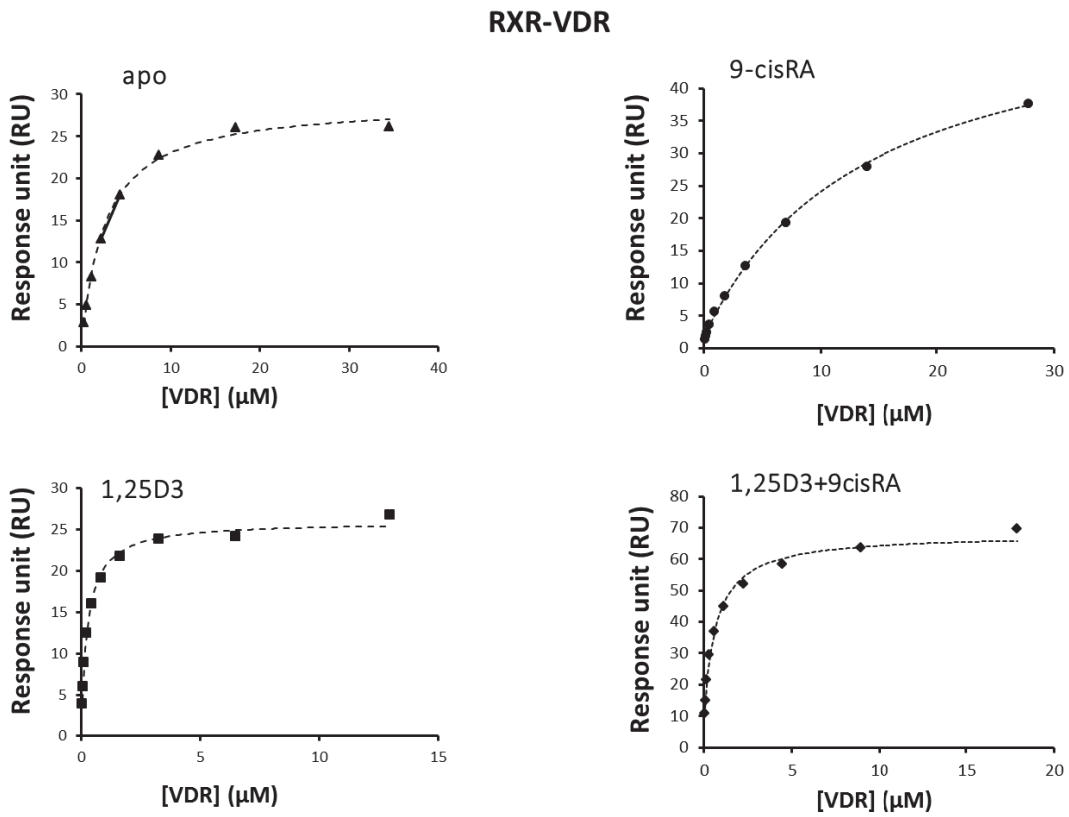


Figure S2. Binding curves of hVDR full-length/RXR α Δ NTD to FAM-labelled s100g DR3 as measured by fluorescence anisotropy. Experiments were carried out in the absence of ligands or in presence of 1,25D3 and/or 9cisRA. Solid lines correspond to fits of the data points by non-linear regression analysis (sigmoidal dose-response variable slope) using GraphPad Prism with the K_D values given in Table 2 and a number of binding sites $n = 1$.

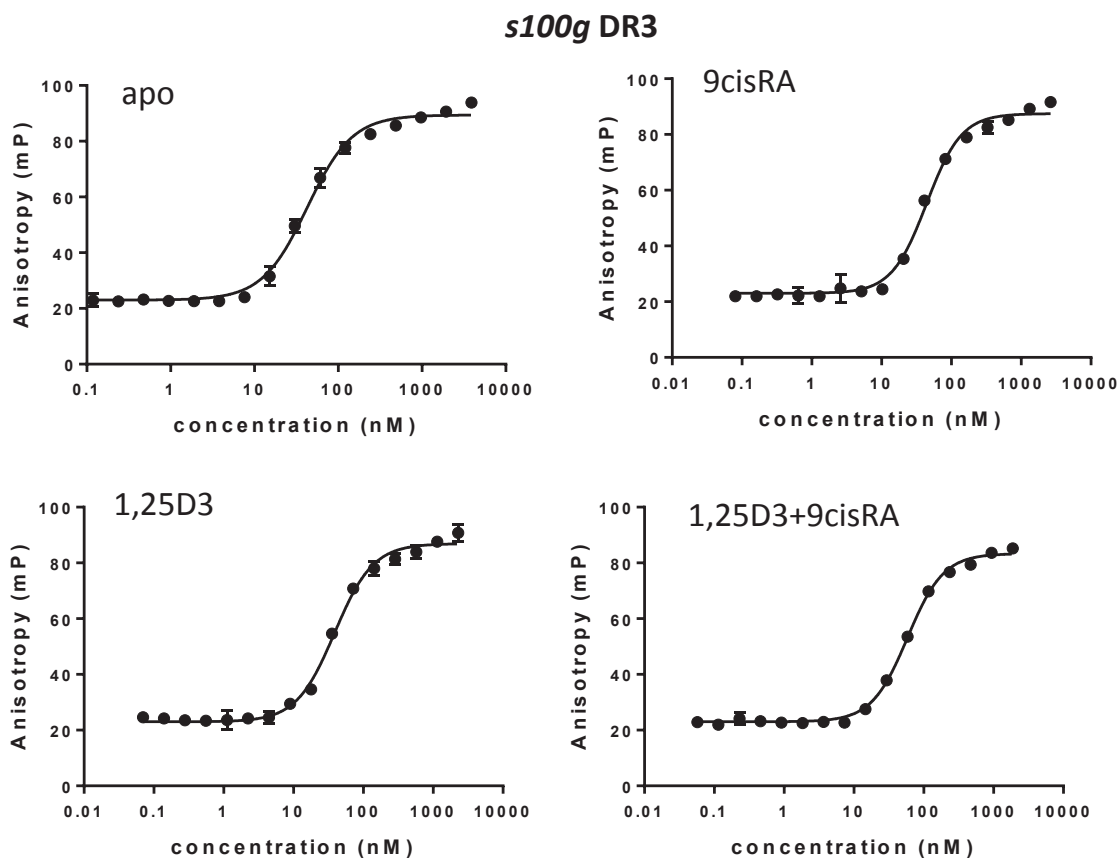


Figure S3. Binding curves of hVDR full-length/RXR α Δ NTD to FAM-labelled sema5 DR3 as measured by fluorescence anisotropy. Experiments were carried out in the absence of ligands or in presence of 1,25D3 and/or 9cisRA. Solid lines correspond to fits of the data points by non-linear regression analysis (sigmoidal dose-response variable slope) using GraphPad Prism with the K_D values given in Table 2 and a number of binding sites $n = 1$.

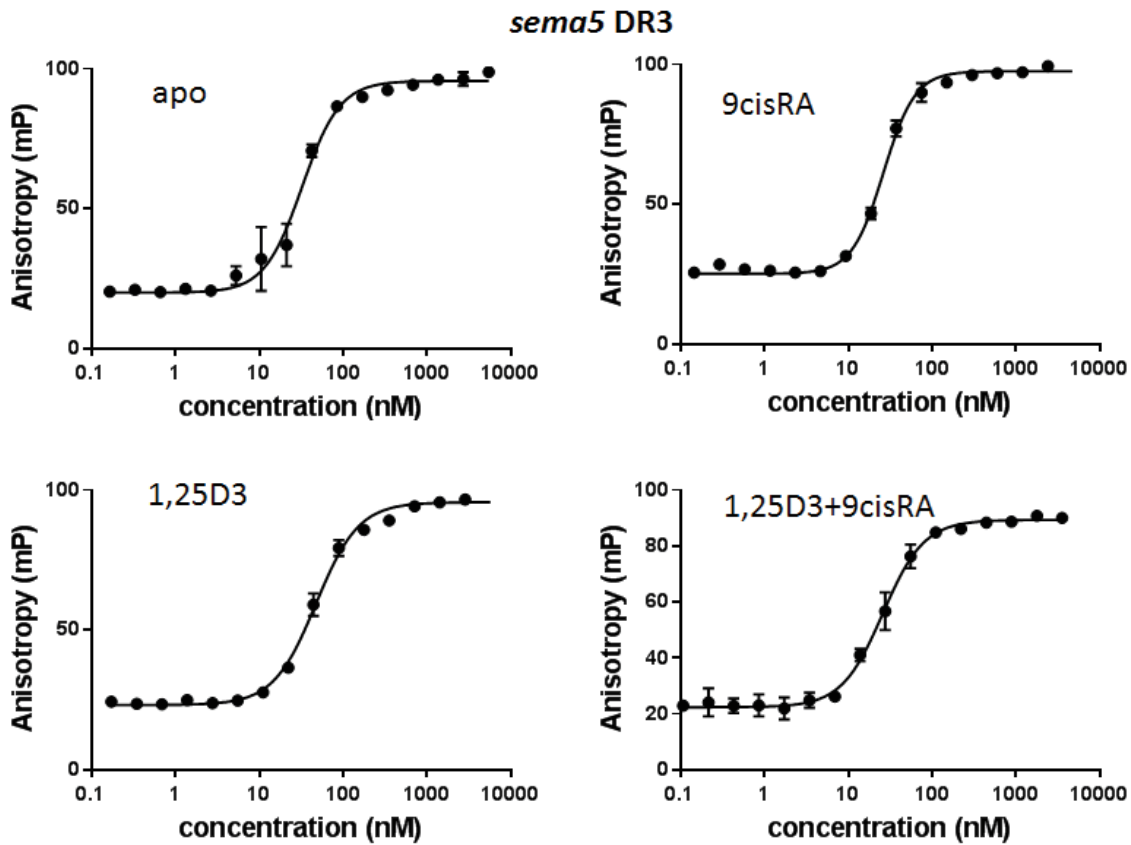


Figure S4. SAXS analysis RXR/VDR/slc37a2 DR3 complex. (A) The final averaged SEC-SAXS data and the computed model fits to the data. (B) The $p(r)$ profiles calculated from the SAXS data showing changes in the distribution of real-space distances.

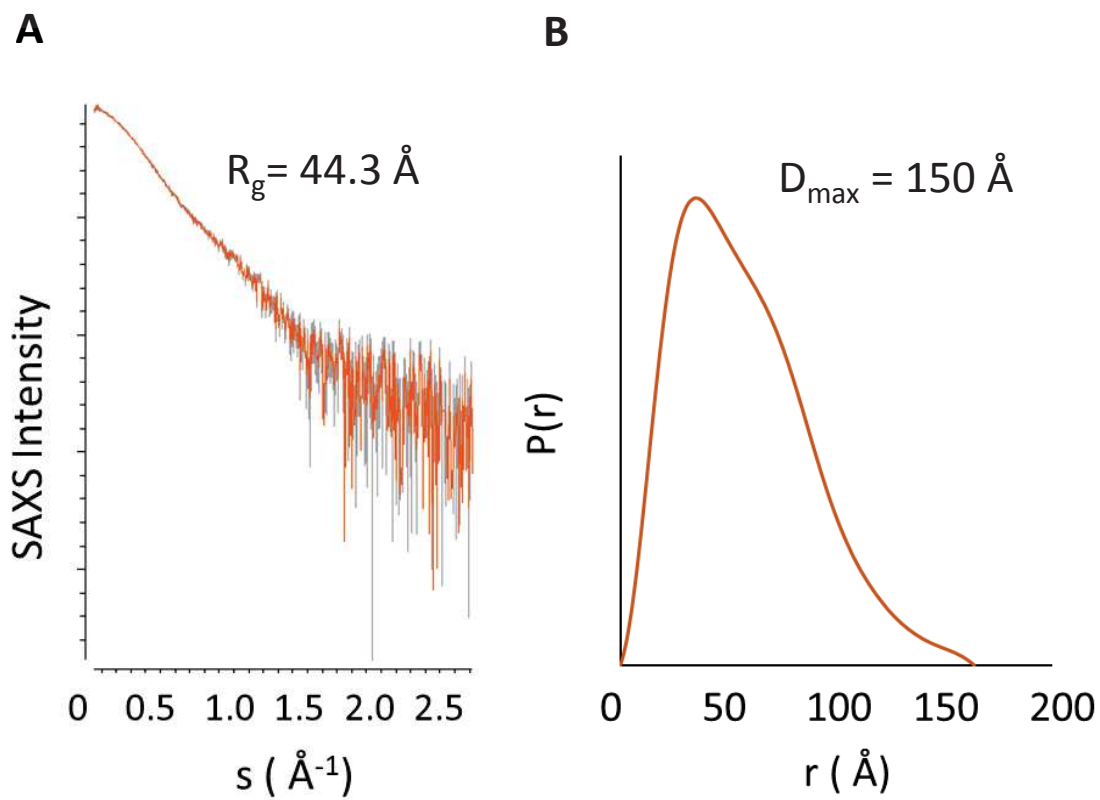
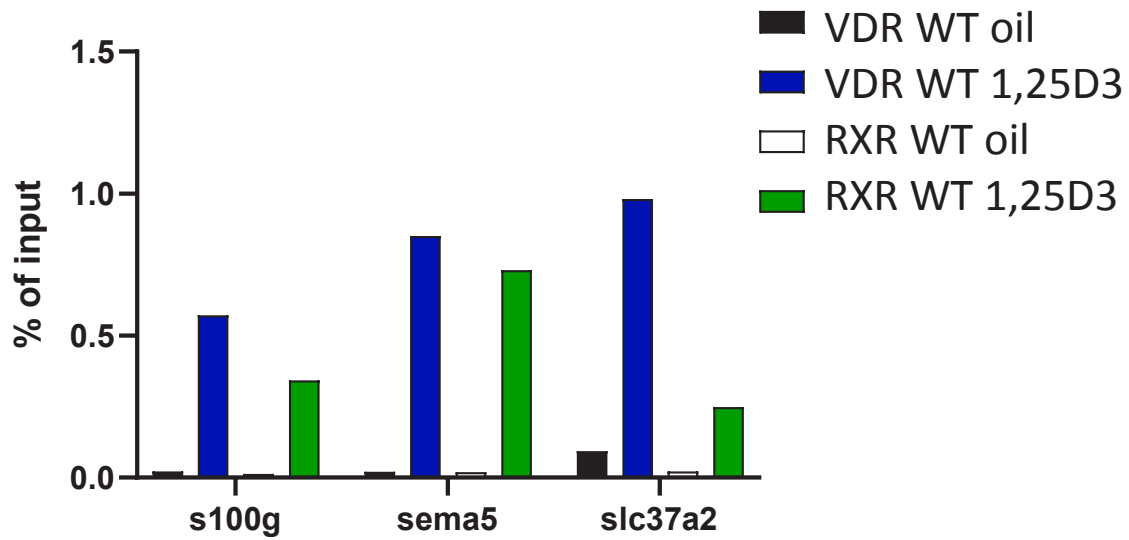


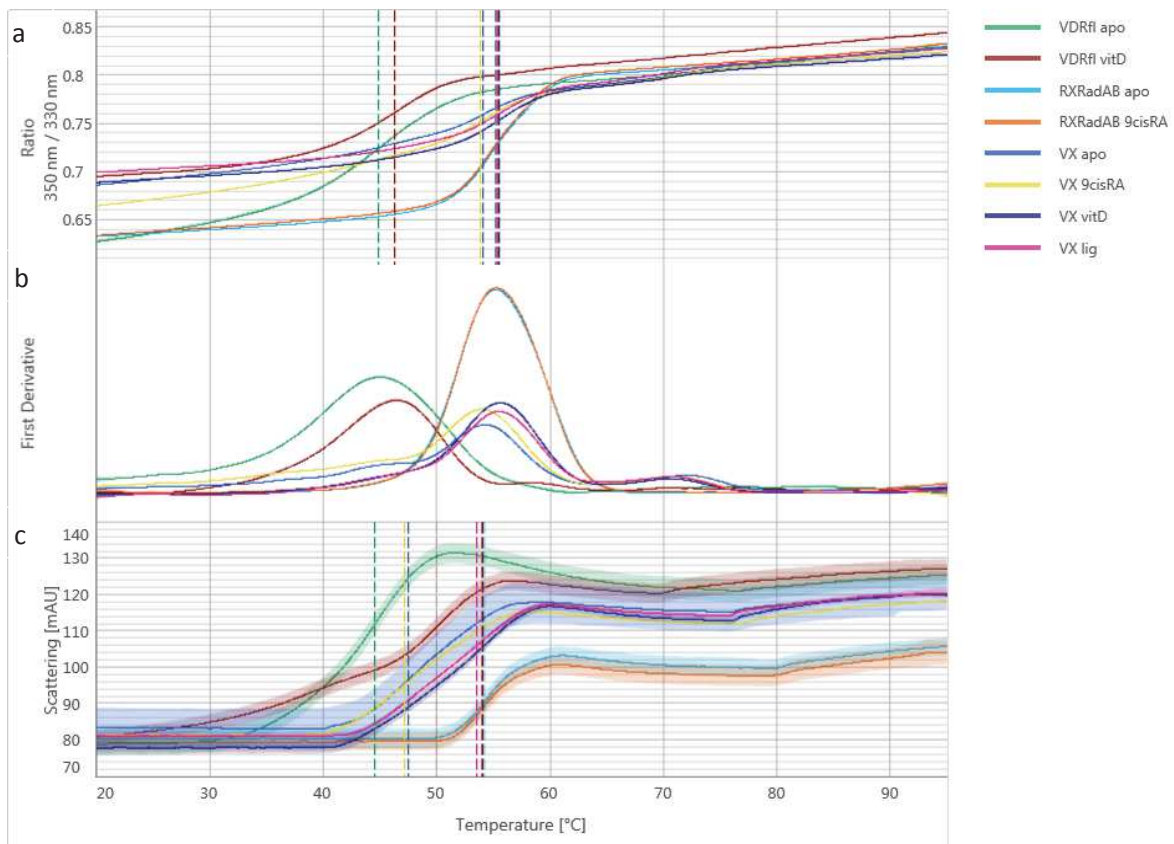
Figure S5. Vdr- and RXR α -ChIP analysis by RT-qPCR of DNA encompassing a VDRE of s100g, slc37a2 and sema5a extracted from the duodenum of wild type and VDR $^{-/-}$ mice treated for 1.5 h with vehicle, 1 μ g/kg 1,25D3. n = 1 / group.



2.4.2 Résumé des principaux résultats supplémentaires de la caractérisation biophysique de RXR et de son ligand sur l'activité de l'hétérodimère VDR/RXR

Dans cette partie nous présentons les résultats supplémentaires de caractérisation de l'effet du 9cisRA sur les activités de VDR. D'une part, afin de comprendre l'effet de RXR et de son ligand sur la stabilité de l'hétérodimère VDR/RXR lié ou non à l'ADN, nous avons utilisé la méthode de nano-DSF. D'autre part, afin de caractériser le rôle de RXR dans l'interaction de VDR/RXR avec Med1, un des co-régulateurs principaux de VDR, nous avons caractérisé l'interaction par SPR de Med1 avec un hétérodimère formé par VDR et RXR tronqué de l'hélice H12 ou dont les résidus de la pince électrostatique K289 et E458 interagissant avec les motifs LXXLL des coactivateurs ont été mutés en Alanine. De plus, nous avons déterminé l'effet du ligand de RXR sur la prolifération cellulaire, seul ou en présence du ligand de VDR, en utilisant deux lignées cellulaires du cancer du sein (MCF-7) et du cancer de la prostate (LNCaP) exprimant le VDR et le RXR.

2.4.2.1 Caractérisation biophysique de l'effet du ligand de RXR sur la stabilité de l'hétérodimère par nano-DSF



d

Protéine	T _m (°C)
VDRfl apo	45.0
VDRfl 1,25D3	46.4
RXRαΔAB apo	55.3
RXRαΔAB 9cisRA	55.4
VDR/RXR apo	54.2
VDR/RXR 9cisRA	54.0
VDR/RXR 1,25D3	55.6
VDR/RXR lig	55.5

Figure 26 : Courbes de dénaturation thermique obtenues par nano-DSF pour caractériser l'effet du RXR et des ligands sur la stabilité du complexe VDR/RXR (a) Ratio 350nm/330nm du signal fluorescent tracé en fonction de l'augmentation de la température pour déterminer le Tm d'une protéine ; (b) Dérivée primaire montrant le signal de fluorescence intrinsèque des protéines, comme mesure de son état de repliement ; (c) signal de diffusion de lumière (mAU) ; (d) Tableau des températures de fusion.

La figure 26 montre que la présence du ligand du VDR n'affecte pas la stabilité de la forme monomérique. Le RXR seul présente une température de fusion plus élevée que celle du VDR seul et semblable pour les formes apo et ligandé au 9cisRA. La température de fusion de l'hétérodimère est similaire à celle de RXR, qui est homodimérique en solution. La température de fusion de l'hétérodimère VDR/RXR est plus élevée, comparé à celle du VDR seul, indiquant que la présence de RXR stabilise VDR. La température de fusion de VDR/RXR, en présence de 9cisRA, est similaire à celle de la forme apo. A l'opposé, en présence de 1,25D3, elle est plus élevée, suggérant que 1,25D3 stabilise l'hétérodimère.

Tableau 3 : Valeurs de Tm (°C) des complexes VDR et RXR en présence de différentes combinaisons de ligands et d'ADN (*slc37a2*, *sema5* et *s100g*).

DR3	Complexes protéiques	Température de fusion Tm (°C)
	VDR/RXR apo	54.3
<i>sema5</i>	VDR/RXR 1,25D3	57.4
	VDR/RXR 9cisRA	55.2
	VDR/RXR combiné	57.0
<i>s100g</i>	VDR/RXR 1,25D3	56.0
	VDR/RXR 9cisRA	54.3
	VDR/RXR combiné	56.0
<i>slc37a2</i>	VDR/RXR 1,25D3	56.0
	VDR/RXR 9cisRA	55.0
	VDR/RXR combiné	55.5

Dans un deuxième temps, les expériences ont été réalisées sur l'hétérodimère VDR/RXR en complexe avec les différents ADNs et les différentes combinaisons de ligands. Les résultats montrent qu'en présence des trois ADNs testés, la température de fusion est plus élevée qu'en absence d'ADN,

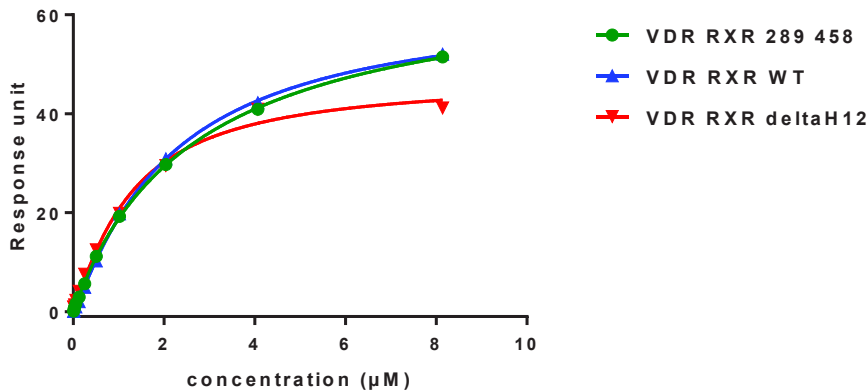
indiquant une légère stabilisation de VDR/RXR (Tableau 3). On observe une légère augmentation de la température de fusion pour VDR/RXR en présence du 1,25D3 seul et combiné par rapport à la forme apo. Pour VDR/RXR, en présence de *sema5*, l'effet des ligands seuls et en combinaison reste minime.

2.4.2.2 Caractérisation de l'effet de RXR sur l'interaction avec Med1

Les interactions entre l'hétérodimère VDR/RXR et Med1 ont été caractérisées par SPR. Afin de montrer si les surfaces d'interaction AF2 de RXR (c'est-à-dire l'hélice H12 et les résidus de la pince électrostatique K289 et E458) interagissant avec les motifs LXXLL des coactivateurs (Sanchez-Martinez et al., 2006) mais aussi H12 de VDR sont impliqués dans cette interaction, nous avons muté ces résidus en tronquant H12 ou en mutant les 2 résidus en Alanine et mesuré l'interaction de l'hétérodimère avec Med1. Les expériences ont été réalisées en présence de 1,25D3 et 9cisRA, respectivement.

La constante de dissociation a été calculée à partir des titrations de liaison entre VDR/RXR et Med1 pour le complexe sauvage (Figure 27A). Aucune interaction n'a été observée en l'absence d'H12 de VDR. Alors que pour l'hétérodimère formé avec RXR double mutants K289A, E458A présente une affinité semblable à l'hétérodimère sauvage. L'hétérodimère formé avec RXR dont H12 est tronqué, montre une affinité plus grande pour Med1. Ces résultats suggèrent que la liaison du VDR/RXR avec Med1 est médié principalement par le domaine AF2 de VDR, le domaine AF2 de RXR ne semblant pas interagir avec Med1.

A



B

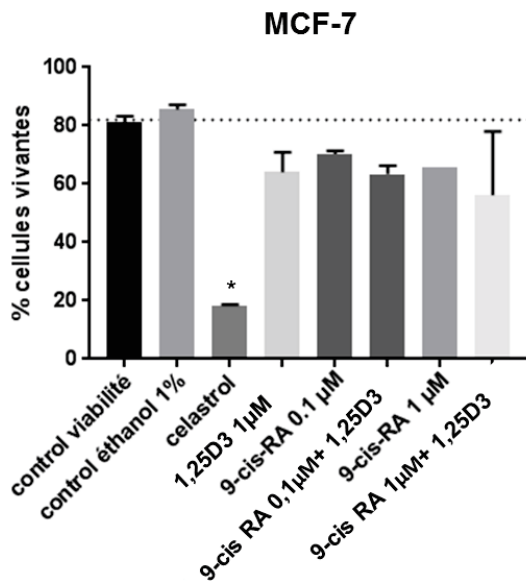
Constante de Dissociation K_D (μM)	
Complexe de protéine titrée	Med1 (50-660) immobilisé
VDR 1,25D3/ RXR $\alpha\Delta\text{NTD}$ mut K289A,E458A 9-cis RA	2,7 \pm 0,04
VDR 1,25D3/ RXR $\alpha\Delta\text{NTD}$ 9-cis RA wt	3,0 \pm 0,3
VDR 1,25D3/ RXR $\alpha\Delta\text{NTD}$ ΔH12 9-cis RA	1,8 \pm 0,27
VDR ΔH12 1,25D3/ RXR $\alpha\Delta\text{NTD}$ 9-cis RA	Pas de liaison

Figure 27 : Caractérisation de l'effet de RXR sur la liaison avec Med1 par SPR. **A** Courbes représentant les unités de réponse en fonction de la concentration des complexes titrés. **B** Tableau représentant les constantes de dissociation correspondantes.

2.4.2.3 Caractérisation de l'effet du ligand de RXR sur la prolifération cellulaire

Le VDR est exprimé dans la plupart des tissus cancéreux et les résultats d'études *in vivo* et *in vitro* montrent que la 1,25D3 inhibe la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, l'invasion et favorise la différenciation cellulaire et l'apoptose (Christakos et al., 2016). Afin de tester l'effet du ligand de RXR pour synergiser l'effet du ligand de VDR sur la prolifération cellulaire, nous avons choisi deux lignées cancéreuses du sein MCF-7 et de la prostate LNCaP exprimant VDR et RXR. Les cellules ont été traitées pendant trois jours avec les ligands de VDR et de RXR seuls ou en combinaison.

A



B

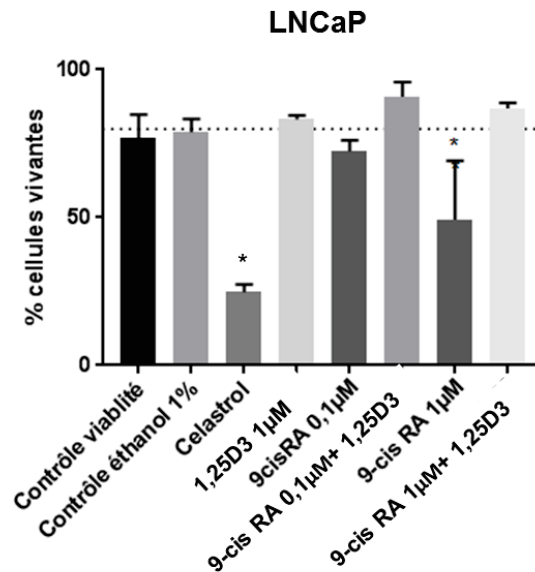


Figure 28 : Caractérisation de l'effet des ligands du VDR et de RXR sur la prolifération des lignées MCF-7 et LNCaP. Pourcentage de cellules vivantes suite au traitement avec les différentes combinaisons de ligands, 1,25D3 1µM, 9cisRA 0.1 et 1 µM seul et en combinaison pour les cellules MCF-7 (A) et les cellules LNCaP (B).

Les résultats de viabilité cellulaire ont montrés que le ligand du VDR, 1,25D3 seul, ainsi que le ligand 9cis RA de RXR seul (concentrations variant entre 0,1 et 1 µM) ne diminuent pas la prolifération des cellules MCF7, de façon significative ($p=ns$). Nous n'avons pas retrouvé d'effet du traitement combiné ($p=ns$). Par contre, le celastrol, utilisé comme contrôle positif, diminue de façon significative la viabilité à 20% et 25%, dans les lignées MCF-7 et LNCaP, par rapport aux lignées non traitées ou traitées par éthanol seul ($p<0.0001$). Ceci est consistant avec les données déjà rapportées pour le celastrol dans les lignées MCF-7 (Li et al., 2018) et LNCaP (Shao et al., 2013; Yang et al., 2006).

Pour les cellules LNCaP, les résultats montrent que le traitement avec 1,25D3 seul n'affecte pas la prolifération cellulaire comparé au contrôle, non traité et traitée avec 1% éthanol. De même, le 9cisRA à 0,1 µM seul ou en combinaison avec le 1,25D3 n'a pas d'effet sur la viabilité des cellules. Cependant le traitement avec le 9cisRA seul à une concentration de 1µM, montre une diminution significative de la

viabilité. Alors que le traitement avec $1\ \mu\text{M}$ de 9cisRA en combinaison avec $1\ \mu\text{M}$ de 1,25D3 ne montre pas d'effet significatif, suggérant que le 1,25D3 combiné avec le 9-cisRA à $1\ \mu\text{M}$ atténue l'effet de ce dernier.

2.5 Discussion et perspectives

Cette partie de la thèse porte sur la caractérisation de l'effet du ligand 9cisRA de RXR dans les propriétés de l'hétérodimère VDR/RXR par des méthodes biophysique et fonctionnelles. Le 9cisRA montre un effet déstabilisant sur la formation de l'hétérodimère entre RXR et les VDR humain ou de poisson zèbre. Ces données sont en accord avec des résultats publiés montrant l'effet déstabilisant du ligand de RXR en absence du ligand de VDR (Cheskis and Freedman, 1994). Au contraire le ligand du VDR seul ou en combinaison présente un effet stabilisant de la dimérisation. Les résultats de nanoDSF montrent que le RXR stabilise l'hétérodimère VDR/RXR par rapport au monomère de VDR et d'une manière indépendante de son ligand. Des résultats similaires ont été obtenus, montrant que VDR entier sous forme apo est instable et que l'ajout du RXR stabilise le VDR apo (Rochel et al., 2011; Zhang et al., 2011).

Les interactions de VDR/RXR avec les éléments de réponses de type DR3 (*slc37a2*, *sema5*, *s100g*) ont été mesurés par MST en condition apo et par anisotropie de fluorescence pour différentes conditions de ligands. Les résultats montrent que l'hétérodimère VDR/RXR se lie avec une bonne affinité aux différents DR3 en absence des ligands et la présence des ligands module légèrement l'affinité avec l'ADN. Ces résultats sont en accord avec les données montrant un effet du ligand de VDR sur l'affinité de liaison avec certaines séquences VDREs (Zhang et al., 2011). De plus, nous avons mesuré par nanoDSF qu'en présence de l'ADN et des ligands, le complexe est légèrement plus stable.

D'autre part, nous avons caractérisé l'effet du ligand de RXR sur le recrutement du motif NR2 du co-activateur SRC1 par VDR-RXR en utilisant la méthode MST. Les résultats montrent que le recrutement

du motif NR2 du co-activateur SRC1 est dépendant de la présence du ligand de VDR seul et le ligand de RXR seul n'a aucun effet seul en combinaison. La présence de certains VDREs telle que slc37a2 et sema5 renforce le recrutement du SRC1 NR2 notamment en présence du ligand de VDR. En utilisant un domaine de SRC1 contenant les trois motifs LXXLL, Zhang et al. ont montré un effet synergique des ligands de VDR et RXR pour la liaison avec SRC1 (Zhang et al., 2011). De plus, ils ont montré que l'hétérodimère VDR/RXR en présence des 2 ligands interagit avec les motifs NR1 et NR3. Il serait donc intéressant de quantifier l'interaction de VDR/RXR en présence des ligands avec les peptides SRC1 NR1 et SRC1 NR3 ou le domaine RID de SRC1.

La sous-unité 1 du médiateur, Med1 est un autre coactivateur de VDR qui participe à la régulation transcriptionnelle du VDR/RXR. Des données fonctionnelles sur le complexe VDR/RXR/Med1 suggère que RXR participe au recrutement de Med1 (Jusu et al., 2017; Jusu et al., 2018; Solomon et al., 1999). L'interaction entre VDR/RXR et Med1 a été montrée être renforcée en présence des 2 ligands (Sanchez-Martinez et al., 2006). La phosphorylation de S260 de RXR affecte cette interaction (Jusu et al., 2017; Jusu et al., 2018; Solomon et al., 1999). Cependant, nos données indiquent que l'interaction se fait principalement par l'intermédiaire de VDR, en accord avec d'autres études (Sanchez-Martinez et al., 2006) et que la région AF2 de RXR n'est pas impliquée. Ces dernières ont montrées que seules les mutations de VDR, au niveau des motifs de liaisons des co-activateurs et de H12, empêchent le recrutement des co-activateurs (SRC1, TIF2 et ACTR), en présence des ligands respectifs, tandis que la mutation de l'hélice H12 de RXR ne présente aucun effet.

Afin de corrélérer nos données de biophysique montrant un effet minime du ligand de RXR sur l'hétérodimérisation et sur la liaison du VDR/RXR avec l'ADN, nous avons caractérisé l'effet du ligand de RXR seul ou en combinaison avec le ligand de VDR sur la transcription des gènes testés au préalable en biophysique. Les résultats de transactivation transitoire montrent que la transcription des

gènes testés (*slc37a2*, *sema5* et *s100g*) est médié par le ligand de VDR seul et aucun effet n'est observé pour le ligand de RXR seul ou en combinaison.

De plus, nous avons caractérisé le rôle du ligand de RXR sur les transcrits de gènes et les résultats montrent que le 9cisRA augmente le nombre de transcrits pour *Sema5* d'une manière similaire à celle de l'effet de 1,25D3. Alors que pour les deux autres gènes testés *Slc37a2* et *S100g*, le 9cisRA seul n'a pas d'effet. Cependant pour les 3 gènes testés, en présence des ligands combinés, 9cisRA inhibe l'action de 1,25D3. Cette différence par rapport aux résultats de transactivation transitoire, peut être due aux conditions expérimentales et à une différence de l'environnement du gène régulé. Pour la caractérisation de la transcription les cellules ont été transfectées en exprimant VDR et RXR de manière équivalente alors que pour la caractérisation des transcrits la réponse dépend de l'expression endogène de VDR et RXR.

Le VDR est une cible thérapeutique. Il est impliqué dans plusieurs types de cancer et son ligand montre des effets d'anti-prolifération cellulaire. Dans ce contexte, nous avons caractérisé l'effet du ligand de RXR seul ou en combinaison avec le ligand de VDR sur la prolifération cellulaires des deux lignées MCF-7 et LNCaP. Nos résultats montrent que les ligands de VDR et RXR seuls possèdent un effet minime alors que les traitements combinés ne présentent pas d'effet sur la prolifération des MCF-7. D'autre part, l'acide 9-cis rétinoïque seul à 1µM présente une diminution significative de la prolifération des cellules de LNCaP mais aucun effet additif n'est observé avec le traitement combiné.

En conclusion, les résultats obtenus indiquent que l'hétérodimère VDR/RXR est non-permissif et son activité est modulée par le ligand de VDR indépendamment du ligand de RXR. Ces résultats sont en accord avec les études montrant que l'activité de VDR/RXR est médiée par le VDR ligandé et que le RXR est silencieux (Bettoun et al., 2003; Jurutka et al., 2001).

Nous avons présenté dans cette partie une étude détaillée de l'effet minime du ligand 9cisRA de RXR sur l'activité du récepteur VDR/RXR. Cependant, d'autres ligands naturels ou synthétiques de RXR

pourraient avoir un effet sur l'activité de VDR/RXR. Notre perspective pour cette partie consistera à étudier d'autres ligands de RXR pouvant potentiellement moduler l'activité du récepteur ainsi que la caractérisation de complexes VDR/RXR ligandés avec des fragments plus grands de coactivateur.

Chapitre 3

Caractérisation biophysique et fonctionnelle du mécanisme antagoniste du ZK168281

3.1 Généralités sur les antagonistes de la série ZK

Les ligands de la série ZK sont les premiers analogues antagonistes de VDR décrits, notamment le ligand ZK168281 qui présente l'effet antagoniste le plus important (Bury et al., 2000; Herdick M., 2000b; Lempiainen et al., 2005). Du point de vue structural, ZK168281 (Figure 29) partage une similarité au niveau de sa chaîne latérale avec ZK159222 qui a été décrit comme étant un agoniste partiel (Bury et al., 2000). Dans le cas du ZK159222, le déplacement de H12 permet toujours une interaction avec des coactivateurs (20% de l'activité 1,25D3). En revanche, ZK168281 présente une chaîne beaucoup plus grande et plus rigide en raison de la présence du groupe carboxyle déplacé et de l'introduction d'une double liaison entre le cycle cyclopropyle et le groupe carboxyle (Figure 29). La modélisation et la dynamique moléculaire des deux composés ZK dans la poche de liaison du VDR en ancrant le groupe 24-hydroxyle ont prédit que ces ligands pourraient empêcher l'hélice H12 d'être correctement positionnée dans son état actif (Bury et al., 2000; Herdick M, 2000; Vaisanen et al., 2002). Cependant, aucune structure cristallographique du VDR en complexe avec ZK168281 n'avait été décrite.

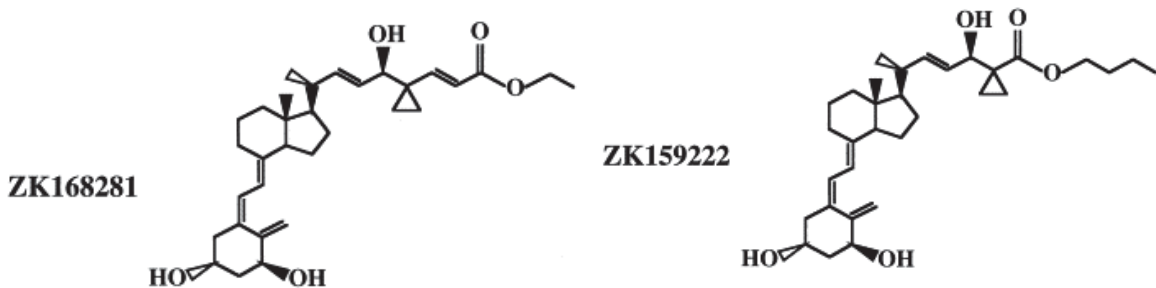


Figure 29: Structures chimiques du ZK168281 et ZK159222

Il a été démontré que le mécanisme antagoniste du ZK168281 consiste en une inhibition de l'interaction du VDR avec les protéines coactivatrices de la famille p160 (TIF2) ainsi que l'interaction de l'hétérodimère VDR/RXR avec l'ADN (Herdick M, 2000). En effet ZK168281 présente une bonne affinité de liaison au VDR ($EC_{50}=0.35nM$) comparable à celle de 1,25D3 ($EC_{50}=0.18nM$) (Bury et al., 2000). Les données fonctionnelles ont montré un effet antagoniste à différentes doses de ZK168281 qui inhibe l'activité transcriptionnelle de 10nM de 1,25D3 dans les cellules HeLa (Bury et al., 2000).

Les essais de transactivation de gènes rapporteurs ont permis de caractériser les effets antagonistes et agonistes des deux analogues ZK159222 et ZK168281 en combinaison avec 10nM de D3 dans différentes lignées cellulaires, Cos-7 (SV40-transformé rein de singe vert africain), Saos-2 (sarcome ostéogénique humain), HaCaT (humain kératinocytes immortalisés) ou MCF-7 (cancer du sein humain). Les résultats obtenus sont comparables. ZK159222 et ZK168281 à $1\mu M$ montrent 3 à 40% de l'activité transcriptionnelle de 10nM 1,25D3. En combinaison avec 10nM de 1,25D3, ZK159222 ou ZK168281 réduit l'activité de 1,25D3 de 20 à 60% du niveau maximal. Dans toutes les lignées cellulaires testées, l'effet agonistique résiduel de ZK168281 s'est avéré inférieur à celui de ZK159222 et l'effet antagoniste correspondant de ZK168281 est plus élevé que celui de ZK159222, de fait ZK168281 semble être un antagoniste plus efficace que ZK159222 (Herdick M, 2000). L'effet antagoniste dans les différentes lignées cellulaires a montré que celui-ci est plus élevé dans les cellules MCF-7 que dans les cellules Cos-7 (Vaisanen et al., 2002).

3.2 Objectifs de l'étude

L'objectif de cette étude était d'approfondir notre compréhension des bases moléculaires de la régulation de la transcription par VDR et la caractérisation du ZK168281 modulant l'activité de ce récepteur. Cette partie porte sur une étude structurale de VDR en présence de ZK168281. Afin de comprendre le mécanisme d'action nous avons mené dans l'équipe, une étude biophysique et structurale par cristallographie et HDX-MS en solution du complexe de VDR. En parallèle, nos collaborateurs de l'équipe de Daniel Metzger à l'IGBMC ont caractérisé l'activité de ce ligand *in vivo*. Pour ma part, j'ai caractérisé par des expériences de biophysique l'activité antagoniste du VDR en présence du ZK168281. J'ai mesuré l'affinité d'hétérodimérisation entre VDR et son partenaire RXR en présence de l'antagoniste comparé au 1,25D3, puis j'ai effectué des mesures d'affinité de VDR/RXR pour le domaine NR2 du coactivateur SRC1. De plus, pour montrer l'effet antagoniste sur la transcription j'ai mené des expériences de transactivation transitoire. Les données *in vivo* de nos collaborateurs ont mis en évidence l'interaction spécifique de VDR-ZK168281 avec la protéine Wbp4 dans le cytoplasme. J'ai quantifié cette interaction *in vitro*. Ces travaux ont mis en évidence un nouveau mécanisme d'action du ligand inhibant l'activité du récepteur. Ces travaux font l'objet de deux publications soumises, sur la caractérisation du mécanisme antagoniste du ZK168281.

3.3 Matériel et méthodes

3.3.1 Production et purification des protéines

Les productions et purifications des constructions de VDR et RXR sont décrites dans la partie « matériels et méthodes » du chapitre 2. La purification de Wbp4 est maintenant décrite.

La séquence codante pour hWbp4 (122-196) a été clonée dans le vecteur pNEAtG. La protéine a été produite dans *Escherichia coli* BL21 DE3 pendant 4 heures à 20°C après induction avec 0.5 mM d'IPTG

à une DO600 de ~ 0,8. Les protéines solubles ont été purifiées en Batch de chromatographie d'affinité (Gluthatione sépharose suivie d'une coupure à la thrombine de l'étiquette GST puis d'une chromatographie d'exclusion de taille sur colonne (HiLoad Superdex increase 200) équilibrée dans le tampon Hepes 20 mM, pH 7.5, 200 mM de NaCl, 2% de glycérol, 0.05% Tween et 1 mM de TCEP. La pureté et l'homogénéité de la protéine sont évaluées par gel natif (4-15%) et par SDS Page.

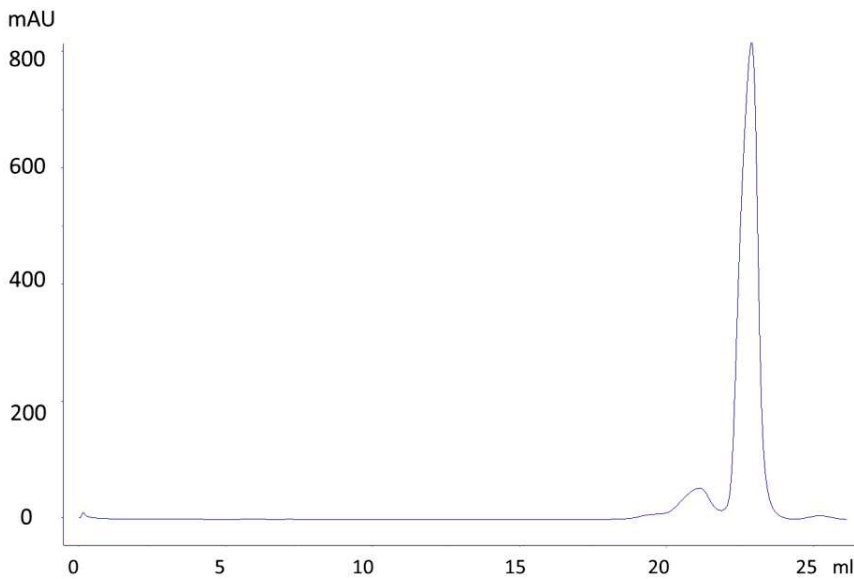


Figure 30: Chromatogramme de la protéine WBP4, après coupure à la TEV de l'étiquette GST, obtenu après exclusion de taille sur colonne Superdex 200 10/300. Le pic observé à 24ml de volume d'élution correspond à la protéine.

Les fractions correspondant au pic d'élution ont été utilisées pour la caractérisation biophysique décrite dans la section « résultats ».

3.3.2 Caractérisation biophysique de l'effet du ZK168281

3.3.2.1 Caractérisation de l'effet du ZK168281 sur l'interaction du VDR/RXR avec les peptides des co-régulateurs SRC1 NR2 et NCoR ID2 par MST

Les mesures d'interaction entre l'hétérodimère VDR/RXR et les co-régulateurs (SRC1 NR2 RHKILHRLQEGS et NCoR ID2 DPASNLGLEDIIRKALMGSFDDK, marqués avec de la

fluorescéine (ThermoFischer) ont été faites par MST. Le complexe hVDR entier / hRXR Δ NTD a été purifié dans un tampon contenant 20 mM Hepes pH 7.5, 200 mM NaCl, glycérol 2%, 1 mM TCEP, 0.05% Tween 20 et l'ajout de 3 équivalents de ligands. Une concentration constante de 100 nM du co-régulateur marqué est titrée avec des concentrations croissantes de VDR/RXR de 0,5 nM à 10 μ M. Les données ont été enregistrées avec des capillaires en verre standard (Nanotemper) à 25°C à une excitation de laser de 15-20% et une puissance MST de 20%, avec un temps d'activation du laser de 30 s et un temps d'extinction du laser de 5 s. Les mesures sont reproduites sur 3 expériences indépendantes et les signaux de thermophorèse enregistrés pour chacun des 16 capillaires sont normalisés. La fluorescence normalisée est représentée en fonction de la concentration de VDR/RXR donnant une courbe sigmoïdale où les écarts type (SEM pour $n \geq 1$) sont déterminés pour chacun des points. Le logiciel NanoTemper Analysis 2.2.4 a été utilisé pour ajuster les données et déterminer les valeurs de K_D .

3.3.2.2 Caractérisation de l'interaction entre zVDR LBD avec le peptide fluoresceine-SRC1 NR2 par MST

De la même manière, l'interaction entre le LBD de zVDR et le peptide fluoresceine-SRC1 NR2 a été déterminée par MST. La protéine zVDR LBD a été purifiée dans un tampon contenant 20 mM Hepes pH 7.5, 200 mM NaCl, glycérol 2%, 1 mM TCEP, 0.05% Tween 20 puis incubé avec l'ajout de 3 équivalents de ligands. Chaque mesure consiste en 16 dilutions sérielles 1:1 de zVDR LBD à partir d'une concentration de 14 μ M jusqu'à 0,4 nM où la concentration en peptide marqué par une sonde fluorescence (SRC1) est constante (50 nM). Les données ont été enregistrées avec des capillaires en verre standard (Nanotemper) à 25°C à une excitation de laser de 50% et une puissance MST de 40%, avec un temps d'activation du laser de 30 s et un temps d'extinction du laser de 5s. Les mesures sont reproduites sur 3 expériences indépendantes et les signaux de thermophorèse enregistrés pour chacun des 16 capillaires sont normalisés. La fluorescence normalisée est représentée en fonction de la concentration de zVDR LBD donnant une courbe sigmoïdale où les écarts type (SEM pour $n \geq 1$) sont

déterminés pour chacun des points. Le logiciel NanoTemper Analysis 2.2.4 a été utilisé pour ajuster les données et déterminer les valeurs de K_D .

3.3.2.3 Caractérisation de l'affinité de fixation du ZK168281 pour VDR par MST

Les mesures d'affinités de liaison du ZK168281 ou de 1,25D3 pour VDR LBD ont été effectuées par la méthode de MST. Le domaine de liaison du ligand de la protéine humaine VDR (hVDR LBD) purifié dans 50 mM Hepes pH 8, 50 mM NaCl, glycérol 2%, 1 mM TCEP, 0.05% Tween 20, est marquée par une sonde fluorescente (NHS 2ème génération) sur une Nap-5ml de sépharose 25. Chaque mesure consiste en 16 dilutions sérielles 1:1 de à partir d'une concentration de 5 μ M jusqu'à 0,15 nM où la concentration du hVDR marqué par fluorescence est constante (42.5 nM). Les mesures ont été effectuées avec des capillaires en verre premium (Nanotemper) à 25°C, à une excitation de 20% LED et une puissance MST de 40%, avec un temps d'activation du laser de 30 s et un temps d'extinction du laser de 5s. La fluorescence normalisée est représentée en fonction de la concentration de ligand donnant une courbe sigmoïdale où les écarts type (SEM pour $n \geq 1$) sont déterminés pour chacun des points. Le logiciel NanoTemper Analysis 2.2.4 a été utilisé pour ajuster les données et déterminer les valeurs de K_D .

3.3.2.4 Caractérisation de l'interaction hVDR/hWBP4 par MST

Les mesures d'affinités de liaison entre hVDR entière et hWbp4 en présence de ZK168281 ou 1,25D3 ont été effectuées MST. Les protéines VDR humaine entière et Wbp4 humaine (122-196) ont été purifiées dans 20 mM Hepes pH 7.5, 200 mM NaCl, glycérol 2%, 1 mM TCEP, 0,05% Tween 20. La protéine de VDR humaine est marquée par une sonde fluorescente (NHS 2ème génération), puis incubée de 30 minutes avec les ligands (3 équivalents molaire). Chaque mesure consiste en 16 dilutions sérielles

1:1 de WBP4 à partir d'une concentration de 10 μM jusqu'à 0,5 nM où la concentration de la protéine VDR humaine marqué par fluorescence est constante (10 nM). Les mesures ont été effectuées avec des capillaires en verre standard (Nanotemper) à 25°C, à une excitation de 40% LED et une puissance MST de 80%, avec un temps d'activation du laser de 30 s et un temps d'extinction du laser de 5s. Les mesures sont reproduites sur 3 expériences indépendantes et les signaux de thermophorèse enregistrés pour chacun des 16 capillaires sont normalisés. La fluorescence normalisée est représentée en fonction de la concentration de VDR donnant une courbe sigmoïdale où les écarts type (SEM pour $n \geq 1$) sont déterminés pour chacun des points. Le logiciel NanoTemper Analysis 2.2.4 a été utilisé pour ajuster les données et déterminer les valeurs de K_D .

3.3.2.5 Caractérisation de l'effet de ZK168281 sur l'affinité d'hétérodimérisation entre VDR et RXR α par SPR

Nous avons mesuré l'affinité d'hétérodimérisation par SPR en utilisant les LBDs de VDR humain ou de zebrafish et de RXR α . Le monomère hRXR α LBD a été immobilisé (400 à 500 unités de réponse) sur la surface de la puce de capteur CM5 série S en utilisant un protocole de couplage amino standard dans un tampon acétate de Na 10 mM pH 5,5. L'expérimentation se fait dans le tampon Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, TCEP 1 mM, Tween 20 0,005%. Une solution de chlorure de sodium 1M a été utilisée pour l'étape de régénération. Les interactions entre la protéine RXR α LBD humaine et VDR LBD humaine ou de poisson zèbre ont été analysées en utilisant une série de dilutions du VDR LBD (apo ou ligandé avec 1,25D3 ou ZK168281) allant de 1 à 30 μM . La phase d'association était de 120 secondes et la phase de dissociation de 120 secondes. Les données ont été ajustées à un modèle de liaison en régime permanent à l'aide du logiciel d'évaluation Biacore T200 après avoir soustrait le signal de référence et le signal du tampon.

3.3.2.6 Caractérisation des complexes de zVDR et hVDR en présence du ZK168281 et du peptide du co-activateur SRC1 NR2 par spectrométrie de masse en conditions natives

Principe de spectrométrie de masse en conditions natives

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

Préparation de l'échantillon

À l'issue de la purification des LBDs de VDR humain et celui du poisson-zèbre, le tampon dans lequel les protéines se trouvent est échangé contre une solution contenant 200 mM d'acétate d'ammonium pH 6,9 par passage sur une colonne microspin Zeba 0,5 mL (Pierce). L'étape de dessalage est très importante, car la présence de sels entraîne la formation d'adduits de sels, responsables d'un élargissement des pics observés sur le spectre. Dans le cas de la présence de sels, plusieurs pics sont observés et cela nuit à un assignement correct des pics. Les protéines dessalées sont ensuite incubées avec 1 équivalent de ligand et de peptide. Les spectres sont réalisés sur les échantillons dilués à 5 μ M dans une solution contenant 50 mM d'acétate d'ammonium et analysés avec Synapt G2 avec un voltage

de cône de 60V et une pression de 6 mBar. Ces expériences ont été réalisées par Maxime Bourguet dans l'équipe de Sarah Cianférani à Strasbourg.

3.3.3 *Expériences de transactivation par la technique du gène-rapporteur*

Les tests fonctionnels ont été effectués avec des cellules de la lignée intestinale du rat IEC18. Le protocole de la transactivation est détaillé dans le chapitre 2.

3.3.3.1 Culture des cellules IEC18

Les cellules IEC18 sont cultivées et maintenues dans du milieu Dulbecco (DMEM 4.5g/L de glucose) contenant 5 % de sérum de veau foetal, 1mM de pyruvate de sodium, 5 % de gentamycine et 0,6 µg/mL d'insuline. Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide contenant 5 % de CO₂.

3.3.3.2 Transfection des cellules

Les cellules sont transfectées par un mélange contenant le vecteur exprimant la protéine de fusion zVDR entière (0.5 µg /puit), le plasmide du gène rapporteur codant pour CYP24 couplé à la luciférase LUC-CYP24 (0.25 µg /puit) et le vecteur portant le gène *LacZ* exprimant la β-galactosidase sous le contrôle de l'opéron lactose (0.25 µg /puit). Le mélange contenant 1 µg d'ADN est dilué dans 50 µL/puit d'une solution Opti-MEM avec l'agent transfectant X-tremeGENE HP, selon les recommandations du fabricant. Enfin, 50 µL de ce mélange ont été ajoutés à chaque puit.

3.3.3.3 Traitement des cellules

16 heures après la transfection, les cellules sont lavées dans du tampon PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM sodium phosphate dibasique, 2 mM potassium phosphate monobasique pH 7.4) frais et stérile puis les ligands à tester (ou le solvant seul) dilués dans 500 µL de milieu frais, sont ajoutés aux cellules. Les expériences ont été réalisées avec une concentration de 10⁻⁷ M du 1,25D₃, concentration pour laquelle on observe une saturation du VDR seul ou une combinaison avec différentes

concentrations de ZK168281 (10^{-6} - 10^{-9} M). Les plaques sont remises dans l'incubateur. Les cellules sont récoltées 24 heures plus tard.

La récolte et la lyse des cellules ainsi que le test de β -galactosidase, de la luciférase et l'analyse des résultats sont fait selon le même protocole du chapitre 2.

3.4 Résultats

Les résultats de cette partie sont présentés sous forme de deux publications soumises, suivis d'un résumé décrivant les principales données supplémentaires, non incluses dans les manuscrits. Le premier manuscrit (publication 2) intitulé "Cytosolic sequestration of the Vitamin D Receptor as a therapeutic option for vitamin D-induced hypercalcemia" est actuellement en révision favorable à Nature Communications. Le deuxième manuscrit (publication 3) intitulé "Structural analysis of VDR complex with ZK168281 antagonist" a été soumis au Journal of Medicinal Chemistry.

3.4.1 *Publication 2: Cytosolic sequestration of the Vitamin D Receptor as a therapeutic option for vitamin D–induced hypercalcemia.*

Daniela Rovito¹⁻⁴, Anna Y. Belorusova⁵, Sandra Chalhoub¹⁻⁴, Anna-Isabella Rerra¹⁻⁴, Elvire Guiot¹⁻⁴, Arnaud Molin⁶, Agnes Linglart⁷, Natacha Rochel¹⁻⁴, Gilles Laverny^{1-4*}, Daniel Metzger^{1-4*}.

¹ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, France.

² Centre National de la Recherche Scientifique UMR7104, Illkirch, France.

³ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1258, Illkirch, France.

⁴ Université de Strasbourg, Illkirch, France.

⁵ Medicinal Chemistry, Respiratory, Inflammation and Autoimmunity, BioPharmaceuticals R&D, AstraZeneca, Gothenburg, Sweden.

⁶ Caen University Hospital, Department of Genetics, Molecular Genetics Laboratory and Reference Center for Rare Diseases of Calcium and Phosphorus Metabolism (OSCAR), BioTARGEN, OeReCa, Caen, France.

⁷ APHP, Reference Center for Rare Diseases of Calcium and Phosphorus Metabolism (OSCAR) and Plateforme d'Expertise Maladies Rares Paris-Sud, Endocrinology and diabetes for children, Bicêtre Paris Sud hospital, Le Kremlin Bicêtre, France.

* Correspondence to Gilles Laverny or Daniel Metzger.

Introductory paragraph

The bioactive form of vitamin D [$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (1,25D3) or calcitriol] plays a central role in the regulation of serum calcium levels by inducing the transcriptional activities of the vitamin D receptor (VDR, also known as NR1I1) (Christakos et al., 2016; Fleet, 2017). High 1,25D3 levels (hypervitaminosis D) in patients with granulomatous diseases, lymphomas, or vitamin D 24-hydroxylase (CYP24A1) loss-of-function mutations [also known as idiopathic infantile hypercalcemia (IIH) (Schlingmann et al., 2011)] induce hypercalcemia which leads to hypercalciuria, nephrocalcinosis and renal dysfunctions (Carpenter, 2017; Figueres et al., 2015; Marcinowska-Suchowierska et al., 2018; Schlingmann et al., 2011). Hypercalcemia can be reduced by diuretics in combination with limiting calcium and vitamin D intake. In severe cases, treatments based on bisphosphonates, ketoconazole or glucocorticoids are required to decrease bone resorption and calcium absorption. However, these treatments do not have sustained effects and impact dramatically the development of children and the quality of life of patients (Figueres et al., 2015). Moreover, no selective therapy targeting calcitriol signaling is currently available.

Our results show that the vitamin D analog ZK168281 (ZK) (Bury et al., 2000) normalizes serum calcium levels induced by calcitriol intoxication in mice and calcitriol-induced VDR signaling in fibroblasts of an IIH patient. Importantly, we demonstrate that ZK blunts calcitriol-induced gene expression by enhancing the interaction of VDR with Wbp4 (also known as Fbp21) in the cytosol, thereby impairing its nuclear translocation. In addition, we demonstrate that ZK derivatives have residual VDR agonistic activities at low calcitriol levels, and that calcemia in ZK-treated mice remains within physiological range. Thus, this compound represents a promising therapeutic option for calcitriol-induced hypercalcemia.

Main

More than 3000 calcitriol analogs were synthesized by medicinal chemistry approaches to modulate VDR activities, including many agonists and few antagonists (Leyssens et al., 2014). Among the latter, ZK, a carboxylic ester analog of 1,25D3 with a rigid extended side chain, was shown to bind to VDR with a similar affinity than calcitriol (Bury et al., 2000), and to reduce calcitriol-induced gene expression in cell culture systems (Herdick et al., 2000). However, its mechanism of action and *in vivo* activities were unknown.

To further characterize ZK activities, IEC-18 intestinal epithelial cells were treated for 4 h with vehicle, 100 nM calcitriol, 1 μ M ZK or a combination of both ligands. The transcript levels of the VDR target gene *Cyp24a1*, encoding the main 1,25D3 catabolic enzyme (Laverny et al., 2009), as well as those involved in calcium absorption (i.e. *Atp2b1*, *S100g* and *Trpv6*) (Christakos et al., 2016) were increased by at least 3-fold by calcitriol and by ZK. In contrast, they were not induced by a 1,25D3 and ZK co-treatment (**Fig. 1a**). Moreover, while *Cyp24a1* transcript levels were induced by 3-, 9- and 16-fold after a 2, 4 and 6 h calcitriol treatment, respectively, no induction was observed after a co-treatment with calcitriol and ZK at any time point (**Fig. 1b**). Calcitriol and ZK, alone or in combination, increased Vdr protein levels by 1.2- to 1.7-fold after 2 to 6 h treatments (**Extended data Fig. 1a,b**), demonstrating that ZK antagonistic activities do not result from VDR degradation. Even though VDR protein levels were higher in the presence of ZK than of calcitriol at 2 h (**Extended data Fig. 1a,b**), ZK alone induced *Cyp24a1* transcript levels with a 2 h delay compared to calcitriol (**Fig. 1b**). Whereas hydroxylation of 1,25D3 by cytochrome P450 enzymes (CYP) leads to its elimination, such modifications increase the activities of some vitamin D analogs (Laverny et al., 2009). To determine whether CYP-induced modifications are involved in ZK differential activities, IEC-18 cells were pretreated with ketoconazole (KTZ), a broad-spectrum inhibitor of such enzymes (Muindi et al., 2010). Under these conditions, ZK-induced VDR target gene expression was abolished, while its antagonistic activities on calcitriol-induced genes were not affected (**Fig. 1a**), indicating that ZK derivatives, but not the parent compound,

have agonistic activities. To investigate whether ZK modifications are CYP24A1 dependent, ZK activities were determined in fibroblasts isolated from an adult patient with hypercalcemia carrying CYP24A1 loss-of-function mutations (Molin et al., 2015) (FB-CYP) and in the human primary fibroblastic cell line FB-789 (Ueda et al., 2009), used as control. As expected, CYP24A1 protein was detected in FB-789, but not in FB-CYP cells (**Extended data Fig. 1c**). Whereas calcitriol treatment strongly induced *CYP24A1* transcript levels in control and CYP24A1-deficient fibroblasts, ZK induced *CYP24A1* transcripts only in FB-789 fibroblasts, but prevented calcitriol-induced *CYP24A1* expression in both cell types (**Fig. 1c**). Thus, ZK antagonizes calcitriol activities and VDR agonistic activities are exerted by CYP24A1-generated metabolite(s). It is likely that calcitriol at high levels competes out ZK for Cyp24a1-mediated enzymatic modifications, required to generate ZK metabolites with VDR agonistic activities.

VDR forms heterodimers with retinoid X receptors (RXRs) to regulate the expression of target genes (Rochel and Molnar, 2017), and RXR was shown to be required for ZK-induced VDR antagonism (Herdick et al., 2000). Surface plasmon resonance revealed that the affinity of the ligand binding domain (LBD) of hVDR for that of hRXR α increased to a similar extent upon ZK and 1,25D3 binding (**Extended data Fig. 2a,b**). To characterise conformational changes of the VDR/RXR heterodimer upon ZK and 1,25D3 binding, we performed Hydrogen Deuterium exchange (HDX) coupled with mass spectrometry (MS) analyses using full-length hVDR and N terminal domain truncated hRXR α (hRXR α Δ NTD) [**Extended Data Table 1 and and Supplementary information (SI) 1,2**]. Deuterium exchange rates of VDR amino acids 342-389 and of RXR amino acids 426-433, forming the dimerization interface, were similar upon ZK and 1,25D3 binding (**Fig. 2a and Extended data Fig. 2c-f**). Moreover, no detectable perturbation was observed in the DNA Binding Domain (DBD) of VDR (**Fig. 2a and Extended data Fig. 2e**) and of RXR (**Extended data Fig. 2d**) upon binding of either ligands. Thus, ZK and calcitriol induce similar RXR conformations within VDR/RXR heterodimers. As previously reported (Zheng et al., 2017), VDR amino acids 224-233, 263-269, 300-307, 390-401 located in helices H3, H5, H6-H7, and H10-H11 respectively, which form the Ligand Binding Pocket (LBP),

and amino acids 414-419 in H12, were protected upon 1,25D3 binding (**Extended data Fig. 2e**). However, ZK reduced deuterium exchange of H3, H5 and H6 with a 6-11 % lower efficiency than 1,25D3 (**Fig. 2a,b, Extended data Fig. 2f**). Moreover, deuterium exchange on VDR H12 upon ZK binding was similar to that of the unliganded receptor (**Fig. 2a-c and Extended data Fig. 2e**). Taken together, these results show that ZK does not induce hVDR active conformation, in agreement with molecular dynamic simulations (Lempiainen et al., 2005). High sequence coverage allowed to demonstrate that binding of calcitriol protects residues hVDR 139-158, encompassing a nuclear localization signal (NLS) (Michigami et al., 1999), from deuterium exchange (**Fig. 2d and Extended data Fig. 2e**). However, whereas calcitriol and ZK reduced deuterium exchange of the NLS by about 30 % at early time, it was higher in the presence of ZK than of 1,25D3 after 10 min (**Fig. 2d,e and Extended data Fig. 2e,f**), indicating that ZK less efficiently stabilizes the conformation of the NLS, and thus might impair VDR intracellular trafficking.

IEC-18 cell fractionation revealed that Vdr was predominantly in the cytosol of vehicle-treated cells, and mainly nuclear in the presence of calcitriol. In contrast, after ZK and 1,25D3 co-treatment, Vdr distribution was similar to that of vehicle treated cells (**Fig. 2f and Extended Data Fig. 3a**). In addition, whereas KTZ did not affect VDR localization in 1,25D3- and in 1,25D3 and ZK co-treated cells, VDR was mainly cytosolic in ZK-treated cells (**Fig. 2g and Extended Data Fig. 3b**), showing that VDR nuclear localization in ZK-treated cells results from ZK derivatives. Thus, ZK antagonizes calcitriol activities by impairing VDR subcellular localisation.

To investigate whether ZK-induced VDR conformational changes affect the recruitment of cytoplasmic proteins in the presence of calcitriol, proteins co-immunoprecipitated with cytosolic Vdr from IEC-18 cells were analysed by MS. Wbp4 peptides were strongly enriched in ZK and 1,25D3 co-treated cells compared to vehicle (**Fig. 3a**), but were not detected in calcitriol-treated cells (**Fig. 3b**). The interaction between Wbp4 and Vdr was confirmed by Vdr immunoblotting of Wbp4 immunoprecipitated cytosolic extracts of 1,25D3 and ZK co-treated IEC-18 cells (**Fig. 3c**). Of note, only a weak interaction between

Wbp4 and Vdr was observed in basal conditions and after calcitriol treatment (**Fig. 3c and Extended Data Fig. 3c**). Wbp4 was previously reported as a component of the U2 complex of the spliceosomes (Huang et al., 2009; Klippel et al., 2011). However, immunostaining revealed that it was mainly present in the cytosol of IEC-18 cells treated with vehicle, calcitriol or in calcitriol and ZK co-treated cells (**Fig. 3d**). Small interfering RNA-mediated silencing of Wbp4 reduced its transcript and protein levels by 84 and 50 %, respectively (**Extended Fig. 3d-f**), and strongly reduced Wbp4 immunostaining (**Extended Fig. 3g**). Importantly, in Wbp4-silenced cells Vdr was mainly in the nucleus (**Fig. 3e and Extended Data Fig. 3h**), and the transcript levels of *Cyp24a1*, *Sl00g* and *Atp2b1* were at least 3-fold than in control cells (**Fig. 3f**). Moreover, Wbp4 silencing strongly impaired ZK antagonistic activities, but had almost no effect on calcitriol-induced VDR target gene expression (**Fig. 3g**). Thus, our data demonstrate that ZK promotes the interaction of VDR with WBP4, and sequesters VDR into the cytoplasm.

To determine the impact of ZK on calcitriol-induced calcium trafficking, we analyzed the intracellular calcium flux in IEC-18 cells pre-treated for 48 h with 100 nM calcitriol alone or in combination with 1 μ M ZK. After Ca^{2+} addition, the increase of intracellular Ca^{2+} levels ($[Ca^{2+}]_i$) was 2.5-fold higher in calcitriol-treated cells than in vehicle-treated cells. In contrast, $[Ca^{2+}]_i$ were similar in cells co-treated with 1,25D3 and ZK and with vehicle (**Extended Data Fig. 3i**), demonstrating that ZK hampers calcitriol-induced calcium flux.

These results prompted us to investigate the effects of ZK in mice. In agreement with previous results (Laverny et al., 2009), mice treated for 4 days with 1 μ g/kg/day calcitriol were hypercalcemic. In contrast, serum calcium levels of mice co-treated with calcitriol and ZK for 4 days were similar to those of vehicle-treated mice (**Fig. 4a**). Note that Wbp4 slightly interacted with Vdr in kidney from wild type mice (**Extended Data Fig. 4a,b**), and a calcitriol and ZK co-treatment enhanced this interaction (**Fig. 4b**). Moreover, Vdr binding to vitamin D response elements of *Cyp24a1*, *Slc30a10*, *Slc37a2*, *Nkain1* and *Atp2b1* in mouse intestine was induced by calcitriol, but not by a calcitriol and ZK co-treatment (**Fig. 4c**). In accordance with these results, genome wide analysis revealed that the levels of 989 out of

the 992 transcripts (> 99 %) induced by calcitriol in the intestine, including *Cyp24a1*, *Slc37a2*, *Slc30a10*, *Atp2b1* and *Nkain1*, were normalized by a co-treatment with ZK (**Fig. 4d**). Of note, the transcript levels of these 5 VDR target genes, as well as serum calcium levels, were higher in calcitriol and ZK co-treated wild type mice than in VDR null mice (**Fig. 4a and Extended Data Fig. 4c**), demonstrating that ZK does not fully abrogate VDR signaling in mice, but normalizes calcitriol-induced hypercalcemia.

To determine the therapeutic potency of ZK after calcitriol intoxication, supra-physiological doses of calcitriol (1 µg/kg/day) were orally administered to mice for 2 days to induce hypercalcemia, followed by a 2-day treatment with calcitriol in presence or absence of ZK (1 µg/kg/day) (**Fig. 4e**). Whereas mice treated with calcitriol alone were hypercalcemic, a 2-day treatment with ZK normalized serum calcium levels (**Fig. 4f**). Moreover, ZK blunted calcitriol-induced *Cyp24a1* transcript levels in the duodenum and kidney (**Fig. 4g,h**).

Taken together, our results show that the vitamin D analog ZK impairs calcitriol-induced VDR nuclear translocation by enhancing the interaction of the receptor with Wbp4 in the cytosol, and prevents and/or normalizes calcitriol-induced hypercalcemia-induced in mice. Moreover, as ZK impairs calcitriol-induced VDR target genes in fibroblast from a IIH patient, but does not fully suppress VDR signaling in mice, this selective, potent and safe compound represents a therapeutic option for acute and chronic hypercalcemia secondary to hypervitaminosis D.

Material and methods.

Chemical

1,25(OH)₂D₃ (17936, Sigma Aldrich) and ZK168281 (gift from the Medicinal Chemistry Department of Schering AG) were dissolved in absolute ethanol at 10⁻² M and stored at -20 °C. Ketoconazole (KTZ, TOKU-E, Sint-Denijs-Westrem, Belgium) was dissolved in DMSO at 10⁻² M and stored at -20 °C.

Cell lines

IEC-18 rat intestinal epithelial cells (American Type Culture Collection, Rockville, USA) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 4.5 g/l glucose supplemented with 5 % fetal calf serum (FCS), 1 mM Sodium Pyruvate, 0.1 UI/mL insulin and 40 µg/mL gentamicin. FB789 normal human primary fibroblasts (IGBMC, France)(Ueda et al., 2009) were maintained in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 15 % FCS, non-essential amino acid and antibiotics (40 µg/mL gentamicin and 100 µg/mL penicillin/streptavidin). Cells at 80 % confluency were grown in medium supplemented with 5% charcoal-treated FCS for 48 h, and treated as indicated.

Patient derived-fibroblasts

Written informed consent was obtained from a patient for collection of clinical and laboratory data, DNA collection, and use of skin biopsy derived-fibroblast. Sanger sequencing of *CYP24A1* coding sequence of a 55-year-old man with elevated urine calcium and 1,25D3 levels in spite of a markedly low parathormone concentration revealed mutations c.62del/p.(Pro21Argfs*8) (rs744432244) and c.427_429del/p.(Glu143del) (rs777676129) in a compound heterozygous state (reference transcript NM_000782.5). The 25-hydroxy-vitamin D3 / 24,25-dihydroxy-vitamin D3 blood ratio by liquid-chromatography tandem mass spectrometry revealed a CYP24A1 deficiency (Molin et al., 2015). Skin punches of 3 mm were obtained from the inner left arm, dissociated and cultured in Gibco™ Amniomax™ Medium (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) for 10 days. Cells were then grown in DMEM / Nutrient Mixture F-10 Ham (1:1) supplemented with 10 % FCS and 40 µg/mL gentamicin.

Gene silencing

Small interference RNA transfection was performed following Dharmacon's protocol. Briefly, IEC-18 cells were seeded and grown overnight in serum-deprived growth medium to 80 % confluency, and

transfected for 96 hours with 1 μ M siRNA targeting rat Wbp4 (Accell pool ID: E-087189-00-0050) or non-targeting siRNA (ID: D-001910-10-50) in Accell delivery media, and treated as indicated.

Mice

C57BL/6J mice (WT) and VDR-null (VDR^{-/-})(Huet et al., 2015) mice on a similar genetic background were fed *ad libitum* (Safe diets, D04, France) and housed in a temperature- and light-controlled animal facility. Mice were administered *per os* (100 μ l/mouse) with the indicated amount of vitamin D analog or vehicle (sunflower oil, Auchan). At the end of the treatment, blood was collected by inferior palpebral vein puncture, and mice were killed by cervical dislocation. Tissues were collected and immediately processed or frozen in liquid nitrogen. All animal experimental protocols were conducted in compliance with French and EU regulations on the use of laboratory animals for research, and approved by the IGBMC Ethical Committee and the French Ministry (#21776-2019082318288737 and #10047-2019082318288737).

RNA isolation and analysis

Tissues and cells were lysed, and total RNA isolated using the NucleoSpin kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) and TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc), respectively, according to the manufacturer's protocols. RNA was quantified by spectrophotometry (Nanodrop, Thermo Fisher), and cDNA prepared using 2 μ g of total RNA, random hexamers and SuperScriptII reverse transcriptase (Thermo Fisher) following the manufacturer's instructions. Quantitative PCR reactions were performed using the Light Cycler 480 SYBR Green I Master X2 Kit (Roche) according to the supplier's protocol. Oligonucleotides are listed in **Extended Data Table 2**.

Transcriptomic Analysis

cDNA libraries were generated from 600 ng of total RNA using the TruSeq Stranded mRNA LT Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA), according to the manufacturer's instructions, quantified and checked for quality using capillary electrophoresis. Fifty base pairs single-read sequencing was performed on Hiseq 4000 sequencer (Illumina) following the manufacturer's instructions. Image analysis and base calling were performed using RTA 2.7.7 and bcl2fastq 2.17.1.14 softwares. Adapter dimer reads were removed using DimerRemover. FastQC 0.11.2 was used to evaluate the quality of sequencing. Reads were mapped onto the mm10 assembly of the mouse genome using Tophat 2.1.1 (Kim et al., 2013) and the Bowtie2 2.3.4.3 (Langmead and Salzberg, 2012). Only uniquely aligned reads were retained for further analyses. Quantification of gene expression was performed using HTSeq-0.11.0 (Anders et al., 2015). Read counts were normalized across libraries with the method of Anders *et al.* (Anders and Huber, 2010). Comparisons of the transcripts with more than 100 raw reads were performed using the method of Love *et al.* (Love et al., 2014) implemented in the DESeq2 Bioconductor library (DESeq2 v1.0.19). Resulting p-values were further adjusted for multiple testing. Genes were considered to be differentially expressed if the adjusted p-value was less than 0.05 and the $|\log_2 \text{Fold-change}| > 1$. Hierarchical clustering was performed using Cluster 3.0, and the heatmaps were visualized using the Java TreeView software.

Protein isolation

Cells were harvested and centrifuged at 400 g for 5 min. Cell pellets were resuspended in radioimmunoprecipitation assay lysis buffer (RIPA) [50 mM Tris pH 7.5, 1% Nonident P40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, and phosphatase and protease inhibitor cocktails (PhosphoStop and Complete-Mini EDTA free; Roche)]. Lysates were cleared by centrifugation at 10,000 g for 10 min at 4 °C, and supernatant protein concentrations were determined using Bradford Reagent (ab119216, Abcam) according to the manufacturer's instructions. For subcellular fractionation, cell pellets were resuspended in 200 μ L of 10 mM HEPES, 60 mM KCl, 1

mM EDTA, 0.075% (v/v) NP40, 1 mM DTT and 1 mM PMSF (pH 7.6), and incubated on ice for 8 min. After centrifugation at 400 g for 5 min, supernatants were collected as cytosolic fractions. Pellets were washed, resuspended in 100 μ L of 20 mM Tris HCl, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 1 mM PMSF and 25% (v/v) glycerol (pH 8.0), for 10 min on ice. After centrifugation at 15,000 g for 10 min, supernatants were collected as the nuclear fractions.

Immunoprecipitation

One mg of total (mouse) or cytosolic (IEC-18 cells) protein extracts obtained from fresh material was incubated overnight with 10 μ L anti-VDR (cell signaling) or anti-WBP4 antibodies (Abcam) in 500 μ L immunoprecipitation buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% glycerol, 1% NP-40). Immunocomplexes recovered using G-coupled agarose beads (Sigma Aldrich) were washed and eluted in loading buffer (30 mM Tris HCl pH 6.8, 1 % sodium deoxysulfate, 2.5 % β -mercaptoethanol, 5 % glycérol, 0.001 % bromophenol blue).

Mass Spectrometry analysis

Immunoprecipitated proteins were reduced, alkylated and digested with trypsin at 37°C overnight. Peptides were analyzed using an Ultimate 3000 nano-RSLC (Thermo Scientific, San Jose California) coupled in line with an Orbitrap ELITE (Thermo Scientific, San Jose California). Briefly, peptides were separated on a C18 nano-column with a linear gradient of acetonitrile and analyzed using the Top 20 collision-induced dissociation method. Data were processed by database searching against *Rattus norvegicus* Uniprot Proteome database (29944 sequences) using Maxquant 1.6.6.0 and Perseus 1.6.6.0. Precursor, and fragment mass tolerance were set at 7 ppm and 0.6 Da respectively. Trypsin was set as enzyme, and up to 2 missed cleavages were allowed. Oxidation (M) and N-term acetylation were set as variable modification and Carbamidomethylation (C) as fixed modification. Proteins were identified with a minimum of two unique peptides and a False Discovery Rate <1%. Proteins identified in 2 out of

3 replicates were considered. P-values obtained by moderated t-test of median-normalized log₂-data were transformed to local False Discovery Rate of 0.05.

SDS-PAGE analysis

Equal amounts of proteins were resolved under denaturing conditions by electrophoresis in 8-10 % polyacrylamide gels containing SDS (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes (Trans-blot turbo transfer system apparatus, Bio-Rad) following the manufacturer's protocol. Membranes were incubated for 1 h at room temperature in 10 mM Tris pH 7.4, 0.05% Tween-20 (TBST) supplemented with 5 % nonfat dry milk. Immunoblotting with antibodies (**Extended Data Table 2**) was performed overnight in TBST with 5 % bovine serum albumin (BSA), and immunocomplexes were revealed upon a 1 h incubation with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies directed against rabbit Ig (Jackson ImmunoResearch) using an enhanced chemiluminescence detection system (ECLplus, GE Healthcare) and an ImageQuant LAS 4000 biomolecular imager (GE Healthcare). For co-immunoprecipitation experiments, membranes were incubated with a mouse anti-Rabbit IgG (L27A9, Conformation Specific, Cell signaling) for 1 h at room temperature before addition of the secondary antibodies. Immunodetected proteins were quantified using FIJI/ ImageJ distribution Software(Schindelin et al., 2012). Representative blots of at least three independent experiments are depicted in the figures.

Serum calcium levels

Blood was kept overnight at 4 °C and centrifuged at 400 g for 10 min at 4°C. Serum calcium levels were determined using a colorimetric assay (Sigma Aldrich) according to the supplier's protocol.

Chromatin Immunoprecipitation

Duodenum was harvested and washed twice in ice-cold PBS, incubated in PBS containing 1% paraformaldehyde (PFA, Electron Microscopy Sciences) for 10 min, and quenched with 0.125 M glycine at room temperature for 5 min. Nuclei from cross-linked tissues were isolated in ChIP Buffer (ChIP-IT High Sensitivity, Active Motif) following the manufacturer's procedure and sonicated in 300–400 bp DNA fragments. Thirty μ g of chromatin was immunoprecipitated with anti-VDR antibodies (D2K6W, Cell Signaling) and DNA was recovered following the manufacturer's directions (ChIP-IT High Sensitivity, Active Motif). qPCR reactions were performed using the Light Cycler 480 SYBR Green I Master X2 Kit (Roche) according to the supplier's protocol. Oligonucleotides are listed in **Extended Data Table 2**.

Immunocytochemistry

Cells grown in 8-well Lab-Tek II RS Glass Chamber Slides (Thermo Fisher) were washed twice with PBS, fixed in 4 % PFA for 15 min at room temperature, washed in PBS and permeabilized in PBS 0.2% Triton X-100 for 5 min. After a 1 h incubation in PBS-5 % BSA, primary antibodies (**Extended Data Table 2**) were added overnight at 4 °C. After 3 washes in PBS, cells were incubated with fluorescent cyanine (Cy3)-conjugated anti-rabbit antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 1 h at room temperature and nuclei were stained with 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma Aldrich). Slides were examined under an epifluorescence microscope (Leica), and images were acquired with a 16-bit Cool Snap FX camera by the Leica Application Suite X (LAS X) software.

Intracellular Calcium Measurement

IEC-18 cells were grown in Ca^{2+} -free medium [20 mM Hepes, 40% (w / v) glucose, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2] in the presence of 1 μ M pluronic acid F-127 (Thermo Fisher) and 5 μ M Indo-1 AM calcium probe (Thermo Fisher) for 30 min at 37°C, washed two times with PBS, and incubated for 30 min at 37°C in Ca^{2+} -free medium. Ratiometric calcium imaging was performed using an inverted

Leica SP8 UV/Visible Laser Confocal Microscope equipped with a Leica HC PL APO 63x 1.4N.A. oil immersion objective. Cells were subjected to a 355 nm UV laser. Two confocal images in the spectral range 400-440 nm and 470-540 nm were simultaneously recorded every 5 sec using HyD detectors in the counting mode. Variation of the intracellular calcium concentration was determined by the intensity ratio between the two emission bands using the FIJI/ ImageJ distribution Software(Schindelin et al., 2012).

Biochemistry

The DNA segments encoding His-tagged ligand-binding domains (LBD) of hVDR (amino acid 118-423) and of hRXR α (amino acid 223-462), and His-tagged hRXR α lacking the N-terminal domain (hRXR α Δ NTD, 130-462) were inserted into pET15b. The cDNAs encoding His-tagged hVDR (1-427) were cloned into pET28b. Recombinant proteins were produced in Escherichia coli BL21 DE3 after induction with 1 mM IPTG (OD600 ~ 0.7) at 23 °C for 4 hours (hVDR full-length and hRXR α Δ NTD) or at 18 °C overnight (LBDs of hVDR and hRXR α). Soluble proteins were purified using chromatography column (HisTrap FF crude, 17-5286-01, GE) followed by size exclusion chromatography (HiLoad Superdex 200, 28-9893-35 GE) equilibrated in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 250 mM NaCl, 5% glycerol, 2 mM CHAPS 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. For HDX-MS analysis, full-length hVDR and hRXR α Δ NTD were mixed in stoichiometric amounts and purified by size exclusion chromatography (HiLoad Superdex 200, 28-9893-35, GE) equilibrated in 20 mM Tris pH 8.0, 75 mM NaCl, 75 mM KCl, 2 mM CHAPS, 5% Glycerol, 4 mM MgSO₄, 1 mM TCEP.

Surface Plasmon Resonance

The SPR measurements were performed with a Biacore T100 sensitivity enhanced T200 equipment (GE Healthcare) using CM5 series S sensor chip. The hRXR α LBD monomer was immobilized on the chip surface using a standard amino-coupling protocol in 10 mM Na-acetate buffer pH 5.5. The resulting immobilized hRXR α Δ NTD was in the range of 400-500 response unit. The running buffer was 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, 0.005% Tween 20. One M sodium chloride solution was used for regeneration. Interactions between the hRXR α LBD and the hVDR LBD were analyzed using 2-fold dilution series of hVDR LBDs ranging from 1 to 30 μ M. The association phase was 120 s and the dissociation phase was 120 s. After subtracting the reference and buffer signal, the data were fit to a steady state binding model using the Biacore T200 Evaluation software (GE Healthcare).

HDX-MS

HDX-MS experiments were performed following the recommendations described by Masson *et al.* (Masson *et al.*, 2019). Prior deuterium incorporation experiments, 10 μ M of full-length hVDR/hRXR α Δ NTD heterodimers were incubated with a 10x excess of ligand or equal volume of ethanol (vehicle) for 30 min at room temperature. Exchange reactions were performed with a CTC PAL sample handling robot (LEAP Technologies). Reactions were conducted by incubating 4 μ l of protein for 30, 60, 180, 600 or 1800 s in 50 μ l of D₂O buffer (50 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 2% Glycerol, 1 mM TCEP). The exchange reaction was quenched by the addition of 50 μ l 3 M Urea containing 0.1% TriFluoro Acetic acid followed by immediate injection into a Aspergillopepsin protease 2.1 x 20 mm column (Affipro) for protein digestion (2 min at 24°C). Peptic digest was injected on a Waters nanoACQUITY UPLC System where peptides were first desalted by trapping for 3 min on a VanGuard Pre-Column Acquity UPLC BEH C18 (1.7 μ m; 2.1 \times 5 mm), and eluted over 9-min with 5–40% (vol/vol) acetonitrile (containing 0.1% formic acid) gradient into a Waters Synapt G2-Si mass spectrometer. Peptide separation was conducted at 0.1°C. All exchange reactions were performed in triplicates. As reference, peptides from three non-deuterated samples were identified using the

ProteinLynx Global Server (PLGS Waters, U.K.). Peptides with an intensity of over 5000, a mass error <5 ppm and present in at least two of the three data acquisitions were pooled and imported into the DynamX data analysis software (Waters, U.K.). After a first round of automated spectral processing using DynamX, each peptide was inspected manually for suitability for further analysis. For the full-length hVDR, a total of 179 peptides remained with a 92.1% coverage and a mean redundancy of 3.99 per amino acid. For hRXR α Δ NTD, a total of 127 peptides remained with a 88.7% coverage and a mean redundancy of 3.98 per amino acid. MEMHDX software was used to identify statistically significant changes of deuterium uptake that occurred upon compound binding (Hourdel et al., 2016). For all peptides, a value of relative exchange per amino acid was corrected to back exchange by using the fully deuterated controls. The mean deuteration level per amino acid was calculated using Matlab (Mathworks) and subsequently mapped onto the crystal structures with PyMOL (Schrodinger LLC). For the representation of the hVDR/hRXR α LBD heterodimer, a previously described homology model was used (Rochel et al., 2011).

Data analysis

Each experiment was repeated at least three times. No inclusion/exclusion criteria, and no method of randomization were used for this study. Data are represented as mean \pm s.e.m. (s.e. of the mean). Statistical comparisons of data from three experimental groups were made by one-way ANOVA and were considered to be statistically significant if $p < 0.05$, and are indicated by an asterisk in the figures (GraphPad Software Prism 7).

Acknowledgements

We thank the IGBMC animal house facility, cell culture and antibody services and proteomic and imaging platforms, and R. Lutzinger, C. Peluso-Iltis and M. Aubert for excellent technical assistance. We acknowledge the Medicinal Chemistry Department of Schering AG for the ZK compound. Sequencing

was performed by the GenomEast platform, a member of the ‘France Génomique’ consortium (ANR-10-INBS-0009). This work was supported by an INSERM young researcher fellowship and by French state funds from *Agence Nationale de la Recherche* ANR-VARaD to G.L. and the grant ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d’Avenir ANR-10-IDEX-0002-02. A.Y.B is a fellow of the AstraZeneca R&D postdoc program. A.I.R is an IGBMC International PhD Programme fellow supported by LabEx INRT funds.

Contributions

D.R, N.R, G.L and D.M conceived the study and analyzed the results. D.R performed in vitro and in vivo experiments. A.Y.B performed and analyzed HDX-MS. S.C produced proteins used for HDX-MS and performed SPR. A.I.R analyzed the sequencing data. E.G helped to design and analyze fluorescent microscopy experiments. A.M provided FB-CYP. A.L discussed the results. N.R, G.L. and D.M wrote the manuscript with input from all the authors. All authors edited the manuscript and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Extended Data Table 1.

Data Set	hVDR- hRXR α ΔNTD
HDX reaction details	50mM Tris, 200 mM NaCl, 2% glycerol, 1 mM TCEP, pDread = 7.6, 25 °C
HDX time course	0.5, 1, 3, 10, 30
HDX control samples	Maximally-labeled control (zebrafish VDR LBD protein)
Back-exchange (mean / IQR)	48.05% / 9.69%
# of Peptides	VDR: 179; RXR α : 127
Sequence coverage	VDR: 92.1%; RXR α : 88.7%
Average peptide length / Redundancy	VDR: 7.91 / 3.99; RXR α : 8.33 / 3.98
Replicates (biological or technical)	3 (technical)
Repeatability	0.049 (average standard deviation)
Significant differences in HDX	p-value \leq 0.05 and Δ HDX > 5% (biological threshold)

Extended Data Table 2.

Oligonucleotides			
RT-qPCR (mouse)			
Gene	Forward primer 5' - 3'	Reverse primer 5' - 3'	
cyp24a1	GGCGGAAGATGTGAGGAATA	GCCCAGCACTGGGTATTTA	
slc30a10	GGTGATTCCTGAACACCGA	ACGTGCAAAAGAACACCTCTG	
slc37a2	TAGGGCCAGACTAGAGCCA	ACATGCTCATCTGCGGAC	
nkain1	GGAGTCAAAGCCACCGATGA	CCTAGCTCTGTTCGGCTTCG	
atp2b1	CACGTCCCGCGACCC	TGTATACATCTCGCCCGCAG	
18 s	AGTCACTGGCATGGCCTTC	CGCTGCTTACCACCTTC	
RT-PCR (mouse)			
genomic region	Forward primer 5' - 3'	Reverse primer 5' - 3'	
cyp24a1_VDRE	CAGTGACTCCCGATGAACC	TCAGGAAGGCTGTAAAGGC	
slc30a10_VDRE	ACAGGGTGCAAAGAAGCCAA	AAGGACCTCCTCCCTACGTC	
slc37a2_VDRE	TCCTGGGTGTGCCGATTCTA	CCTGGTCTGGTTGTTACCGT	
nkain1_VDRE	GCCTGTGTAACCACTTCGT	TCGTTTAAACACGTACCAGGCA	
atp2b1_VDRE	TTAAACCCAGTAACTGCAATGT	AAGGTCACTGAACCTCGAAA	
RT-qPCR (rat)			
Gene	Forward primer 5' - 3'	Reverse primer 5' - 3'	
Cyp24a1	TCCATGAGGCTTACCCCAAG	GCGTATTCACCCAGAACCCTG	
Atp2b1	GTGGAGGTTCATTCAGGGG	CTCGGATACCCACAGGAGT	
S100g	GACAGCAAGCAGCACAGAAAA	TGGACAGCTGGTTGGATCG	
Trpv6	GAGCACAGGTTGTGGTACT	CCAAGACCATACTCTCGCC	
Wbp4	CCTGGAAAGTTCTGAGGCGA	TACTCGGGCGCCTGAC	
Gapdh	AGTGCCAGCCTCGTCTCATA	GGTAACCAGGCGTCCGATAC	
RT-qPCR (human)			
Gene	Forward primer 5' - 3'	Reverse primer 5' - 3'	
CYP24A1	GACATCCAGGCCACAGACAA	ACCACCATCTGAGGCGTATT	
GAPDH	TATCTCTGATTGGTCTGATTGGG	AGTTGAGGTCAATGAAGGGGTC	
Antibodies			
Target	Host	supplier	reference
Vdr	Rabbit	Cell Signaling	D2K6W, #12550
Wbp4	Rabbit	Abcam	ab108144
Lamin B1	Rabbit	Abcam	ab16048
Gapdh	Rabbit	Cell Signaling	14C10, #2118
anti-rabbit HRP conjugated	Goat	Jackson ImmunoResearch	111-035-003
anti-rabbit CY3 conjugated	Goat	Jackson ImmunoResearch	111-165-003
anti-mouse HRP conjugated	Goat	Jackson ImmunoResearch	115-035-003
anti-rabbit IgG	Mouse	Cell Signaling	L27A9, #3678

Figures.

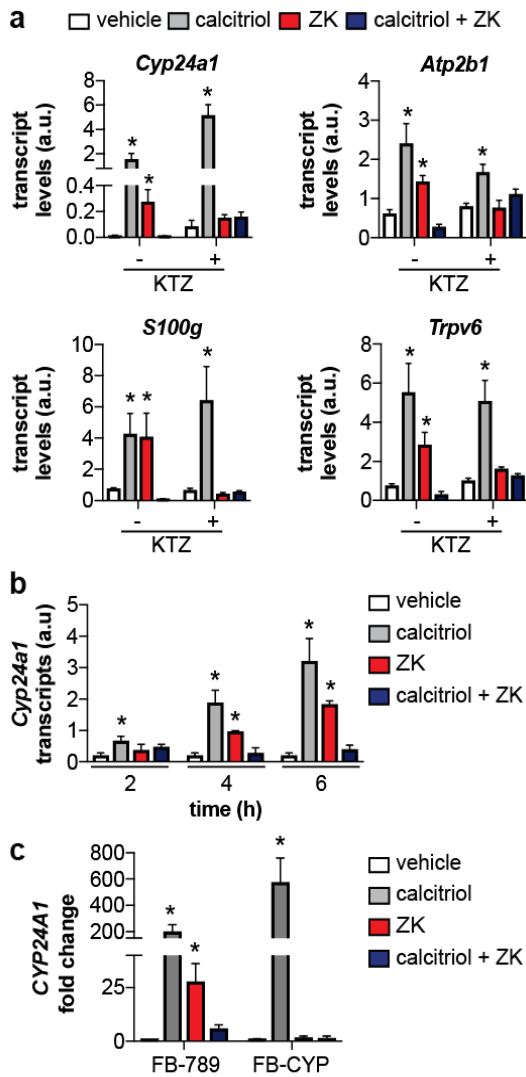


Fig. 1. ZK activities in rat intestinal epithelial cells and in human fibroblasts. (a) Transcript levels of *Cyp24a1*, *Atp2b1*, *S100g*, and *Trpv6* were determined after a 4 h treatment with vehicle (white bars), 100 nM calcitriol (grey bars), 1 μ M ZK (red bars), or 100 nM calcitriol and 1 μ M ZK (blue bars) in IEC-18 cells, pretreated (+) or not (-) with 5 μ M ketoconazole (KTZ) for 2 h. n = 3 / condition. **(b)** Transcript levels of *Cyp24a1* were determined in IEC-18 cells treated with vehicle, 100 nM calcitriol, 1 μ M ZK, or 100 nM calcitriol and 1 μ M ZK for 2, 4, and 6 h. n = 3 / condition. **(c)** CYP24A1 transcript levels in FB-789 and in FB-CYP treated for 6 h with vehicle, 100 nM calcitriol, 1 μ M ZK, or 100 nM calcitriol and 1 μ M ZK. n = 3 / condition. Data are expressed as fold induction compared to vehicle. * p < 0.05 vs. vehicle.

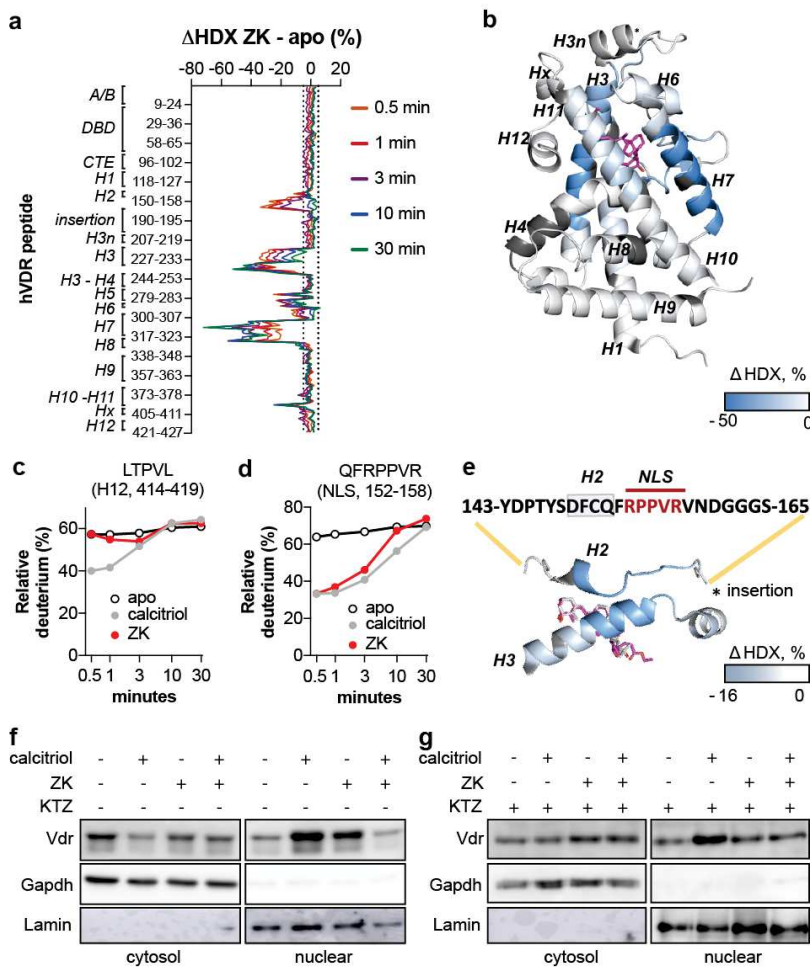


Fig. 2. ZK-induced hVDR conformational changes. (a) Differences in deuterium uptake between ZK-bound and apo VDR. Negative values indicate decreased hydrogen deuterium exchange upon ligand binding. (b) Average ΔHDX of VDR in the presence of 1,25D3 and of ZK mapped onto hVDR LBD model (PDB: 1DB1(Rochel et al., 2000b)). Regions not covered by HDX-MS are shown in dark grey. (c) Deuterium uptake of the residues 414-419 (LTPVL peptide) located in hVDR H12. (d) Deuterium uptake of the residues 152-158 (QFRPPVR peptide) of the hVDR H1-H3 loop. (e) Zoom of the region of VDR encompassing H2 and a nuclear localization signal (NLS). HDX-MS data were collected in triplicates, and deuteration data are normalized to the maximal theoretical uptake (\pm standard deviation). Representative western blot analysis of nuclear and cytosolic Vdr levels in extracts of IEC-18 cells treated for 1.5 h with vehicle, 100 nM calcitriol, 1 μM ZK, or 100 nM calcitriol and 1 μM ZK,

pretreated **(f)** or not **(g)** with 5 μ M ketoconazole (KTZ) for 2 h. Gapdh and lamin B were used as internal control. n = 3 / condition.

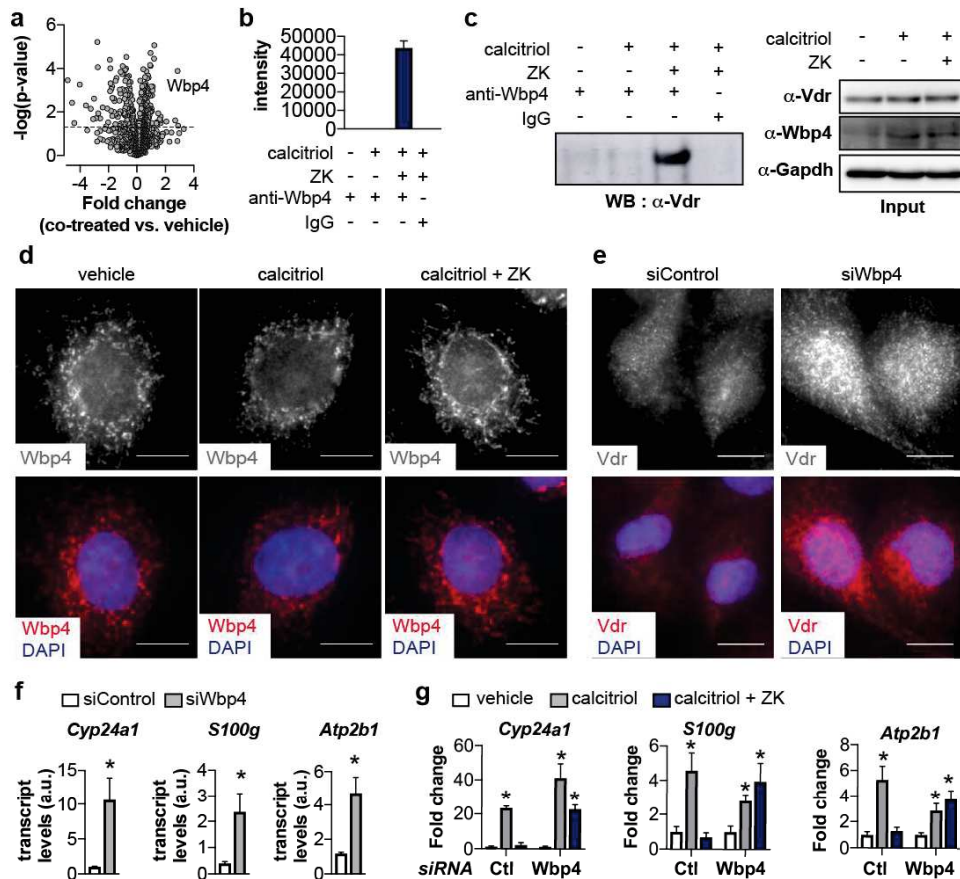


Fig. 3. VDR intracellular localization and transcriptional activities. (a) Volcano plot representing the differential peptides bound to cytosolic Vdr in cells co-treated with 100 nM calcitriol and 1 μ M ZK or treated with vehicle. n = 3 / condition. (b) Abundance of Wbp4 peptides determined by mass-spectroscopy of VDR immunoprecipitated cytosolic extracts of IEC-18 cells treated for 1.5 h with vehicle, 100 nM calcitriol or 100 nM calcitriol and 1 μ M ZK. n = 3 / condition. (c) Representative western blot of VDR in Wbp4-immunoprecipitated cytosolic extracts of IEC-18 cells treated for 1.5 h with vehicle, 100 nM calcitriol or 100 nM calcitriol and 1 μ M ZK (**left panel**). Immunoprecipitation with IgG was used as control. Representative western blot of Vdr, Wbp4 and Gapdh (used as loading control) in cytosolic extract of IEC-18 cells treated for 1.5 h with vehicle, 100 nM calcitriol or 100 nM calcitriol and 1 μ M ZK (**right panel**). (d) Representative immunostaining of Wbp4 in IEC-18 cells treated for 1.5 h with vehicle, 100 nM calcitriol, or with 100 nM calcitriol and 1 μ M ZK. Nuclei are stained with DAPI. Scale bar: 10 μ m. (e) Representative immunostaining of Vdr in hVDR transfected

IEC-18 cells silenced (siWbp4) or not (siControl) for Wbp4. Scale bar: 10 μm . **(f)** transcript levels of *Cyp24a1*, *S100g* and *Atp2b1* in untreated IEC-18 cells silenced (siWbp4) or not (siControl) for Wbp4. * $p < 0.05$ vs. siControl. **(g)** Transcript levels of *Cyp24a1*, *S100g* and *Atp2b1* in IEC-18 cells transfected with Wbp4 siRNA (Wbp4) and unrelated siRNA (Ctl) treated for 6 h with vehicle, 100 nM calcitriol, or with 100 nM calcitriol and 1 μM ZK. * $p < 0.05$ vs. vehicle.

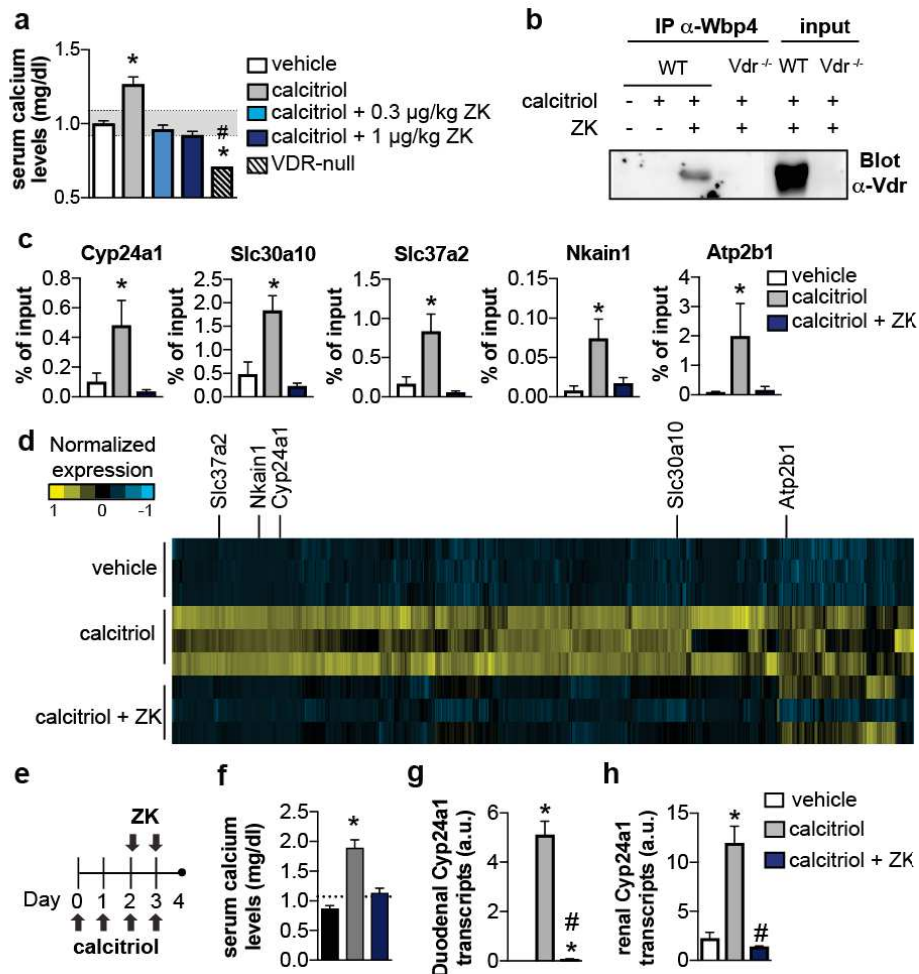
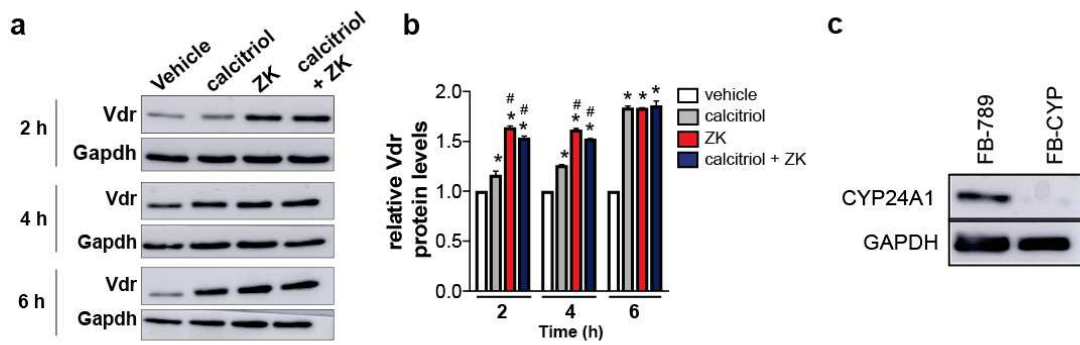
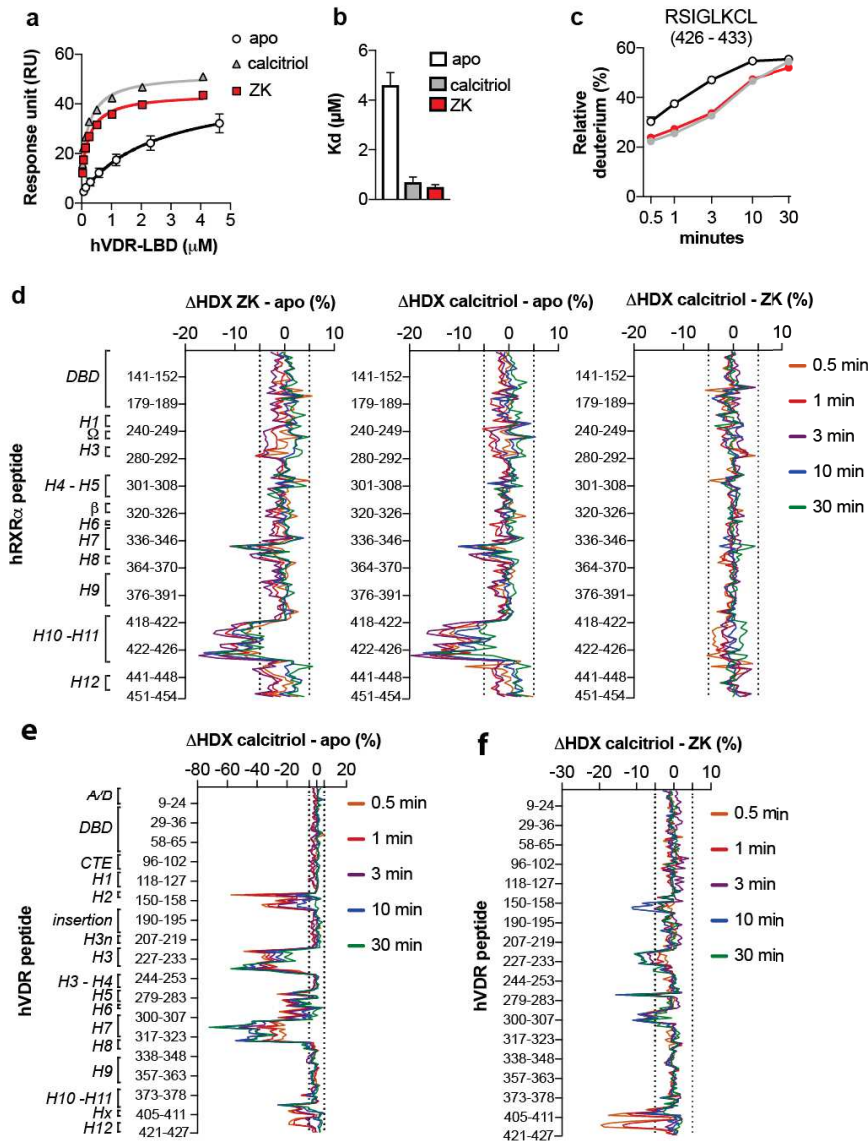


Fig. 4. ZK activities in mice. (a) 10 week-old wild type mice were daily treated per os for 4 days with 1 µg/kg calcitriol (grey bar), 1 µg/kg calcitriol and 0.3 µg/kg ZK (light blue bar), 1 µg/kg calcitriol and 1 µg/kg (dark blue bar) or vehicle (white bars) and serum calcium levels were determined 24 h after the last administration. n = 6 / group. * p < 0.05 vs. vehicle, # p < 0.05 vs. calcitriol and ZK cotreatment. The grey area represents the normocalcemic range. Age-matched VDR-null mice were used as hypocalcemic controls. (b) Representative western blotting of Vdr in Wbp4 immunoprecipitated (IP- α Wbp4) or in total (input) extracts from kidney of wild type mice treated for 6 h with vehicle, 1 µg/kg calcitriol, or 1 µg/kg calcitriol and 1 µg/kg ZK and from VDR-null mice treated with 1 µg/kg calcitriol and 1 µg/kg ZK. (c) Vdr ChIP analysis by qPCR of DNA encompassing a VDRE of Cyp24a1, Slc30a10, Slc37a2, Nkain-1 and Atp2b1 extracted from the duodenum of wild type mice treated for 1.5 h with vehicle, 1 µg/kg calcitriol, and 1 µg/kg calcitriol and 1 µg/kg ZK. n = 4 / group. * p < 0.05 vs.

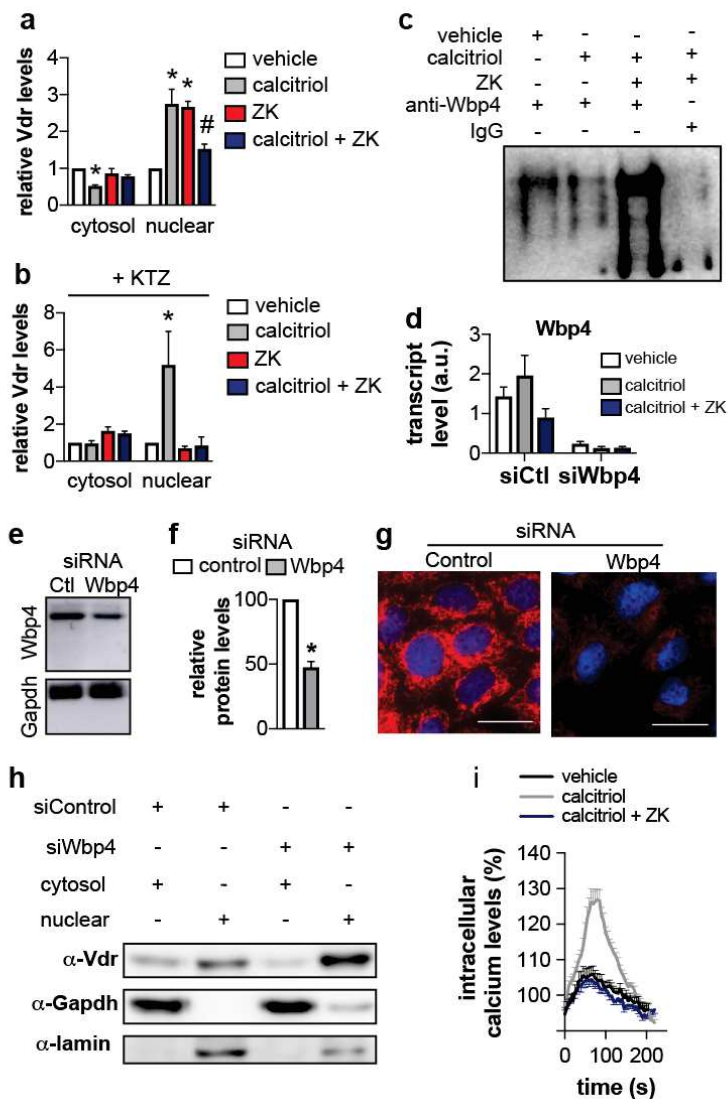
vehicle, # $p < 0.05$ vs. calcitriol. **(d)** Heatmap representing the mean-centered normalized expression of annotated transcripts (e.g. *Slc37a2*, *Nkain1*, *Cyp24a1*, *Slc30a10* and *Atp2b1*) induced by at least 2-fold after calcitriol administration, in intestine of wild type mice treated with vehicle, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ calcitriol, and 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ calcitriol and 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ZK for 6 h. $n = 3$ / condition. **(e)** Schematic representation of calcitriol and ZK administration. Serum calcium levels **(f)**, duodenal **(g)** and renal **(h)** *Cyp24a1* transcript levels were determined 24 hours after the last treatment. * $p < 0.05$ vs. vehicle, # $p < 0.05$ vs. calcitriol.



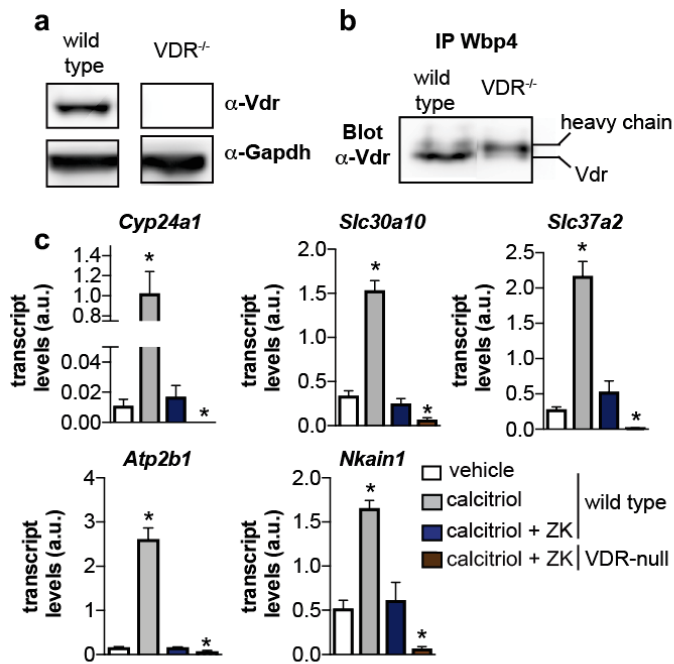
Extended data Fig. 1. VDR levels in IEC-18 cells and in human fibroblasts. Representative western blot analysis **(a)** and average fold-change **(b)** of Vdr in IEC-18 cells treated for 1, 4 and 6 h with vehicle, 100 nM calcitriol, 1 μ M ZK, or 100 nM calcitriol and 1 μ M ZK. **(c)** CYP24A1 protein levels in FB-CYP fibroblasts isolated from a patient with IIIH carrying loss-of-function mutations in the CYP24A1 gene and in the human primary fibroblastic cell line FB-789. * $p < 0.05$ vs. vehicle.



Extended data Fig. 2. Effect of ligands on RXR α and VDR conformations. Analysis of the interactions of hVDR LBD with hRXR α LBD in the presence of 1,25D3 or ZK by surface plasmon resonance (**a**) and calculated K_D (**b**). (**c**) Deuterium uptake of the RSIGLKCL peptide from hRXR α H10 (residues 426-433) in different states. (**d**) Differences in deuterium uptake of hRXR α peptides between ZK-bound, calcitriol-bound and apo hVDR/ hRXR α ΔNTD heterodimers. Differences in deuterium uptake of hVDR between calcitriol-bound and apo hVDR/ hRXR α ΔNTD heterodimers (**e**) and between calcitriol-bound and ZK-bound hVDR/ hRXR α ΔNTD heterodimers (**f**). Experiments were performed in triplicates.



Extended data Fig. 3. Effect of VDR ligands and Wbp4 silencing in IEC-18 cells. Average fold change of Vdr levels in nuclear and cytosolic extracts from IEC-18 cells treated for 1.5 h with vehicle, 100 nM calcitriol, 1 μ M ZK, or 100 nM calcitriol and 1 μ M ZK, pretreated (b) or not (a) with 5 μ M ketoconazole (KTZ) for 2 h. Gapdh and lamin B were used as internal control. n = 3 / condition. * p < 0.05 vs. vehicle, # p < 0.05 vs. calcitriol. (c) Longer exposure of the western blot presented in Fig. 3d. Wbp4 transcript (d) and protein (e and f) levels, as well as immunocytochemistry (g) in IEC-18 cells transfected with Wbp4 siRNA (siWbp4) or unrelated siRNA (siControl). n = 3 / condition. Scale bar: 20 μ m. (h) Representative western blot analysis of Vdr levels in nuclear and cytosolic extracts from IEC-18 cells treated for 1.5 h with vehicle or 100 nM calcitriol in the presence of Wbp4 siRNA (siWbp4) or unrelated siRNA (siControl). Gapdh and lamin B expression were used as internal control. n = 3 / condition. (i) Intracellular calcium flux in IEC-18 cells treated for 48 h with vehicle (black), 100 nM calcitriol (grey), 1 μ M ZK (red), or co-treated with 100 nM calcitriol and 1 μ M ZK (blue). n > 40 cells/condition. Data are expressed as % of basal levels.



Extended data Fig. 4. Effect of ZK in mice. Representative western blotting of Vdr, before (a) or after (b) immunoprecipitation of Wbp4 in renal total extracts from wild type and VDR-null mice. (c) Transcript levels of Cyp24a1, Slc30a10, Slc37a2, Atp2b1 and Nkain1 in duodenum of 10 week-old wild type mice treated with vehicle, 1 µg/kg calcitriol, and 1 µg/kg calcitriol and 1 µg/kg ZK, and in VDR-null mice treated with 1 µg/kg calcitriol and 1 µg/kg ZK (brown bars) for 6 h determined by RT-qPCR. n = 4/group. * p < 0.05 vs. vehicle.

References

- 1 Fleet, J. C. The role of vitamin D in the endocrinology controlling calcium homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* **453**, 36-45, doi:10.1016/j.mce.2017.04.008 (2017).
- 2 Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L. & Carmeliet, G. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev* **96**, 365-408, doi:10.1152/physrev.00014.2015 (2016).
- 3 Schlingmann, K. P. *et al.* Mutations in CYP24A1 and idiopathic infantile hypercalcemia. *N Engl J Med* **365**, 410-421, doi:10.1056/NEJMoa1103864 (2011).
- 4 Figueres, M. L. *et al.* Kidney function and influence of sunlight exposure in patients with impaired 24-hydroxylation of vitamin D due to CYP24A1 mutations. *Am J Kidney Dis* **65**, 122-126, doi:10.1053/j.ajkd.2014.06.037 (2015).
- 5 Carpenter, T. O. CYP24A1 loss of function: Clinical phenotype of monoallelic and biallelic mutations. *J Steroid Biochem Mol Biol* **173**, 337-340, doi:10.1016/j.jsbmb.2017.01.006 (2017).
- 6 Marcinowska-Suchowierska, E., Kupisz-Urbanska, M., Lukaszkiwicz, J., Pludowski, P. & Jones, G. Vitamin D Toxicity-A Clinical Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)* **9**, 550, doi:10.3389/fendo.2018.00550 (2018).
- 7 Bury, Y., Steinmeyer, A. & Carlberg, C. Structure activity relationship of carboxylic ester antagonists of the vitamin D(3) receptor. *Mol Pharmacol* **58**, 1067-1074 (2000).
- 8 Leyssens, C., Verlinden, L. & Verstuyf, A. The future of vitamin D analogs. *Front Physiol* **5**, 122, doi:10.3389/fphys.2014.00122 (2014).
- 9 Herdick, M., Steinmeyer, A. & Carlberg, C. Carboxylic ester antagonists of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) show cell-specific actions. *Chem Biol* **7**, 885-894 (2000).
- 10 Laverny, G. *et al.* Synthesis and anti-inflammatory properties of 1alpha,25-dihydroxy-16-ene-20-cyclopropyl-24-oxo-vitamin D3, a hypocalcemic, stable metabolite of 1alpha,25-dihydroxy-16-ene-20-cyclopropyl-vitamin D3. *J Med Chem* **52**, 2204-2213, doi:10.1021/jm801365a (2009).
- 11 Muindi, J. R. *et al.* CYP24A1 inhibition enhances the antitumor activity of calcitriol. *Endocrinology* **151**, 4301-4312, doi:10.1210/en.2009-1156 (2010).
- 12 Molin, A. *et al.* CYP24A1 Mutations in a Cohort of Hypercalcemic Patients: Evidence for a Recessive Trait. *J Clin Endocrinol Metab* **100**, E1343-1352, doi:10.1210/jc.2014-4387 (2015).
- 13 Ueda, T., Compe, E., Catez, P., Kraemer, K. H. & Egly, J. M. Both XPD alleles contribute to the phenotype of compound heterozygote xeroderma pigmentosum patients. *J Exp Med* **206**, 3031-3046, doi:10.1084/jem.20091892 (2009).
- 14 Rochel, N. & Molnar, F. Structural aspects of Vitamin D endocrinology. *Mol Cell Endocrinol* **453**, 22-35, doi:10.1016/j.mce.2017.02.046 (2017).
- 15 Zheng, J. *et al.* HDX reveals the conformational dynamics of DNA sequence specific VDR co-activator interactions. *Nat Commun* **8**, 923, doi:10.1038/s41467-017-00978-7 (2017).
- 16 Lempiainen, H., Molnar, F., Macias Gonzalez, M., Perakyla, M. & Carlberg, C. Antagonist- and inverse agonist-driven interactions of the vitamin D receptor and the constitutive androstane receptor with corepressor protein. *Mol Endocrinol* **19**, 2258-2272, doi:10.1210/me.2004-0534 (2005).
- 17 Michigami, T. *et al.* Identification of amino acid sequence in the hinge region of human vitamin D receptor that transfers a cytosolic protein to the nucleus. *J Biol Chem* **274**, 33531-33538, doi:10.1074/jbc.274.47.33531 (1999).
- 18 Klippel, S. *et al.* Multivalent binding of formin-binding protein 21 (FBP21)-tandem-WW domains fosters protein recognition in the pre-spliceosome. *J Biol Chem* **286**, 38478-38487, doi:10.1074/jbc.M111.265710 (2011).
- 19 Huang, X. *et al.* Structure and function of the two tandem WW domains of the pre-mRNA splicing factor FBP21 (formin-binding protein 21). *J Biol Chem* **284**, 25375-25387, doi:10.1074/jbc.M109.024828 (2009).
- 20 Huet, T. *et al.* A vitamin D receptor selectively activated by gemini analogs reveals ligand dependent and independent effects. *Cell Rep* **10**, 516-526, doi:10.1016/j.celrep.2014.12.045 (2015).
- 21 Kim, D. *et al.* TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* **14**, R36, doi:10.1186/gb-2013-14-4-r36 (2013).
- 22 Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**, 357-359, doi:10.1038/nmeth.1923 (2012).
- 23 Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166-169, doi:10.1093/bioinformatics/btu638 (2015).

- 24 Anders, S. & Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* **11**, R106, doi:10.1186/gb-2010-11-10-r106 (2010).
- 25 Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550, doi:10.1186/s13059-014-0550-8 (2014).
- 26 Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676-682, doi:10.1038/nmeth.2019 (2012).
- 27 Masson, G. R. *et al.* Recommendations for performing, interpreting and reporting hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) experiments. *Nat Methods* **16**, 595-602, doi:10.1038/s41592-019-0459-y (2019).
- 28 Hourdel, V. *et al.* MEMHDX: an interactive tool to expedite the statistical validation and visualization of large HDX-MS datasets. *Bioinformatics* **32**, 3413-3419, doi:10.1093/bioinformatics/btw420 (2016).
- 29 Rochel, N. *et al.* Common architecture of nuclear receptor heterodimers on DNA direct repeat elements with different spacings. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 564-570, doi:10.1038/nsmb.2054 (2011).
- 30 Rochel, N., Wurtz, J. M., Mitschler, A., Klaholz, B. & Moras, D. The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Mol Cell* **5**, 173-179 (2000).

Structural analysis of VDR complex with ZK168281 antagonist.

Anna Y. Belorusova^{1-5*}, Sandra Chalhoub¹⁻⁴, Natacha Rochel^{1-4*}

1. Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, France
2. Institut National de La Santé et de La Recherche Médicale (INSERM), U1258, Illkirch, France
3. Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), UMR7104, Illkirch, France
4. Université de Strasbourg, Illkirch, France
5. Medicinal Chemistry, Respiratory, Inflammation and Autoimmunity, BioPharmaceuticals R&D, AstraZeneca, Gothenburg, Sweden

ABSTRACT: Vitamin D receptor (VDR) antagonists prevent the VDR activation function helix 12 from folding into its active conformation, thus affecting coactivator recruitment and antagonizing the transcriptional regulation induced by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃. Here we report the crystal structure of the zebrafish VDR ligand binding domain in complex with the ZK168281 antagonist, revealing that the ligand prevents optimal folding of the C-terminal region of VDR. This interference was confirmed by HDX-MS in solution.

Ligand-induced transcription factors form a subgroup of the nuclear receptor superfamily. Agonist binding induces homo- or hetero-dimerization, the folding of the activation function helix 12 (H12) into its active conformation to modulate coregulatory molecules recruitment, and DNA binding in target gene regulatory regions¹. Antagonists, in turn, destabilize the nuclear receptor interaction with cofactors and repress transcription¹. The receptor of the secosteroid hormone vitamin D (VDR), in complex with its heterodimeric partner RXR, regulate various physiological functions, such as calcium levels, cell growth and differentiation, apoptosis and adaptive/innate immune responses²⁻³. To modulate VDR activities, more than 4000 vitamin D analogs have been developed by medicinal chemistry approaches. Whereas most of them are agonists, very few elicit antagonistic properties⁴⁻⁶.

Active VDR antagonists are defined as ligands preventing H12 from folding into its active conformation which in turn affects coactivator recruitment and antagonizes the transcriptional regulation induced by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ ($1,25D_3$), the bioactive form of vitamin D⁴⁻⁶. Analogs of the ZK series⁷⁻⁹ exhibit the skeleton of the clinically used vitamin D analog calcipotriol and possess a 25-carboxylic ester moiety in their side chain. Among them, only ZK168281, which exhibits the largest rigid chain (Figure 1A), has been described as a full VDR antagonist⁷⁻⁸. Modelling and molecular dynamics of ZK168281 docked into the VDR ligand binding pocket (LBP) by anchoring the 24-hydroxyl group

predicted that it might prevent H12 from being correctly positioned in its active state^{8,10}. However, no crystal structure of ZK168281 in complex with VDR was previously reported.

In the present study, we determined the crystal structure of the zebrafish (z) VDR ligand binding domain (LBD) in complex with ZK168281 and examined its conformational dynamics in solution by hydrogen/deuterium exchange coupled with mass spectrometry (HDX-MS). In addition, we investigated the potency of ZK168281 to antagonize $1,25D_3$ -induced VDR activity in cells.

Results

Binding mode of ZK168281 to zVDR LBD

To determine the binding mode of ZK168281 in the VDR LBD, we carried out an X-ray crystallographic analysis of the zVDR LBD complexed with ZK168281. We attempted to crystallize VDR LBD/ZK168281 in absence or presence of the corepressor NCOR1 or the coactivator SRC1. Only crystals of the complex in the presence of the SRC1 coactivator peptide NR2 (RHKILHRLLEQEGS) were obtained and analyzed (Supplementary Table 1). These results are in agreement with previous reports characterizing X-ray structures of VDR complexes in presence of antagonist ligands¹¹⁻¹⁶.

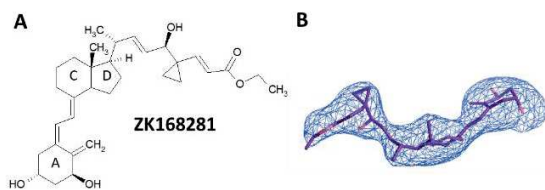


FIGURE 1: Binding mode of ZK168281. (A) Chemical structure of ZK168281 with A, C/D rings labelled. (B) ZK168281 modelled into the omit Polder map contoured at 3.5σ , with model bias reduction and exclusion of solvent density.

ZK168281 binds to the VDR LBP unambiguously as shown by the POLDER omit map (Figure 1B). Superposition of the VDR LBP in the presence of ZK168281 or 1,25D₃ shows that positioning of the A-ring of ZK168281 is similar to that of 1,25D₃, but C/D-rings of ZK168281 are slightly shifted (Figure 2A). The 1-OH and 3-OH groups in the A-ring of ZK168281 form hydrogen bonds similar to 1,25D₃: with Ser265 and Arg302 and with Tyr175 and Ser306, respectively (Figure 2A,B). In contrast to the 25-OH group of 1,25D₃ that forms specific hydrogen bonds with His333 and His423, a sole hydrogen bond with His423 is formed by the 24-OH group of ZK168281. Note that the carboxyl moiety of ZK168281 weakly interacts with His333 (Figure 2A). In addition to those residues, ZK168281 interacts with 15 residues of the LBP at a 4 Å distance cutoff (Figure 2B) in comparison to 14 for 1,25D₃. Differential interactions are observed for Ala331 and Gly332 that interact with the terminal extended side chain of ZK168281 at 3.8 Å and 4.0 Å, respectively (in contrast to 4.3 and >5 Å for 1,25D₃) and Ala259 that selectively interacts with the cyclopropyl of ZK168281 at 3.7 Å. At the same time, ZK168281 forms weaker interaction with Leu255 at 4.1 Å (instead of 3.8 Å for 1,25D₃), Leu261 at 4.0 Å (instead of 3.6 Å for 1,25D₃) and Leu337 at 4.9 Å (instead of 3.7 Å for 1,25D₃). Importantly, Leu430 (H11) side chain is re-orientated in the presence of ZK168281 compared to that in 1,25D₃-bound VDR LBD (Figure 2C). To determine whether these differential interactions selectively modulate the VDR LBD conformation, we compared the overall 3D structures of ZK168281- and 1,25D₃-bound VDR. Significant differences between two structures were revealed: the last four atoms of the ZK168281 side chain extend towards helix 11 and induce C α shift for the last turn of helix H11 (1.2 Å), the loop 11-12 (0.7 Å) and helix H6 (0.7 Å) (Figure 2C). However, H12 adopts the agonist conformation in the presence of both compounds, and is involved in similar ligand interactions i.e. with V444 (Figure 2B).

Taken together, these results show that, whereas permitting H12 to adopt an active conformation, ZK168281 destabilizes the C-terminal region of VDR which could lead

HDX-MS analysis of 1,25D₃- and ZK168281-zVDR complexes

We achieved an excellent peptide coverage of 99% of zVDR LBD (Supplementary Figure 1) resulting in a high spatial resolution of the HDX-MS data. First, we characterized the conformational dynamics of unliganded (apo) zVDR LBD. H11 and H12 C-terminus, the insertion

to its suboptimal agonistic conformation. Since the active fold could be explained by a large excess of coactivator peptide used to crystallize the complex and the crystal packing forces, we further probed antagonist-induced conformational changes of VDR in solution and assessed the effect of ZK168281 on H12 mobility using HDX-MS.

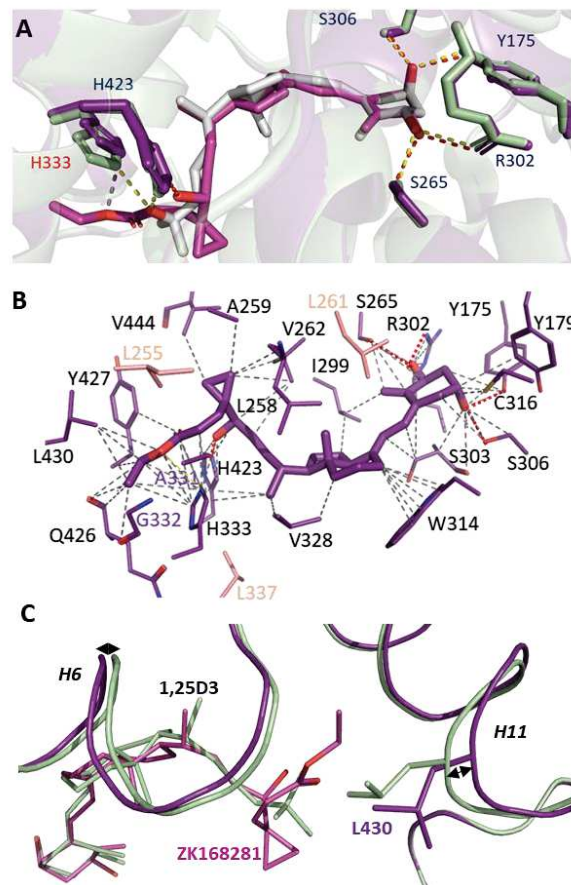


FIGURE 2: Structural accommodation of ZK168281 in the zVDR ligand binding pocket. (A) Hydrogen bonds interactions between 1,25D₃ (yellow dashed lines) or ZK168281 (red dashed lines) with VDR. In ZK168281 complex, His333 does not form a hydrogen bond but interacts with the carbonyl moiety (grey dashed line). ZK168281 is shown in purple and 1,25D₃ in grey. (B) Interactions between ZK168281 and residues lining the LBP of zVDR LBD at 4 Å cutoff. Differential interacting residues are shown in purple and salmon. (C) Conformational changes of C α main chain and Leu430 side chain that opens an additional pocket to fit the ZK168281 side chain (purple) compared to VDR-1,25D₃ (grey).

region (residues 186-251), β -sheets (residues 306 – 324) and H6 (residues 325-330) of zVDR LBD exhibit rapid exchanges rate with the solvent, indicating that these regions are highly dynamic. In contrast, regions remote from the LBP and forming central part of the α -helical sandwich, notably H4 (residues 286-295), H5 (residues 296-305), and H8-H9 (residues 355-399) are more protected from the solvent (Supplementary Figure 2). These observations are in line with those reported for human¹⁷ and rat¹³ VDR. Interestingly,

C-terminal H10 (residues 417-430) showed ~80% exchange to deuterium after 1 min, indicating that this region is very flexible in zebrafish in contrast to rat and human where it does not exceed 20% exchange after 60 min.

We next analyzed the effect of 1,25D₃ binding on zVDR LBD (Supplementary Figure 2C and Supplementary Figure 3A). A significant stabilization of structural elements forming the LBP (H1-2, H3, H5, H6-7, H10-11) was observed, notably the regions involving residues forming hydrogen bonds with 1,25D₃ (i.e. Tyr175 of H1, Ser265 of H3, Arg302 and Ser306 of H5, His333 of the loop H6-H7 and His423 of H11). Surprisingly, no protection from deuterium exchange was observed for zVDR H12 in tested conditions, indicating that 1,25D₃ alone is not sufficient to fold zH12 in its active conformation, in contrast to rat and human VDR H12 that exhibit a large degree of protection upon agonist binding at similar time points^{13,17,18}. This difference could be due to an increased intrinsic flexibility of the zebrafish VDR C-terminus observed for the apo form. HDX-MS experiments were next performed in the presence of the SRC₁ NR₂ coactivator peptide. The peptide enhances 1,25D₃-driven a stabilization of zVDR H10 (residues 416-426) at 3 and 10 min exchange and leads to a large stabilization of zVDR H12 (residues 440-445) with 30-40% increase in protection after 1 min exchange (Figure 3F, Supplementary Figure 3B). Thus, despite its apparent flexibility, H12 of agonist-bound zVDR is stabilized upon coactivator binding.

To investigate the effect of ZK168281 binding on the zVDR LBD conformation we performed differential HDX-MS analysis of the antagonist complex and compared it to 1,25D₃. H3 and H7 regions displayed the highest protection

(up to 60-80%) after ZK168281 binding when compared to apo states (Figure 3A,B and Supplementary Table 2). However, binding residues in H3 (residues 253-267), H6-H7 (residues 322-344) and H10-H11 (residues 416-437) were 10-15% less protected in comparison to 1,25D₃ (Figure 3C,D and Supplementary Table 2). The stabilization of residues of H1 and H2 by ZK168281 was similar to 1,25D₃ (Figure 3D). In addition, H5 (residues 290-297) showed more than 30% of deprotection compared to 1,25D₃ (Figure 3C-D and Supplementary Figure 4A,B). As Lys292 (H5) is forming hydrogen bond with the backbone NH of Gly449 (H12), these results indicate that ZK168281 fails to fold zVDR H12 into its active conformation. Importantly, the presence of SRC₁ NR₂ peptide does not enhance ZK168281-induced zVDR LBD stabilization, including H12 (Figure 3E,F, Supplementary Figure 2D and Supplementary Figure 3C,D). Altogether, differential HDX-MS data show that, contrary to 1,25D₃, ZK168281 binding does not lead to the stabilization of active H12 conformation and prevents zVDR-coactivator interaction.

This impaired interaction between zVDR-ZK168281 and SRC₁ peptide was further confirmed by measurement of the affinity of SRC₁ NR₂ peptide for zVDR LBD in solution by MicroScale Thermophoresis. In the presence of saturating 1,25D₃ concentration, the SRC₁ peptide was efficiently recruited by zVDR (K_D 1.2 μ M). In contrast, the recruitment of SRC₁ by ZK168281-liganded zVDR LBD was strongly impaired (K_D >30 μ M; Supplementary Figure 4C). Similar results were obtained for the full-length hVDR/RXR α heterodimer (Supplementary Figure 4D).

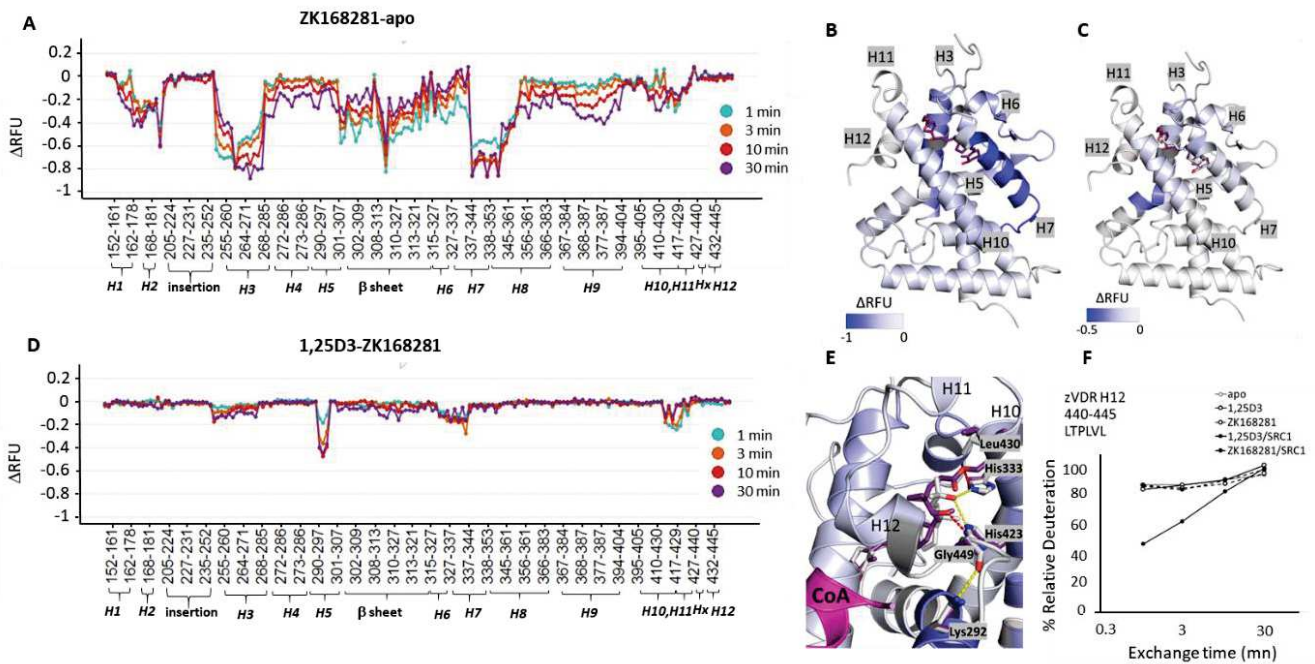


FIGURE 3: HDX analysis of the ZK168281-bound zVDR LBD. (A) Relative fractional uptake (RFU) difference plot showing the variations of deuterium uptake between apo- and ZK168281-bound zVDR LBD. A negative difference value corresponds to a protection from deuterium uptake upon ligand binding, with large absolute values corresponding to a strong effect. (B) Protection from deuterium exchange upon ZK168281 binding mapped onto ZK168281-zVDR crystal structure, RFU levels are the average of four time points (1, 3, 10, 30 min). Regions of the zVDR structure not covered by HDX-MS are shown in dark grey. (C) Average RFU difference mapped onto ZK168281-zVDR crystal structure and corresponding RFU difference plot showing the variations of deuterium uptake between 1,25D₃- and ZK168281-bound zVDR LBD (D). Regions of the zVDR structure not covered by HDX-MS are shown in dark grey. (E) Details of the interactions between ZK168281 (purple) and zVDR LBP

(CA-atoms colored according to the difference in RFU between 1,25D₃ and ZK168281 measured in the presence of the coactivator SRC1). (F) Deuterium uptake of the LTPVLV peptide from zVDR H12 (residues 440-445) in different complexes plotted as a function of time. Deuterium uptake values for all peptides were corrected to back exchange using the fully deuterated control. HDX-MS measurements were performed in triplicates. Full peptide list and statistical summary are presented in the Supplementary Table 2.

ZK168281 antagonizes VDR transcriptional activity.

To characterize antagonistic activities of ZK168281, VDR reporter gene assays were performed in the human embryonic kidney cell line HEK293 EBNA with hVDR. Cells were transfected with expression vectors encoding the full-length hVDR and a luciferase reporter plasmid encompassing the well-characterized promoter region of the main VDR target gene hCYP24A1¹⁹, and treated with 1,25D₃ 10⁻⁸ M in the presence of various ZK168281 concentrations for 18 h (Figure 4A). 1,25D₃ increased luciferase activity by 50-fold compared to vehicle-treated cells (Figure 4A), and ZK168281 reduced

1,25D₃-induced reporter activity by up to 60 % in a dose-dependent manner. To further determine if ZK168281 similarly antagonizes zVDR activity, we performed a similar cell-based VDR reporter gene assay in rat ileum derived cell line (IEC-18) using full-length zVDR and CYP24A1 luciferase reporter plasmid (Figure 4B). While, 1,25D₃ increased reporter activity in IEC-18 at 10⁻⁷M concentration (Figure 4B), ZK168281 reduced zVDR mediated 1,25D₃-induced activity at any tested doses (Figure 4B). Thus, ZK168281 similarly antagonizes 1,25D₃-induced hVDR and zVDR activity.

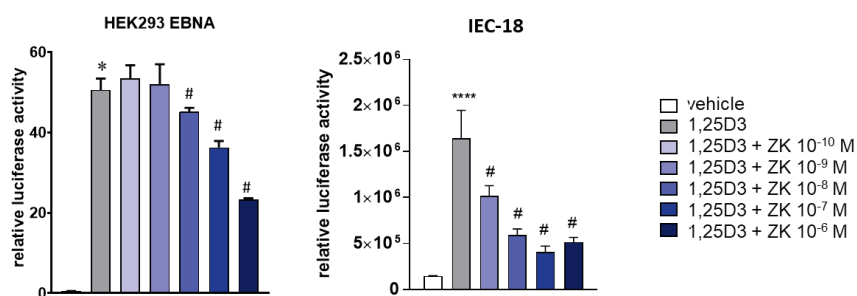


FIGURE 4: Effect of ZK168281 on hVDR and zVDR transcriptional activity. Luciferase gene assay performed in HEK293 EBNA cells transfected with expression vectors encoding the full-length hVDR and a hCYP24A1 luciferase reporter plasmid, and treated for 18 h with vehicle or 10⁻⁸M of 1,25D₃ in the presence or absence of the indicated ZK168281 doses (10⁻¹⁰ to 10⁻⁶ M) (A) IEC18 cells zVDR transfected with expression vectors encoding the full-length zVDR and a hCYP24A1 luciferase reporter plasmid, and treated for 24 h with vehicle or different ZK168281 doses (10⁻⁹ to 10⁻⁶ M) in the presence of 10⁻⁷ M of 1,25D₃. n = 3 * p < 0.05 vs. vehicle, # p < 0.05 vs. 1,25D₃.

Discussion and Conclusions

In the present study, we determined the conformational changes of VDR LBD induced by ZK168281 and show that this vitamin D analog fails to stabilize zVDR H12 folding and to recruit co-activator peptide which provides basis for its antagonistic properties. Furthermore, we show that ZK168281 antagonizes both hVDR and zVDR cellular transcriptional activities.

We solved the crystal structure of zVDR LBD in complex with the antagonist ZK168281 revealing that insufficient stabilization of the C-terminal region of VDR results from ZK168281-induced shifts of H11, loop 11-12 and H6, the repositioning of Leu430, the loss of a hydrogen bond with His333, and of the interaction with Leu337 previously described as key amino acid for VDR agonism¹⁹. The observed structural rearrangement slightly differs from the initial modeling^{8,10}, that proposed either a perturbation of hHis397 (zHis423) and hPhe422 (zPhe448) interaction⁸ or a steric hindrance with hAla231 (zAla259) and hVal418 (zVal444)¹⁰. The suboptimal positioning of helix H11 and the loop 11-12 does not prevent the active fold of H12 observed in the crystal structure. However, the crystal structure of the complex was obtained in the presence of excess of coactivator peptide, underlying the necessity to use other methods to investigate the antagonist binding mode, such as HDX-MS, a pseudo-structural method detecting perturbations in protein dynamics in solution. Indeed, HDX-MS confirmed the destabilization of the C-terminal region by ZK168281 suggested by the crystal structure, and additionally identified helix H5 as the most affected region in the antagonist-bound zVDR complex in comparison with 1,25D₃. This differs from the reported HDX-MS analysis of rVDR in complex with the 25-dibenzyl antagonist which also prevents the VDR LBD C-terminus from folding into an active state however does not impact H5¹³.

Here we show that albeit the structural dynamics of zVDR LBD in its apo form is similar to previously characterized rVDR¹³ and hVDR¹⁷ LBDs, its C-terminus exhibits larger flexibility. H12 of zVDR remains flexible upon agonist binding in solution; similar behaviour was described for hRXR bound to gcisRA or hER bound to estradiol.¹⁷ Nevertheless, in the presence of the SRC1 NR2 coactivator peptide, a large stabilization effect was observed on agonist-bound zVDR H12 similarly to hVDR¹⁸. Similar structural elements were stabilized upon 1,25D₃ binding. Thus, in agreement with our previous analysis comparing ligand binding modes of 1,25D₃ between hVDR and zVDR²⁰, these results confirmed the validity of the use of zVDR LBD for structural studies of complexes with agonist ligands and coactivator peptides. As demonstrated in this work, due to artefact crystal packing of antagonist bound VDR complexes, a full understanding of the structural consequences of antagonist binding could only be obtained by combining x-ray crystallography with solution structural methods.

VDR antagonists have a high therapeutic potential to treat diseases associated with VDR hyperfunction²¹. The potency of ZK168281 to reduce 1,25D₃-induced gene expression has previously been shown to vary among the genetically engineered cancer-derived immortalized cell lines (Cos-7, Saos-2, HaCaT and MCF-7) overexpressing VDR⁹. In the present study, we show that ZK168281 blunts 1,25D₃-induced hVDR and zVDR transcriptional activity, thus acting as a non-species specific VDR antagonist. ZK168281 is a good potential candidate for diseases associated with VDR hyperfunction, and this work provides atomic details of its binding mode as well as its effect on VDR conformational dynamics in solution that could be used for a rational design of next generation antagonists of VDR.

Experimental section

Chemicals

1,25(OH)₂D₃ (17936, Sigma Aldrich) and ZK168281 (gift from the Medicinal Chemistry Department of Schering AG, now Bayer) were dissolved in absolute ethanol at 10⁻² M and stored at -20 °C. The fluorescent SRC1 NR2 peptide (683-LTERHKILHRLQLQEGSPSD-701) was purchased from Thermo-Fisher. The SRC1 NR2 peptide (686-RHKILHRLQLQEGSPS-700) was synthesized by Pascal Eberling (IGBMC peptide synthesis common facility).

Cells

IEC-18 rat intestinal epithelial cells (American Type Culture Collection, Rockville, USA) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 4.5 g/l glucose supplemented with 5 % fetal calf serum (FCS), 1 mM Sodium Pyruvate, 0.1 UI/mL insulin and 40 µg/mL gentamicin. HEK293 EBNA human embryonic renal cells were maintained in DMEM supplemented with 10 % FCS. Cells at 80 % confluency were grown in medium supplemented with 5% charcoal-treated FCS for 48 h, and treated as indicated.

Luciferase assay Transactivation Assays

Cells were seeded into 24-well plates (5 × 10⁴ cells per well). HEK293 EBNA cells were co-transfected with 150 ng of the expression plasmid pSG5-hVDR wild-type and 150 ng of the reporter plasmid pLuc-MCS (Stratagene, La Jolla, USA) containing the proximal promoter region (-414 to -64) of the human CYP24A1 gene, 3 ng of the pRL plasmid (Promega, Madison, USA) containing the Renilla luciferase gene, and 697 ng of the carrier plasmid pBluescript (Stratagene). Transfection was performed with jetPEI (PolyPlus Transfection, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions. IEC18 cells were co-transfected with an expression vector for human VDR (hVDR, 0.5 µg per well) and zebrafish VDR (zVDR, 0.5 µg per well) respectively, a plasmid containing the proximal promoter region (-414 to -64) of the human CYP24a1 gene linked with the firefly luciferase reporter gene (cyp24-RE, 0.25 µg per well), and a plasmid expressing β-galactosidase (β-gal, 0.25 µg/well) using X-tremeGENE HP DNA

Transfection Reagent (Roche Diagnostics) following the manufacturer's instructions.

Six hours after transfection, tested compounds were added. Cells were harvested after 18h or 24h of incubation with ligands for hVDR and zVDR, respectively. Cells were lysed and 20 μ l of lysates were assayed for luciferase activity as recommended by the supplier (Perkin-Elmer) and the Renilla luciferase or β -gal activity was used to normalize the transfection efficiencies.

Crystallization and Structure Determination

Expression of zebrafish VDR LBD (residues 156–453) and the following purification were done by the procedure reported previously²². The protein was concentrated using Amicon ultra-30 (Millipore) to 3–7 mg/ml and incubated with a two-fold excess of ligand and a three-fold excess of the coactivator SRC-1 NR2 peptide. Crystals were obtained in 50 mM Bis-Tris pH 6.5, 1.6 M lithium sulfate and 50 mM magnesium sulfate. Protein crystals were mounted in a fiber loop and flash-cooled under a nitrogen flux after cryo-protection with 20% glycerol. Data collection from a single frozen crystal was performed at 100 K on the ID30B beamline at ESRF (France). The raw data were processed with XLS²³ and scaled with AIMLESS^{24,25} programs. The crystals belong to the space group P6₅22, with one LBD complex per asymmetric unit. The structure was solved and refined using BUSTER²⁶, Phenix²⁷ and iterative model building using COOT²⁸. Crystallographic refinement statistics are presented in Table S1. All structural figures were prepared using PyMOL (www.pymol.org/).

HDX-MS

Prior the deuterium incorporation experiments, 10 μ M zVDR LBD protein was incubated with ten-fold excess of ligand (1,25D₃, ZK168281) or equal volume of ethanol as a control for 30 min at room temperature. In the experiments with the coactivator peptide fifteen-fold excess of RHKILHRLQEGS peptide from the human SRC1 receptor-interacting domain 2 (Thermo Fisher) was added to the protein-ligand complex. A fully deuterated zVDR LBD sample was generated by incubating protein with 4M Guanidine-HCl in D₂O for 30 min at 45°C. Exchange reactions were performed with a CTC PAL sample handling robot (LEAP Technologies). Reactions were conducted by incubating 4 μ l of protein for 60, 180, 600 or 1800 s with 50 μ l of D₂O buffer (50 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 2% Glycerol, 1mM TCEP). The exchange reaction was quenched by the addition of 50 μ l of 3 M Urea and 0.1% TFA, followed by immediate injection into a protease column for protein digestion (2 min at 24°C). Enzymate BEH Pepsin 2.1 \times 30 mm Column (Waters, U.K.) was used. Peptic digest was further injected on a Waters nanoACQUITY UPLC System where peptides were first desalted by trapping for 3 min on a VanGuard Pre-Column Acquity UPLC BEH C₁₈ (1.7 μ m; 2.1 \times 5 mm), and then eluted over 6-min 5–40% (vol/vol) acetonitrile (containing 0.1% formic acid) gradient into a Waters Synapt G2-Si mass spectrometer.

Peptide separation was conducted at 0.1°C. All exchange reactions were performed in triplicates.

Peptides from three samples of non-deuterated sample were identified using the ProteinLynx Global Server (PLGS Waters, U.K.). Peptides with an intensity of over 5000, a mass error <5 ppm and present in at least two of the three data acquisitions were pooled and imported into the DynamX data analysis software (Waters, U.K.). After a first round of automated spectral processing using DynamX, each peptide was inspected manually for suitability for further analysis. For zVDR LBD, a total of 164 peptides remained, with 99% coverage and a mean redundancy of 6.427 per amino acid. For all peptides, a value of relative exchange per amino acid was corrected to back exchange by using the fully deuterated controls. The mean deuteration level per amino acid was calculated using Matlab (Mathworks) according to³⁰ and subsequently mapped onto the crystal structures with PyMOL (Schrodinger LLC). For the representation of the apo zVDR LBD comprising insertion region, loop modelling with MOE (Chemical Computing Group Inc.) was applied on zHC4.pdb file.

Microscale thermophoresis

Measurements were performed with a Monolith NT.15 instrument (NanoTemper Technologies GmbH, Munchen, Germany) monitoring the binding of fluorescein labelled SRC1 NR2 peptide to zVDR LBD or hVDR full-length/hRXR α Δ NTD. The hVDR full-length/hRXR α Δ NTD complexes were purified as described in³¹ followed by a final size exclusion chromatography step on a Superdex 200 (GE) column equilibrated in 20 mM Hepes pH 7.5, 200 mM NaCl, Glycerol 2%, 1 mM TCEP, 0.05% Tween 20. Each measurement consisted of 16 reaction mixtures where the fluorescent-labeled peptide concentration was kept constant (100 nM) and hVDR/RXR was serially diluted from a concentration of 10 μ M down to 0.5 nM. Measurements were performed in standard glass capillaries (Nanotemper) at 25°C, at 15–20% LED excitation and 20% MST power, with a laser-on time of 30 s and a laser-off time of 5 s.

For zVDR, the fluorescent-labeled peptide concentration was 50 nM and zVDR concentrations comprised between 14 μ M and 0.4 nM. Measurements were made with standard glass capillaries (Nanotemper) at 25°C, at 50% LED excitation and 40% 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.

Statistics

Transactivation assays data are shown as the mean of assays performed in triplicate \pm standard deviation. Statistical comparisons of data from three experimental groups were made by one-way ANOVA and were considered to be statistically significant if $p < 0.05$, and are indicated by an asterisk in the figures (GraphPad Software Prism 7). For the HDX-MS data, significance of the changes in deuterium uptake and

p-value were calculated using unpaired t-test with GraphPad Prism (GraphPad Software).

ASSOCIATED CONTENT

Accession Code. The atomic coordinates and structure factors have been deposited accession code 6T2M. Authors will release the atomic coordinates and experimental data upon article publication.

Supporting Information. Table of the refinement of the crystal structure as well as additional supplementary figures can be found in SI appendix.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

* A.Y. Belorusova
(anna.belorusova@astrazeneca.com)
or N. Rochel (rochel@igbmc.fr)

Author Contributions

A.Y.B. and N.R. conceived the study. A.Y.B. produced protein, solved the crystal structure, performed and analyzed HDX-MS. S.C. produced proteins and performed MST experiments. A.Y.B. and S.C. performed cellular assays. A.Y.B. and N.R. wrote the manuscript.

ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge the Medicinal Chemistry Department of Schering AG, now Bayer, for the ZK compound. We thank the IGBMC staff: cell culture service, P. Eberling for peptide synthesis, A. McEwen for help in X-ray data collections, and C. Peluso-Iltis for excellent technical assistance. The authors thank the staff of ID30 at ESRF for assistance in using the beamlines. We thank Daniela Rovito and Gilles Laverny (IGBMC) for discussion. The work was supported by grant ANR-13-BSV8-0024-01 from ANR and institutional funds from Instruct-ERIC for support and the use of resources of the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (ANR-10-LABX-0030-INRT and ANR-10-IDEX-0002-02), Alsace contre le Cancer, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM-FDT20140930978). A.Y.B. is a fellow of the AstraZeneca R&D postdoc program. S.C. thanks ARTP for a doctoral fellowship.

ABBREVIATIONS

1,25D₃, 1 α ,25-dihydroxyvitaminD₃; VDR, vitamin D receptor; LBD, ligand binding domain; LBP, ligand binding pocket; HDX-MS, hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry.

REFERENCES

1. Burris TP₁, Solt LA, Wang Y, Crumbley C, Banerjee S, Griffett K, Lundasen T, Hughes T, Kojetin DJ. Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators. *Pharmacol Rev.* 2013; 65(2):710-78.
2. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, Molecular

Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev.* 2016; 96(1):365-408.

3. Fleet, J. C. The role of vitamin D in the endocrinology controlling calcium homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 2017; 453, 36-45.

4. Teske KA, Yu O, Arnold LA. Inhibitors for the Vitamin D Receptor-Coregulator Interaction. *Vitam Horm.* 2016; 100:45-82.

5. Saitoh H. Vitamin D Receptor Antagonists. *Vitamin D: Fourth Edition.* 2017; 679-694.

6. Belorusova AY, Rochel N. Structural Basis for Ligand Activity in Vitamin D Receptor. *Vitamin D: Fourth Edition.* 2017; 189-209.

7. Bury Y, Steinmeyer A, Carlberg C. Structure activity relationship of carboxylic ester antagonists of the vitamin D(3) receptor. *Mol Pharmacol.* 2000; 58(5):1067-74.

8. Väisänen S₁, Peräkylä M, Kärkkäinen JI, Steinmeyer A, Carlberg C. Critical role of helix 12 of the vitamin D(3) receptor for the partial agonism of carboxylic ester antagonists. *J Mol Biol.* 2002; 315(2):229-38.

9. Herdick M, Steinmeyer A, Carlberg C. Carboxylic ester antagonists of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) show cell-specific actions. *Chem Biol.* 2000; 7(11):885-94.

10. Tocchini-Valentini G, Rochel N, Wurtz JM, Moras D. Crystal structures of the vitamin D nuclear receptor liganded with the vitamin D side chain analogues calcipotriol and seocalcitol, receptor agonists of clinical importance. Insights into a structural basis for the switching of calcipotriol to a receptor antagonist by further side chain modification. *J Med Chem.* 2004; 47(8):1956-61.

11. Nakabayashi M, Yamada S, Yoshimoto N, Tanaka T, Igarashi M, Ikura T, Ito N, Makishima M, Tokiwa H, DeLuca HF, Shimizu M. Crystal structures of rat vitamin D receptor bound to adamantyl vitamin D analogs: structural basis for vitamin D receptor antagonism and partial agonism. *J Med Chem.* 2008; 51(17):5320-9.

12. Inaba Y, Yoshimoto N, Sakamaki Y, Nakabayashi M, Ikura T, Tamamura H, Ito N, Shimizu M, Yamamoto K. A new class of vitamin D analogues that induce structural rearrangement of the ligand-binding pocket of the receptor. *J Med Chem.* 2009; 52(5):1438-49.

13. Kato A, Itoh T, Anami Y, Egawa D, Yamamoto K. Helix₁₂-Stabilization Antagonist of Vitamin D Receptor. *Bioconjug Chem.* 2016; 27(7):1750-61.

14. Kato A, Yamao M, Hashihara Y, Ishida H, Itoh T, Yamamoto K. Vitamin D Analogues with a p-Hydroxyphenyl Group at the C₂₅ Position: Crystal Structure of Vitamin D Receptor Ligand-Binding Domain Complexed with the Ligand Explains the Mechanism Underlying Full Antagonistic Action. *J Med Chem.* 2017; 60(20):8394-8406.

15. Asano L, Waku T, Abe R, Kuwabara N, Ito I, Yanagisawa J, Nagasawa K, Shimizu T. Regulation of the vitamin D receptor by vitamin D lactam derivatives. *FEBS Lett.* 2016; 590(18):3270-9.

16. Anami Y, Itoh T, Egawa D, Yoshimoto N, Yamamoto K. A mixed population of antagonist and agonist binding conformers in a single crystal explains partial agonism against vitamin D receptor: active vitamin D analogues with 22R-alkyl group. *J Med Chem.* 2014; 57(10):4351-67.

17. Zhang J, Chalmers MJ, Stayrook KR, Burris LL, Garcia-Ordóñez RD, Pascal BD, Burris TP, Dodge JA, Griffin PR. Hydrogen/deuterium exchange reveals distinct agonist/partial agonist receptor dynamics

within vitamin D receptor/retinoid X receptor heterodimer. *Structure*. 2010; 18(10):1332-41.

18. Zheng J, Chang MR, Stites RE, Wang Y, Bruning JB, Pascal BD, Novick SJ, Garcia-Ordóñez RD, Stayrook KR, Chalmers MJ, Dodge JA, Griffin PR. HDX reveals the conformational dynamics of DNA sequence specific VDR co-activator interactions. *Nat Commun*. 2017; 8(1):923.

19. Huet T, Laverny G, Ciesielski F, Molnár F, Ramamoorthy TG, Belorusova AY, Antony P, Potier N, Metzger D, Moras D, Rochel N. A vitamin D receptor selectively activated by gemini analogs reveals ligand dependent and independent effects. *Cell Rep*. 2015; 10(4):516-26.

20. Ciesielski F, Rochel N, Moras D. Adaptability of the Vitamin D Nuclear Receptor to the Synthetic Ligand Gemini: Remodelling the LBP With One Side Chain Rotation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103 (3-5):235-42.

21. Galson DL, Roodman GD. Pathobiology of Paget's Disease of Bone. *J Bone Metab*. 2014; 21(2):85-98.

22. Belorusova AY, Eberhardt J, Potier N, Stote RH, Dejaegere A, Rochel N. Structural insights into the molecular mechanism of vitamin D receptor activation by lithocholic acid involving a new mode of ligand recognition. *J Med Chem*. 2014; 57(11):4710-9.

23. Kabsch, W. Software XDS for image rotation, recognition and crystal symmetry assignment. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010; 66:125-32.

24. Collaborative Computational Project, N. 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr*. 1994; 50:760-3.

25. Evans, P. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr*. 2006; 62:72-82.31.

26. Bricogne G, Blanc E, Brandl M, Flensburg C, Keller P, Paciorek W, Roversi P, Sharff A, Smart OS, Vonrhein C, Womack TO. BUSTER version 2.11.2. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd 2011.

27. Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD. *CCP4 Newsl* 2005; 42, contribution 8

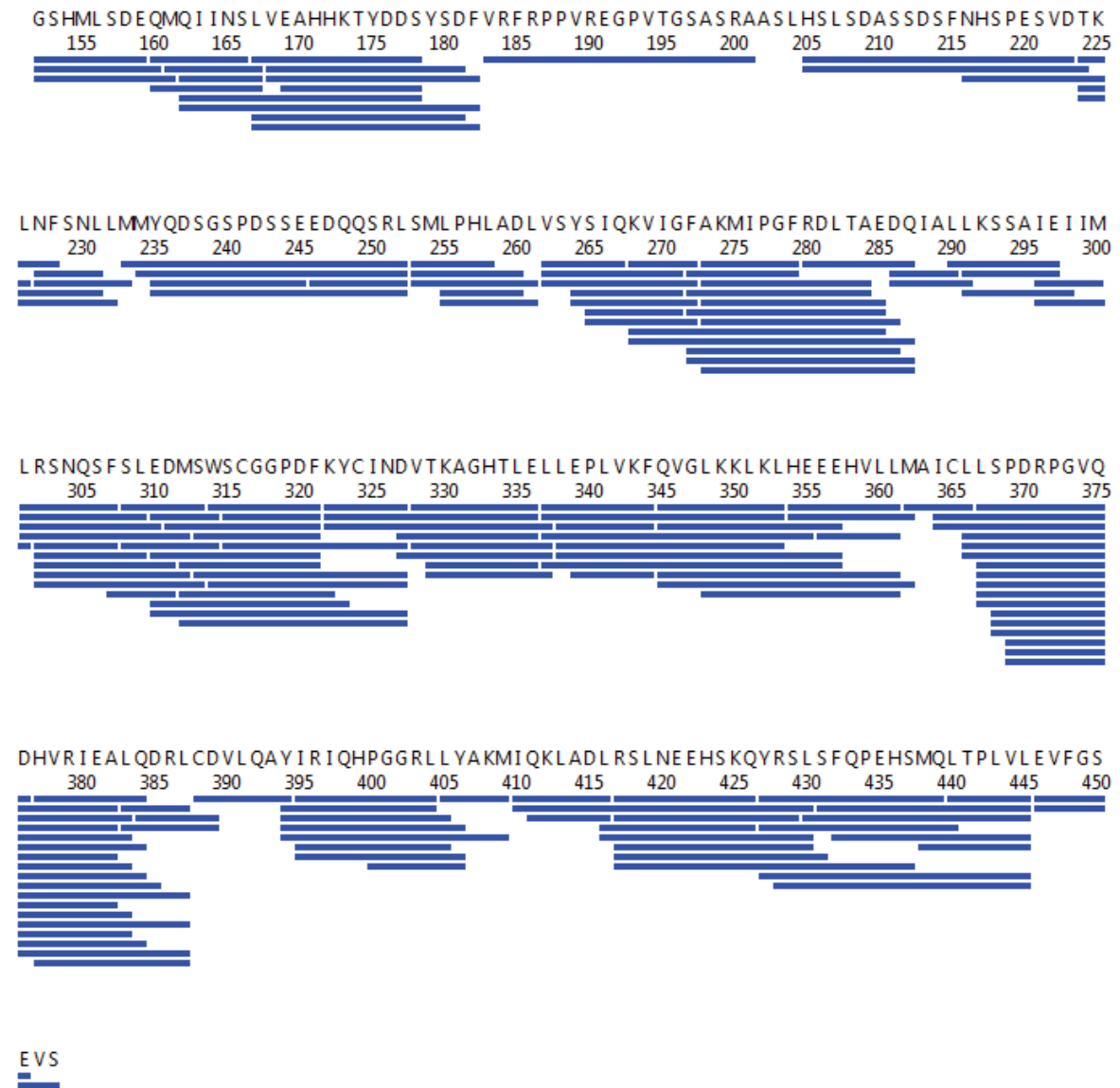
28. Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr* 2004; D60: 2126-32.

29. Hourdel V, Volant S, O'Brien DP, Chenal A, Chamot-Rooke J, Dillies MA, Brier S. MEMHDX: an interactive tool to expedite the statistical validation and visualization of large HDX-MS datasets. *Bioinformatics*. 2016; 32(22):3413-19.

30. Stephens AD, Nespoitaya N, Zacharopoulou M, Kaminski CF, Phillips JJ, Kaminski Schierle GS. Different Structural Conformers of Monomeric α -Synuclein Identified after Lyophilizing and Freezing. *Anal Chem*. 2018; 90(11):6975-83.

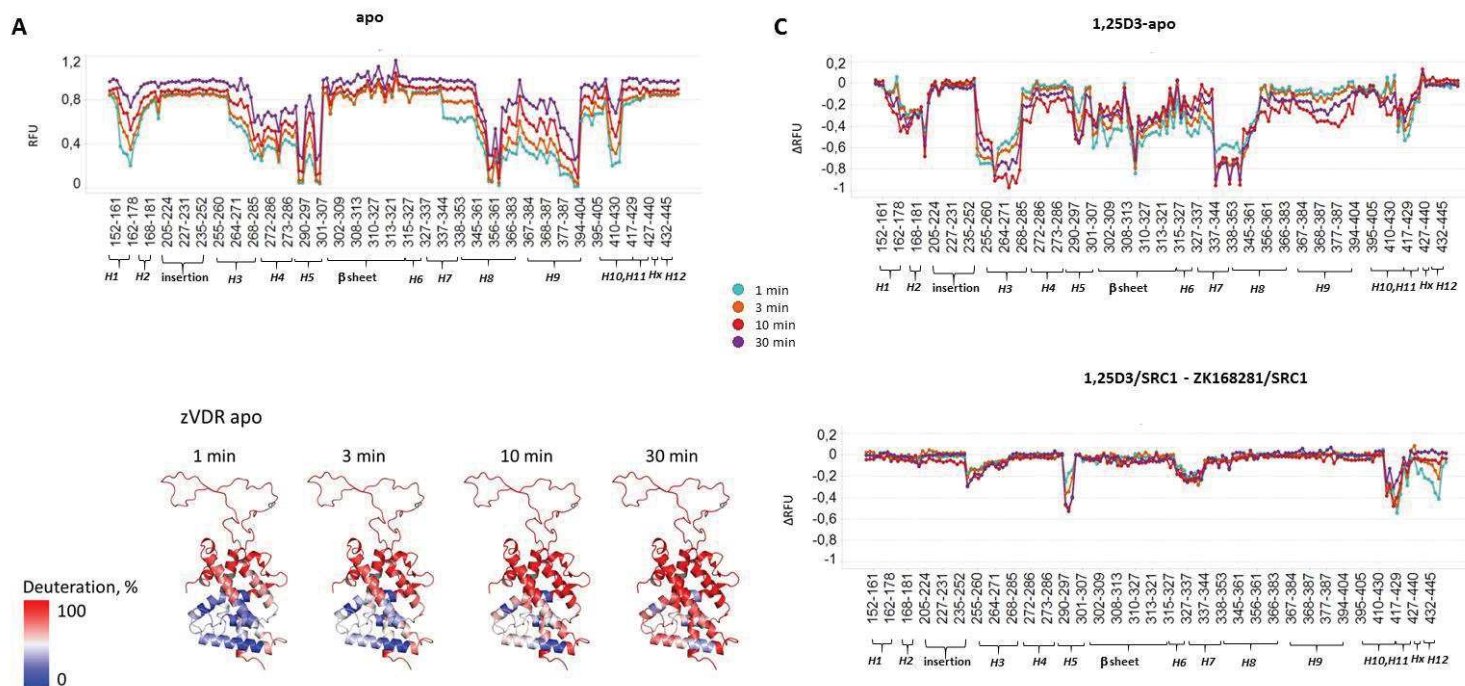
31. Rochel N, Ciesielski F, Godet J, Moman E, Roessle M, Peluso-Iltis C, Moulin M, Haertlein M, Callow P, Mély Y, Svergun DI, Moras D. Common architecture of nuclear receptor heterodimers on DNA direct repeat elements with different spacings. *Nat Struct Mol Biol*. 2011; 18(5):564-70.

Supplementary Figure 1

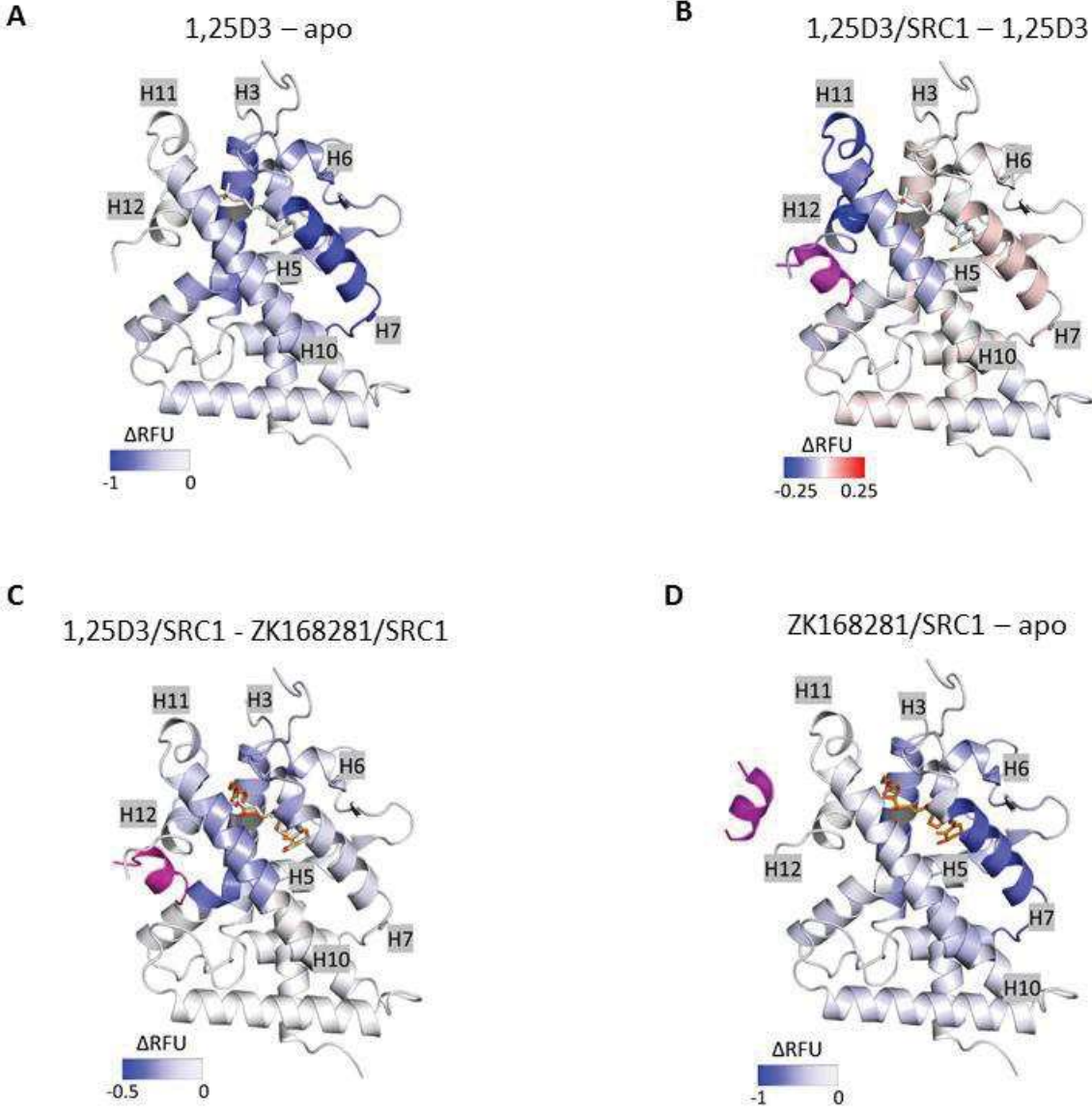


Total: 167 Peptides, 99.0% Coverage, 6.52 Redundancy

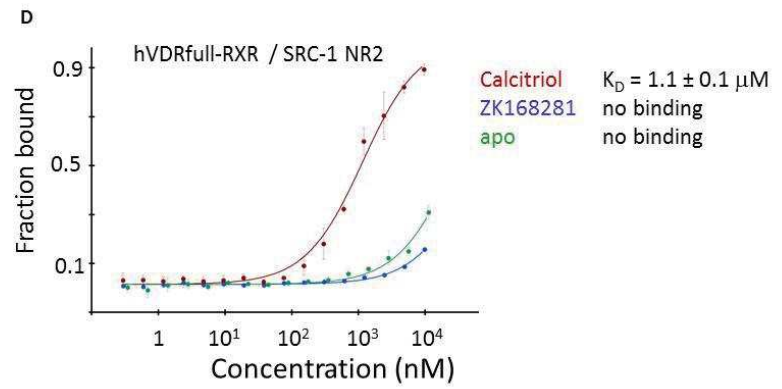
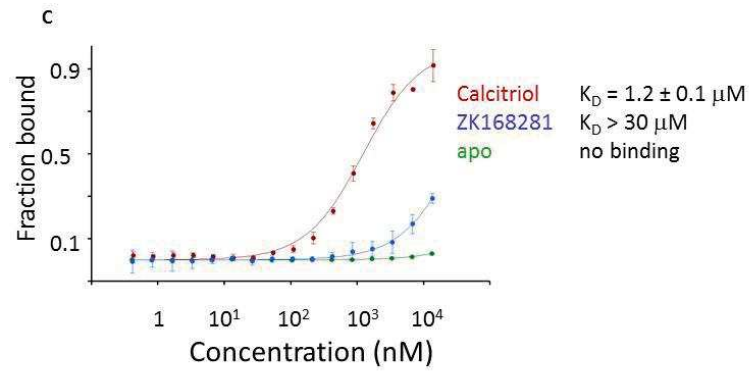
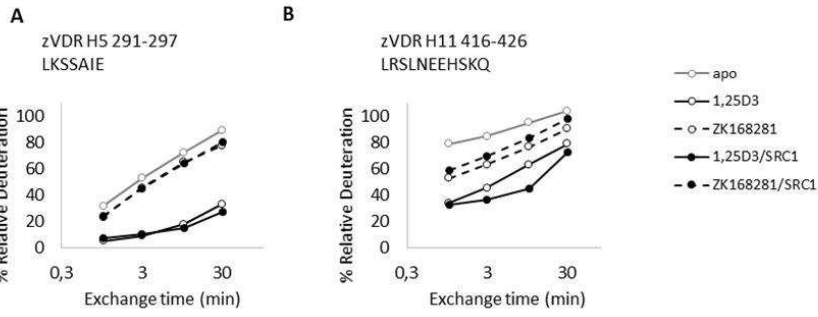
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



Supplementary Table 1

zVDR-ZK168281

PDB ID

Data collection

Space group	P 65 2 2
Unit cell (a, b, c (Å) , α, β, γ (°))	66.15, 66.15, 265.31, 90, 90, 120
Resolution	35.0-3.0
Multiplicity	1.9 (1.9)
Completeness (%)	0.98 (1.00)
Mean I/sigma(I)	9.82 (1.83)
R-merge	0.03651 (0.4271)
CC _{1/2}	0.999 (0.831)

Refinement

Resolution	35.0-3.0
N° reflections	7441
R-work	0.2149
R-free	0.2591
N° atoms	
macromolecules	1996
ligands	37
water	19
RMS(bonds)	0.002
RMS(angles)	0.46
B-factor	98.80
macromolecules	99.03
ligands	86.86
water	98.22

3.4.3 Résumé des principaux résultats de la caractérisation biophysique de l'effet du ZK168281

Dans cette partie, sont décrits les résultats supplémentaires aux données mentionnées dans les publications. Nous avons caractérisé l'affinité de liaison de ZK168281 pour VDR par MST ainsi que son effet sur l'hétérodimérisation entre le LBD de RXR et les LBDs du VDR humain et de poisson zèbre. L'effet du ZK168281 sur le recrutement de peptides corégulateurs par VDR a été caractérisé en plus de la MST par spectrométrie de masse en conditions natives. Les données fonctionnelles ayant identifiées une séquestration de VDR dans le cytoplasme lors de la fixation de ZK168281 par l'intermédiaire de Wbp4, nous avons caractérisé l'effet du ZK168281 sur la liaison de VDR avec la protéine Wbp4.

3.4.3.1 Caractérisation de l'affinité de liaison du ZK168281 pour le VDR

Dans un premier temps, j'ai caractérisé l'affinité de liaison du ZK168281 au LBD de VDR par la méthode de MST. La figure 31 présente les courbes de liaison de ZK168281 et de 1,25D3 pour le LBD du VDR humain. Les constantes de dissociation obtenues montrent une affinité de liaison du ZK168281 ($K_D=111$ nM) légèrement supérieure à celle de la 1,25D3 ($K_D=172$ nM).

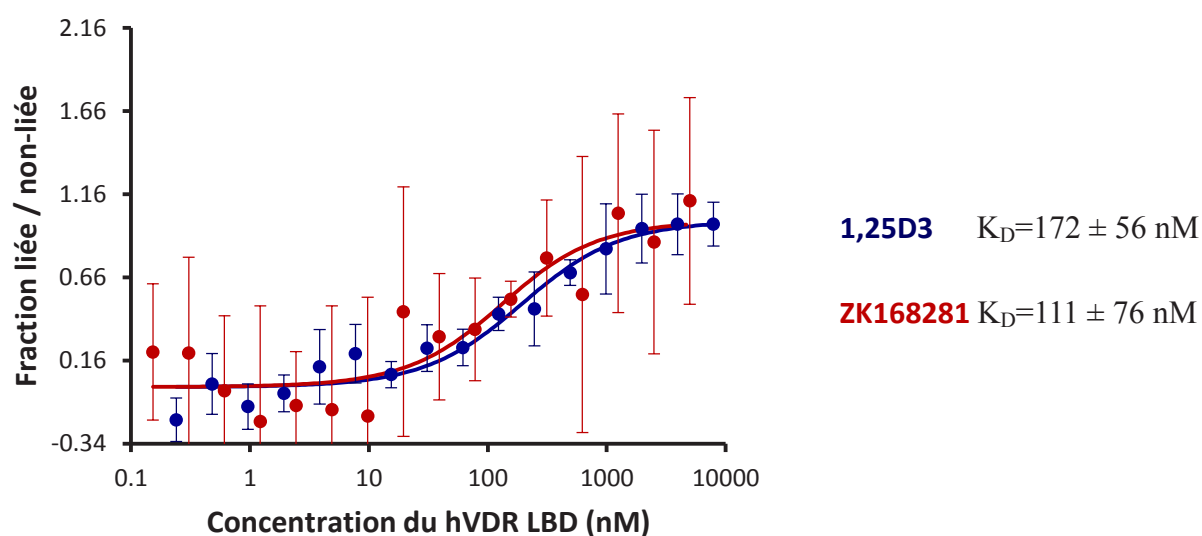


Figure 31 : Courbes sigmoïdales permettant la détermination des constantes de dissociation (K_D) caractérisant l'interaction entre le VDR LBD et 1,25D3 (en bleu) ou le ZK168281 (en rouge). Les barres d'erreur sur les trois mesures sont représentées pour chaque point.

3.4.3.2 Effet du ZK168281 sur l'hétérodimérisation du VDR avec le RXR α

J'ai ensuite utilisé la méthode de SPR pour caractériser l'effet de ZK168281 sur l'interaction du LBD du VDR pour le LBD de RXR α humain, en l'absence de ligand de RXR. Les courbes de titration ont été déterminées pour le VDR humain (résultats présentés sur la figure 2a et la publication 2) et pour le VDR du poisson zèbre (résultats présentés sur la figure supplémentaire 5 dans la publication 2). Les valeurs de K_D calculées à partir de ces courbes sont présentées dans le tableau 4 ci-dessous. La protéine hVDR LBD non ligandé présente l'affinité la plus faible pour RXR LBD. La présence de ZK168281 dans VDR stabilise la formation de l'hétérodimère avec une affinité 9 fois supérieure à celle de la forme apo. L'effet de ZK168281 est semblable à celle de 1,25D3. Les résultats sont similaires pour la protéine du poisson zèbre, en présence de ZK168281, l'affinité d'hétérodimérisation est similaire à celle observée en présence de 1,25D3 et 6 fois à celle de la protéine sous forme apo. Nos

résultats permettent de conclure que le ZK168281 stabilise l'hétérodimérisation du VDR avec son partenaire RXR de façon similaire à 1,25D3.

Tableau 4: Caractérisation de l'effet du ZK168281 sur l'hétérodimérisation entre les LBDs de VDR et RXR par SPR

	VDR humain K_D (μM)	VDR du poisson zèbre K_D (μM)
VDR LBD apo – RXR LBD apo	4,6±0,5	2,9±0,2
VDR LBD vitD – RXR LBD apo	0,7±0,2	0,4±0,1
VDR LBD ZK168281 – RXR LBD apo	0,5±0,1	0,5±0,03

3.4.3.3 Effet du ZK16281 sur le recrutement de peptides co-régulateurs par VDR

ZK168281, ligand dont l'activité antagoniste a été montrée dans des tests de transactivation est supposé affecter l'interaction avec les corégulateurs. J'ai testé l'effet de ZK168281 lié à VDR sur le recrutement des peptides de corégulateurs. Il a été démontré que SRC1 NR2 lie VDR LBD et RXR LBD avec une grande affinité en présence des ligands agonistes (Rochel et al., 2011; Sato et al., 2010). Ainsi, le NCoR ID2 est recruté au niveau de VDR/RXR de manière ligand-dépendante (Sanchez-Martinez et al., 2008). Les interactions de VDR/RXR humain entier et du LBD du VDR du poisson zèbre pour les peptides du coactivateur SRC1 NR2 et du corépresseur NCoR ID2 ont été mesurées par la méthode de MST. Les résultats obtenus présentés sur la figure 32 montrent qu'en présence de ZK168281, le complexe VDR/RXR entier humain et le domaine de fixation du ligand LBD du zVDR n'interagissent plus ou avec une affinité très faible avec le peptide du coactivateur SRC1 NR2 en comparaison de l'interaction observée en présence de 1,25D3. En parallèle, l'affinité d'interaction du VDR/RXR pour le peptide NCoR ID2 est plus grande en présence du ZK168281 comparée à celle du complexe apo ou en présence de 1,25D3. Ces données de perte d'interaction avec le coactivateur sont en accord avec une conformation antagoniste adoptée par VDR en présence du ZK168281 et confirment les études montrant sa capacité à

recruter NCoR (Lempiainen et al., 2005) et à inhiber l'interaction de VDR/RXR avec les coactivateurs (SRC1 et DRIP205) (Zella et al., 2007).

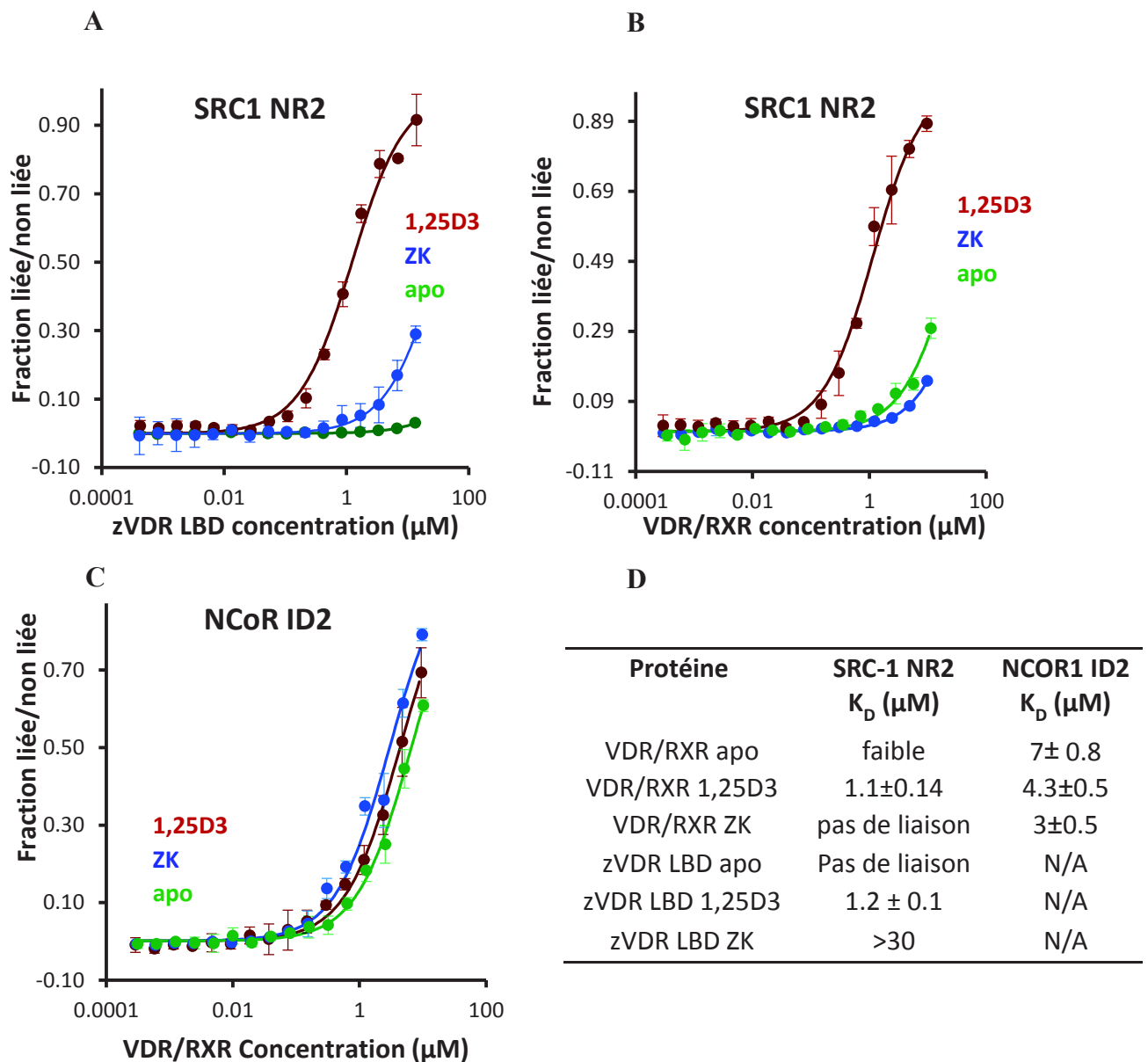


Figure 32 : Caractérisation par MST de l'effet du ZK168281 sur l'interaction du VDR avec les peptides corégulateurs. Interaction du peptide SRC1 NR2 avec (A) zVDR LBD et (B) hVDR/hRXR α . (C) Interaction de NCoR ID2 avec hVDR/hRXR α . (D) Tableau récapitulatif des constantes de dissociation.

3.4.3.4 Caractérisation des complexes de zVDR et hVDR, en présence du ZK168281 et du peptide de co-activateur SRC1 NR2, par spectrométrie de masse, en conditions natives

L'analyse de la formation des complexes entre les LBDs de hVDR ou zVDR et ZK168281 ou ZK168281 et SRC1 NR2 a été faite après mélange des composants avec une stœchiométrie de 1:1 ou 1:1:1.

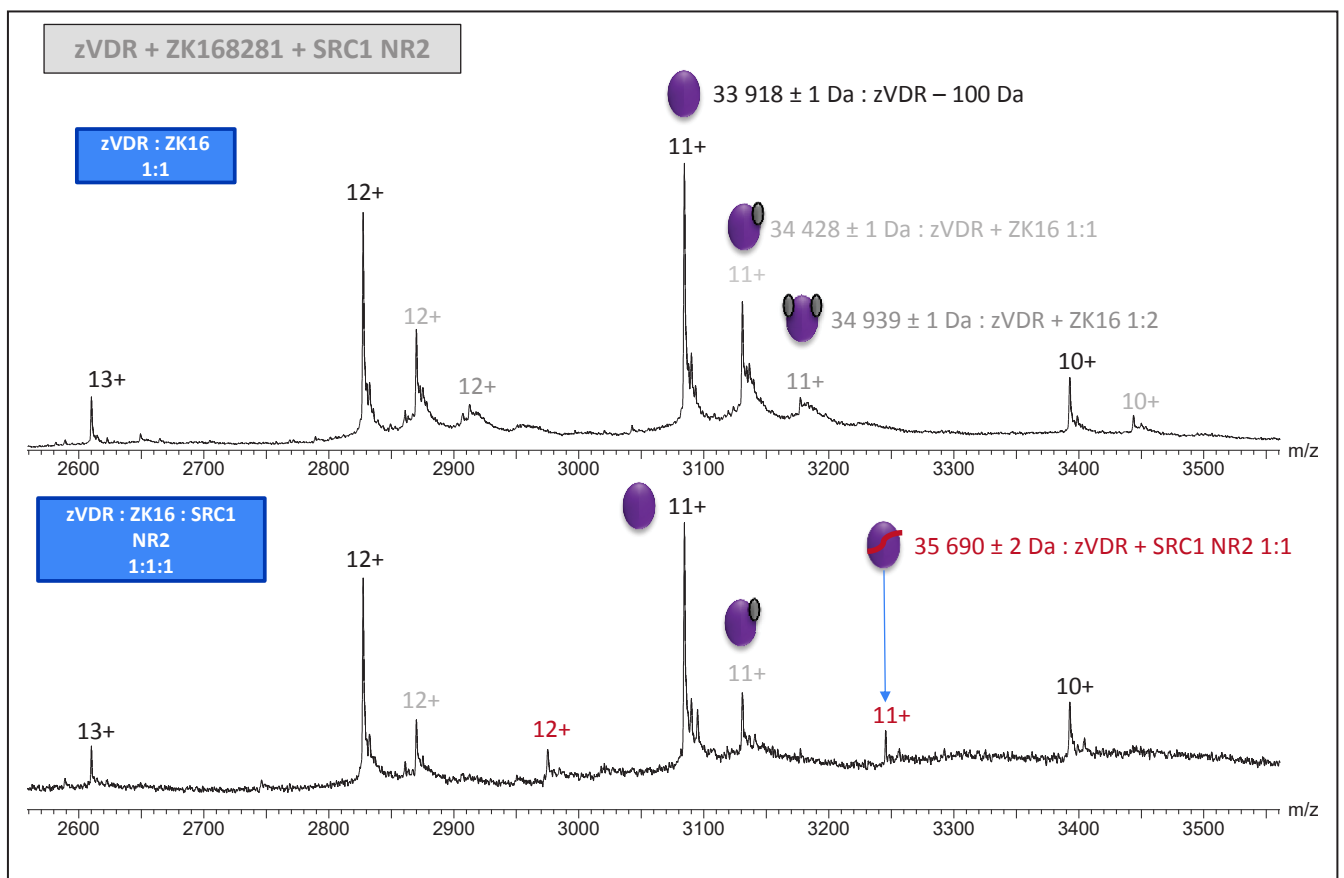


Figure 33 : Spectres de spectrométrie de masse en conditions natives du zVDR/ZK168281 seul et en présence de SRC1 NR2

Dans les conditions de la spectrométrie de masse (phase gazeuse et voltage de 80V), on observe que dans le cas du complexe zVDR LBD/ZK168281 (panneau supérieure de la figure 33), le zVDR LBD est majoritairement sous forme non ligandé. ZK168281 se lie au LBD de zVDR avec une stœchiométrie de 1 pour 1 et un pic minoritaire correspond à la fixation de 2

ligands par zVDR. Dans le cas du complexe zVDR LBD/ZK168281/SRC1 présenté dans la partie inférieure de la figure 33, le zVDR LBD est majoritairement sous forme non ligandé avec un pic minoritaire correspondant au zVDR apo lié au peptide. Un second pic très minoritaire correspond au complexe zVDR LBD/ZK168281. Aucun complexe de zVDR/ZK168281 avec SRC1 NR2 n'est observé.

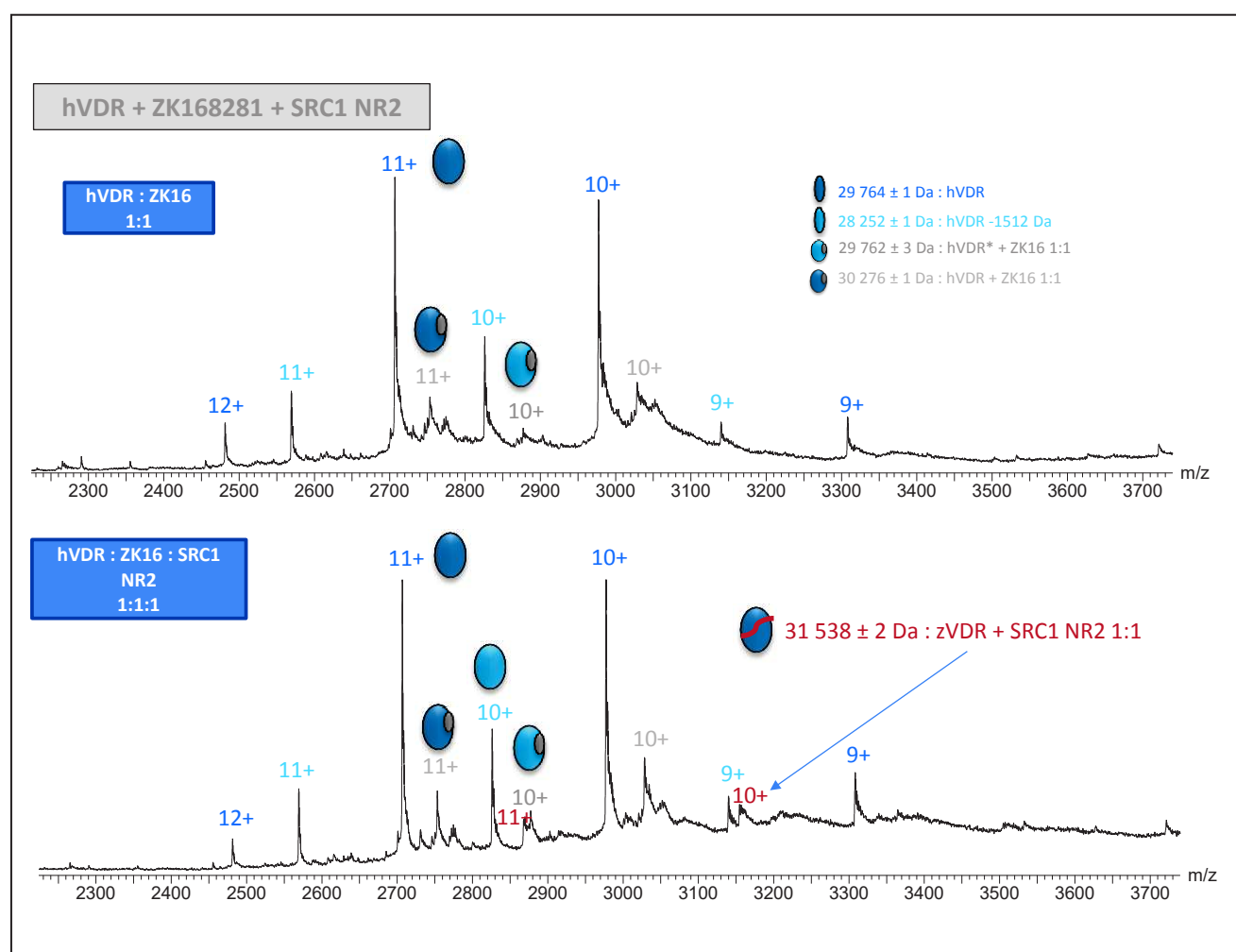


Figure 34 : Spectres de spectrométrie de masse en conditions natives du hVDR/ZK168281 seul et en présence de SRC1 NR2

Dans le cas du complexe hVDR LBD/ZK168281 dans les mêmes conditions expérimentales notamment de voltage, le spectre présenté dans la partie supérieure de la figure 34 montre

que le LBD de hVDR est majoritairement sous forme non ligandé. Trois formes minoritaires correspondent au hVDR LBD liée au ZK168281 avec une stœchiométrie de 1:1 ainsi qu'une autre forme tronquée de hVDR apo liée au ZK168281. Dans le cas du complexe hVDR LBD/ZK168281/SRC1 présenté dans la partie inférieure de la figure 34, hVDR LBD est majoritairement sous forme non ligandé et des formes minoritaires correspondent aux complexes avec ZK168281. Un petit pic sort du bruit de fond et correspond au complexe hVDR LBD/SRC1. Aucun complexe de hVDR/SRC1 n'est observé en présence de ZK168281 dans ces conditions.

Ces résultats sont en accord avec les résultats de MST et démontrent une faible affinité des LBDs de zVDR ou hVDR pour le peptide co-activateur SRC1 NR2.

3.4.3.5 Caractérisation de l'effet du ZK168281 sur la liaison de VDR avec la protéine WBP4

L'étude *in vivo* du ligand ZK168281 par l'équipe de Daniel Metzger a révélé que le mécanisme antagoniste du ZK168281 est médié par la protéine Wbp4. Le recrutement de Wbp4 par VDR est démontré par des expériences d'immuno-précipitations sur des cellules IEC18 traitées par la combinaison ZK168281 et 1,25D3 ainsi qu'en présence du ZK168281 et de kétoconazole (données de la publication 2). Lors de la fixation du ligand antagoniste, le VDR est séquestré dans le cytoplasme car il interagit avec Wbp4 qui prévient sa translocation dans le noyau.

Pour quantifier l'affinité de liaison entre VDR et Wbp4, nous avons caractérisé celle-ci par la méthode de MST en marquant le VDR humain entier par une sonde fluorescence et en titrant avec des concentrations croissantes du domaine WW de hWbp4 (112-196). Les résultats sont présentés sur la figure 35 et montrent que l'interaction entre VDR et Wbp4 en présence du

ZK168281 ($K_D=11 \mu\text{M}$) est supérieure à celle mesurée en présence de 1,25D3 ou en condition apo ($K_D > 20 \mu\text{M}$).

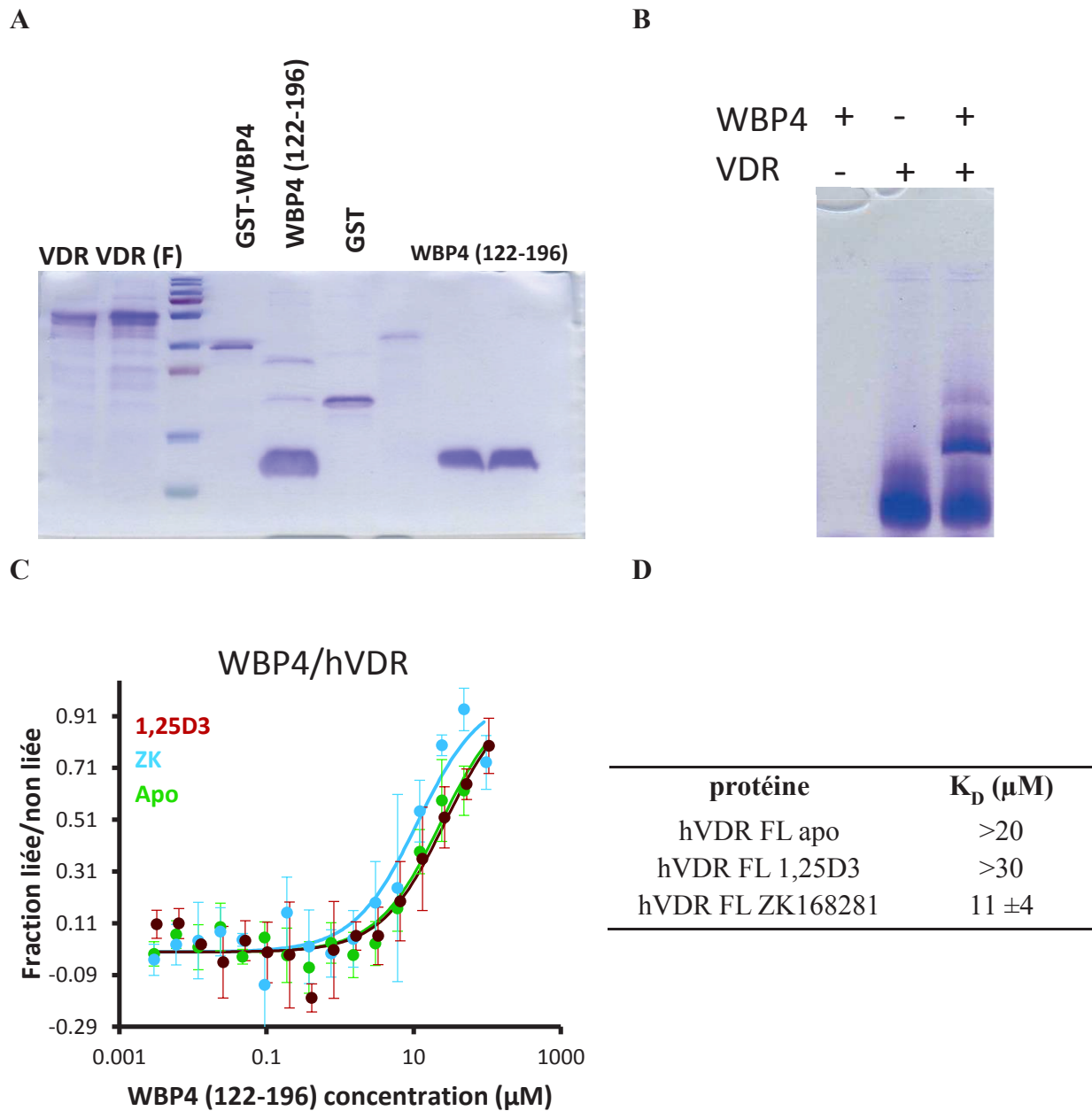


Figure 35: Caractérisation de l'interaction du VDR avec la protéine WBP4. (A) SDS-page 15% montrant les protéines purifiées. (hVDR entier, hVDR entier marqué avec la sonde NHS-rouge fluorescente (Monolith protein labeling kit- Red NHS second generation), MW : marqueur de taille protéique, GST-WBP4(122-196), WBP4(122-196) après coupure de l'étiquette GST par la thrombine, étiquette GST, WBP4(122-196) après purification. (B) Gel natif avec un gradient 4-15% montrant la formation d'une bande supérieure (marquée en rouge) dans le cas d'ajout du ZK168281 au mélange de WBP4 et hVDR entier. Cette bande a été analysée par spectrométrie de masse et correspond à un complexe entre WBP4 (122-196)

et hVDR entier. (C) Caractérisation par MST de l'effet des ligands sur l'interaction de VDR/WBP4. (D) Tableau montrant les constantes de dissociation.

3.5 Discussion et perspectives

A ce jour, un grand nombre d'analogues de la vitamine D3 ont été synthétisés pour atteindre 4000 analogues. La plupart possède des activités agonistes puissantes et sélectives du récepteur de la vitamine D, peu d'entre eux exerçant des activités antagonistes. Le développement de tels ligands peuvent être utiles pour le traitement de l'hypercalcémie induite par des taux élevés de calcitriol circulant, en particulier pour le traitement de l'hypercalcémie idiopathique infantile « IIH », une des pathologies génétiques rares à l'origine de l'hypercalcémie causée par l'hypervitaminose D.

Parmi ces ligands antagonistes décrits dans la littérature, le ligand ZK168281 a été décrit comme antagoniste du VDR. L'étude présentée dans cette partie est focalisée sur la caractérisation biophysique du mécanisme d'action du ZK168281. Ce projet a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Daniel Metzger à l'IGBMC qui a caractérisé *in vitro* et *in vivo* et montré que la combinaison de 1,25D3 et de ZK168281 peut normaliser l'hypercalcémie chez des modèles de souris ainsi que dans des cellules issues de patient atteint d'hypercalcémie idiopathique infantile « IIH ». En parallèle, nous avons mené une étude comparative pour caractériser l'effet du ligand antagoniste ZK168281 sur diverses propriétés de VDR humain ou de poisson zèbre par des méthodes biophysiques. Nos résultats montrent que ZK168281 se lie au VDR avec une affinité légèrement supérieure à celle de 1,25D3 et stabilise l'hétérodimère de la même manière que 1,25D3. La méthode d'échange hydrogène-deutérium couplée à la spectrométrie de masse a permis de montrer que la liaison du ZK168281 au VDR humain induit une conformation inactive au niveau de l'hélice H12 similaire à celle du VDR apo et que l'interface de liaison de l'hétérodimère des DBD à l'ADN

est semblable à celle observé en présence de 1,25D3. Les résultats biophysiques que j'ai obtenus, sont en accord avec ces données structurales, démontrant que la présence du ZK168281 n'affecte pas l'interface d'hétérodimérisation et empêche les coactivateurs d'interagir.

Généralement les antagonistes régulent la transcription des gènes en favorisant le recrutement des corépresseurs et diminuant le recrutement des coactivateurs. Pour cela, nous avons caractérisé l'effet de la liaison du ZK168281 sur le recrutement du coactivateur SRC1 NR2 et corépresseur NCoR ID2 par les méthodes de thermophorèse à micro-échelle et spectrométrie de masse en condition native. Les résultats montrent une perte d'affinité du recrutement du SRC1 par hVDR/RXR ou zVDR en présence du ZK168281 ainsi qu'une meilleure affinité pour NCoR.

Les résultats de nos collaborateurs ont montré que chez des souris traitées, le ZK168281 antagonise l'effet de la 1,25D3 pour la transcription des gènes cible de la vitamine D impliqué dans la régulation de la calcémie (*cyp24a1*, *slc30a10*, *slc37a2*, *Nkain1* et *Atp2b1*). De plus, la combinaison du traitement normalise les taux du calcium au niveau de l'intestin et du rein chez les souris. Nous avons montré que l'effet sur la transcription observé chez la souris, est similaire pour le VDR humain ou le VDR de poisson zèbre. Les résultats de transactivation du *CYP24* dans les deux lignées cellulaires, HEK-293 transfecté avec VDR humain et IEC18 transfecté avec le VDR du poisson zèbre, ont montré une diminution de l'activité transcriptionnelle dose-dépendante, inhibant l'activité de 1,25D3.

D'autre part, les résultats *in vivo* ont montré que le mécanisme antagoniste du ZK168281 implique l'interaction avec Wbp4 qui induit le blocage de VDR dans le cytoplasme. Pour caractériser l'interaction et la formation du complexe VDR/WBP4, nous avons quantifié l'interaction par MST et montré une affinité accrue en présence du ligand antagoniste.

En conclusion, nos résultats permettent de confirmer l'activité antagoniste du ZK168281 sur le recrutement de régulateurs et sur l'activation de la transcription des gènes. ZK168281 agit comme antagoniste en déstabilisant la conformation agoniste du VDR, empêchant l'interaction avec les coactivateurs mais surtout par son effet sur l'interaction avec la protéine Wbp4 et la séquestration de VDR dans le cytoplasme. Le Wbp4 est donc une protéine essentielle dans le mécanisme antagoniste du ZK168281. Peu de données sur Wbp4 sont décrites dans la littérature. Wbp4 contient deux domaines structurés WW1 et WW2 connectés par une région flexible. Wbp4 est connu pour son rôle fonctionnel dans la formation du complexe pré-épissage (Huang et al., 2009). Dans ce contexte, Wbp4 contient des séquences riches en proline importantes pour la formation de complexes avec différents facteurs d'épissage SIPP1, des ribonucléoprotéines (snRNP) pour former le spliceosome (Bedford et al., 1998; Huang et al., 2009; Klippel et al., 2011). Nous montrons dans cette étude un rôle de Wbp4 dans la séquestration de VDR dans le cytoplasme inhibant la translocation de VDR. Le VDR non ligandé est localisé dans le cytoplasme et le noyau. Lors de la liaison du calcitriol, le VDR cytoplasmique est alors transloqué dans le noyau (Han et al., 2010). La fixation de ZK168281 par VDR permettant à celui-ci d'interagir avec Wbp4, empêche cette translocation. Notre perspective sera de caractériser les régions d'interactions entre VDR et Wbp4 en présence du ZK168281 par des méthodes structurales. Ces données seront nécessaires pour une meilleure compréhension du mécanisme d'action et du rôle de Wbp4.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Mes travaux de thèse ont porté sur deux axes de recherche: la caractérisation de l'effet du ligand de RXR, le 9-cis RA, sur l'activité de l'hétérodimère VDR/RXR, et la caractérisation du mécanisme d'action antagoniste de VDR du ZK168281.

VDR et son ligand, le calcitriol, jouent un rôle important dans l'homéostasie du calcium et du phosphate, dans la différenciation et prolifération cellulaires et dans l'immunité. VDR est une cible pharmaceutique prometteuse dans le traitement de nombreuses maladies dont des cancers, des maladies auto-immunes, de maladies infectieuses et cardio-vasculaires, et également de désordres de la minéralisation osseuse. Une meilleure compréhension des voies de signalisation de la vitamine D3 est cependant nécessaire pour permettre de telles applications.

VDR forme un hétérodimère fonctionnel avec RXR dont le 9cisRA est l'un des ligands. Les données de la littérature sur le rôle du ligand de RXR sur les activités transcriptionnelles de VDR/RXR sont contradictoires, d'où l'importance d'étudier l'effet du 9cisRA sur les propriétés et activités de VDR/RXR. L'étude présentée dans cette thèse intègre des données biophysiques et cellulaires qui montrent que le 9cisRA lié à l'hétérodimère VDR/RXR n'a aucun effet sur la dimérisation de VDR avec RXR, sur l'interaction de VDR/RXR avec les éléments de réponse de l'ADN des gènes *sema5*, *s100g* et *slc37a2* et sur l'interaction de VDR/RXR avec le peptide coactivateur SRC1 NR2. VDR est activé par son seul ligand et les tests de transactivation transitoire indiquent que VDR/RXR est un hétérodimère non-permissif. Cependant, l'analyse des transcrits des 3 gènes étudiés indiquent que 9cisRA inhibe l'action du calcitriol.

Parmi les 4000 analogues du calcitriol, très peu sont des ligands antagonistes de VDR. ZK168281 est l'un des premiers ligands antagonistes décrits mais son action *in vivo* n'avait pas été étudiée. La deuxième étude présentée dans cette thèse porte sur l'étude du mécanisme d'action de ce ligand *in vitro* et *in vivo*. Elle a été faite en collaboration avec l'équipe de D. Metzger à l'IGBMC. Les données biophysiques obtenues montrent que ZK168281 perturbe la région C-terminale du VDR empêchant le complexe d'adopter une conformation agoniste et de recruter les coactivateurs. ZK168281 agit donc bien comme un antagoniste de VDR pour différentes espèces. De plus, les données cellulaires ont montré que ZK168281 possède une capacité à inhiber la translocation du VDR dans le noyau par l'intermédiaire de la protéine wbp4. Ces travaux mettent en lumière un nouveau mécanisme antagonisme de VDR par séquestration cytoplasmique. Il conviendra d'étudier attentivement la formation de ce complexe.

Ces données soulignent la complexité de la régulation du VDR et confirment l'importance d'étudier tous les aspects de régulation pour une meilleure compréhension des voies de signalisation régulées par la vitamine D et pour permettre le développement d'analogues plus efficaces.

Références

- Adams, J.S., and Hewison, M. (2012). Extrarenal expression of the 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase. *Arch Biochem Biophys* 523, 95-102.
- Al Mutair, A.N., Nasrat, G.H., and Russell, D.W. (2012). Mutation of the CYP2R1 vitamin D 25-hydroxylase in a Saudi Arabian family with severe vitamin D deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 97, E2022-2025.
- Allen, B.L., and Taatjes, D.J. (2015). The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nature reviews Molecular cell biology* 16, 155-166.
- Anami Y, I.T., Egawa D, Yoshimoto N, Yamamoto K. (2014). A mixed population of antagonist and agonist binding conformers in a single crystal explains partial agonism against vitamin D receptor: active vitamin D analogues with 22R-alkyl group. *J Med Chem* 57, 4351–4367.
- Anami Y, S.Y., Itoh T, Inaba Y, Nakabayashi M, Ikura T, Ito N, Yamamoto K. (2015). Fine tuning of agonistic/antagonistic activity for vitamin D receptor by 22-alkyl chain length of ligands: 22S-Hexyl compound unexpectedly restored agonistic activity. *Bioorg Med Chem Lett* 23, 7224–7281.
- Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11, R106.
- Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166-169.
- Arnaud C., M.R., Reade T., Scriver C.R., Whelan D.T. (1970). Vitamin D dependency: an inherited postnatal syndrome with secondary hyperparathyroidism. *Pediatrics* 46, 871–880.
- Asturias F.J., J.Y.W., Myers L.C., Gustafsson C.M. and Kornberg R.D. (1999). Conserved structures of mediator and RNA polymerase II holoenzyme. *Science* 283, 985–987.
- Balananda-Dhurjati K. Putchaa, E.W., Joseph S. Brunzelleb, Elias J. Fernandez (2012). Structural basis for negative cooperativity within agonist-bound TR:RXR heterodimers *PNAS* 109, 6084–6087
- Baniahmad, A.e.a. (1995). The tau 4 activation domain of the thyroid hormone receptor is required for release of a putative corepressor(s) necessary for transcriptional silencing. *Molecular and cellular biology* 15, 76–86.
- Bartik, L., Whitfield, G.K., Kaczmarska, M., Lowmiller, C.L., Moffet, E.W., Furnick, J.K., Hernandez, Z., Haussler, C.A., Haussler, M.R., and Jurutka, P.W. (2010). Curcumin: a novel nutritionally derived ligand of the vitamin D receptor with implications for colon cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem* 21, 1153-1161.
- Batie, S., Lee, J.H., Jama, R.A., Browder, D.O., Montano, L.A., Huynh, C.C., Marcus, L.M., Tsosie, D.G., Mohammed, Z., Trang, V., *et al.* (2013). Synthesis and biological evaluation of halogenated curcumin analogs as potential nuclear receptor selective agonists. *Bioorganic & medicinal chemistry* 21, 693-702.
- Bedford, M.T., Reed, R., and Leder, P. (1998). WW domain-mediated interactions reveal a spliceosome-associated protein that binds a third class of proline-rich motif: the proline glycine and methionine-rich motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10602-10607.
- Berridge, M.J. (2018). Vitamin D deficiency: infertility and neurodevelopmental diseases (attention deficit hyperactivity disorder, autism, and schizophrenia). *American journal of physiology Cell physiology* 314, C135-C151.
- Bettoun, D.J., T.P., B., Houck, K.A., D.W., B., K.R., S., Khalifa, B., Lu, J., Chin, W.W., and Nagpal, S. (2003). Retinoid X receptor is a nonsilent major contributor to vitamin D receptor-mediated transcriptional activation. *Mol Endocrinol* 17, 2320-2328.
- Boehm, M.F.F., P.; Zou, A.; Elgort, M. G.; Bischoff, E. D.; Mere, L.; Mais, D. E.; Bissonnette, R. P.; Heyman, R. A.; Nadzan, A. M.; Reichman, M.; Allegretto, E. A. (1999). Novel nonsecosteroidal

vitamin D mimics exert VDR-modulating activities with less calcium mobilization than 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Chem Biol* 6, 265–275.

Bouillon, R., Carmeliet, G., Verlinden, L., van Etten, E., Verstuyf, A., Luderer, H.F., Lieben, L., Mathieu, C., and Demay, M. (2008). Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 29, 726-776.

Bouillon, R., Okamura, W.H., and Norman, A.W. (1995). Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 16, 200-257.

Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995). Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- α . *Nature* 375, 377-382.

Briot K, A.M., Cortet B, Fardellone P, Marcelli C, Orcel P, Vellas B, Thomas T, Roux C. (2009). Vitamin D: skeletal and extra skeletal effects; recommendations for good practice. *Presse Med* 38, 43- 54.

Burakov, D., Wong, C.W., Rachez, C., Cheskis, B.J., and Freedman, L.P. (2000). Functional interactions between the estrogen receptor and DRIP205, a subunit of the heteromeric DRIP coactivator complex. *J Biol Chem* 275, 20928-20934.

Bury, Y., Steinmeyer, A., and Carlberg, C. (2000). Structure activity relationship of carboxylic ester antagonists of the vitamin D(3) receptor. *Mol Pharmacol* 58, 1067-1074.

Carlberg, C. (1995). Mechanisms of nuclear signalling by vitamin D₃. Interplay with retinoid and thyroid hormone signalling. *European journal of biochemistry* 231, 517-527.

Carlberg, C., Bendik, I., Wyss, A., Meier, E., Sturzenbecker, L.J., Grippo, J.F., and Hunziker, W. (1993). Two nuclear signalling pathways for vitamin D. *Nature* 361, 657-660.

Carlberg, C., Molnar, F., and Mourino, A. (2012). Vitamin D receptor ligands: the impact of crystal structures. *Expert opinion on therapeutic patents* 22, 417-435.

Carlberg, C., and Polly, P. (1998). Gene regulation by vitamin D₃. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 8, 19-42.

Carpenter, T.O. (2017). CYP24A1 loss of function: Clinical phenotype of monoallelic and biallelic mutations. *J Steroid Biochem Mol Biol* 173, 337-340.

Cavaillès, V., Dauvois, S., Danielian, P.S., and Parker, M.G. (1994). Interaction of proteins with transcriptionally active estrogen receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10009-10013.

Cavaillès, V., Dauvois, S., L'Horset, F., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P.J., and Parker, M.G. (1995). Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J* 14, 3741-3751.

Chakravarti D., L.V.J., Nelson M.C., Nakajima T., Schulman I.G., Juguilon H., Montminy M., Evans R.M. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* 383, 99-103.

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

Cheng, J.B., Levine, M.A., Bell, N.H., Mangelsdorf, D.J., and Russell, D.W. (2004). Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7711-7715.

Cheskis, B., and Freedman, L.P. (1994). Ligand modulates the conversion of DNA-bound vitamin D₃ receptor (VDR) homodimers into VDR-retinoid X receptor heterodimers. *Mol Cell Biol* 14, 3329-3338.

Cheskis, B.J., Freedman, L.P., and Nagpal, S. (2006). Vitamin D receptor ligands for osteoporosis. *Curr Opin Investig Drugs* 7, 906-911.

Cho K., U.F., Kato-Nakamura Y., Namekawa J., Ishizuka S., Takenouchi K., Nagasawa K. (2008). Structure-activity relationship studies on vitamin D lactam derivatives as vitamin D antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 18, 4287–4290.

Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L., and Carmeliet, G. (2016). Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiological reviews* 96, 365-408.

Christakos S., R.-P.M., Wernyj R.P., Yang W. (1996). Genomic mechanisms involved in the pleiotropic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem J* 316, 361-371.

Ciesielski, F., Sato, Y., Chebaro, Y., Moras, D., Dejaegere, A., and Rochel, N. (2012). Structural basis for the accommodation of bis- and tris-aromatic derivatives in vitamin D nuclear receptor. *J Med Chem* *55*, 8440-8449.

Ciesielski F., R.N., Moras D. (2007). Adaptability of the Vitamin D nuclear receptor to the synthetic ligand Gemini: remodelling the LBP with one side chain rotation. *J Steroid Biochem Mol Biol* *103*, 235-242.

Courbebaisse, M., and Souberbielle, J.C. (2011). [Phosphocalcic metabolism: regulation and explorations]. *Nephrol Ther* *7*, 118-138.

Dalvin, S., Komatsuzaki, K., Anselmo, M.A., Kling, D.E., Schnitzer, J.J., and Kinane, T.B. (2004). Retinoic acid decreases fetal lung mesenchymal cell proliferation in vivo and in vitro. *Development, growth & differentiation* *46*, 275-282.

Davis, J.A., Takagi, Y., Kornberg, R.D., and Asturias, F.A. (2002). Structure of the yeast RNA polymerase II holoenzyme: Mediator conformation and polymerase interaction. *Mol Cell* *10*, 409-415.

Delage-Mourroux R., M.P.G., Choi I., Kraichely D.M., Hoeksema J., Katzenellenbogen B.S. (2000). Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA) and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA. *J Biol Chem* *275*, 35848–35856.

DeLuca, H.F., and Plum, L.A. (2016). Analogs of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D(3) in Clinical Use. *Vitamins and hormones* *100*, 151-164.

Devarakonda, S.e.a. (2011). Disorder-to-order transition underlies the structural basis for the assembly of a transcriptionally active PGC-1 α /ERR γ complex. . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 18678–18683.

Di Somma, C., Scarano, E., Barrea, L., Zhukouskaya, V.V., Savastano, S., Mele, C., Scacchi, M., Aimaretti, G., Colao, A., and Marzullo, P. (2017). Vitamin D and Neurological Diseases: An Endocrine View. *Int J Mol Sci* *18*.

DiRenzo, J., Soderstrom, M., Kurokawa, R., Ogliaastro, M.H., Ricote, M., Ingre, S., Horlein, A., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (1997). Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors. *Mol Cell Biol* *17*, 2166-2176.

Dusso, A.S., Brown, A.J., and Slatopolsky, E. (2005). Vitamin D. *American journal of physiology Renal physiology* *289*, F8-28.

Ebeling, P.R., Adler, R.A., Jones, G., Liberman, U.A., Mazziotti, G., Minisola, S., Munns, C.F., Napoli, N., Pittas, A.G., Giustina, A., *et al.* (2018). MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Therapeutics of Vitamin D. *European journal of endocrinology* *179*, R239-R259.

Eelen G., V.L., Rochel N., Claessens F., De Clercq P., Vandewalle M., Tocchini-Valentini G., Moras D., Bouillon R., Verstuyf A. (2005). Superagonistic action of 14-epi-analogs of 1,25-dihydroxyvitamin D explained by vitamin D receptor-coactivator interaction. . *Mol Pharmacol* *67*, 1566–1573.

Egea, P.F., Mitschler, A., Rochel, N., Ruff, M., Chambon, P., and Moras, D. (2000). Crystal structure of the human RXR α ligand-binding domain bound to its natural ligand: 9-cis retinoic acid. *EMBO J* *19*, 2592-2601.

Epping M.T., W.L., Edel M.J., Carlee L., Hernandez M., Bernards R. (2005). The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell* *122*, 835–847.

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

Everts, H.B., Sundberg, J.P., and Ong, D.E. (2005). Immunolocalization of retinoic acid biosynthesis systems in selected sites in rat. *Experimental cell research* *308*, 309-319.

Feng W., R.C.J.R., R.L Wagner, H Nguyen, J.A Apriletti, R.J Fletterick, J.D Baxter, P.J Kushner, B.L West (1998). Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* *280*, 1747-1749.

Fernandes I., B.Y., Wai T., Nygard K., Lin R., Cormier O., Lee H.S., Eng F., Bertos N.R., Pelletier N. (2003). Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell* *11*, 139–150.

Figueres, M.L., Linglart, A., Bienaime, F., Allain-Launay, E., Roussey-Kessler, G., Ryckewaert, A., Kottler, M.L., and Hourmant, M. (2015). Kidney function and influence of sunlight exposure in patients with impaired 24-hydroxylation of vitamin D due to CYP24A1 mutations. *Am J Kidney Dis* 65, 122-126.

Flanagan, P.M., Kelleher, R.J., 3rd, Sayre, M.H., Tschochner, H., and Kornberg, R.D. (1991). A mediator required for activation of RNA polymerase II transcription in vitro. *Nature* 350, 436-438.

Fleet, J.C. (2017). The role of vitamin D in the endocrinology controlling calcium homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 453, 36-45.

Fleet, J.C., DeSmet, M., Johnson, R., and Li, Y. (2012). Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem J* 441, 61-76.

Fondell, J.D., Ge, H., and Roeder, R.G. (1996). Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8329-8333.

Forman, B.M., Umesono, K., Chen, J., and Evans, R.M. (1995). Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* 81, 541-550.

Foulds, C.E.e.a. (2013). Proteomic analysis of coregulators bound to ER α on DNA and nucleosomes reveals coregulator dynamics. *Molecular cell* 51, 185–199.

Freedman, L.P., and Towers, T.L. (1991). DNA binding properties of the vitamin D3 receptor zinc finger region. *Mol Endocrinol* 5, 1815-1826.

Ganguly, A., Tamblyn, J.A., Finn-Sell, S., Chan, S.Y., Westwood, M., Gupta, J., Kilby, M.D., Gross, S.R., and Hewison, M. (2018). Vitamin D, the placenta and early pregnancy: effects on trophoblast function. *The Journal of endocrinology* 236, R93-R103.

Ge, K., Guermah, M., Yuan, C.X., Ito, M., Wallberg, A.E., Spiegelman, B.M., and Roeder, R.G. (2002). Transcription coactivator TRAP220 is required for PPAR gamma 2-stimulated adipogenesis. *Nature* 417, 563-567.

Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., and Laudet, V. (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological reviews* 58, 685-704.

Giner, X.C., Cotnoir-White, D., Mader, S., and Levesque, D. (2015). Selective ligand activity at Nur/retinoid X receptor complexes revealed by dimer-specific bioluminescence resonance energy transfer-based sensors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29, 4256-4267.

Grant W.B., L.H., McDonnell S.L., Baggerly C.A., French CB, Aliano JL, Bhattoa HP (2020). Evidence that Vitamin D Supplementation Could Reduce Risk of Influenza and COVID-19 Infections and Deaths. *Nutrients* 12.

Halachmi, S., Marden, E., Martin, G., MacKay, H., Abbondanza, C., and Brown, M. (1994). Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science* 264, 1455-1458.

Hamilton R., H.J., Fraser D., Radde I., Morecki R., Paunier L. (1970). The small intestine in vitamin D dependent rickets. *Pediatrics* 45, 364–373.

Han, S., Li, T., Ellis, E., Strom, S., and Chiang, J.Y. (2010). A novel bile acid-activated vitamin D receptor signaling in human hepatocytes. *Mol Endocrinol* 24, 1151-1164.

Hanske, J., Sadian, Y., and Muller, C.W. (2018). The cryo-EM resolution revolution and transcription complexes. *Current opinion in structural biology* 52, 8-15.

Harrus, D., Demene, H., Vasquez, E., Boulahtouf, A., Germain, P., Figueira, A.C., Privalsky, M.L., Bourguet, W., and le Maire, A. (2018). Pathological Interactions Between Mutant Thyroid Hormone Receptors and Corepressors and Their Modulation by a Thyroid Hormone Analogue with Therapeutic Potential. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 28, 1708-1722.

Haussler M.R., W.G.K., Haussler C.A., Hsieh J.C., Thompson P.D., Selznick S.H., Dominguez C.E., Jurutka P.W. (1998). The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 13, 325–349.

Haussler, M.R., Haussler, C.A., Bartik, L., Whitfield, G.K., Hsieh, J.C., Slater, S., and Jurutka, P.W. (2008). Vitamin D receptor: molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention. *Nutr Rev* 66, S98-112.

Haussler, M.R., Jurutka, P. W., Mizwicki, M. & Norman, A. W. (2011). Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D₃: genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25, 543–559.

Herdick M, S.A., Carlberg C. (2000). Antagonistic action of a 25-carboxylic ester analogue of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ is mediated by a lack of ligand-induced vitamin D receptor interaction with coactivators. *J Biol Chem* 275, 16506–16512.

Herdick, M., Steinmeyer, A., and Carlberg, C. (2000). Carboxylic ester antagonists of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ show cell-specific actions. *Chem Biol* 7, 885-894.

Herdick M., B.Y., Quack M., Uskokovic M., Polly P., Carlberg C. (2000a). Response element- and coactivator-mediated conformational change of the vitamin D₃ receptor permits sensitive interaction with agonists. *Mol Pharmacol* 57, 1206-1217.

Herdick M., S.A., Carlberg C. (2000b). Carboxylic ester antagonists of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ show cell-specific actions. *Chem Biol* 7, 885-894.

Herrmann, M., Farrell, C.L., Pusceddu, I., Fabregat-Cabello, N., and Cavalier, E. (2017). Assessment of vitamin D status - a changing landscape. *Clin Chem Lab Med* 55, 3-26.

Hewison, M. (2011). Antibacterial effects of vitamin D. *Nat Rev Endocrinol* 7, 337-345.

Holick, M.F. (2003). Vitamin D: a millenium perspective. *J Cell Biochem* 88, 296-307.

Holick, M.F. (2007). Vitamin D deficiency. *The New England Journal of Medicine* 357, 266-281.

Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., *et al.* (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.

Hourdel, V., Volant, S., O'Brien, D.P., Chenal, A., Chamot-Rooke, J., Dillies, M.A., and Brier, S. (2016). MEMHDX: an interactive tool to expedite the statistical validation and visualization of large HDX-MS datasets. *Bioinformatics* 32, 3413-3419.

Huang, X., Beullens, M., Zhang, J., Zhou, Y., Nicolaescu, E., Lesage, B., Hu, Q., Wu, J., Bollen, M., and Shi, Y. (2009). Structure and function of the two tandem WW domains of the pre-mRNA splicing factor FBP21 (formin-binding protein 21). *J Biol Chem* 284, 25375-25387.

Huet, T., Laverny, G., Ciesielski, F., Molnar, F., Ramamoorthy, T.G., Belorusova, A.Y., Antony, P., Potier, N., Metzger, D., Moras, D., *et al.* (2015). A vitamin D receptor selectively activated by gemini analogs reveals ligand dependent and independent effects. *Cell Rep* 10, 516-526.

Inaba Y, N.M., Itoh T, Yoshimoto Y, Ikura T, Ito N, Shimizu M, Yamamoto K. . (2010). $22\text{S-Butyl-}1\alpha,24\text{R}$ -dihydroxyvitamin D₃: recovery of vitamin D receptor agonistic activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121, 146–150.

Inaba Y, Y.N., Sakamaki Y, Nakabayashi M, Ikura T, Tamamura H, Ito N, Shimizu M, Yamamoto K. (2009). A new class of vitamin D analogues that induce structural rearrangement of the ligand binding pocket of the receptor. *J Med Chem* 52, 1438–1449.

Inaba Y., Y.K., Yoshimoto N., Matsunawa M., Uno S., Yamada S., Makishima M. (2007). Vitamin D₃ derivatives with adamantane or lactone ring side chains are cell type-selective vitamin D receptor modulators. *Mol Pharmacol* 71, 1298–1311.

J.W., C.R.C.a.C. (2013). The mediator complex and transcription elongation. *Biochim Biophys Acta* 1829, 69–75.

Jeronimo, C., and Robert, F. (2017). The Mediator Complex: At the Nexus of RNA Polymerase II Transcription. *Trends in cell biology* 27, 765-783.

Jones G, P.D., Kaufmann M. (2012). 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1) : its important rôle in the degradation of vitamin D. *Arch Biochem Bioph*, 9-18.

Jones, G., Prosser, D.E., and Kaufmann, M. (2014). Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *J Lipid Res* 55, 13-31.

Jurutka, P.W., Whitfield, G.K., Hsieh, J.C., Thompson, P.D., Haussler, C.A., and Haussler, M.R. (2001). Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 2, 203-216.

Jusu, S., Presley, J.F., and Kremer, R. (2017). Phosphorylation of Human Retinoid X Receptor alpha at Serine 260 Impairs Its Subcellular Localization, Receptor Interaction, Nuclear Mobility, and $1\alpha,25$ -

Dihydroxyvitamin D₃-dependent DNA Binding in Ras-transformed Keratinocytes. *J Biol Chem* 292, 1490-1509.

Jusu, S., Presley, J.F., Williams, C., Das, S.K., Jean-Claude, B., and Kremer, R. (2018). Examination of VDR/RXR/DRIP205 Interaction, Intranuclear Localization, and DNA Binding in Ras-Transformed Keratinocytes and Its Implication for Designing Optimal Vitamin D Therapy in Cancer. *Endocrinology* 159, 1303-1327.

Kamei Y., X.L., Heinzel T., Torchia J., Kurokawa R., Gloss B., Lin S.C., Heyman R.A., Rose D.W., Glass C.K., Rosenfeld M.G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85, 403-414.

Kamei, Y.e.a. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. . *Cell* 85, 403–414.

Kang, Y.K., Guermah, M., Yuan, C.X., and Roeder, R.G. (2002). The TRAP/Mediator coactivator complex interacts directly with estrogen receptors alpha and beta through the TRAP220 subunit and directly enhances estrogen receptor function in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2642-2647.

Kashiwagi, H.O., M.; Ono, Y.; Morikami, K.; Itoh, S.; Sato, H.; Takahashi, T. (2013). Effects of fluorines on nonsecosteroidal vitamin D receptor agonists. *Bioorg Med Chem* 21, 712–721.

Kato Y., N.Y., Sano H., Tanatani A., Kobayashi H., Shimazawa R., Koshino H., Hashimoto Y., Nagasawa K. (2004). Synthesis of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-26,23-lactams (DLAMs), a novel series of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 14, 2579–2583.

Kayalar, O., and Oztay, F. (2014). Retinoic acid induced repair in the lung of adult hyperoxic mice, reducing transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) mediated abnormal alterations. *Acta histochemica* 116, 810-819.

Kelleher, R.J., 3rd, Flanagan, P.M., and Kornberg, R.D. (1990). A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell* 61, 1209-1215.

Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., and Salzberg, S.L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* 14, R36.

Klippel, S., Wieczorek, M., Schumann, M., Krause, E., Marg, B., Seidel, T., Meyer, T., Knapp, E.W., and Freund, C. (2011). Multivalent binding of formin-binding protein 21 (FBP21)-tandem-WW domains fosters protein recognition in the pre-spliceosome. *J Biol Chem* 286, 38478-38487.

Kojetin, D.J., Matta-Camacho, E., Hughes, T.S., Srinivasan, S., Nwachukwu, J.C., Cavett, V., Nowak, J., Chalmers, M.J., Marciano, D.P., Kamenecka, T.M., *et al.* (2015). Structural mechanism for signal transduction in RXR nuclear receptor heterodimers. *Nat Commun* 6, 8013.

Krężel W., R.R., de Lera AR. (2019). Alternative retinoid X receptor (RXR) ligands. *Mol Cell Endocrinol*

Lamblin M., S.R., Wang T.T., Burger M.C., Dabbas B., Moitessier N., White J.H., Gleason J.L. (2010). An o-aminoanilide analogue of 1 α ,25-dihydroxyvitaminD₃ functions as a strong vitamin D receptor antagonist. *J Med Chem* 53, 7461–7465.

Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9, 357-359.

Larivière L., S.M.a.C.P. (2012). A structural perspective on mediator function. . *Curr Opin Cell Biol* 24, 305–313.

Laverny, G., Penna, G., Uskokovic, M., Marczak, S., Maehr, H., Jankowski, P., Ceailles, C., Vouros, P., Smith, B., Robinson, M., *et al.* (2009). Synthesis and anti-inflammatory properties of 1 α ,25-dihydroxy-16-ene-20-cyclopropyl-24-oxo-vitamin D₃, a hypocalcemic, stable metabolite of 1 α ,25-dihydroxy-16-ene-20-cyclopropyl-vitamin D₃. *J Med Chem* 52, 2204-2213.

le Maire, A., Teyssier, C., Balaguer, P., Bourguet, W., and Germain, P. (2019). Regulation of RXR-RAR Heterodimers by RXR- and RAR-Specific Ligands and Their Combinations. *Cells* 8.

Leid, M., Kastner, P., Lyons, R., Nakshatri, H., Saunders, M., Zacharewski, T., Chen, J.Y., Staub, A., Garnier, J.M., Mader, S., *et al.* (1992). Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 68, 377-395.

Lekanne Deprez R.H., R.P.H., Groen N.A., Warringa U.L., van Biezen N.A., Molijn A.C., Bootsma D., de Jong P.J., Menon A.G., Kley N.A., Seizinger B.R., Zwarthoff E.C. (1995). Cloning and characterization of

MN1, a gene from chromosome 22q11, which is disrupted by a balanced translocation in a meningioma. *Oncogene* 10, 1521–1528.

Lempiainen, H., Molnar, F., Macias Gonzalez, M., Perakyla, M., and Carlberg, C. (2005). Antagonist- and inverse agonist-driven interactions of the vitamin D receptor and the constitutive androstane receptor with corepressor protein. *Mol Endocrinol* 19, 2258-2272.

Leyssens, C., Verlinden, L., and Verstuyf, A. (2014). The future of vitamin D analogs. *Frontiers in physiology* 5, 122.

Li B., C.M., Workman J.L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707–719

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, D., Li, T., Wang, F., Tian, H. & 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, X., Zhu, G., Yao, X., Wang, N., Hu, R., Kong, Q., Zhou, D., Long, L., Cai, J., and Zhou, W. (2018). Celestrol induces ubiquitin-dependent degradation of mTOR in breast cancer cells. *Onco Targets Ther* 11, 8977-8985.

Lieve Verlinden, R.B., Pierre De Clercq, Annemieke Verstuyf (2019). Analogs of Calcitriol.

Lightwood R., S.T. (1953). Idiopathic hypercalcaemia in infants. *Lancet* 265, 255–256.

Lin, L.M., Peng, F., Liu, Y.P., Chai, D.J., Ning, R.B., Xu, C.S., and Lin, J.X. (2016). Coadministration of VDR and RXR agonists synergistically alleviates atherosclerosis through inhibition of oxidative stress: An in vivo and in vitro study. *Atherosclerosis* 251, 273-281.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550.

MacDonald P.N., D.D.R., Zhang C., Gu C. (2004). Emerging insights into the coactivator role of NCoA62/SKIP in vitamin D-mediated transcription. *J Steroid Biochem* 89–90, 179–186.

Maestro, M.A., Molnar, F., and Carlberg, C. (2019). Vitamin D and Its Synthetic Analogs. *J Med Chem* 62, 6854-6875.

Makishima, M., Lu, T.T., Xie, W., Whitfield, G.K., Domoto, H., Evans, R.M., Haussler, M.R., and Mangelsdorf, D.J. (2002). Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 296, 1313-1316.

Malik, S., Wallberg, A.E., Kang, Y.K., and Roeder, R.G. (2002). TRAP/SMCC/mediator-dependent transcriptional activation from DNA and chromatin templates by orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *Mol Cell Biol* 22, 5626-5637.

Malloy, P.J., Tiosano, D., and Feldman, D. (2018). Hereditary 1,25-Dihydroxyvitamin D Resistant Rickets. In *Vitamin D* edition 4, pp. 264-294.

Malloy, P.J., Xu, R., Peng, L., Clark, P.A., and Feldman, D. (2002). A novel mutation in helix 12 of the vitamin D receptor impairs coactivator interaction and causes hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets without alopecia. *Mol Endocrinol* 16, 2538-2546.

Malloy, P.J., Zhu, W., Zhao, X.Y., Pehling, G.B., and Feldman, D. (2001). A novel inborn error in the ligand-binding domain of the vitamin D receptor causes hereditary vitamin D-resistant rickets. *Mol Genet Metab* 73, 138-148.

Mangelsdorf, D.J., Borgmeyer, U., Heyman, R.A., Zhou, J.Y., Ong, E.S., Oro, A.E., Kakizuka, A., and Evans, R.M. (1992). Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* 6, 329-344.

Marcinowska-Suchowierska, E., Kupisz-Urbanska, M., Lukaszkiwicz, J., Pludowski, P., and Jones, G. (2018). Vitamin D Toxicity-A Clinical Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9, 550.

Masson, G.R., Burke, J.E., Ahn, N.G., Anand, G.S., Borchers, C., Brier, S., Bou-Assaf, G.M., Engen, J.R., Englander, S.W., Faber, J., *et al.* (2019). Recommendations for performing, interpreting and reporting hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) experiments. *Nat Methods* 16, 595-602.

Masuda, S., and Jones, G. (2006). Promise of vitamin D analogues in the treatment of hyperproliferative conditions. *Molecular cancer therapeutics* 5, 797-808.

McCollum E.V., S.N., Becker J.E., Shipley P.G. (1922). An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *J Biol Chem* *53*, 293–298.

Meyer M.B., W.M., Kim S., Shevde N.K., Pike J.W. (2006). The human transient receptor potential vanilloid type 6 distal promoter contains multiple vitamin D receptor binding sites that mediate activation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in intestinal cells. *Mol Endocrinol* *20*, 1447-1461.

Michigami, T., Suga, A., Yamazaki, M., Shimizu, C., Cai, G., Okada, S., and Ozono, K. (1999). Identification of amino acid sequence in the hinge region of human vitamin D receptor that transfers a cytosolic protein to the nucleus. *J Biol Chem* *274*, 33531-33538.

Miura D., M.K., Gao Q., Norman A.W., Ishizuka S. (1999). 1 α -Dihydroxyvitamin D₃-26,23-lactone analogs antagonize differentiation of human leukemia cells (HL-60 cells) but not of human acute promyelocytic leukemia cells (NB4 cells). *FEBS Lett* *460*, 297–302.

Molin, A., Baudoin, R., Kaufmann, M., Souberbielle, J.C., Ryckewaert, A., Vantuyghem, M.C., Eckart, P., Bacchetta, J., Deschenes, G., Kesler-Roussey, G., *et al.* (2015). CYP24A1 Mutations in a Cohort of Hypercalcemic Patients: Evidence for a Recessive Trait. *J Clin Endocrinol Metab* *100*, E1343-1352.

Molnar, F. (2014). Structural considerations of vitamin D signaling. *Frontiers in physiology* *5*, 191.

Moras, D., and Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Current opinion in cell biology* *10*, 384-391.

Morgan H.G., M.R.G., Stowers J.M., Thomson J. (1956). Metabolic studies on two infants with idiopathic hypercalcaemia. *Lancet* *270*, 925–931.

Muindi, J.R., Yu, W.D., Ma, Y., Engler, K.L., Kong, R.X., Trump, D.L., and Johnson, C.S. (2010). CYP24A1 inhibition enhances the antitumor activity of calcitriol. *Endocrinology* *151*, 4301-4312.

Murakami, S., Nagari, A., and Kraus, W.L. (2017). Dynamic assembly and activation of estrogen receptor alpha enhancers through coregulator switching. *Genes Dev* *31*, 1535-1548.

Nagulapalli M., M.S., Dwivedi N., Dahiya P. and Thakur J.K. (2016). Evolution of disorder in mediator complex and its functional relevance. *Nucleic Acids Res* *44*, 1591–1612.

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

Nakabayashi M., Y.S., Yoshimoto N., Tanaka T., Igarashi M., Ikura T., Ito N., Makishima M., Tokiwa H., DeLuca H.F., Shimizu M. (2008). Crystal structures of rat vitamin D receptor bound to adamantyl vitamin D analogs: structure basis for vitamin D receptor antagonism and partial agonism. *J Med Chem* *51*, 5320–5329.

Nehring J.A., Z.C., DeLuca H.F. (2007). Lithocholic acid can carry out in vivo functions of vitamin D. . *Proc Natl Acad Sci USA* *104*, 10006–10009.

Nonet, M.L., and Young, R.A. (1989). Intragenic and extragenic suppressors of mutations in the heptapeptide repeat domain of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II. *Genetics* *123*, 715-724.

Norman A.W., O.W.H., Hammond M.W., Bishop J.E., Dormanen M.C., Bouillon R., van Baelen H., Ridall A.L., Daane E., Khoury R., Farach-Carson M.C. (1997). Comparison of 6-s-cis- and 6-s-trans-locked analogs of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ indicates that the 6-s-cis conformation is preferred for rapid nongenomic biological responses and that neither 6-s-cis- nor 6-s-trans- locked analogs are preferred for genomic biological responses. *Mol Endocr* *11*, 1518-1531.

Oda, Y., Hu, L., Bul, V., Elalieh, H., Reddy, J.K., and Bikle, D.D. (2012). Coactivator MED1 ablation in keratinocytes results in hair-cycling defects and epidermal alterations. *J Invest Dermatol* *132*, 1075-1083.

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. *EMBO J* *31*, 291-300.

Osburn, D.L., Shao, G., Seidel, H.M., and Schulman, I.G. (2001). Ligand-dependent degradation of retinoid X receptors does not require transcriptional activity or coactivator interactions. *Mol Cell Biol* *21*, 4909-4918.

Perez, E., Bourguet, W., Gronemeyer, H., and de Lera, A.R. (2012). Modulation of RXR function through ligand design. *Biochim Biophys Acta* *1821*, 57-69.

Perlman K.L., S.R.E., Paaren H.E., DeLuca H.F. (1991). Novel synthesis of 19-nor-vitamin-D compounds. *Tetrahedron Lett* 32, 7663–7666.

Pogenberg, V., Guichou, J.F., Vivat-Hannah, V., Kammerer, S., Perez, E., Germain, P., de Lera, A.R., Gronemeyer, H., Royer, C.A., and Bourguet, W. (2005). Characterization of the interaction between retinoic acid receptor/retinoid X receptor (RAR/RXR) heterodimers and transcriptional coactivators through structural and fluorescence anisotropy studies. *J Biol Chem* 280, 1625-1633.

Polly P., H.M., Moehren U., Baniahmad A., Heinzel T., Carlberg C. (2000). VDR–Alien: a novel, DNA-selective vitamin D3 receptor–corepressor partnership. *FASEB J* 14, 1455-1463.

Prosser, D.E., and Jones, G. (2004). Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends in biochemical sciences* 29, 664-673.

Rachez, C., Gamble, M., Chang, C.P., Atkins, G.B., Lazar, M.A., and Freedman, L.P. (2000). The DRIP complex and SRC-1/p160 coactivators share similar nuclear receptor binding determinants but constitute functionally distinct complexes. *Mol Cell Biol* 20, 2718-2726.

Rachez, C., Lemon, B.D., Suldan, Z., Bromleigh, V., Gamble, M., Naar, A.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Freedman, L.P. (1999). Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature* 398, 824-828.

Rachez, C., Suldan, Z., Ward, J., Chang, C.P., 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.

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.

Rochel, N., Ciesielski, F., Godet, J., Moman, E., Roessle, M., Peluso-Iltis, C., Moulin, M., Haertlein, M., Callow, P., Mely, 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., Hourai, S., Perez-Garcia, X., Rumbo, A., Mourino, A., and Moras, D. (2007). Crystal structure of the vitamin D nuclear receptor ligand binding domain in complex with a locked side chain analog of calcitriol. *Arch Biochem Biophys* 460, 172-176.

Rochel, N., and Molnar, F. (2017). Structural aspects of Vitamin D endocrinology. *Mol Cell Endocrinol* 453, 22-35.

Rochel, N., Wurtz, J.M., Mitschler, A., Klaholz, B., and Moras, D. (2000a). The Crystal Structure of the Nuclear Receptor for Vitamin D Bound to Its Natural Ligand. *Molecular Cell* 5, 173-179.

Rochel, N., Wurtz, J.M., Mitschler, A., Klaholz, B., and Moras, D. (2000b). The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Mol Cell* 5, 173-179.

Roizen, J.D., and Levine, M.A. (2018). The Role of Genetic Variation in CYP2R1, the Principal Vitamin D 25-Hydroxylase, in Vitamin D Homeostasis. In *Vitamin D édition 4*, pp. 303-316.

Rosenfeld, M.G., Lunyak, V.V., and Glass, C.K. (2006). Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* 20, 1405-1428.

Ross, A.C., Manson, J.E., Abrams, S.A., Aloia, J.F., Brannon, P.M., Clinton, S.K., Durazo-Arvizu, R.A., Gallagher, J.C., Gallo, R.L., Jones, G., *et al.* (2011). The 2011 Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D: what dietetics practitioners need to know. *J Am Diet Assoc* 111, 524-527.

Ryan E. Stites, J.G.M., Keith R. Stayrook (2019). Nonsecosteroidal Ligands and Modulators of Vitamin D Receptor.

Saito N., M.M., Matsunaga T., Saito H., Anzai M., Takenouchi K., Miura D., Ishizuka S., Takimoto-Kamimura M., Kittaka A. (2004). 24,24-Dimethylvitamin D3-26,23-lactones and their 2 α -functionalized analogues as highly potent VDR antagonists. *Tetrahedron* 60, 7951–7961.

Saito N., M.M., Saito H., Takenouchi K., Ishizuka S., Namekawa J., Takimoto-Kamimura M., Kittaka A. (2005). A synthesis of 24,24-ethanovitamin D3 lactones using ruthenium-catalyzed intermolecular enyne metathesis: potent vitamin D receptor antagonists. *Synthesis*, 2533–2543.

Saitoh, H. (2017). Vitamin D: Fourth Edition. In *Vitamin D Receptor Antagonists*, pp. 679-694.

Sakamaki, Y., Inaba, Y., Yoshimoto, N., and Yamamoto, K. (2010). Potent antagonist for the vitamin D receptor: vitamin D analogues with simple side chain structure. *J Med Chem* 53, 5813-5826.

Sanchez-Martinez, R., Castillo, A.I., Steinmeyer, A., and Aranda, A. (2006). The retinoid X receptor ligand restores defective signalling by the vitamin D receptor. *EMBO Rep* 7, 1030-1034.

Sanchez-Martinez, R., Zambrano, A., Castillo, A.I., and Aranda, A. (2008). Vitamin D-dependent recruitment of corepressors to vitamin D/retinoid X receptor heterodimers. *Mol Cell Biol* 28, 3817-3829.

Sato, Y., Ramalanjaona, N., Huet, T., Potier, N., Osz, J., Antony, P., Peluso-Ittis, C., Poussin-Courmontagne, P., Ennifar, E., Mely, Y., *et al.* (2010). The "Phantom Effect" of the Retinoid LG100754: structural and functional insights. *PLoS One* 5, e15119.

Savkur, R.S., Bramlett, K.S., Stayrook, K.R., Nagpal, S., and Burris, T.P. (2005). Coactivation of the human vitamin D receptor by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha. *Mol Pharmacol* 68, 511-517.

Sayers, J., Hynes, A.M., Srivastava, S., Downen, F., Quinton, R., Datta, H.K., and Sayer, J.A. (2015). Successful treatment of hypercalcaemia associated with a CYP24A1 mutation with fluconazole. *Clin Kidney J* 8, 453-455.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., *et al.* (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676-682.

Schlingmann, K.P., Kaufmann, M., Weber, S., Irwin, A., Goos, C., John, U., Misselwitz, J., Klaus, G., Kuwertz-Broking, E., Fehrenbach, H., *et al.* (2011). Mutations in CYP24A1 and idiopathic infantile hypercalcemia. *N Engl J Med* 365, 410-421.

Shao, L., Zhou, Z., Cai, Y., Castro, P., Dakhov, O., Shi, P., Bai, Y., Ji, H., Shen, W., and Wang, J. (2013). Celastrol suppresses tumor cell growth through targeting an AR-ERG-NF-kappaB pathway in TMPRSS2/ERG fusion gene expressing prostate cancer. *PLoS One* 8, e58391.

Simons, S.S., Edwards, D.P. & Kumar, R. (2014). Minireview: dynamic structures of nuclear hormone receptors: new promises and challenges. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md) 28, 173–182.

Slominski, A.T., Brozyna, A.A., Skobowiat, C., Zmijewski, M.A., Kim, T.K., Janjetovic, Z., Oak, A.S., Jozwicki, W., Jetten, A.M., Mason, R.S., *et al.* (2018). On the role of classical and novel forms of vitamin D in melanoma progression and management. *J Steroid Biochem Mol Biol* 177, 159-170.

Solomon, C., White, J.H., and Kremer, R. (1999). Mitogen-activated protein kinase inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D3-dependent signal transduction by phosphorylating human retinoid X receptor alpha. *J Clin Invest* 103, 1729-1735.

Sone T, S.R., Hughes MR, Malloy PJ, Feldman D, O'Malley BW, Pike JW. (1989). Mutant vitamin D receptors which confer hereditary resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D3 in humans are transcriptionally inactive in vitro. *J Biol Chem* 264, 20230–20234.

Sone T., K.S., Pike JW. (1991). Vitamin D receptor interaction with specific DNA. Association as a 1,25-dihydroxyvitamin D3-modulated heterodimer. *J Biol Chem* 266, 23296-23305.

Soutourina, J. (2018). Transcription regulation by the Mediator complex. *Nature reviews Molecular cell biology* 19, 262-274.

Spencer T.E., J.G., Burcin M.M., Allis C.D., Zhou J., Mizzen C.A., McKenna N.J., Onate S.A., Tsai S.Y., Tsai M.J., O'Malley B.W. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389, 194–198.

Sucov, H.M., Izipisua-Belmonte, J.C., Ganán, Y., and Evans, R.M. (1995). Mouse embryos lacking RXR alpha are resistant to retinoic-acid-induced limb defects. *Development* 121, 3997-4003.

Sutton A.L., Z.X., Dowd D.R., Kharode Y.P., Komm B.S., Macdonald P.N. (2008). Semaphorin 3B is a 1,25-Dihydroxyvitamin D3-induced gene in osteoblasts that promotes osteoclastogenesis and induces osteopenia in mice. *Mol Endocrinol* 22, 1370-1381.

Taatjes D.J., N.A.M., Andel, F. III, Nogales E. and Tjian R. (2002). Structure, function, and activator-induced conformations of the CRSP coactivator. *Science* 295, 1058–1062.

Thacher, J.M.P.K.T.T.D. (2018). Vitamin D deficiency and nutritional rickets in children, Vol 2, 4 edn.

Thacher, T.D., Fischer, P.R., Singh, R.J., Roizen, J., and Levine, M.A. (2015). CYP2R1 Mutations Impair Generation of 25-hydroxyvitamin D and Cause an Atypical Form of Vitamin D Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* *100*, E1005-1013.

Thompson C.M., K.A.J., Chao D.M. and Young R.A. (1993). A multisubunit complex associated with the RNA polymerase II CTD and TATA-binding protein in yeast. *Cell* *73*, 1361–1375

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.

Thompson, P.D., Remus, L.S., Hsieh, J.C., Jurutka, P.W., Whitfield, G.K., Galligan, M.A., Encinas Dominguez, C., Haussler, C.A., and Haussler, M.R. (2001). Distinct retinoid X receptor activation function-2 residues mediate transactivation in homodimeric and vitamin D receptor heterodimeric contexts. *J Mol Endocrinol* *27*, 211-227.

Toell, A., Gonzalez, M.M., Ruf, D., Steinmeyer, A., Ishizuka, S., and Carlberg, C. (2001). Different molecular mechanisms of vitamin D(3) receptor antagonists. *Mol Pharmacol* *59*, 1478-1485.

Tolon R.M., C.A.I., Jimenez-Lara A.M., Aranda A. (2000). Association with Ets-1 causes ligand- and AF2-independent activation of nuclear receptors. *Mol Cell Biol* *20*, 8793–8802.

Toth-Petroczy, A., Oldfield, C.J., Simon, I., Takagi, Y., Dunker, A.K., Uversky, V.N., and Fuxreiter, M. (2008). Malleable machines in transcription regulation: the mediator complex. *PLoS computational biology* *4*, e1000243.

Tsopyrkov, O., Chen, X., Hoche, C.F., Skoblo, R., Lianghong, Y., and Hoche, B. (2018). Why should we measure free 25(OH) vitamin D? *J Steroid Biochem Mol Biol* *180*, 87-104.

Tuckey R.C., C.C.Y.S., Slominski A.T. (2019). The serum vitamin D metabolome: What we know and what is still to discover. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* *186*, 4–21.

Ueda, T., Compe, E., Catez, P., Kraemer, K.H., and Egly, J.M. (2009). Both XPD alleles contribute to the phenotype of compound heterozygote xeroderma pigmentosum patients. *J Exp Med* *206*, 3031-3046.

Umesono, K., Murakami, K.K., Thompson, C.C., and Evans, R.M. (1991). Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D₃ receptors. *Cell* *65*, 1255-1266.

Vaisanen, S., Perakyla, M., Karkkainen, J.I., Steinmeyer, A., and Carlberg, C. (2002). Critical role of helix 12 of the vitamin D(3) receptor for the partial agonism of carboxylic ester antagonists. *J Mol Biol* *315*, 229-238.

Vanherwegen, A.S., Gysemans, C., and Mathieu, C. (2017). Regulation of immune function by vitamin D and its use in diseases of immunity. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1061-1094.

Vanhooke, J., Benning, M., Bauer, C., Pike, J., and DeLuca, H. (2004). Molecular structure of the rat vitamin D receptor ligand binding domain complexed with 2-carbon-substituted vitamin D₃ hormone analogues and a LXXLL-containing coactivator peptide. *Biochemistry* *43*, 4101-4110.

Wacker, M., and Holick, M.F. (2013). Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. *Dermatoendocrinol* *5*, 51-108.

Wang, N., Zou, Q., Xu, J., Zhang, J., and Liu, J. (2018). Ligand binding and heterodimerization with retinoid X receptor alpha (RXRalpha) induce farnesoid X receptor (FXR) conformational changes affecting coactivator binding. *J Biol Chem* *293*, 18180-18191.

Wang, Q., Sharma, D., Ren, Y., and Fondell, J.D. (2002). A coregulatory role for the TRAP-mediator complex in androgen receptor-mediated gene expression. *J Biol Chem* *277*, 42852-42858.

Westin, S., Kurokawa, R., Nolte, R.T., Wisely, G.B., McInerney, E.M., Rose, D.W., Milburn, M.V., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (1998). Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators. *Nature* *395*, 199-202.

Whitfield G.K., S.S.H., Haussler C.A., Hsieh J.C., Galligan M.A., Jurutka P.W., Thompson P.D., Lee S.M., Zerwekh J.E., Haussler M.R. (1996). Vitamin D receptors from patients with resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D₃: point mutations confer reduced transactivation in response to ligand and impaired interaction with the retinoid X receptor heterodimeric partner. *J Mol Endocrinol* *10*, 1617–1631.

Whyte, W.A., Orlando, D.A., Hnisz, D., Abraham, B.J., Lin, C.Y., Kagey, M.H., Rahl, P.B., Lee, T.I., and Young, R.A. (2013). Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* 153, 307-319.

Wilfinger J., S.S., Tuomainen T.P., Virtanen J.K., Voutilainen S., Nurmi T., de Mello V.D., Uusitupa M., Carlberg C. (2014). Primary vitamin D receptor target genes as biomarkers for the vitamin D3 status in the hematopoietic system. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25, 875-884.

Willy, P.J.M., D. J. (1997). Unique requirements for retinoid-dependent transcriptional activation by the orphan receptor LXR. *Genes Dev* 11, 289–298.

Windaus A, L.O. (1928). Vitamin D1. *Ann Chem* 465, 148.

Windaus A, L.O., Luttringhaus A, Weidlich G. (1932). Crystalline vitamin D2 *Ann Chem* 492, 226–241.

Xu J., W.R.C., O'Malley B.M. (2009). Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family. *Nat Rev Cancer* 9, 615-630.

Yang, H., Chen, D., Cui, Q.C., Yuan, X., and Dou, Q.P. (2006). Celastrol, a triterpene extracted from the Chinese "Thunder of God Vine," is a potent proteasome inhibitor and suppresses human prostate cancer growth in nude mice. *Cancer Res* 66, 4758-4765.

Yoshimoto N, S.Y., Haeta M, Kato A, Inaba Y, Itoh T, Nakabayashi M, Ito N, Yamamoto K. (2012). Butyl pocket formation in the vitamin D receptor strongly affects the agonistic or antagonistic behavior of ligands. *J Med Chem* 55, 4373–4381.

Yuan, C.X., Ito, M., Fondell, J.D., Fu, Z.Y., and Roeder, R.G. (1998). The TRAP220 component of a thyroid hormone receptor- associated protein (TRAP) coactivator complex interacts directly with nuclear receptors in a ligand-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7939-7944.

Zella, L.A., Chang, C.Y., McDonnell, D.P., and Pike, J.W. (2007). The vitamin D receptor interacts preferentially with DRIP205-like LxxLL motifs. *Arch Biochem Biophys* 460, 206-212.

Zhang, J., Chalmers, M.J., Stayrook, K.R., Burris, L.L., Wang, Y., Busby, S.A., Pascal, B.D., Garcia-Ordonez, R.D., Bruning, J.B., Istrate, M.A., *et al.* (2011). DNA binding alters coactivator interaction surfaces of the intact VDR-RXR complex. *Nat Struct Mol Biol* 18, 556-563.

Zhang, J., Hu, X., and M.A., L. (1999). A novel role for helix 12 of retinoid X receptor in regulating repression. *Mol Cell Biol* 19, 6448–6457.

Zheng, J., Chang, M.R., Stites, R.E., Wang, Y., Bruning, J.B., Pascal, B.D., Novick, S.J., Garcia-Ordonez, R.D., Stayrook, K.R., Chalmers, M.J., *et al.* (2017). HDX reveals the conformational dynamics of DNA sequence specific VDR co-activator interactions. *Nat Commun* 8, 923.

Zheng, W., Lu, Y., Tian, S., Ma, F., Wei, Y., Xu, S., and Li, Y. (2018). Structural insights into the heterodimeric complex of the nuclear receptors FXR and RXR. *J Biol Chem* 293, 12535-12541.

Zhu, J., and DeLuca, H.F. (2012). Vitamin D 25-hydroxylase - Four decades of searching, are we there yet? *Arch Biochem Biophys* 523, 30-36.

Zhu, J.G., Ochalek, J.T., Kaufmann, M., Jones, G., and Deluca, H.F. (2013). CYP2R1 is a major, but not exclusive, contributor to 25-hydroxyvitamin D production in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 15650-15655.

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.

Études structurales et fonctionnelles des complexes de corégulation du récepteur nucléaire de la Vitamine D

Résumé

Le VDR est un facteur de transcription activé par la fixation du calcitriol. VDR est une cible thérapeutique potentielle pour de multiples pathologies telles que les maladies auto-immunes, les maladies neuro-dégénératives et certains cancers. VDR forme un hétérodimère fonctionnel avec le récepteur nucléaire des rétinoïdes X, RXR, et module l'expression de gènes cibles par le recrutement sélectif de corégulateurs. Les données de la littérature sur le rôle de RXR et de son ligand, l'acide rétinoïque 9cis (9cisRA), dans la régulation de la transcription contrôlée par VDR sont contradictoires. Dans une première partie, nous avons combiné des méthodes biophysiques et fonctionnelles pour caractériser l'effet du ligand de RXR sur l'activité du récepteur. Ces données ont permis de mieux comprendre le rôle joué par RXR et du 9cisRA dans les activités de VDR et de montrer que le 9cisRA administré conjointement au calcitriol n'a pas d'effet synergique mais qu'il peut moduler l'activité de régulation de certains gènes. La seconde partie s'intéresse à la caractérisation structurale, biophysique et fonctionnelle du ligand antagoniste ZK168281 de VDR et de son mécanisme d'action. Nous avons caractérisé l'effet de l'antagoniste sur l'interaction de VDR avec les corégulateurs et sur l'activité transcriptionnelle. Ces travaux ont mis en évidence un nouveau mécanisme d'action du ligand inhibant l'activité du récepteur.

Mots clés: VDR, RXR, calcitriol, 9cisRA, régulation de la transcription, ligand antagoniste, ZK168281, biophysique

Summary

VDR is a transcription factor activated by binding calcitriol. VDR is a potential therapeutic target for multiple pathologies such as autoimmune diseases, neurodegenerative diseases and certain types of cancer. VDR forms a functional heterodimer with the nuclear retinoid X receptor RXR, and modulates the expression of target genes by the selective recruitment of coregulators. The data in the literature are contradictory on the role of RXR and its ligand, the 9cis retinoic acid, 9cisRA, in the transcription regulation induced by VDR. In a first part, we have combined biophysical and functional methods to characterize the effect of the RXR and its ligand in VDR activities. Our data showed that 9cisRA combined to calcitriol has no synergistic effect but it can modulate the regulatory activity of certain genes. The second part describes the structural, biophysical and functional characterization of the antagonist ligand of VDR, ZK168281, and its mechanism of action. We characterized the effect of ZK168281 on VDR interactions with coregulators and on transcriptional activity. This work revealed a new mechanism of action of the ligand inhibiting the activity of the receptor.

Key words: VDR, RXR, calcitriol, 9cisRA, transcription regulation, antagonist ligand, ZK168281, biophysics