

2m11.2714.10

Université de Montréal

**Étude de la spécificité d'interaction avec l'ADN
des récepteurs stéroïdiens par mutagenèse
de deux acides aminés de la boîte P**

par

Étienne Rouault

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en biologie moléculaire

Juillet 1999

© Étienne Rouault, 1999



QH 57.1112

506

U54

1999

V.011

Université de Montréal

Étude de la spécificité d'interaction avec l'ADN
des récepteurs stéroïdiens par mutagenèse
de deux sites aminés de la boîte 5

par

Étienne Frenette

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître en sciences (M.Sc.)

en biologie moléculaire



1999, 1999

Étienne Frenette

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

« Étude de la spécificité d'interaction avec l'ADN
des récepteurs stéroïdiens par mutagenèse
de deux acides aminés de la boîte P »

Présenté par :
Étienne Rouault

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Luc DesGroseillers, président-rapporteur

Dr Sylvie Mader, directrice

Dr Manon Valiquette, membre du jury

Mémoire accepté le : 99-08-30

Sommaire

Les récepteurs stéroïdiens qui comprennent les récepteurs des glucocorticoïdes (GR), des androgènes (AR), de la progestérone (PR), des minéralocorticoïdes (MR) et des oestrogènes (ER), sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. L'activité de ces récepteurs est induite par leur ligand. Ils modulent la transcription de gènes cibles en liant spécifiquement des séquences d'ADN appelées élément de réponse aux hormones (HRE). Un HRE est généralement constitué de deux motifs de six paires de bases, séparés par un nombre variable de paires de base, arrangés en répétitions directes ou inversées (palindromes). Il existe seulement deux motifs principaux reconnus par les récepteurs nucléaires connus : le motif PuGGTCA reconnu par ER, RAR (récepteur à l'acide rétinoïque), TR (récepteur à l'hormone thyroïdienne) et VDR (récepteur à la vitamine D), et le motif PuGAACA reconnu par GR, AR, PR et MR.

Dans un premier temps, nous avons étudié la spécificité du mutant naturel AR- G577R. La mutation, qui touche l'un des trois acides aminés du domaine de liaison à l'ADN (DBD) importants dans la discrimination entre éléments de réponse des oestrogènes et des androgènes, a été reproduite par mutagenèse dirigée par PCR. Les DBD des récepteurs sauvage et mutant ont été exprimés dans E.coli. Leur affinité pour un élément de réponse aux androgènes (ARE) et leur spécificité pour différents HRE (correspondant aux 16 motifs GNNCA) ont été testées par des expériences de retard sur gel. Ces deux récepteurs reconnaissent quatre motifs PuGNACA mais avec des différences dans les affinités relatives. Nos résultats peuvent donc expliquer le phénotype du porteur de cette mutation du AR.

Dans un deuxième temps, différentes mutations ont été introduites par mutagenèse dirigée dans le domaine de liaison à l'ADN (DBD) du récepteur des oestrogènes (ER) afin de vérifier la fiabilité d'un code de reconnaissance de l'ADN. Ce code, proposé par Susuki *et al* (1994b), utilise les données de la cristallographie du DBD du ER et du GR pour prédire l'effet de mutations à des positions précises dans le DBD (203, 206 et 211) sur la spécificité pour l'élément de réponse (HRE). Les mutations ponctuelles que nous avons introduites modifient l'acide glutamique en position 203 et l'acide aminé voisin 204. Les DBD des récepteurs de types sauvages et mutés ont été exprimés dans *E.coli* et les récepteurs entiers ont été produits par transfection transitoire dans les cellules COS. La capacité des différentes protéines à lier spécifiquement l'ADN a été testée par retard sur gel. Pour les mutations E203N et E203R, aucune des liaisons avec des motifs GNNCA prédites par le code de reconnaissance n'a pu être mise en évidence, alors que des interactions non envisagées ont été observées pour les mutants E203N, E203R, G204A et G204S. De plus, l'effet de ces mutations sur les propriétés d'activation de la transcription par l'ER a été testé par un système de gène rapporteur sous contrôle d'HREs consensus ou mutés. Malgré sa fixation à l'ERE avec une affinité comparable à celle du récepteur sauvage, le mutant G204A a une capacité de transactivation réduite. En conclusion, ces résultats montrent que (i) l'affinité de certaines des interactions prédites est, au mieux, très faible (ii) d'autres acides aminés que ceux pris en compte dans le code, sont importants dans la reconnaissance de l'ERE (iii) la conformation de certains mutants du DBD de ER pourrait moduler non seulement la liaison à l'ADN mais aussi les propriétés de transactivation.

<u>Table des matières</u>	Pages
Sommaire	iii
Table des matières	v
Liste des figures	viii
Liste des sigles et abréviations	x
Remerciements	xii
1. INTRODUCTION	1
1.1. Généralités sur les facteurs de transcription.....	1
1.1.1. Spécificité cellulaire de la transcription.....	1
1.1.2. Séquences d'ADN promotrices de la transcription.....	3
1.1.3. Les grandes familles de facteurs de transcription.....	4
1.1.4. Signalisation intracellulaire et contrôle de l'expres- sion des gènes.....	5
1.2. La super famille des récepteurs nucléaires.....	6
1.2.1. Classification.....	6
1.2.2. Structures et fonctions.....	10
1.3. Modes d'action des récepteurs stéroïdiens.....	12
1.3.1. Interaction avec des cofacteurs.....	12
1.3.2..Interférences avec d'autres facteurs de transcription	13
1.3.3. Interférences avec d'autres voies de signalisation.....	16
1.4. Spécificité des récepteurs nucléaires pour leurs éléments de réponse.....	16
1.4.1. Apports initiaux de la dissection moléculaire.....	17
1.4.2. Apports des études cristallographiques.....	20
1.4.3. Analyses plus fines par mutagénèse.....	24
1.4.4. Prévion de nouvelles spécificités.....	25
1.5.Objectifs et description du projet de recherche	28
1.5.1. Travaux sur le récepteur aux androgènes G577R	28

1.5.2. Travaux sur des mutants du récepteur aux oestrogènes.....	28
2. MATÉRIEL ET MÉTHODE	30
2.1. Produits chimiques et matériel	30
2.2. Construction de plasmides recombinants	30
2.2.1. Système d'expression eucaryote	30
2.2.2. Système d'expression procaryote	31
2.2.3. Système de vecteurs rapporteurs	32
2.3. Mutagenèse dirigée par PCR	32
2.3.1. BHEX-pSV-AR-G577R	32
2.3.2. Mutants E203N, E203R et E203H du récepteur des oestrogènes	32
2.4. Séquençage	34
2.5. Expression des domaines de liaison à l'ADN	34
2.5.1. Contrôle de l'expression par marquage à la méthionine ³⁵ S	35
2.5.2. Préparation des extraits bactériens	35
2.6. Expression dans des cellules Cos 1	36
3.6.1. Préparation des extraits cellulaires	36
3.6.2. Contrôle de l'expression par western blot	37
3.7. Gel retard	37
3.8. Essais de transactivation	38
3. RÉSULTATS.....	40
3.1. Étude du récepteur aux androgènes mutant G577R.....	40
3.1.1. Contrôle des niveaux d'expression.....	41
3.1.2. Optimisation de la quantité d'extrait à utiliser.....	41
3.1.3. Évaluation de la stabilité de la liaison DBD-GRE pour la liaison à un GRE.....	44

3.1.4. Comparaison des spécificités des récepteurs aux androgènes sauvage et mutant G577R pour différents éléments de réponse.....	47
3.2. Spécificité du récepteur aux androgènes pour différents éléments de réponse.....	50
3.3. Spécificité du récepteur aux glucocorticoïdes pour différents éléments de réponse.....	53
3.4. Spécificité du récepteur aux oestrogènes pour différents éléments de réponse.....	56
3.4.1. Spécificité du récepteur aux oestrogènes sauvage.....	62
3.4.2. Mutations en position 203 du récepteur aux oestrogènes	65
3.4.3. Mutations en position 204 du récepteur aux oestrogènes	70
a- Spécificité du récepteur aux oestrogènes mutant G204A.....	71
b- Spécificité du récepteur aux oestrogènes mutant G204S.....	76
3.5. Effets de coopérativité en présence de plusieurs éléments de réponse.....	79
4. DISCUSSION	84
4.1. Spécificité des récepteurs aux androgènes et aux glucocorticoïdes.....	84
4.2 Lien entre la mutation G577R du récepteur aux androgènes et syndrome d'insensibilité partielle aux androgènes.....	84
4.3. Spécificité du récepteur aux oestrogènes.....	87
4.4. Rôle de l'acide aminé 203 du récepteur aux oestrogènes.....	89
4.5. Rôle de l'acide aminé 204 du récepteur aux oestrogènes	93
4.6. Peut-il exister un code de reconnaissance pour les récepteurs nucléaires?	95
4.7. Perspectives	96
5. BIBLIOGRAPHIE.....	97

Liste des figures

Pages

<u>Figure n° 1A</u> : Structure générale des récepteurs stéroïdiens	
<u>Figure n° 1B</u> : Séquences consensus des éléments de réponse aux oestrogènes et aux glucocorticoïdes.....	7
<u>Figure n° 2</u> : Modulation de la transcription par les récepteurs nucléaires	14
<u>Figure n° 3A</u> : Représentation schématique du domaine de liaison à l'ADN du récepteur aux glucocorticoïdes	
<u>Figure n° 3B</u> : Séquence des sondes oligonucléotides contenant un élément de réponse.....	18
<u>Figure n° 4A</u> : Hélices α de reconnaissance de l'ADN des récepteurs aux glucocorticoïdes et aux oestrogènes	
<u>Figure n° 4B</u> : Interactions des récepteurs aux glucocorticoïdes et aux oestrogènes avec leur élément de réponse	
<u>Figure n° 4C</u> : Résumé du rôle des acides aminés de la boîte P.....	22
<u>Figure n° 5A</u> : Contrôle des niveaux d'expression des domaines de liaisons à l'ADN du récepteur aux oestrogènes, du récepteur aux androgènes sauvage et du récepteur aux androgènes mutant par marquage à la méthionine marquée	
<u>Figure n° 5 B</u> : Détermination de la quantité optimale d'extrait à utiliser.....	42
<u>Figure n° 6</u> : Comparaison de la stabilité des domaines de liaisons à l'ADN du récepteur aux oestrogènes, du récepteur aux androgènes sauvage et du récepteur aux androgènes mutant sur leur élément de réponse consensus.....	45

<u>Figure n° 7A</u> : Spécificité de la liaison du DBD de ARwt sur différents éléments de réponse aux hormones	
<u>Figure n° 7B</u> : Spécificité de la liaison du DBD de AR-G577R sur différents éléments de réponse aux hormones.....	48
<u>Figure n° 8</u> : Spécificité du récepteur aux androgènes pour différents éléments de réponse.....	51
<u>Figure n° 9</u> : Spécificité du récepteur aux glucocorticoïdes pour différents éléments de réponse.....	54
<u>Figure n° 10</u> : Code de reconnaissance des interactions ADN / Récepteur stéroïdiens d'après Suzuki <i>et al.</i>	57
<u>Figure n° 11</u> : Contrôle des niveaux d'expression.....	60
<u>Figure n° 12</u> : Spécificité du récepteur aux oestrogènes pour différents éléments de réponse.....	63
<u>Figure n° 13</u> : Effets de substitutions de l'acide glutamique 203 du récepteur aux oestrogènes sur la spécificité pour différents éléments de réponse.....	66
<u>Figure n° 14</u> : Spécificité du récepteur aux oestrogènes mutant G204A pour différents éléments de réponse.....	72
<u>Figure n° 15</u> : Stabilité de la fixation du récepteur aux oestrogènes sauvage et récepteur mutant ER-G204A sur un élément de réponse aux oestrogènes.....	74
<u>Figure n° 16</u> : Spécificité du récepteur aux oestrogènes mutant G204S pour différents éléments de réponse.....	77
<u>Figure n° 17</u> : Effets de coopérativité entre plusieurs éléments de réponse.....	80

Liste des sigles et abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
AF-1	activation function-1
AF-2	activation function-2
AMP _c	cyclic adenosine monophosphate
AP1	activator protein-1
AR	androgen receptor
ARA	androgen receptor associated protein
ARN _m	acide ribonucléique messenger
CAT	chloramphenicol acetyltransferase
CBP	CREB binding protein
CREB	cAMP response element binding protein
DAG	diacylglycerol
DBD :	DNA binding domain
Dex	dexametasone
DR	direct repeat
E ₂	17β-estradiol
ER	estrogen receptor
ERE	estrogen response element
FBS	fetal bovine serum
GMP _c	guanosine monophosphate cyclic
GR	glucocorticoid receptor
GRE	glucocorticoïd response
HAT	histone acetyl transferase
HRE	hormone response element
HSP	heat-shock protein
HTH	helix-turn-helix
IP ₃	inositol 1,4,5-triphosphate
IPTG	isopropylthiogalactoside
JNK	jun N-terminal kinase

LBD	ligand binding domain
MAPK	mitogen-activated protein kinase
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
p/CAF	p300/CBP-associated factor
PCR	polymerase chain reaction
PR	progesterone receptor
RAR	retinoic acid receptor
RMN	raisonnance magnétique nucléaire
RXR	retinoic X receptor
SDS	sodium dodecyl sulfate
SRC-1	steroid coactivator-1
TBP	TATA binding protein
TIF	transcriptional intermediary factor
TR	thyroid receptor
TRE	TPA response element

Remerciements

Au Docteur Sylvie Mader qui m'a fait l'honneur de diriger ce travail. Sa rigueur scientifique, ainsi que ses précieux conseils, m'ont appris à développer ma capacité de travail et incité à améliorer sans cesse la qualité de mes travaux. J'exprime ici mes sincères remerciements, ainsi que ma respectueuse reconnaissance.

Aux étudiants en stage au laboratoire qui ont contribué aux travaux, en particulier Geneviève Melançon pour les études sur les DBD de ER, Walter Rochas, Patrick Lapointe et Denis Nguyen pour leur aide dans la mise au point des conditions des gels shifts.

À Samuel Chagnon toujours disponible pour répondre aux questions et pour trouver une solution aux problèmes les plus épineux.

À Julie, Sébastien et Rocio pour m'avoir supporté durant les trois années que j'ai passé au laboratoire.

À Annie, Silvia et Wenli qui ont avec moi été les premiers étudiants du laboratoire. Les difficultés que nous avons eu à traverser, parfois seul, parfois solidairement ont créé des liens d'amitié inoubliables. Merci les filles! xxx

*Quand bien même je parlerais toutes les langues de la terre,
Quand bien même j'aurais toute la connaissance de l'univers,
Quand bien même j'aurais la foi la plus totale, celle qui
transporte les montagnes,
S'il me manque l'amour, je ne suis rien.*

Saint Paul (Épître aux Corinthiens 13.1-2)

1. INTRODUCTION

Avant de devenir des organismes pluricellulaires nous sommes passés par un stade où tout notre être se résumait en une seule et unique cellule. Toutes nos cellules, aussi différenciées soient elles, sont issues de cette première cellule et partagent le même patrimoine génétique. Si l'ADN qu'elles contiennent dans leur noyau leur est commun, tous les gènes ne sont pas exprimés dans chaque cellule. Parmi les différents mécanismes régulant l'expression des gènes, certaines protéines liant l'ADN et appelées facteurs de transcription jouent un rôle très important. Le sujet de ce mémoire concerne plus particulièrement l'étude de la reconnaissance spécifique de l'ADN par les récepteurs stéroïdiens, une famille de facteurs de transcription hormono-dépendants.

1.1. Généralités sur les facteurs de transcription

1.1.1. Spécificité cellulaire de la transcription

On a depuis longtemps montré que les niveaux de transcription d'un gène dépendaient du type cellulaire. Certains gènes comme celui de l'actine sont transcrits dans pratiquement toutes les cellules tandis que d'autres ne sont transcrits que dans certaines cellules (Derman E. *et al* 1981). Dans le noyau des cellules eucaryotes, l'ADN est associé à des protéines formant un complexe appelé chromatine. Selon que cette chromatine est plus ou moins condensée, on distingue respectivement l'hétérochromatine et

l'euchromatine. Il a été montré que les gènes transcrits étaient associés à l'euchromatine (Felsenfeld G *et al* 1992 et 1996). Les histones sont des constituants importants de la chromatine. Le nucléosome est une unité structurale formée par un enroulement du double brin d'ADN autour d'un octamère d'histones formé de quatre différents histones : H2a, H2b, H3 et H4, représentées deux fois chacune. Ces quatre histones sont extrêmement conservées au cours de l'évolution des eucaryotes, y compris entre animaux et végétaux, ce qui suggère un rôle important. Entre les nucléosomes, espacés d'environ 200 paires de bases, on trouve l'histone H1 qui est moins conservée. L'histone H1 peut lier spécifiquement le nucléosome et permet un empilement ordonné des nucléosomes pour former des fibres de 30 nm. Il existe plusieurs autres degrés d'enroulement conduisant à une chromatine de plus en plus condensée (Zlatanova *et al* 1991).

L'activation de la transcription est fréquemment accompagnée par une réorganisation de la structure de la chromatine facilitant l'accès à l'ADN des protéines de la machinerie transcriptionnelle. Inversement la répression est accompagnée par la restauration de l'organisation ordonnée de la chromatine. Les protéines de remodelage de la chromatine seraient par conséquent fortement impliquées dans le contrôle de la transcription en contrôlant l'accessibilité de la machinerie transcriptionnelle (Travers 1999). Parmi ces protéines, on trouve le complexe SWI-SNF impliqué dans le remodelage ATP-dépendant de la chromatine par des mécanismes encore mal compris (Peterson CL *et al* 1995). De plus la déacétylation des histones est fortement corrélée avec la stabilisation et la condensation des histones.

L'acétylation et la déacétylation des histones pourraient constituer un mécanisme permettant le remodelage réversible de la chromatine. Il est important de noter que plusieurs coactivateurs et corepresseurs des récepteurs nucléaires ont des activités d'acétyltransférase ou de désacétylases des histones, respectivement. De plus des composantes du facteur SWI-SNF peuvent également interagir avec les récepteurs nucléaires. Ces données suggèrent que le remodelage local de la chromatine joue un rôle important dans le processus d'activation transcriptionnelle par les récepteurs nucléaires (Torchia *et al* 1998).

1.1.2. Séquences d'ADN promotrices de la transcription

Au voisinage des séquences codantes d'ADN se trouvent des séquences importantes pour la régulation de la transcription (Kadonaga J.T. *et al* 1986). La région de l'ADN qui contient ces séquences impliquées dans l'initiation de la transcription est appelée "promoteur transcriptionnel". La boîte TATA, située en amont de nombreux gènes, est reconnue par la protéine TBP, l'une des composantes de la machinerie transcriptionnelle de base. D'autres séquences plus ou moins éloignées du site d'initiation de la transcription sont reconnues par des facteurs de transcription qui interagissent avec l'ADN de façon spécifique et modulent l'initiation de la transcription. D'autres protéines que les facteurs de transcription peuvent lier l'ADN, ce sont par exemple les protéines impliquées dans la réplication ou dans la réparation de l'ADN ou encore les histones qui lient l'ADN de façon non spécifique.

1.1.3. Les grandes familles de facteurs de transcription

Les facteurs de transcription contrôlent le développement des cellules, la différenciation et la croissance cellulaire en liant l'ADN au niveau de sites spécifiques et en modulant l'expression des gènes. La diversité des familles de facteurs de transcription reflète le fait qu'il existe plusieurs façons pour une protéine de lier spécifiquement l'ADN. On peut cependant distinguer des propriétés communes à la plupart des facteurs de transcription. Les facteurs de transcription lient souvent l'ADN sous forme de dimères. Les motifs de reconnaissance sont souvent constitués par une hélice α qui s'insère dans le sillon majeur de l'ADN. Il s'établit des contacts entre certains acides aminés (faisant le plus souvent intervenir les chaînes latérales) d'une part et les bases ou le squelette de l'ADN (avec l'oxygène phosphodiester le plus souvent) d'autre part. Les liaisons sont le plus souvent des liaisons hydrogènes directes ou faisant intervenir des molécules d'eau; il existe parfois des liaisons hydrophobes.

Les facteurs de transcription peuvent être classés selon leurs motifs de reconnaissance de l'ADN. Les plus grandes familles sont : les protéines hélice-tour-hélice (HTH), les homéodomaines, les protéines à doigts de zinc, les récepteurs nucléaires, les protéines à "leucine zipper" et les protéines hélice-boucle-hélice. D'autres familles plus petites existent dont certaines ont une structure en feuillet β comme le répresseur Arc du phage P22 (Breg *et al* 1990). Il existe aussi des protéines, par exemple l'antigène grand T de SV40 ou le suppresseur de tumeur p53, qui n'appartiennent à aucune famille (pour

revue voir Pabo C.O. 1992).

1.1.4. Signalisation intracellulaire et contrôle de l'expression des gènes

Les cellules possèdent sur leur surface membranaire un grand nombre de récepteurs leur conférant une sensibilité à de nombreux signaux externes. On peut citer, par exemple, les récepteurs à la sérotonine ou au glucagon (couplés à une protéine G), à l'acétylcholine (canal ionique), aux cytokines (associés avec une tyrosine kinase), aux facteurs de croissance ou à l'insuline (avec activité enzymatique intrinsèque). La liaison du ligand sur son récepteur membranaire va généralement provoquer l'augmentation, ou la diminution, de la concentration d'un second messenger (AMPc, GMPc, DAG, IP₃, Ca²⁺). Cette modification de la concentration du second messenger va elle-même provoquer une cascade d'activations enzymatiques comme par exemple celle des MAP kinases (Mitogen activation Proteins) qui appartiennent à la famille des sérine-thréonine kinases et dont l'activation par phosphorylation va conduire, entre autres, à la phosphorylation de facteurs de transcription.

Par opposition aux mécanismes d'action détaillés ci-dessus, certaines hormones liposolubles peuvent diffuser passivement au travers de la membrane et lier des récepteurs dans le cytoplasme ou dans le noyau. Ces complexes hormone-récepteur vont reconnaître et lier l'ADN au niveau de région régulant la transcription. Ces récepteurs, qui sont donc aussi des effecteurs directs des signaux hormonaux, forment la super-famille des récepteurs nucléaires dont nous allons détailler les propriétés dans la

section 1.2.

Les voies de signalisation des récepteurs membranaires et des récepteurs nucléaires ne sont pas indépendantes mais sont, au contraire, étroitement liées. Le “dialogue croisé” ou “cross talk” entre plusieurs voies de signalisation permet, en définitive, l'intégration des messages conduisant à des réponses cellulaires complexes (figure 2 et section 1.3.).

1.2. La super famille des récepteurs nucléaires

1.2.1. Classification

Les récepteurs nucléaires peuvent être classés selon leur ligand. On distingue ainsi les récepteurs stéroïdiens qui comprennent les récepteurs des glucocorticoïdes, des oestrogènes, des androgènes, de la progestérone, des minéralocorticoïdes; les récepteurs à l'hormone thyroïdienne, à la vitamine D, et les récepteurs des rétinoïdes (RAR pour l'acide rétinoïque, RXR pour l'acide 9-cis-rétinoïque). Il existe aussi des récepteurs pour lesquels aucun ligand n'a encore été découvert, appelés “récepteurs orphelins”.

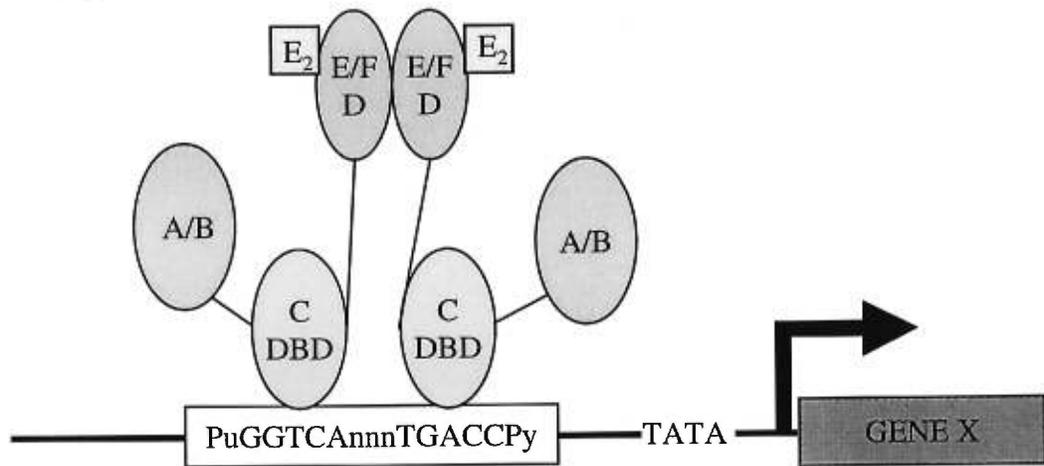
Les récepteurs nucléaires lient spécifiquement l'ADN au niveau de séquences appelées “éléments de réponse”. Les récepteurs stéroïdiens lient leur élément de réponse sous forme d'homodimères (Tsai SY *et al* 1988) tandis que la plupart des autres récepteurs lient l'ADN sous forme d'hétérodimères en association avec RXR (Kliwer SA *et al* 1992). Certains récepteurs orphelins peuvent agir sous forme de monomères.

La comparaison de plusieurs éléments de réponse des glucocorticoïdes (GRE) a permis de dégager une séquence consensus

Figure n° 1A : **Structure générale des récepteurs stéroïdiens.** Après fixation du ligand par exemple l'oestradiol (E₂), les récepteurs homodimérisent et reconnaissent leur élément de réponse en amont d'un gène dont l'expression est modulée.

Figure n° 1B : **Séquences consensus des éléments de réponse aux oestrogènes et aux glucocorticoïdes.** La numérotation est tirée de Zilliacus *et al* 1995. N signifie n'importe quelle paire de bases.

A



A/B : Fonction d'activation indépendante du ligand (AF1)

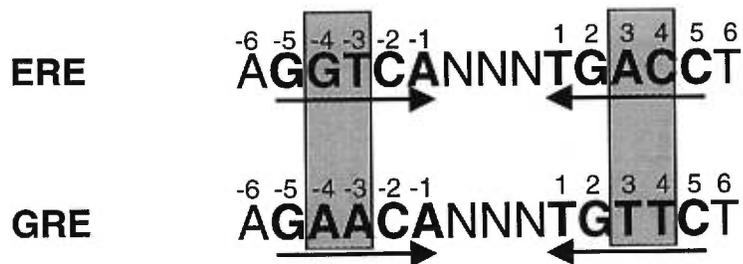
C : Domaine de liaison à l'ADN (DBD)

D-E-F : Domaine de dimérisation

Fixation du ligand

Fonction d'activation dépendante du ligand (AF2)

B



composée de deux motifs de six paires de bases disposées en palindrome et espacés de trois paires de bases (figure 1B). La partie droite du palindrome est davantage conservée que la partie gauche (Scheidereit C et al 1986). Les récepteurs des androgènes et ceux de la progestérone reconnaissent le même élément de réponse (Beato *et al* 1989). Un élément consensus de réponse des oestrogènes (ERE) a également été défini (Klein-Hitpass L *et al* 1988) et comporte de fortes similitudes avec un GRE puisque leurs motifs ne diffèrent que par deux paires de bases (figure 1B). Les récepteurs à la thyroxine (TR) à l'acide rétinoïque (RAR) et à la vitamine D3 (VDR) activent la transcription, sous forme d'hétérodimères avec RXR, à partir d'éléments de réponses composés de motifs identiques à ceux de l'ERE mais placés en répétition directe plutôt qu'en palindrome. Les hétérodimères VDR-RXR activent la transcription à partir d'un élément de réponse ayant un espace de 3 paires de bases entre les deux motifs directement répété (DR3); TR-RXR à partir d'un élément DR4 et RAR-RXR à partir d'un élément DR5. Umesono *et al* (1989) ont ainsi défini la règle du "3-4-5". Cette règle a été complétée pour inclure des éléments DR2 qui peuvent également être reconnus par des hétérodimères RXR-RAR et des éléments DR1 qui peuvent être reconnus par des homodimères RXR, HNF-4 ou encore par différents hétérodimères formés entre RXR et plusieurs récepteurs orphelins tels que PPAR, ARP-1, EAR-2 et EAR-3. Enfin un certain nombre de récepteurs orphelins incluant NGFI-B, SF-1, FTZ-F1, RevErbA et ROR α peuvent lier un motif ERE sous forme de monomères (voir pour revue Zilliacus *et al* 1995b).

Mangelsdorf *et al* (1995) distinguent ainsi quatre groupes de récepteurs nucléaires suivant leurs propriétés de liaison à l'ADN :

- Les récepteurs des stéroïdes qui sont associés à des protéines Hsp90. Ces protéines chaperones maintiendraient le récepteur dans une conformation permettant la fixation du ligand (Picard D *et al* 1990). La liaison de l'hormone conduit à un changement conformationnel, à une dissociation des protéines Hsp et à une liaison sous forme d'homodimères à des éléments de réponse palindromiques.
- Le deuxième groupe de récepteurs est celui des récepteurs pour l'hormone thyroïdienne, les rétinoïdes, les prostaglandines, la vitamine D3 et l'ecdysone. Ces récepteurs sont liés à l'ADN en absence de ligand. La liaison du ligand entraîne un changement conformationnel et une activation de la transcription. Ces récepteurs lient préférentiellement l'ADN sous forme d'hétérodimères au niveau d'éléments de réponses en répétition directe, en palindrome opposé ou inversé.
- Les récepteurs orphelins qui peuvent lier l'ADN sous forme de monomères.
- Les récepteurs orphelins qui peuvent lier l'ADN sous forme de dimères, préférentiellement sur des répétitions directes.

1.2.2. Structures et fonctions

La structure générale des récepteurs nucléaires est présentée sur la figure 1A (revue par Beato *et al* 1991). Globalement, on distingue une région très conservée avec de part et d'autre une région N-terminale peu conservée et une région C-terminale assez conservée.

Dans la partie N-terminale, la région A/B possède une fonction

d'activation de la transcription (AF1) qui est indépendante de la liaison au ligand (Tasset *et al* 1990). La région C, très conservée, est responsable de la reconnaissance spécifique de l'élément de réponse par le récepteur. Cette région contient deux groupes de quatre cystéines coordonnées par un atome de zinc, appelés "doigts de zinc". Cependant ces motifs diffèrent des doigts de zinc "classiques" en C₂H₂ comme ceux de TFIIIA et des structures dites "zinc cluster" comme dans le facteur de transcription Gal4 chez la levure (Vallée BL *et al* 1991). La partie C-terminale est assez conservée et possède plusieurs fonctions telles que la liaison au ligand (Moras *et al* 1998), la transactivation de la transcription (AF2), la dimérisation, la localisation nucléaire et parfois la répression de la transcription (Baniahmad *et al* 1992). Ces fonctions peuvent être modulées par la liaison du ligand. Ainsi, la fonction de transactivation AF2 est dépendante de la liaison du ligand. La fonction de dimérisation et la fonction de localisation nucléaire peuvent également, suivant les récepteurs, dépendre de la liaison au ligand.

La plupart des récepteurs nucléaires sont représentés par plusieurs isoformes. Les isoformes diffèrent soit par leur partie N-terminale soit par leur partie C-terminale. Les récepteurs à la progestérone PR_A et PR_B sont transcrits à partir de deux promoteurs différents. Ils diffèrent par leur partie N-terminale, PR_A n'ayant pas les 164 premiers acides aminés de PR_B. PR_A serait un répresseur de PR_B (Vegeto *et al* 1993). Le récepteur des glucocorticoides β est généré par un épissage différentiel et serait un inhibiteur du récepteur complet (Bamerger CM *et al* 1995). Des isoformes des

récepteur des androgènes et des oestrogènes ont également été décrits (Kuiper *et al* 1996) mais leur rôle n'a pas encore été élucidé.

1.3. Modes d'action des récepteurs stéroïdiens

En absence de ligand, les récepteurs stéroïdiens forment des complexes protéiques avec des protéines de choc thermique telles que Hsp90. L'existence d'un complexe multimérique autour de Hsp90 a été démontrée par des expériences de "cross-linking" (Segnitz B *et al* 1995). Ce complexe protéique maintiendrait le récepteur dans une conformation favorisant la liaison du ligand. Une différence dans la composition du complexe permettrait de moduler l'action du ligand (Renoir JM *et al* 1995). La fixation du ligand va induire une succession d'évènements incluant la dimérisation, la localisation nucléaire, la reconnaissance spécifique de l'élément de réponse et l'activation de la transcription.

1.3.1. Interaction avec des cofacteurs

Comment les récepteurs stéroïdiens, une fois liés à leur élément de réponse, activent-ils la transcription? On a d'abord pensé que la fixation du récepteur sur son élément de réponse suffisait à induire l'activation de la transcription par recrutement des premiers composants de la machinerie transcriptionnelle. On a dans ce sens montré qu'une surexpression de la TBP (TATA box Binding Protein) pouvait augmenter la transactivation par ER et que les deux protéines pouvaient interagir *in vitro* (Sadavsky *et al* 1995). L'hypothèse de l'intervention de facteurs intermédiaires a été suggérée par des expériences de "séquestration" : la surexpression d'un récepteur stéroïdien

entraîne la diminution de la transcription par un autre récepteur stéroïdien suggérant qu'il y a titration d'un facteur limitant (Meyer *et al* 1989). Plusieurs familles de co-facteurs ont été identifiées en utilisant la technique du double hybride chez la levure et le criblage de banque d'ADNc. On peut citer la famille de TIF2 (Transcriptional intermediary factor) et SRC-1 (Steroid Receptor Co-activator), et la famille de CBP (CREB-binding protein) et p300. Il existe aussi des co-répresseurs qui pourraient être liés aux récepteurs en absence de ligand. La fixation du ligand entraînerait une modification de la configuration du domaine de liaison au ligand (LBD) avec comme conséquence la libération du co-répresseur et la fixation de co-activateurs. Certains antagonistes des récepteurs nucléaires pourraient lier le LBD sans induire le changement conformationnel approprié.

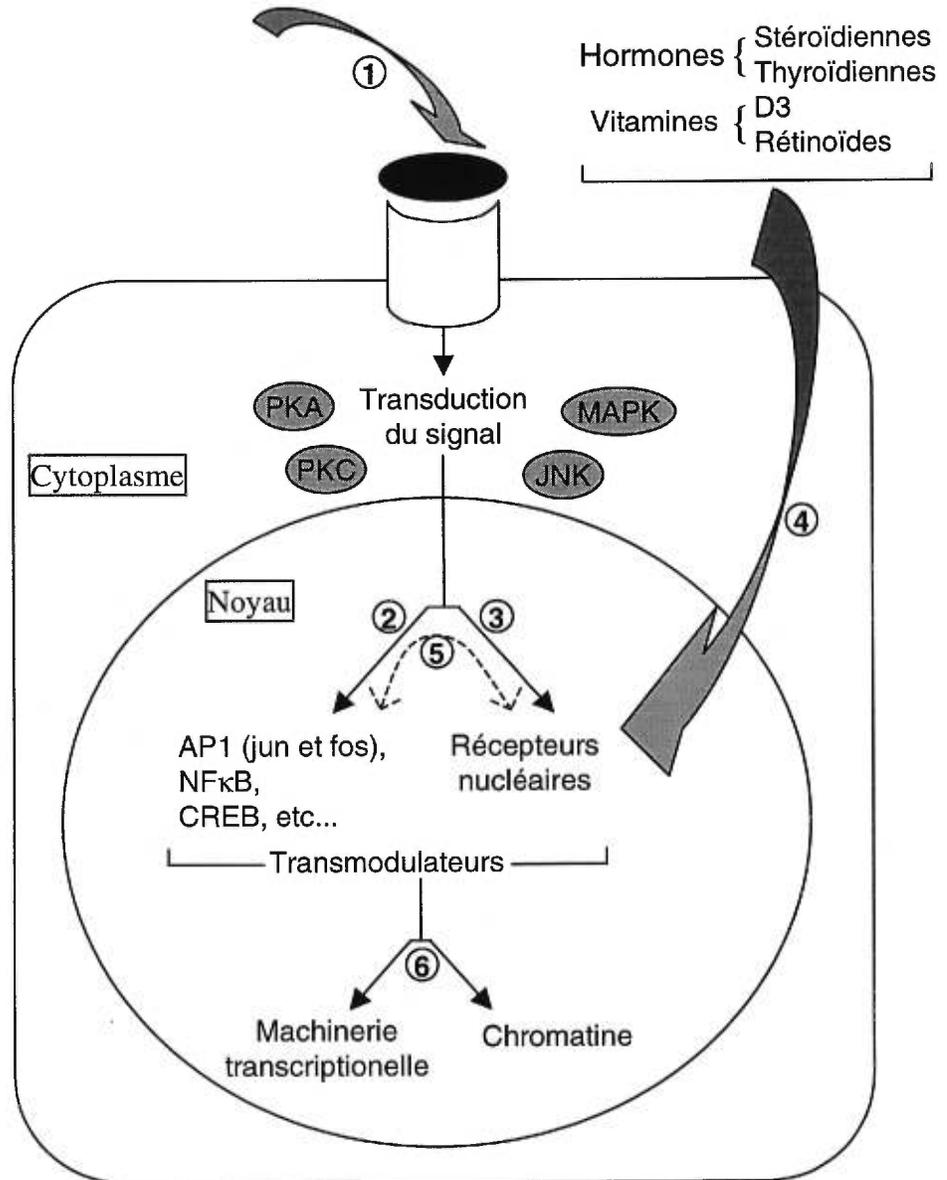
1.3.2. Interférences avec d'autres facteurs de transcription

Dans de nombreux promoteurs, la fonction de transactivation des récepteurs stéroïdiens est médiée ou augmentée par d'autres facteurs de transcription (Schüle *et al* 1988). Il existe par exemple des éléments de réponse composites, c'est à dire reconnus par plusieurs facteurs de transcription, qui peuvent être actifs ou inactifs en fonction du contexte physiologique (Diamond *et al* 1990). Dans ce cas l'élément de réponse composite peut être à la fois lié par GR et c-jun; l'effet positif ou négatif dépend de la présence de c-jun et de la proportion de c-fos. D'autres types d'interférences existent puisque, par exemple, GR peut inhiber l'activation de la transcription de gènes, comme celui de la collagénase, par AP1 sans qu'aucune liaison de GR à l'ADN ne soit nécessaire (Schüle *et al* 1991).

Figure n°2 : Modulation de la transcription par les récepteurs nucléaires.

1) : La liaison d'un ligand sur son récepteur à la surface de la cellule induit une cascade de réactions suivant plusieurs voies de signalisation. 2) : La cascade de signalisation aboutit à l'activation de facteurs de transcription en particulier par phosphorylation. 3) : La cascade peut également aboutir à la phosphorylation de récepteurs nucléaires. 4) : Certains ligands liposolubles traversent passivement la membrane cellulaire et se fixent sur des récepteurs nucléaires. 5) : Il existe des interférences (cross-talk) entre les récepteurs nucléaires et d'autres facteurs de transcription. 6) : L'intervention de co-activateurs ou co-répresseurs (transmodulateurs) conduit à l'intégration des différentes voies de signalisation par des modifications de la structure de la chromatine et par une interaction avec la machinerie transcriptionnelle.

Facteurs de croissance,
cytokines, signaux de stress
neurotransmetteurs, hormones peptidiques



Plusieurs hypothèses restent sous investigation : une interaction protéine-protéine entre AP1 et GR, une interférence de GR avec la Jun N-terminal kinase (JNK) qui active normalement AP1, une compétition pour des cofacteurs limitants comme CBP. Le récepteur des glucocorticoïdes a également montré un effet inhibiteur sur NF- κ B (Beato *et al* 1996).

1.3.3. Interférences avec d'autres voies de signalisation

Certains cofacteurs et en particulier CBP/p300 sont des cofacteurs pour un grand nombre de facteurs de transcription et sont en quantité limitante dans la cellule par rapport aux concentrations de facteur de transcription avec lesquels ils interagissent. Ces deux propriétés feraient des cofacteurs des intégrateurs des différentes voies de signalisation (figure 2). CBP/p300 pourrait constituer une plateforme pour le recrutement de plusieurs facteurs transcriptionnels au niveau du site d'initiation. CBP possède une activité HAT (Histone Acetyl Transferase) et peut en outre recruter d'autres co-activateurs tel P/CAF (p300/CBP-associated factor) ayant également une activité HAT. La découverte d'un nombre croissant de co-facteurs présentant une telle activité suggère que l'acétylation des histones serait nécessaire pour activer la transcription ou pour lever une répression. Ces études montrent toute l'importance de la structure chromatinienne dans le contrôle de la transcription.

1.4. Spécificité des récepteurs nucléaires pour leurs éléments de réponse

Comme nous l'avons déjà précisé, les récepteurs nucléaires ne

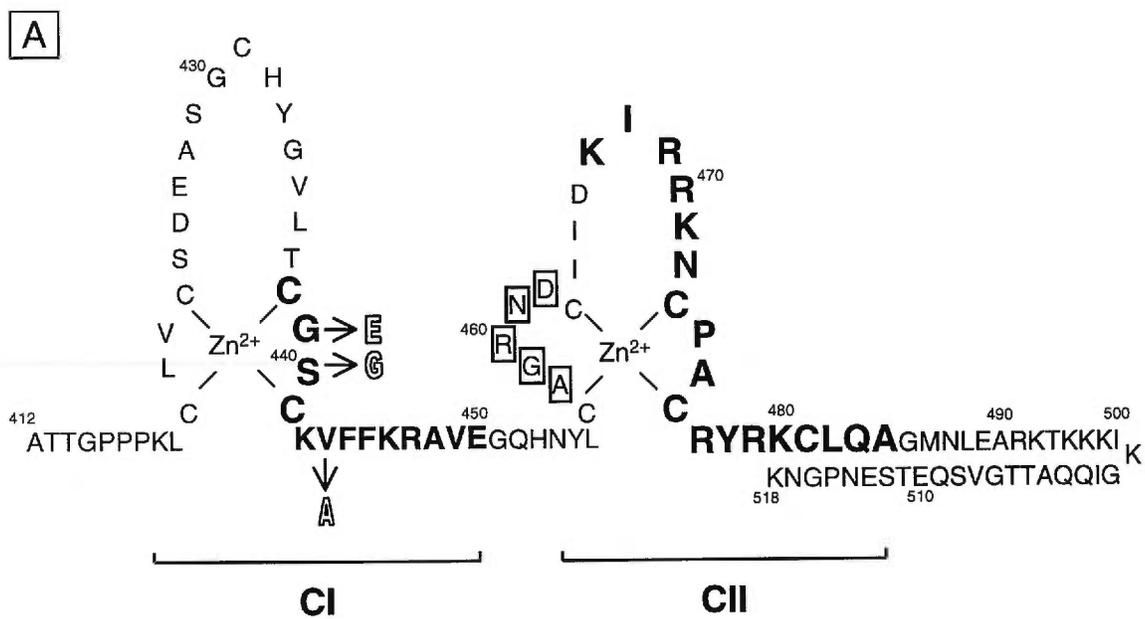
reconnaissent qu'un faible nombre de séquences spécifiques appelées éléments de réponse à l'hormone (HRE) (Klock *et al* 1987). Un HRE est généralement constitué de deux motifs de six paires de bases. Les deux motifs sont séparés par un nombre variable de paires de base et peuvent être arrangés en répétitions directes ou inversées (palindromes). Il existe seulement deux motifs principaux reconnus par les récepteurs nucléaires connus : le motif P_uGGTCA (P_u pour base purique : A ou G) reconnu par ER, RAR, TR et VDR, et le motif P_uGAACA reconnu par GR, AR, PR et MR. Deux approches ont été utilisées pour déterminer les acides aminés importants dans la discrimination de reconnaissance entre les HRE de type ERE et ceux de type GRE. Une première stratégie consiste à déterminer à l'aide de la technique de mutagenèse dirigée quels sont les acides aminés importants dans la reconnaissance spécifique de l'élément de réponse. Une autre approche consiste à déterminer les contacts chimiques existant entre le DBD du récepteur et les bases de l'élément de réponse par des études de résonance magnétique nucléaire ou des études cristallographiques.

1.4.1. Apports initiaux de la dissection moléculaire

Le premier doigt de zinc est responsable de la spécificité du récepteur pour son élément de réponse. En effet, si on intervertit la partie N-terminale du domaine de liaison à l'ADN (DBD) du récepteur des glucocorticoïdes et du récepteur des oestrogènes, on inverse leurs spécificités (Green S *et al* 1988). Certains acides aminés du DBD sont invariants, en particulier les huit cystéines qui sont coordonnées par deux ions zinc (Freedman *et al* 1988). Des expériences de mutagenèse dirigée ont ensuite montré que 3 acides aminés

Figure n° 3A : Représentation schématique du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des glucocorticoïdes. Les acides aminés sont représentés par le code à une lettre. Les acides aminés des hélices α sont en gras. Les acides aminés de la boîte P sont indiqués par des flèches; les lettres creuses représentent les acides aminés correspondants du récepteur des oestrogènes. Les acides aminés de la boîte D sont encadrés. Les deux doigts de zinc sont notés CI et CII.

Figure n° 3B : Séquence des sondes oligonucléotides contenant un élément de réponse. Les positions 3 et 4 de l'élément de réponse ainsi que les bases complémentaires —3 et —4 ont été substituées par 16 différentes combinaisons de deux paires de bases. La nomenclature des sondes est déterminée par les positions —3 et —4 (entourées en gris).



sont critiques pour la discrimination entre motifs de type ERE ou GRE. En effet, si les acides aminés Glu 203, Gly 204 et Ala 207 du récepteur des oestrogènes sont respectivement substitués par les acides aminés correspondant du récepteur des glucocorticoïdes, Gly 439, Ser 440 et Val 443, on obtient une spécificité de type GR (Mader *et al* 1989). Ces trois acides aminés constituent la boîte P (proximale) et se trouvent dans une hélice α appelée hélice de reconnaissance de l'ADN (figure 3A et section 3.1.2.). Inversement la substitution des trois acides aminés de la boîte P du GR par ceux du ER change la spécificité du récepteur mutant qui reconnaît avec une haute affinité un ERE et lie un GRE plus faiblement (Zilliacus *et al* 1992).

Au niveau du second "doigt de zinc", une boucle de 5 acides aminés appelée "boîte D" (distale) joue un rôle dans la dimérisation. La boîte D est particulièrement importante pour la distinction entre palindromes et répétitions directes (Umescio and Evans 1989).

1.4.2. Apports des études cristallographiques

Les structures tridimensionnelles des DBD de GR, ER, RAR et RXR ont été déterminées par résonance magnétique nucléaire (Härd *et al* 1990; Schwabe *et al* 1990; Knegtel *et al* 1993; Lee *et al* 1993) et les structures des complexes avec l'ADN des DBD de GR et ER par cristallographie aux rayons X (Luisi *et al* 1991; Schwabe *et al* 1993). Bien que d'allure similaire, les deux doigts de zinc (CI en N-terminal et CII en C-terminal), encodés par deux exons séparés (Ponglikimongkol *et al* 1988), ont des fonctions bien distinctes.

Chaque module possède une hélice α qui, réunies, forment le coeur hydrophobique du DBD. Les boucles entre les deuxièmes et troisièmes cytosines de chaque module établissent des contacts avec les phosphates de l'ADN. Ces contacts non spécifiques stabilisent et positionnent le DBD de telle sorte que l'hélice α de C1 soit placée dans le sillon majeur et perpendiculairement à l'axe de l'ADN. C'est cette hélice α ("hélice de reconnaissance de l'ADN") qui établit des contacts spécifiques avec les bases de l'élément de réponse.

La comparaison des contacts avec l'ADN des DBD de ER et de GR montre des similitudes mais aussi des différences. Pour le GR, trois acides aminés établissent des contacts spécifiques avec le GRE. Il s'agit de la lysine 442 (5), de la valine 443 (6) et de l'arginine 447 (10). La numérotation entre parenthèse correspond à la position sur l'hélice α de reconnaissance de l'ADN et permet de comparer ER et GR. Pour ER, quatre acides aminés établissent des contacts avec l'ERE : l'acide glutamique 203 (2), la lysine 206 (5), la lysine 210 (9) et l'arginine 211 (10). À l'exception de la liaison de type hydrophobique entre valine 443 (6) et la thymine 3, toutes les liaisons sont des ponts hydrogènes soit directs soit par l'intermédiaire de molécules d'eau (figure 4B).

Les contacts spécifiques qui se font avec les bases communes aux ERE et GRE font intervenir les mêmes acides aminés et les mêmes bases : liaison de l'arginine (10) avec la guanine 2, et de la lysine (5) avec la guanine -5. Pour le GR, la lysine 5 établit un contact direct et un contact faisant

Figure n° 4A : Hélices α de reconnaissance de l'ADN des récepteurs des glucocorticoïdes et des oestrogènes. Les chiffres inscrits au-dessus de la séquence primaire du GR correspondent à la position des acides aminés dans la protéine. Pour le ER les chiffres correspondants sont inscrits en dessous de chaque acide aminé. La numérotation centrale est commune au ER et GR et correspond à la position dans l'hélice α . Les acides aminés de la boîte P sont soulignés. Les acides aminés qui établissent un contact direct avec des bases de l'élément de réponse sont en gras.

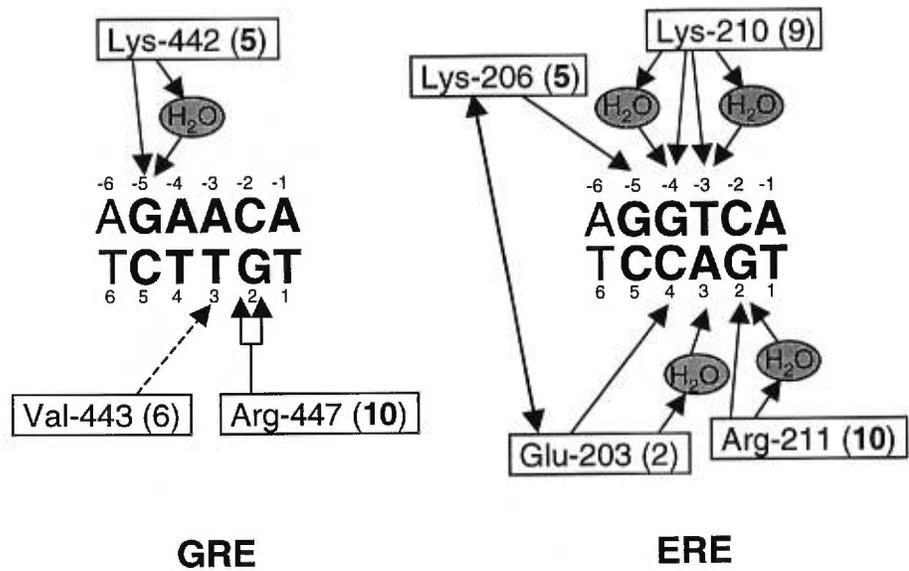
Figure n° 4B : Interactions des récepteurs des glucocorticoïdes et des oestrogènes avec leur élément de réponse. Les acides aminés sont représentés par le code à trois lettres suivi du chiffre représentant leur position dans la protéine. Le chiffre entre parenthèses correspond à la position dans l'hélice α . La Valine 443 (6) du GR établit une liaison hydrophobe (flèche en pointillé) avec la thymine 3. Les autres liaisons sont des liaisons hydrogènes qui peuvent être directes ou via une molécule d'eau. Pour les deux récepteurs, la lysine (5) et l'arginine (10) établissent des contacts avec la guanine —5 et la guanine 2 respectivement. Les autres contacts sont spécifiques au GR ou à l'ER. Pour ER, il existe un contact entre Glu-203 et Lys-206. Seul un demi-site est représenté.

Figure n° 4C : Résumé du rôle des acides aminés de la boîte P. Les acides aminés du GR et du ER sont entourés par des rectangles ou des cercles respectivement. Leurs interactions positives ou négatives avec les éléments de réponse sont indiquées. La sérine 440 notée (3) du GR établit un contact avec l'arginine 470 notée (33) (Zilliacus *et al* 1995).

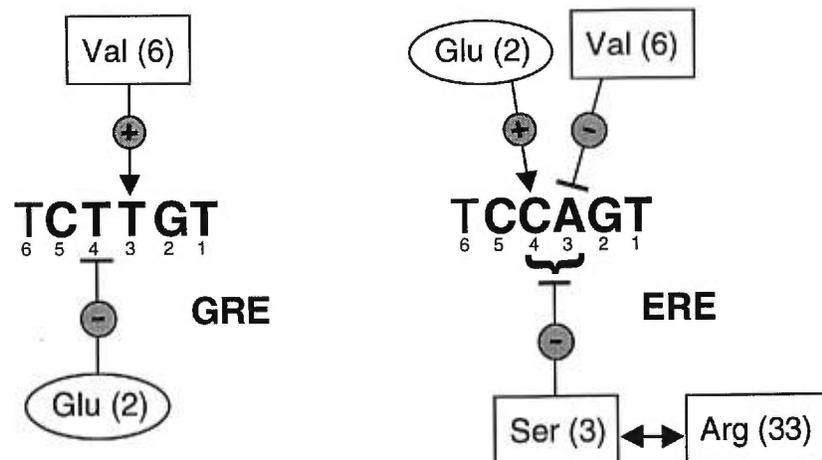
A

GR	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450
	Cys	<u>Gly</u>	<u>Ser</u>	Cys	Lys	<u>Val</u>	Phe	Phe	Lys	Arg	Ala	Val	Glu
(# aa)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ER	Cys	<u>Glu</u>	<u>Gly</u>	Cys	Lys	<u>Ala</u>	Phe	Phe	Lys	Arg	Ser	Ile	Gln
	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214

B



C



intervenir une molécule d'eau tandis qu'il n'y aurait qu'une seule liaison hydrogène directe pour ER. L'arginine (10) établit deux contacts directs pour GR, tandis que pour ER il existe un contact direct et un contact faisant intervenir une molécule d'eau.

Les autres contacts s'établissent avec les bases non communes aux ERE et GRE. Le DBD du GR établit une liaison hydrophobe entre la valine 443 (6) et la thymine 3. Le DBD de ER établit des contacts avec l'ERE avec deux acides aminés : l'acide glutamique 203 (2) et la lysine 210 (9). L'acide glutamique établit un contact via une molécule d'eau avec l'adénine 3 et un contact direct avec la cystéine 4. La lysine établit deux contacts, l'un direct l'autre via une molécule d'eau, avec la thymine -3 et deux contacts, l'un direct l'autre via une molécule d'eau avec la guanine -4.

Les études cristallographiques ont également mis en évidence des contacts entre acides aminés du DBD. La lysine 446 (9) du GR établit un pont salin avec l'acide glutamique 450 (13) et la sérine 440 (3) établit une liaison hydrogène avec l'arginine 470 (33). La lysine 206 (5) du ER établit un contact avec l'acide glutamique 203 (2) (Luisi et al 1991; Schwabe et al 1993).

1.4.3. Analyses plus fines par mutagenèse

En utilisant des mutants du GR, il a été montré qu'en position 2 de l'hélice de reconnaissance, tous les acides aminés ont une meilleure affinité que l'acide glutamique pour des éléments de réponse ayant une thymine en position 4 (Zilliaccus et al 1994). Ceci suggère que l'acide glutamique 203 (2) du ER permettrait en même temps une interaction positive avec une cytosine en position 4 et une interaction négative avec une thymine en cette même

position. D'après les modélisations moléculaires, cette sélectivité négative, particulière à l'acide glutamique, pour une thymine en position 4 serait due à un encombrement stérique entre le groupe carbonyle du glutamate et le groupement méthyle de la thymine (Zilliacus et al 1995a).

De la même manière la valine 443 (6) du GR permet en même temps une interaction hydrophobe positive avec le groupement méthyle d'une thymine en position 3 et une interaction négative avec une adénine à la même position.

Si la sérine 440 (3) du GR est substituée par une glycine comme dans ER, on diminue largement la spécificité. L'absence de sérine en cette position est nécessaire pour la reconnaissance d'un ERE par un ER. Ceci suggère que la sérine 440 (3) restreint la spécificité du GR au GRE. Les études cristallographiques montrent qu'il existe une liaison hydrogène entre le groupement hydroxyle de la sérine 440 et l'arginine 470 du GR (Luisi et al 1991). Si on supprime le groupement hydroxyle de la sérine 440 en substituant cet acide aminé par une alanine, le DBD de GR mutant est alors capable d'établir une liaison avec un ERE. La liaison hydrogène entre la sérine 440 et l'arginine 470 pourrait induire un changement de conformation du DBD de GR et c'est ce changement de conformation qui restreindrait la spécificité (Zilliacus et al 1994).

1.4.4. Prévion de nouvelles spécificités

Les comparaisons entre les familles et au sein de chaque famille de facteurs de transcription sont susceptibles de nous aider à dégager des grands principes de l'interaction spécifique entre protéines et ADN. Neuf

grands principes de reconnaissance spécifique de l'ADN par les facteurs de transcription ont été définis par Pabo et Sauer (1992). On peut appliquer ces grands principes aux récepteurs nucléaires. (1) La reconnaissance spécifique implique toujours un certain nombre de contacts avec les bases et la structure de l'ADN. (2) Les liaisons hydrogènes sont essentielles même s'il existe aussi des liaisons hydrophobes. Il existe souvent une à deux douzaine de liaisons hydrogènes à l'interface protéine / ADN. (3) Les chaînes latérales sont essentielles même s'il existe aussi des liaisons hydrogènes entre la structure peptidique et les bases ou la structure de l'ADN. (4) Il n'y a pas de correspondance simple un pour un entre les chaînes latérales des acides aminés et les bases qu'ils contactent. Il apparaît que la forme, le repliement, de la protéine entière facilite le contrôle de la reconnaissance spécifique par l'hélice de reconnaissance. (5) La plupart des contacts s'établissent dans le sillon majeur. Les bases puriques qui sont plus grosses et qui permettent plus de possibilités de liaisons hydrogènes semblent être particulièrement importantes. (6) La plupart des motifs de reconnaissance contiennent une hélice α qui se positionne dans le sillon majeur. Il existe des exemples impliquant des feuillets β ou des chaînes polypeptidiques mais les contacts avec les bases paraissent moins courants. (7) Les contacts avec la structure d'ADN impliquent souvent des liaisons hydrogènes et/ou des ponts salins avec des oxygènes phospho-diesters. (8) Plusieurs DBD sont généralement nécessaires pour une reconnaissance spécifique de haute affinité. Le même motif peut être utilisé plusieurs fois comme cela est le cas lorsqu'il existe une

homo ou une hétéro-dimérisation. (9) La reconnaissance est un processus structural très précis. L'hydratation joue un rôle essentiel et la structure de l'ADN, qui dépend de la séquence, peut aussi être importante.

Suzuki et al (1993, 1994a et 1994b) pensent au contraire qu'il est possible d'établir une correspondance simple entre les acides aminés de l'hélice α et les bases de l'élément de réponse. Les règles de reconnaissance seraient de deux types, chimiques et stéréochimiques. Les règles chimiques déterminent les possibilités de pairage entre acides aminés et bases au travers de liaisons hydrogène ou hydrophobe. La taille des acides aminés est également importante puisque pour une position donnée sur la protéine, un acide aminé long pourra atteindre une base plus éloignée sur l'ADN. Suzuki et al (1994a) distinguent ainsi quatre groupes d'acides aminés : petits, moyens, grands et aromatiques. Pour calculer le "score de liaison", un programme informatique prend en compte des "points de mérite stéréochimique" et des "points de mérite chimique". Les points de mérite chimique ne tiennent pas seulement compte de la possibilité d'établissement d'une liaison entre un acide aminé et une base mais aussi de la relative facilité à établir ce contact. Par exemple une arginine et une lysine peuvent établir une liaison hydrogène avec une thymine, une guanine ou une adénine. Mais en fait, ces deux acides aminés qui sont chargés positivement ne reconnaissent presque exclusivement une guanine parce que la pair G-C est chargée négativement. Par conséquent, la liaison d'une arginine ou d'une lysine avec une guanine obtiendra plus de point qu'avec une thymine ou une

adénine. De même, les “points de mérite stéréochimique” ne sont pas les mêmes pour tous les pairages. Susuki *et al* (1994b) reconnaissent ne pas prendre en compte les modifications de structure de l’ADN dues à l’interaction d’une part et dépendant de la séquence d’autre part. Ils estiment cependant avoir établi un code de reconnaissance “simple, logique, cohérent et spécifique”.

1.5. Objectifs et description du projet de recherche

1.5.1. Travaux sur le récepteur des androgènes mutant G577R

Une nouvelle mutation du récepteur des androgènes (AR) a été observée chez un patient souffrant d'un syndrome d'insensibilité partielle des androgènes. Un premier objectif consiste à examiner si cette mutation dans le domaine de liaison à l’ADN affecte l’affinité et/ou la spécificité de l’interaction AR / éléments de réponse; ce qui expliquerait le phénotype d'insensibilité partielle aux androgènes. Cette mutation touche l'un des trois acides aminés de la boîte P du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des androgènes. Il est donc intéressant de comparer les différences de spécificité entre les récepteurs mutant et sauvage. Les domaines de liaison à l'ADN seront clonés dans un vecteur d'expression procaryote puis leur affinité et spécificité relative pour différents éléments de réponse seront mesurées par retard sur gel.

1.5.2. Travaux sur des mutants du récepteur des oestrogènes

Dans le but de vérifier la pertinence d'un code de reconnaissance de l'ADN, plusieurs mutations seront introduites dans le domaine de liaison à

l'ADN du récepteur des oestrogènes. Les mutations ponctuelles introduites modifient l'acide glutamique 203 qui établit une liaison avec une cytosine de l'élément de réponse des oestrogènes. Afin de déterminer l'importance des acides aminés non pris en compte par le code proposé par Suzuki *et al* (1994), d'autres mutations modifient la glycine voisine. Les domaines de liaison des récepteurs de types sauvages et mutés seront exprimés dans *E.Coli* et les récepteurs entiers seront produits par transfection transitoire dans les cellules Cos. La capacité des différentes protéines à lier l'ADN sera testée par retard sur gel en utilisant des HRE mutés. La différence entre les motifs ERE et GRE se situant au niveau des deux paires de bases centrales des motifs reconnus, nous avons utilisé les 16 combinaisons possibles à ces deux positions. Dans un deuxième temps, l'effet de ces mutations sur les propriétés d'activation de la transcription par le récepteur des oestrogènes sera testée par un système de gènes rapporteurs sous contrôle d'HRE consensus ou mutés.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Produits chimiques et matériel

L'oestradiol (E₂), la dexamétasone (Dex), la rifampicine, et les acides aminés ont été achetés chez Sigma; la mibolérone, le dATP-[α ³²P], le dATP-[³⁵S] et le chloramphénicol-[³H] chez Mandel. Les enzymes de restriction ont été achetés chez Pharmacia et les enzymes de modification de l'ADN (T4 polynucléotide kinase, phosphatase alcaline et Vent® DNA polymérase) chez New England Biolabs.

Le milieu de culture cellulaire, le serum foetal bovin (FBS), la trypsine et l'hygromicine B ont été achetés chez Life technologies.

Les produits chimiques pour la préparation des différentes solutions et tampons sont de qualité analytique.

2.2. Construction de plasmides recombinants

2.2.1. Système d'expression eucaryote

Pour l'expression du récepteur des androgènes nous avons utilisé le vecteur BHEX-pSV-AR₀ (dérivé de pSV-AR₀, Brinkmann *et al* 1989) gracieusement reçu du professeur Pinsky (*Lady Davis Institute for Medical Research* à Montréal). Le vecteur BHEX-pSV-AR-A577R a été obtenu en remplaçant le fragment [KpnI-XhoI] par le fragment équivalent obtenu par mutagenèse dirigée (section 3.3.1.).

Le vecteur pSG₁-HE₀ pour l'expression de ERwt a été décrit par Green S (1986). Les plasmides PSG₁-E203G, PSG₁-G204A et PSG₁-G204S pour l'expression de ER mutants, ont été construits par Mader S (1989). Les vecteurs PSG₁-ER-E203N, PSG₁-ER-E203R et PSG₁-ER-E203H ont été construits en remplaçant le fragment [KpnI-XhoI] de HE80 (construit par Mader S à partir de pSG₁-HE₀) par le fragment équivalent obtenu par mutagenèse dirigée (section 3.3.2.).

2.2.2. Système d'expression procaryote

Le vecteur pET31 que nous avons utilisé est dérivé du vecteur pET3b (Rosenberg *et al* 1987) : un oligonucléotide contenant les sites Kpn_I et Xho_I a été inséré entre les deux sites de clonage de pET3b. L'expression par les vecteurs pET est contrôlée par la polymérase T7, dont l'expression est induite par l'IPTG (acheté chez Bioshop) dans la souche bactérienne BL21 DE3 (Novagen).

Le vecteur pET31-HE81, construit par Mader *et al* (1993), code pour le domaine de liaison à l'ADN (acides aminés 176 à 282) du récepteur des oestrogènes. Deux fragments d'ADN, codant pour le domaine équivalent dans ARwt et AR mutant (acides aminés 550 à 656), ont été générés par PCR à partir de BHEX-pSV-AR₀ et BHEX-pSV-AR-A577R en utilisant un oligo en 5' qui introduit un site KpnI (ATCGGTACCGACTATTACTTTCCACCCCAG) et un oligo en 3' qui introduit un codon stop encadré par les sites BamHI et XhoI (ATCGGATCCTCAGGCTCGAGCGGTTGTCTCCTCAGTGGGG). Ces

fragments ont été introduits entre les sites KpnI et XhoI de pET31-HE81 pour donner les vecteurs pET31-ARwt et pET31-AR-A577R.

2.2.3. Système de vecteurs rapporteurs

Tous les vecteurs rapporteurs sont dérivés de pBL-CAT8+ (Klein-Hitpass *et al* 1988). Ce plasmide possède un site de clonage multiple en amont d'un promoteur thymidine kinase (tk) et du gène de la chloramphénicol acétyl transférase (CAT).

Un oligonucléotide de 35 paires de bases, contenant un élément de réponse à l'hormone (HRE) au centre et deux extrémités cohésives BamHI et BglII, a été inséré dans pBL-CAT8+ préalablement ouvert par BamHI. Les oligonucléotides utilisés sont les mêmes que ceux utilisés dans les expériences de retard sur gel (section 2.7.). Les vecteurs rapporteurs p**ERE**tkCAT, p**GRE**tkCAT, p[**CT**]tkCAT, p[**TT**]tkCAT, p[**AT**]tkCAT, p[**GA**]tkCAT présentent un élément de réponse à l'hormone dont les motifs sont respectivement : **GGTCA** (ERE), **GAACA** (GRE), **GCTCA**, **GTTCA** et **GATCA** et **GGACA**.

Les vecteurs rapporteurs p(ERE)₂tkCAT, p(GRE)₂tkCAT et p(GRE*)₂tkCAT ont été créés par insertion d'un oligonucléotide contenant deux éléments de réponse (Mader S. non publié). Les vecteurs rapporteurs pBL-CAT8+(ERE)₃ et pBL-CAT8+(GRE)₃ ont été créés par insertion de trois oligonucléotides successifs au lieu d'un seul comme précédemment (Mader S. non publié). L'indication GRE* désigne l'élément de réponse intermédiaire entre ERE et GRE et dont le motif est **GGACA**.

2.3. Mutagenèse dirigée par PCR

Toutes les mutagenèses ont été réalisées selon la méthode décrite par Higuchi et al (1988). Les réactions d'amplification ont été effectuées par l'ADN polymérase Vent® (New England Biolabs). Quatre oligonucléotides ont été utilisés pour chaque mutagenèse.

2.3.1. BHEX-pSV-AR-G577R

L'ADN servant de matrice a été fourni par le vecteur BHEX-pSV-AR₀.

Les oligonucléotides utilisés sont :

5'TGAGAATTTCGGTACCCTGGCGGCATG^{3'} (site KpnI souligné)

5'GAAGAAGACCTTGCAGCTTCGACATGTGAGAGCTCCATAGTG^{3'}

5'TGAGAATTCCCTCGAGGACATTCAGAAAGATG^{3'} (site XhoI souligné)

5'CACTATGGAGCTCTCACATGTCGAAGCTGCAAGGTCTTCTTC^{3'}

Le fragment de PCR final a été digéré par KpnI et XhoI et inséré entre ces mêmes sites dans le vecteur BHEX-pSV-AR₀.

2.3.2. Mutants E203N, E203R et E203H du récepteur des oestrogènes

Le vecteur PSG₅-HE80 a servi de matrice pour les trois mutagenèses. Les deux oligonucléotides communs aux trois mutagenèses sont MT149 et MT150 dont les séquences sont respectivement :

5'TCGGTACCATGGAATCTGCCAAGGAGAC^{3'} (site KpnI souligné)

5'CACTCGAGCAGACCCCACTTCACCCCTGC^{3'} (site XhoI souligné)

Pour le mutant E203N les oligonucléotides servant à introduire la mutation sont :

5'CCATTATGGAGTCTGGTCCTGT**AAT**GGCTGCAAGGCCTTCTTC^{3'} et

5'GAAGAAGGCCTTGCAGCC**ATT**ACAGGACCAGACTCCATAATGG^{3'}

Pour le mutant E203H les oligonucléotides mutagènes sont :

5'CCATTATGGAGTCTGGTCCTG**CCAT**GGCTGCAAGGCCTTCTTC^{3'} et

5'GAAGAAGGCCTTGCAGCC**ATG**GCAGGACCAGACTCCATAATGG^{3'}

Pour le mutant E203R les oligonucléotides mutagènes sont :

5'CCATTATGGAGTCTGGTCCTG**CCGGG**GGCTGCAAGGCCTTCTTC^{3'} et

5'GAAGAAGGCCTTGCAGCC**CCGGC**AGGACCAGACTCCATAATGG^{3'}

2.4. Séquençage

Toutes les constructions ont été séquencées en utilisant les instructions de du "T7 sequencing Kit" de Pharmacia.

Les amorces utilisées sont :

"T7 universal primer" fourni par le kit pour le plasmide pET31 et ses dérivés,

MT149 pour les vecteurs exprimant les différents ER mutants,

"tk reverse primer" pour les vecteurs rapporteurs dérivés de pBL-CAT8+.

2.5. Expression des domaines de liaison à l'ADN

L'expression des domaines de liaison à l'ADN a été réalisée en utilisant E.coli-BL21(DE3)-pLysS (Novagen). Les bactéries compétentes sont transformées par les plasmides pET31 recombinants. Du LB (100ml) auquel

on a ajouté 100 µg/ml d'ampicilline et 35 µg/ml de chloramphénicol est ensemencé par une préculture obtenue dans les mêmes conditions pendant 16 heures. L'incubation à 37°C se poursuit jusqu'à une DO de 0,5 à 600 nm. De l'IPTG (0.5mM) sont alors ajouté pour induire l'expression pendant deux heures à 37°C.

2.5.1. Contrôle de l'expression par marquage à la méthionine ³⁵S

Avant d'ajouter l'IPTG, un aliquot de 0,5 ml est prélevé pour contrôler l'expression par marquage à la méthionine ³⁵S. Cet aliquot est centrifugé pendant une minute à 13 000 rpm. Le culot est rincé par un millilitre de milieu minimum M9 (Miller JH 1972) puis repris dans un millilitre de milieu M9 auquel on a ajouté 0,01% (poids/volume) de chacun des 18 acides aminés (les vingt acides aminés naturels sauf la méthionine et la cystéine). On ajoute 0,5 mM d'IPTG et 25 µg/ml de rifampicine (inhibiteur de l'ARN polymérase bactérienne) avant d'incuber à 37°C pendant trente minutes. On ajoute alors 10 µCi de méthionine ³⁵S et l'incubation se poursuit cinq minutes. La préparation est alors centrifugée une minute à 13 000 rpm. Le culot est repris avec 40 µl de tampon SDS 2X (100 mM Tris-Cl pH6,8; 4% SDS; 0,2% bleu de bromophénol; 20% glycérol), bouilli puis chargé sur un gel SDS-PAGE 12%. Après migration, le gel est séché et autoradiographié.

2.5.2. Préparation des extraits bactériens

Deux heures après l'induction de l'expression par l'IPTG, les 100 ml de culture sont centrifugés. Le culot est ressuspendu dans quatre millilitres de

tampon de sonication (20mM Tris-Cl pH 7,4; 1mM EDTA pH 8,0; 100mM NaCl; 10% glycérol) auquel on a ajouté 1 mM DTT et 18 µg/ml d'inhibiteurs de protéases (leupeptine, inhibiteur de la trypsine, pepstatine, aprotinine et PMSF). La lyse des cellules est effectuée par quatre sonications de 30 secondes. Après trente minutes de centrifugation à 10 000 rpm, le surnageant recueilli constitue l'extrait bactérien.

2.6. Expression dans des cellules Cos 1

L'expression des récepteurs complets à été réalisée dans des cellules COS-1 (ATCC). Les cellules ont été poussées dans des plaques de 10 cm contenant 10 ml de "Dulbecco's modified Eagle's medium" complété par 5% de sérum foetal bovin (FBS). Les cellules sont transfectées à 50% de confluence avec 15 µg de vecteur PSG recombinant en utilisant la technique de coprécipitation au phosphate de calcium. Après 24 heures les cellules sont rincées et le milieu est remplacé. Après encore 24 heures on ajoute 10^{-5} M (10^{-9} M final) d'hormone (oestradiol, dexaméthasone ou mibolérone selon le récepteur); les cellules sont récoltées une heure plus tard.

2.6.1. Préparation des extraits cellulaires

Le culot de cellules COS-1 est ressuspendu dans un tampon d'extraction (Tris-Cl 20 mM pH 7,6; glycérol 20%; KCl 400mM) et est centrifugé à 12 000 rpm après trois cycle de gel-dégel. Le surnageant constitue l'extrait cellulaire total utilisé dans les expériences de retard sur gel et pour le contrôle de l'expression.

2.6.2. Contrôle de l'expression par western blot

Le protocole de western blot à été décrit par Salinovich *et al* (1986). A 5 μ l d'extrait on ajoute 5 μ l de tampon SDS 2X (100 mM Tris-Cl pH6,8; 4% SDS; 0,2% bleu de bromophénol; 20% glycérol), le tout est chargé sur gel SDS-polyacrylamide 8% et la migration s'effectue à 120 volts. Les protéines du gel sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose (Life technologies), une heure à 110 volts à 4 °C dans un tampon de transfert (20% méthanol; 2,4 g/l Tris-base; 11,5 g/l glycine). Après le transfert la membrane est incubée une heure dans une solution de blocage (TBS 1X, 0,1% Tween, 3% BSA), on utilise ensuite l'anticorps anti-ER gracieusement offert par le Dr. Chambon P (Illkirch, France). Après une heure quatre lavages sont effectués avant une incubation d'une heure en présence du second anticorps (anti-souris) marqué avec une enzyme peroxydase. Après quatre autres lavages on utilise le kit de révélation par chemoluminescence (Biorad) avant l'exposition d'un film.

2.7. Gel retard

Nous avons utilisé les conditions décrites par Kumar *et al* (1988) avec seize différentes sondes oligonucléotidiques décrites sur la figure 3B. Ces sondes oligonucléotidiques ont été phosphorylées par 50 μ Ci de γ^{32} P ATP (Mandel) et la T4 polynucléotide kinase (New England Biolabs) avant d'être purifiées sur colonne sephadexTM G-50 (Pharmacia). Les extraits sont préincubés sur glace en présence de 2 μ g de poly dIdC (Pharmacia) et après dilution avec du

tampon d'extraction sans KCl pour obtenir une concentration finale en KCl de 80mM. L'incubation se poursuit 15 minutes à température de la pièce après avoir ajouté 80 000 cpm de sonde radioactive. Les échantillons sont chargés sur gel polyacrylamide (acrylamide : bis-acrylamide 37.5 : 1) 5% 0,5 ou 0,25X TBE (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA) et la migration s'effectue à 140 volts dans une chambre froide (4°C). Le gel est séché avant d'être autoradiographié.

Pour les expériences de compétition entre sonde marquée et sonde froide, nous avons utilisé le protocole précédemment décrit par Mader *et al* (1993). La compétition est réalisée par un large excès de sonde froide (40 pmole).

2.8. Essais de transactivation

Les cellules sont étalées dans des boîtes de 10 cm (1,5 millions de cellules par boîte) et transfectées, en utilisant la méthode de coprécipitation au phosphate de calcium, avec 15 µg d'ADN (1 µg de vecteur d'expression, 2 µg de vecteur rapporteur pHREtkCAT, 2 µg de vecteur de standardisation interne RSV-LacZ et 10 µg de Bluescribe M13+). Après 24 heures d'incubation le milieu est changé pour éliminer le précipité et 10^{-5} M d'hormone est ajouté (oestradiol, dexaméthasone ou mibolone selon les cas). Après encore 24 heures les cellules sont récoltées et reprises dans 400 µl de Tris-Cl 0,25 M pH 8,0. Les extraits sont obtenus après trois cycles gel-dégel et centrifugation à 12 000 rpm. La mesure de l'activité β -galactosidase permet une standardisation des échantillons avant la mesure de l'activité CAT. Cette

activité CAT est déterminée par incubation pendant une heure des échantillons avec 0,25 μCi de [^3H] chloramphénicol (Mandel) et 0,2mg/ml de N-butyryl-CoA (Seed *et al* 1988).

3. RÉSULTATS

3.1. Étude du récepteur aux androgènes mutant G577R

Une nouvelle mutation du récepteur aux androgènes, G577R, a été découverte par l'équipe du Professeur Pinsky du *Lady Davis Institute for Medical Research* à Montréal chez un patient souffrant d'un syndrome d'insensibilité partielle aux androgènes. Cette mutation est située au niveau du DBD du AR à la position 577 qui est l'un des trois acides aminés du DBD importants dans la discrimination entre éléments de réponse aux oestrogènes et aux androgènes (boîte P). Des résultats préliminaires d'expériences de liaison au ligand effectuées dans le laboratoire du professeur Pinsky laissent penser que le récepteur mutant lie normalement son ligand. Il nous est apparu raisonnable de considérer que les symptômes du patient souffrant d'insensibilité partielle aux androgènes pourraient être reliés à une plus faible capacité du récepteur mutant à lier spécifiquement l'ADN ou à une altération de la spécificité de cette liaison. Autrement dit, il se pourrait que le DBD de AR-G577R ait une moins bonne capacité à lier les séquences reconnues par ARwt ou reconnaisse seulement une partie de ces séquences.

Dans un premier temps nous avons reproduit la mutation G577R, au niveau du DBD de AR, en utilisant la technique de mutagenèse dirigée par PCR tel que décrit dans la section 2.3. Des fragments comprenant les acides aminés D550 à T656 (soit 106 acides aminés) de ARwt et de AR-G577R ont été clonés dans un vecteur d'expression procaryote. Un fragment équivalent du ER (106 acides aminés de M176 à S282) a également été cloné dans le même vecteur. Les trois constructions ainsi que le vecteur seul sans insert

ont été transfectées et exprimées dans *E.coli*. Les extraits protéiques ainsi obtenus ont été utilisés pour tester la spécificité et l'affinité de la liaison à l'ADN des récepteurs aux androgènes sauvage et mutant dans des expériences de retard sur gel (voir section 2.7.). Deux expériences préliminaires ont été réalisées afin de pouvoir interpréter correctement les tests de retard sur gel. Il est en effet nécessaire de vérifier les niveaux d'expression des différents DBD et de déterminer la quantité optimale d'extrait à utiliser pour détecter les complexes protéine-ADN sans saturer la sonde radioactive.

3.1.1. Contrôle des niveaux d'expression

Nous avons réalisé une expérience de marquage à la méthionine en utilisant un aliquot de chaque culture d'expression (section 2.5.1.). Sur la figure 5A, la bande correspondant au DBD de ER migre plus rapidement que celles pour ARwt et AR-G577R. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les peptides n'ont pas la même séquence en acides aminés. Etant donné leur relative petite taille (106 acides aminés), cette différence pourrait suffire à influencer la vitesse de migration. Le principal résultat est que les DBD de ER, ARwt et AR-G577R sont exprimés de façon comparable.

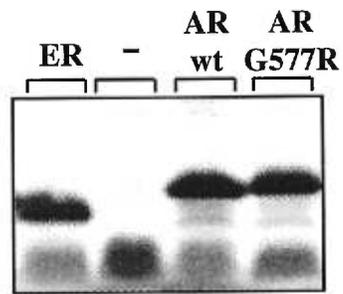
3.1.2. Optimisation de la quantité d'extrait à utiliser pour la liaison à un GRE

Cette expérience a pour but de déterminer la quantité minimum d'extrait exprimant AR à utiliser pour obtenir une bande retardée avec une sonde GRE/ARE (élément consensus de réponse aux glucocorticoïdes et androgènes) et d'éviter de saturer la sonde radioactive dans les tests de

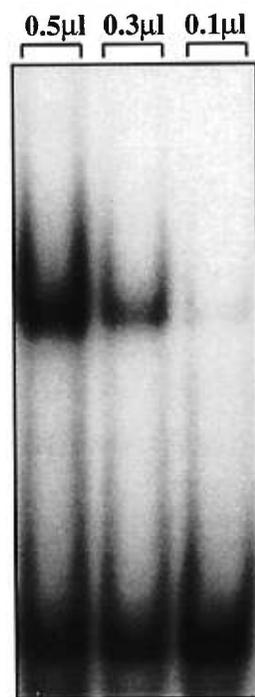
Figure n° 5A : Contrôle des niveaux d'expression des domaines de liaisons à l'ADN du récepteur aux oestrogènes, du récepteur aux androgènes sauvage et du récepteur aux androgènes mutant par marquage à la méthionine marquée. Les différents DBD clonés dans le vecteur d'expression procaryote ainsi que le vecteur sans insert sont exprimés par *E.Coli* BL21 DE3. 100 ml de LB sontensemencés par 1 ml d'une pré-culture de 16 heures et mis sous agitation à 37°C jusqu'à obtenir une DO de 0,5 à 450 nm. L'expression est induite par l'ajout de 0,5 mM IPTG dans la culture et est poursuivie pendant 2 heures. Pour comparer les niveaux d'expression, des aliquots de 1 ml sont prélevés juste avant l'induction. On réalise sur ces aliquots un marquage à la méthionine ³⁵S tel que décrit dans la section 2.5.1. Dans le premier puits à gauche, on a un contrôle positif montrant l'expression du DBD de ER, dans le second puits le vecteur d'expression sans insert a été utilisé pour montrer l'absence d'expression. Les deux derniers puits correspondent respectivement à l'expression des DBD de ARwt et de AR-G577R.

Figure n° 5 B : Détermination de la quantité optimale d'extrait à utiliser.

La quantité optimale d'extrait est déterminée de façon empirique en testant la liaison sur une sonde GRE/ARE marquée au ³²P par des quantités décroissantes d'extrait brut contenant le DBD de ARwt (0,5, 0,3 et 0,1 µl). Les dilutions sont effectuées dans le tampon de sonication contenant 500 mM KCl. La liaison à la sonde se fait à 4°C pendant 15 minutes (concentration en sel finale 70 mM KCl) après préincubation sur glace pendant 15 minutes en présence de 2 µg de poly dIdC. Les réactions sont ensuite chargées sur gel 0,5X TBE polyacrylamide 7% (acrylamide : bis-acrylamide 37.5 : 1). (voir section 2.7).



A.



B.

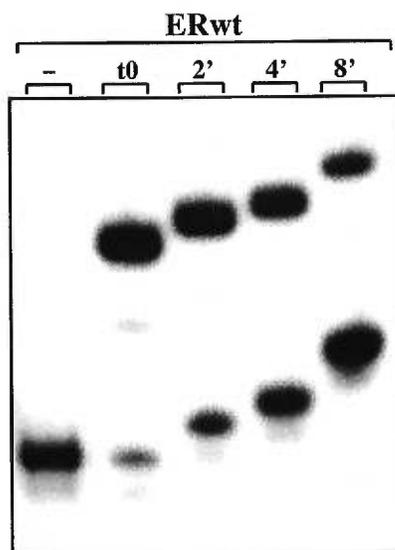
retard sur gel. Différentes dilutions de l'extrait contenant le DBD de ARwt ont été testées en retard sur gel avec une sonde GRE/ARE. Sur la figure 5B, on montre qu'une dilution correspondant à l'utilisation de 0,3 μ l d'extrait brut permet d'obtenir une bande sans que la sonde GRE marquée au 32 P ne soit saturée.

3.1.3. Évaluation de la stabilité de la liaison DBD-GRE

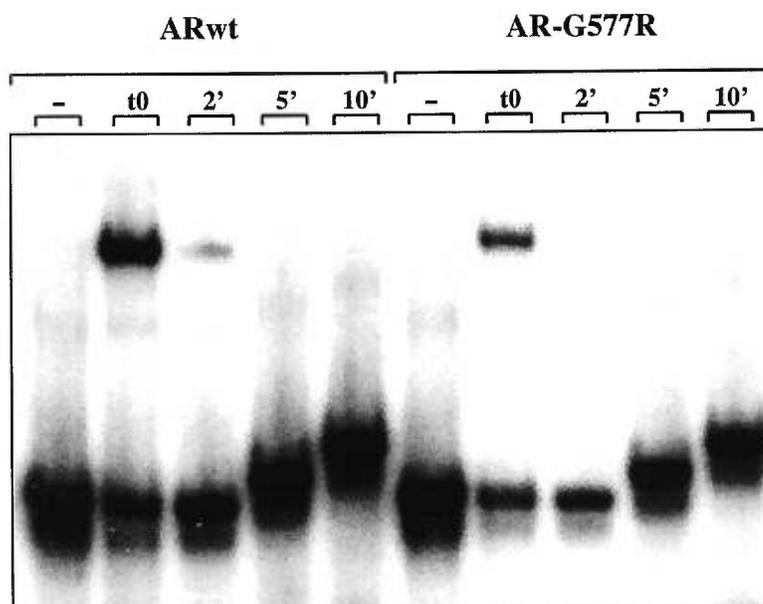
Pour obtenir une estimation de la demi-vie des complexes DBD-GRE, nous avons choisi de visualiser par retard sur gel la disparition de complexes DBD-sonde marquée par ajout d'un excès de sonde non-marquée après formation des complexes radioactifs (Mader *et al* 1993).

La figure 6A montre un essai de compétition entre un ERE marqué au 32 P et un ERE froid, pour la fixation au DBD du ER. Dans le premier puits, la sonde froide est ajoutée en même temps que la sonde marquée. Une seule bande est visible en bas du gel, et correspond à la migration de la sonde marquée libre. On montre ainsi d'une part que la bande qui apparaît dans les autres puits représente une fixation spécifique à un ERE et d'autre part que l'excès de sonde froide est suffisant pour déplacer complètement la sonde marquée liée. Dans le deuxième puits, le temps t_0 correspond au complexe formé avant l'ajout d'un excès de sonde froide. On remarque une bande retardée correspondant à la fixation spécifique du DBD du ER sur l'ERE. La bande correspondant à la sonde libre marquée est diminuée d'autant. Après avoir ajouté la sonde froide à la préparation contenant l'extrait et la sonde marquée, des aliquots sont prélevés et chargés sur le gel après 2, 4 et 8 minutes. La compétition est arrêtée lors du chargement sur le gel. Ce dernier va en effet maintenir les liaisons existantes tout en permettant une migration plus rapide de la sonde non-liée. Les bandes apparaissent de plus en plus

Figure n° 6 : **Comparaison de la stabilité des domaines de liaisons à l'ADN du récepteur aux oestrogènes, du récepteur aux androgènes sauvage et du récepteur aux androgènes mutant sur leur élément de réponse consensus.** (A) Cinétique de dissociation du complexe entre le DBD de ER et l'ERE. Dans le premier puits on a ajouté 100 fois (30 pMol) de ERE froid en même temps que la sonde marquée au ^{32}P . Le puits t_0 correspond au complexe formé avant l'ajout d'un excès de sonde ERE froide. (90 pMol soit 300 fois) . La concentration en sel finale des échantillons après l'ajout de sonde chaude est de 70 mM. Des aliquots de 5 ml sont prélevés et chargés sur gel 0,5 X TBE après 2, 4 et 8 minutes sans arrêter la migration qui s'effectue à 180 volts. La migration est prolongée pendant une heure puis le gel est séché avant d'être autoradiographié. (B) Cinétique de dissociation des DBD de ARwt AR-G577R sur une sonde GRE/ARE. Les conditions expérimentales sont identiques à celles de l'expérience précédente. Dans le premier puits, on a ajouté simultanément la sonde GRE marquée au ^{32}P et un excès de sonde GRE/ARE froide. Le puits t_0 correspond au complexe formé avant l'ajout de sonde froide. Après avoir ajouté la sonde froide, des aliquots sont prélevés et chargés sur gel 0,5X TBE polyacrylamide 7% (acrylamide : bis-acrylamide 37.5 : 1) (voir section 2.7.) aux temps 2, 5 et 10 minutes. Ces figures sont représentatives de trois expériences indépendantes.



A.



B.

haut sur le gel du fait que les chargements sur le gel se font alors que la migration se poursuit. On observe une diminution graduelle de l'intensité de la bande retardée. Après 8 minutes, la compétition n'est pas encore achevée.

La même expérience est refaite, figure 6B, avec les extraits contenant les DBD du ARwt et AR-G577R. Cette fois, la compétition s'effectue de façon beaucoup plus rapide. Après 2 minutes, les complexes retardés ont presque totalement disparu.

Cette cinétique de disparition est trop rapide pour pouvoir mesurer une différence potentielle de stabilité entre ARwt et AR-G577R pour le GRE/ARE consensus. On peut cependant noter que la liaison du DBD de AR au GRE est beaucoup moins stable que celle du DBD de ER sur un ERE (voir discussion).

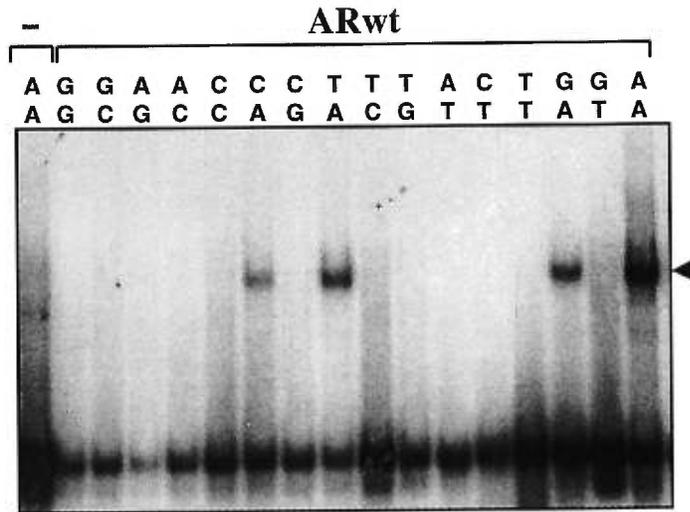
3.1.4. Comparaison des spécificités des récepteurs aux androgènes sauvage et mutant G577R pour différents éléments de réponse

Dans le but de vérifier si les récepteurs aux androgènes sauvage et mutant G577R ont la même spécificité, nous avons utilisé 16 sondes différentes ayant pour motif GNNCA où NN correspond aux 16 combinaisons de deux bases possibles. Ce motif a été choisi parce qu'il est commun aux deux grandes familles d'éléments de réponse (figure 1B).

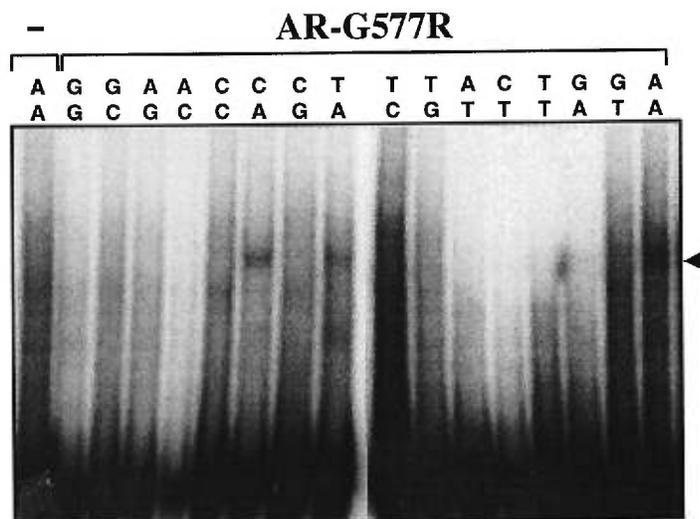
Pour le retard sur gel, figure 6, on a utilisé la sonde AA (GRE/ARE) avec un extrait de bactéries transfectées par le vecteur sans insert (témoin négatif). Dans le dernier puits, la sonde AA a été utilisée avec un extrait de bactéries transfectées par le vecteur d'expression codant pour le DBD de AR.

Figure n° 7A : **Spécificité de la liaison du DBD de ARwt sur différents éléments de réponse aux hormones.** Un extrait bactérien contenant le DBD de ARwt est préparé tel que décrit dans la section 2.5.2. La concentration finale en NaCl est de 80 mM après l'ajout de sonde marquée au ^{32}P . Les sondes utilisées représentent 16 différents HRE ayant pour motif général GXXCA où les deux X sont substitués par l'une des 16 combinaisons possibles de deux bases. Dans le premier puits à gauche (témoin négatif) nous avons utilisé un extrait bactérien ayant été transfecté par le vecteur sans insert en présence de sonde AA (GRE). Le retard sur gel est réalisé avec un gel polyacrylamide 7% (acrylamide:bis-acrylamide 37.5 : 1) 0,5X TBE (section 2.7.). Cette figure est représentative de trois expériences indépendantes.

Figure n° 7B : **Spécificité de la liaison du DBD de AR-G577R sur différents éléments de réponse aux hormones.** Même expérience qu'en 8A en utilisant un extrait bactérien contenant le DBD de AR-G577R. Cette figure est représentative de deux expériences indépendantes.



A.



B.

Les deux récepteurs, sauvage et mutant, reconnaissent spécifiquement la sonde AA et reconnaissent aussi les sondes TA, GA et CA (figures 7A et 7B).

La quantification de la quantité de sonde liée par rapport à la sonde libre permet de constater que le récepteur de type sauvage reconnaît avec une plus forte affinité la sonde AA, puis la sonde TA, puis GA. La sonde CA est reconnue avec le moins d'affinité (figure 7A). Le récepteur mutant reconnaît lui aussi préférentiellement la sonde AA mais par contre, il a plus d'affinité pour la sonde CA que pour TA tandis que la liaison avec la sonde GA est à peine perceptible (figure 7B).

En conclusion, la spécificité pour l'ADN des DBD des récepteurs aux androgènes sauvage et G577R est différente. L'ordre de préférence pour le récepteur de type sauvage est AA, TA, GA et CA alors que pour le récepteur G577R l'ordre est : AA, CA, TA et GA.

3.2. Spécificité du récepteur aux androgènes pour différents éléments de réponse

Afin de vérifier si le récepteur complet reconnaît les mêmes éléments de réponse que le domaine de liaison à l'ADN, nous avons utilisé la technique de gel retard avec ARwt exprimé dans des cellules eukaryotes en culture et différents HRE.

Des vecteurs d'expression pour le récepteur ARwt ou pour le récepteur ERwt ont été transfestés dans des cellules COS1 par la technique du précipité au phosphate de calcium (section 2.6.). Les cellules COS1 ont été choisies parce que ces dernières ne possèdent pas de récepteurs stéroïdiens endogènes.

Sur la figure 8, on observe la fixation du ER sur un ERE (sonde GT) tandis qu'il n'y a pas formation de complexe avec un GRE (sonde AA du deuxième

Figure n° 8 : Spécificité du récepteur aux androgènes pour différents éléments de réponse. Les extraits ainsi que le retard sur gel 0,5 X TBE polyacrylamide 7% (acrylamide:bis-acrylamide 37.5 : 1) sont préparés tel que décrit dans la section 2.6.1. Un extrait de cellules Cos 1 transfectées par le vecteur d'expression de ERwt est utilisé comme témoin positif pour la liaison à l'ERE (premier puits) et comme témoin négatif pour la liaison au GRE (deuxième puits). Dans les quatre derniers puits, on a utilisé des extraits de cellules Cos 1 transfectées par le vecteur d'expression de ARwt. Les sondes marquées utilisées ont pour motifs, de la gauche vers la droite : **GGTCA** (ERE), **GAACA** (GRE/ARE), **GCACA** et **GGACA**. La migration est poursuivie pendant deux heures à 180 volts à 4°C. Le gel est autoradiographié après avoir été séché.



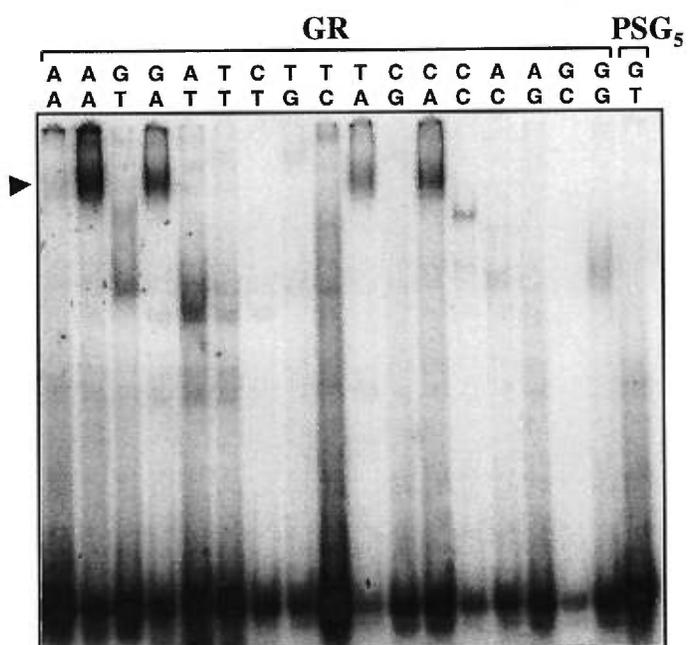
puits). L'ARwt quant à lui, ne montre pas de fixation avec l'ERE (sonde GT) et se fixe au GRE/ARE (sonde AA). Des bandes de moindre intensité sont observables au même niveau avec les sondes CA et GA.

Les résultats obtenus avec ARwt sont à rapprocher de ceux obtenus plus loin pour GR. Ces deux récepteurs reconnaissent le même élément consensus de réponse et ont en commun 12 des 13 acides aminés de l'hélice de reconnaissance de l'ADN dont les trois acides aminés de la boîte P. Les études cristallographiques du GR lié à un GRE ne montrent pas de liaison avec l'adénine en position 4 ni avec la thymine sur le brin opposé en position -4 (Luisi *et al* 1991). Par conséquent, il est en théorie possible de substituer l'adénine en position 4 par l'une des trois autres bases. Nos résultats confirment en partie seulement cette théorie. En effet, l'intensité moins grande des bandes obtenues avec les sondes CA et GA comparée à AA (figure 8) suggère une moins bonne liaison du ARwt à l'HRE. Ainsi, si en théorie la substitution de l'adénine en position 4 du GRE n'affecte pas la liaison du ARwt sur le GRE, nos résultats montrent qu'une substitution de l'adénine par une cytosine ou une guanine pourrait réduire la capacité du ARwt à lier l'HRE.

3.3. Spécificité du récepteur aux glucocorticoïdes pour différents éléments de réponse

La différence entre les HRE de type ERE et ceux de type GRE réside au niveau des bases en position 3 et 4 du motif TGNNCA où NN est AA ou GT, respectivement pour le GRE ou l'ERE. Nous avons testé la liaison du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) exprimé dans les cellules Cos sur les seize sondes TGNNCA. Sur la figure 9 on observe, dans le deuxième puits, une bande retardée lorsque la sonde AA, correspondant au GRE, est utilisée.

Figure n° 9 : Spécificité du récepteur aux glucocorticoïdes pour différents éléments de réponse. Les extraits de cellules COS1 préalablement transfectées par le vecteur d'expression du GR ont été préparés tel que décrit dans la section 2.6.1. Le tampon d'extraction utilisé contient une concentration de 500 mM en chlorure de potassium. Le retard sur gel 0,25X TBE à été réalisé tel que décrit dans la section 2.7. Nous avons utilisé 16 différents HRE dont le motif général est GXXCA où les deux X sont représentés 16 combinaisons possibles des quatre bases. Dans les deux premiers puits on a utilisé la sonde GRE (GAACA) marquée au ³²P. Dans le premier puits, contrairement au deuxième, on a en plus utilisé un excès de sonde GRE froide (30 pMol). Dans le dernier puits à droite nous avons utilisé la sonde ERE marquée avec les extraits de cellules Cos1 ayant été transfectées par le vecteur d'expression sans insert (pSG5). Cette figure est représentative de trois expériences indépendantes.



La disparition de cette bande lorsqu'on ajoute un excès de 100 fois de sonde froide montre qu'il s'agit d'une liaison spécifique (puits n° 1). À la même hauteur, on observe trois autres bandes avec les sondes GA, TA et CA.

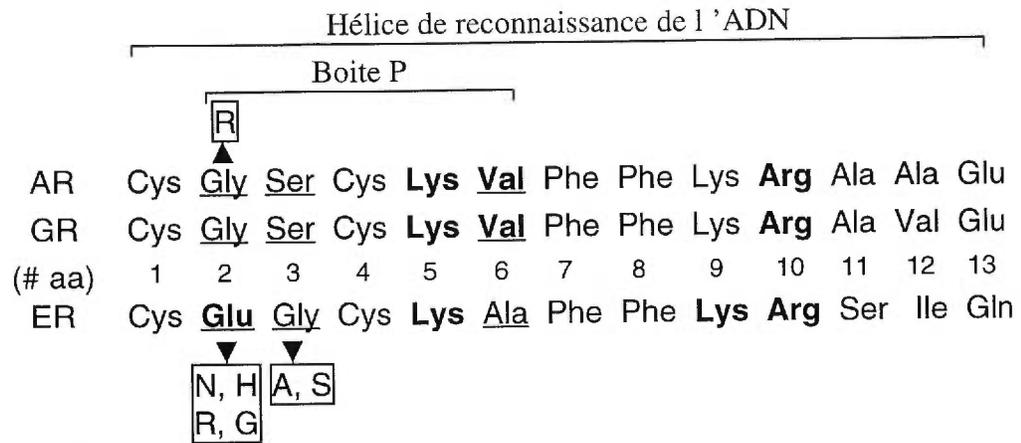
La nécessité d'avoir une adénine en position 3 du GRE peut être expliquée par les données des études cristallographiques. Ces études montrent un contact entre la thymine, située en position —3 sur le brin opposé, et la valine en position 443 du GR (Luisi *et al* 1991). Val-443, le troisième acide aminé de la boîte P participe donc positivement à la reconnaissance du GRE (Zilliacus *et al* 1995).

Les analyses cristallographiques ne montrent aucune liaison entre un acide aminé du GR et la base en position 4 de l'HRE (Luisi *et al* 1991). Il était donc prévisible de pouvoir substituer l'adénine, normalement présente sur un GRE, par l'une des trois autres bases. On note cependant une intensité moins grande des trois bandes retardées GA, TA et CA comparées à la bande AA. Cela pourrait suggérer, comme pour ARwt, une plus grande stabilité du complexe protéine-ADN lorsque l'on a une adénine en position 4.

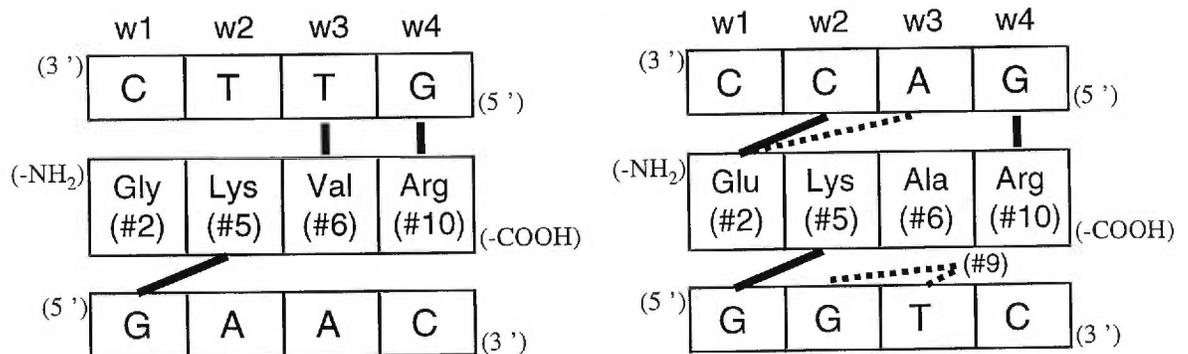
3.4. Spécificité du récepteur aux oestrogènes pour différents éléments de réponse

Pour le récepteur aux oestrogènes, l'acide glutamique 203 est le premier acide aminé de la boîte P et correspond à la position mutée dans le AR (G577R). Des études cristallographiques ont montré que cet acide aminé établi une liaison avec la cytosine en position 4 de l'ERE (Schwabe *et al* 1993). Par contre aucune liaison n'est établie par l'acide aminé correspondant (une glycine) dans le GR ou le AR (Luisi *et al* 1991). Les travaux de Suzuki *et al* (1994), basés sur ces études cristallographiques, ont

Figure n° 10 : Code de reconnaissance des interactions ADN / Récepteurs stéroïdiens d'après Suzuki *et al.* En haut, acides aminés de l'hélice de reconnaissance des récepteurs aux androgènes, glucocorticoïdes et oestrogènes. Les acides aminés de la boîte P sont soulignés, les acides aminés qui établissent un contact avec des bases de l'élément de réponse sont en caractères gras. Les substitutions étudiées sont indiquées par le code à une lettre et encadrées. Au milieu, un tableau montre les liaisons possibles pour une base donnée (w2, w3 ou w4) ou pour un acide aminé donné (#2, #6 ou #10). Les acides aminés en position #2 que nous avons utilisés sont soulignés. En bas, schématisation des contacts entre GR et GRE (à gauche) et ER et ERE (à droite). Les contacts sont représentés par des traits gras, les contacts non pris en compte par le code de reconnaissance sont indiqués en pointillés.



	w4 aa #10 taille : l	w3 aa #6 taille : m,l	w2 aa #2 taille : m,l
A	Gln, Glu	Asn, Asp Gln, Glu	<u>Asn</u> , Asp Gln, <u>Glu</u>
T	Leu, Met	Val, Ile Leu, Met	Val, Ile Leu, Met
G	Arg, Lys	His Arg, Lys	<u>His</u> <u>Arg</u> , Lys
C	Glu Leu, Met	Asp, Glu Leu, Met Ile	Asp, <u>Glu</u> Leu, Met Ile



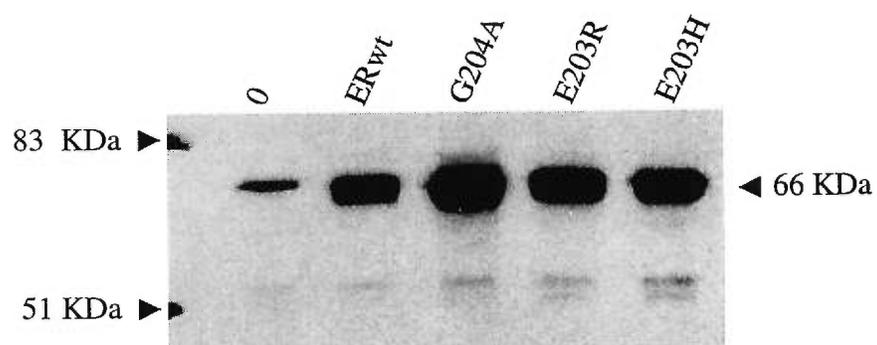
Complexe GR/GRE

Complexe ER/ERE

tenté d'établir un code de reconnaissance entre acides aminés du DBD et bases de l'ADN (figure 10). Ce code prévoit, en tenant compte des propriétés physico-chimiques des acides aminés du récepteur et des bases de l'HRE, de quelle façon le remplacement de l'acide glutamique 203 par d'autres acides aminés affecterait la sélectivité d'interaction avec des éléments de réponse. Afin de vérifier ce modèle, nous avons substitué l'acide glutamique en position 203 par différents acides aminés. L'acide glutamique étant un acide aminé polaire chargé négativement, nous avons choisi de substituer ce dernier par : l'arginine et l'histidine (polaires, chargés positivement), l'asparagine (polaire non chargé) et la glycine (petit acide aminé apolaire). Nous avons aussi voulu tester l'effet d'une substitution de l'acide aminé voisin en position 204. À cette position, la glycine du ER n'établit aucune liaison avec des bases de l'ERE mais établit une liaison avec un phosphate de l'ADN via une molécule d'eau. Cet acide aminé est important dans la discrimination entre GRE et ERE puisqu'il est l'un des trois acides aminés de la boîte P. Nous avons substitué la glycine 204 par une sérine qui est l'acide aminé correspondant pour le GR et le AR. Nous avons également substitué la glycine 204 par l'alanine, un acide aminé structuralement proche de la glycine et trouvé à cette position dans des séquences de *C. elegans* codant pour des homologues de récepteurs nucléaires (Kostrouch *et al* 1995).

Les récepteurs mutants ont été créés par la technique de mutagenèse dirigée par PCR puis ils ont été séquencés (section 2.4.). Nous avons tout d'abord vérifié que les récepteurs étaient exprimés de façon comparable. Des expériences de western-blot (section 2.6.2.) indiquent que les récepteurs mutants ER-G204A, ER-E203R et ER-E203H sont exprimés de façon comparable à ERwt (figure 11). L'expression des autres mutants a été

Figure n° 11 : Contrôle des niveaux d'expression des récepteurs des oestrogènes sauvage et mutants. Les cellules COS 1 sont transfectées par la technique au phosphate de calcium avec 15 µg de vecteurs d'expression de ER wt ou ER mutant ou 15 µg de vecteur sans insert. Après 48 heures, les cellules sont récoltées et les extraits préparés par gel / dégel dans du tampon PBS 1X. Les extraits sont chargés sur gel SDS-polyacrylamide 8% (acrylamide:bis-acrylamide 37.5:1). On réalise un Western Blot tel que décrit dans la section 2.6.2.



vérifiée de la même façon.

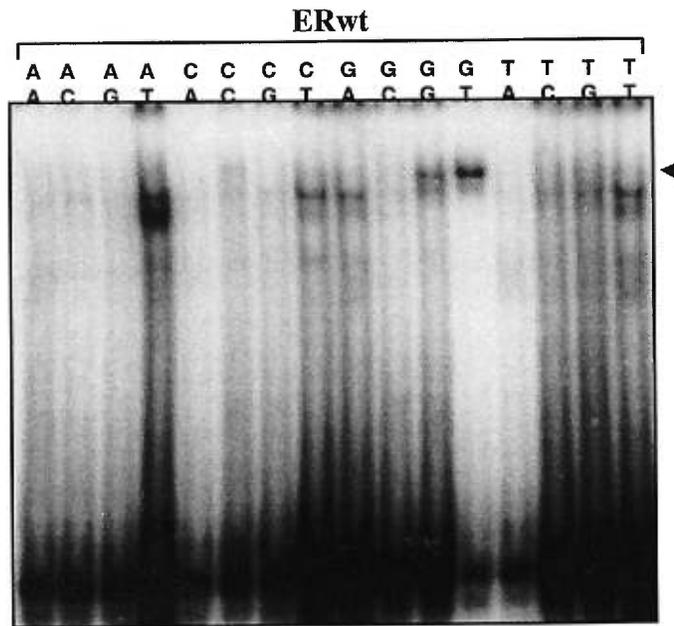
Nous avons testé la spécificité d'interaction de ces récepteurs mutants par retard sur gel et par des expériences de transfections transitoires en utilisant des vecteurs rapporteurs contenant les éléments de réponse en amont du promoteur thymidine kinase et du gène de la chloramphénicol acétyle transférase (CAT). Ces vecteurs sont co-transfectés avec un vecteur d'expression pour le ERwt ou mutant afin de mesurer la capacité de ces récepteurs à moduler l'expression du gène CAT (section 2.8.), reflétant ainsi leur capacité à interagir avec l'élément de réponse correspondant.

3.4.1. Spécificité du récepteur aux oestrogènes sauvage

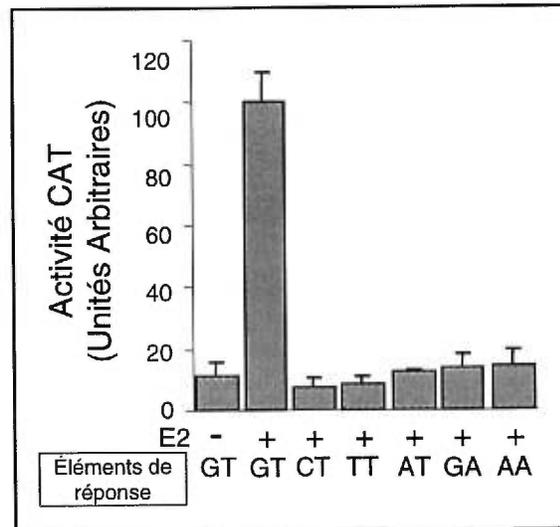
Afin de tester cette spécificité, nous avons utilisé les seize sondes correspondant aux seize combinaisons possible au niveau des deux bases qui différencient un ERE d'un GRE. Nous avons réalisé un retard sur gel avec des extraits de cellules transfectées par un vecteur d'expression eucaryote codant pour ER (section 2.6.). Sur la figure 12A un complexe spécifique est formé entre le ER et l'ERE (sonde GT). Cette bande disparaît en présence d'un excès de cent fois de sonde ERE (GT) non-marquée (résultat non montré). Les complexes migrant à des positions différentes représentent soit des liaisons non spécifiques soit des liaisons spécifiques réalisées par d'autres facteurs cellulaires que le ER.

Un complexe migrant à la même position qu'avec la sonde ERE est observé avec la sonde GG. Le code de Suzuki ne prévoyait pas cette spécificité. En effet la liaison existant entre la thymine en position 4 du ERE et la lysine 210 du ER (Schwabe *et al* 1993) n'est pas prise en compte par ce code.

Figure n° 12 : **Spécificité du récepteur aux oestrogènes pour différents éléments de réponse.** (A) Les extraits ont été obtenus à partir de cellules Cos1 transfectées par un vecteur d'expression de ERwt et lysées dans un tampon d'extraction contenant 400 mM KCl. Le retard sur gel a été effectué tel que décrit à la section 2.7. Les mêmes 16 sondes marquées que celles de l'expérience précédente ont été utilisées. (B) Des cellules COS1 ont été cotransfectées avec un vecteur d'expression de ERwt et un vecteur rapporteur possédant un promoteur constitué d'un HRE en amont du promoteur tk. Un troisième vecteur exprimant constitutivement l'enzyme β -galactosidase est également cotransfecté afin de permettre une standardisation des différents essais. Les HRE utilisées ont pour motif : l'ERE (GGTCA), le GRE (GAACA), deux motifs intermédiaires (GGACA et GATCA) et deux autres motifs qui correspondent à la substitution de la base en position 4 (GCTCA et GTTCA). Les cellules ont été traitées par l'oestradiol (concentration finale de $2,5 * 10^{-8}$ M) 24 heures avant d'être récoltées. Les essais permettant de mesurer l'expression du gène CAT ont été réalisés tel que décrit à la section 2.8. Les valeurs obtenues ont été normalisées en ramenant à 100 la valeur obtenue pour l'activation du gène CAT par un ERwt via un ERE (deuxième colonne). Chaque figure est représentative de trois expériences indépendantes.



A.



B.

Une lysine (chargée positivement) peut établir une liaison hydrogène avec une thymine, une adénine ou une guanine mais préférentiellement avec cette dernière du fait de la présence d'une charge négative dans la paire de bases G-C. Il apparaît logique que la sonde GG puisse lier le ER. Nous montrons que la thymine en position 4 de l'ERE est importante et que la substitution en cette position par une adénine ou une cytosine (sonde GA et GC respectivement) empêche ou réduit fortement la capacité de l'HRE à lier le ER.

Afin de confirmer ces résultats *in vivo*, nous avons testé la capacité du ERwt à transactiver la transcription via la fixation sur différents HRE. Comme attendu, la présence d'oestradiol est nécessaire pour que ER induise la transcription du gène rapporteur CAT via un ERE : comparer avec et sans oestradiol (E₂) dans les quatre premières colonnes de la figure 12B. Si au lieu du ERE les HRE CT, TT, AT, GA ou AA sont placés en amont du gène CAT, on n'observe pas de transactivation significativement supérieure au niveau basal. Ces résultats sont en conformité avec les résultats du retard sur gel puisqu'aucun des HRE utilisés dans les essais de transactivation ne montrait de liaison avec ER en retard sur gel.

3.4.2. Mutations en position 203 du récepteur aux oestrogènes

L'acide glutamique en position 203 établit une liaison hydrogène avec la cytosine en position 4 de l'ERE. Le code proposé par Suzuki *et al* prévoit de nouvelles spécificités pour les mutants E203N, E203H, E203R et E203G. Afin de vérifier ces prévisions, nous avons comparé par retard sur gel, la capacité des récepteurs sauvage et mutants à lier différents éléments de réponses. Les éléments de réponse que nous avons choisis correspondent

Figure n° 13 : Effets de substitutions de l'acide glutamique 203 du récepteur aux oestrogènes sur la spécificité pour différents éléments de réponse. L'acide glutamique 203 du ER a été substitué par l'asparagine (polaire non chargé), l'histidine et l'arginine (polaires chargés positivement) et la glycine (petit apolaire). Pour chaque mutant nous avons testé par retard sur gel la capacité à lier différents HRE. Les sondes utilisées sont **GGTCA** (ERE), deux sondes correspondant à la substitution de la guanine —4 par une cytosine ou une thymine (**GCTCA** et **GTTCA**) et une sonde intermédiaire entre GRE et ERE (**GGACA**). Nous avons également testé la capacité à transactiver en cotransfectant dans des cellules COS 1 des gènes rapporteurs contenant les différents éléments de réponse et des vecteurs d'expression pour les récepteurs :

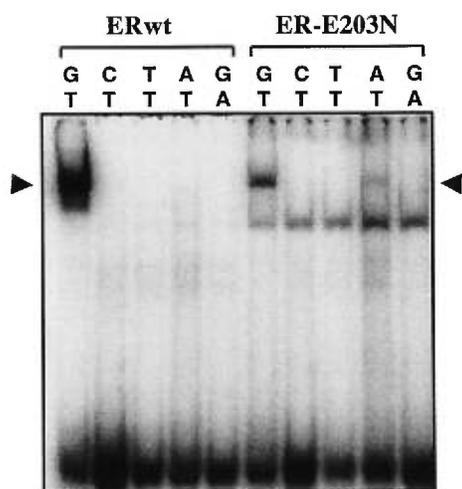
ER-E203N (A et B),

ER-E203H (C et D),

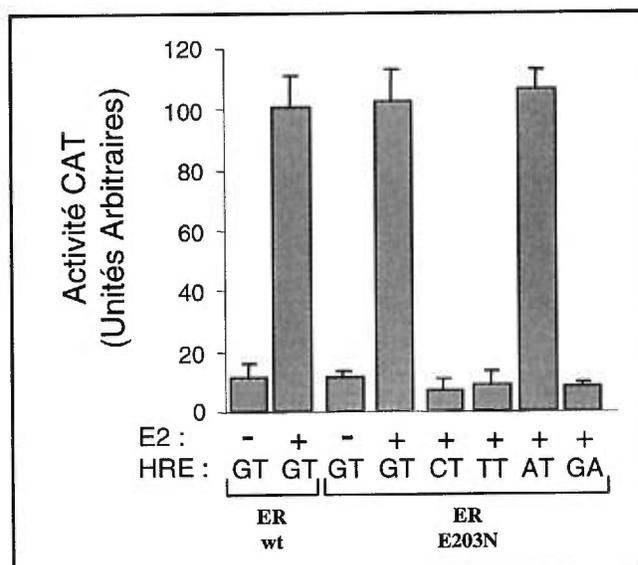
ER-E203R (E et F) et

ER-E203G (G et H).

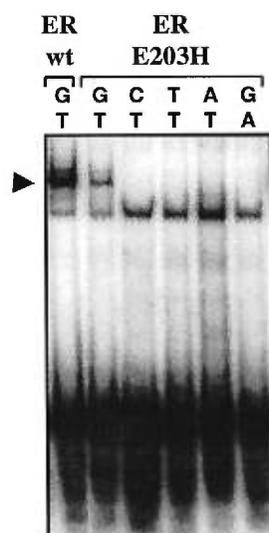
Chaque figure est représentative de deux expériences indépendantes.



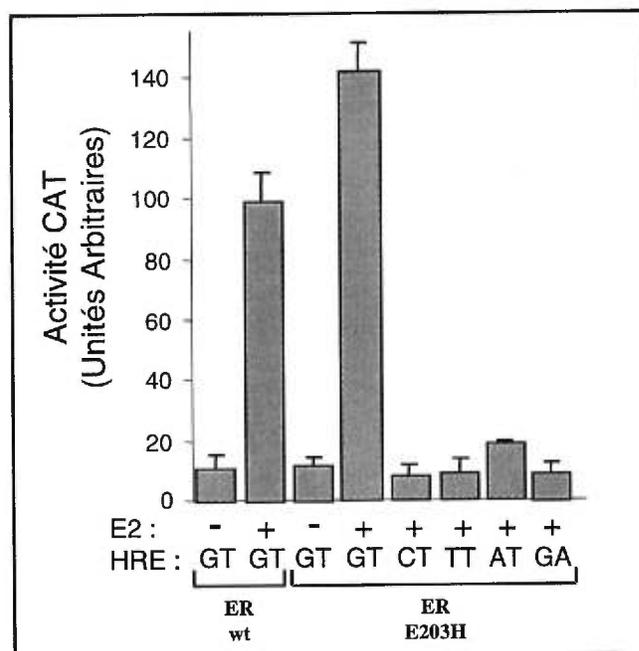
A.



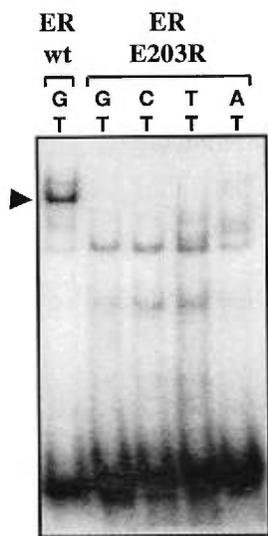
B.



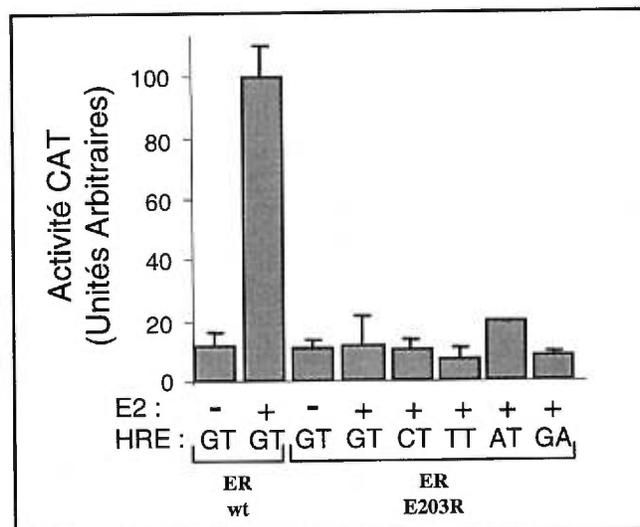
C.



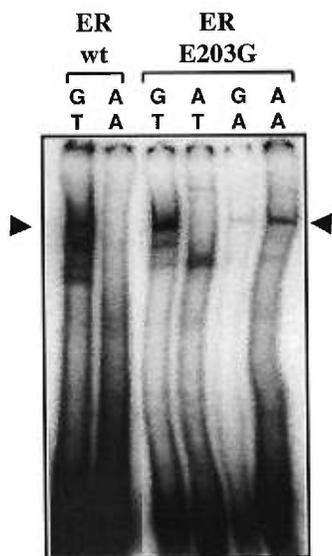
D.



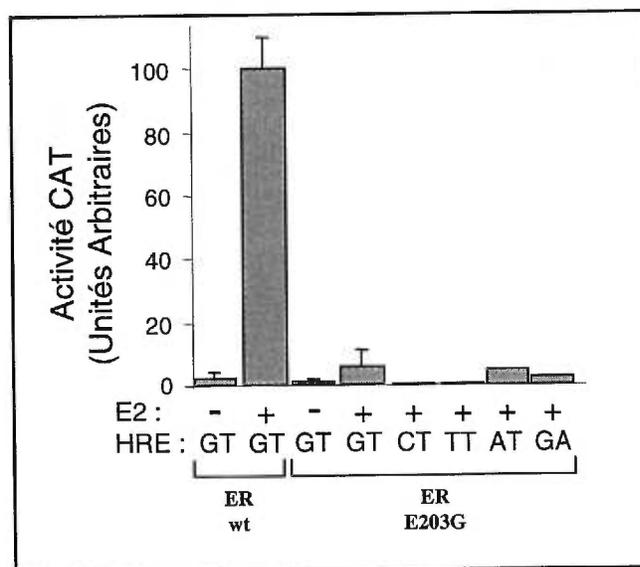
E.



F.



G.



H.

aux quatre possibilités de base en position 4 de l'HRE. Nous avons également utilisé la sonde GA dont le motif **GGACA** est intermédiaire entre un ERE et un GRE. Les observations des retards sur gel sont confirmées *in vivo* en utilisant des essais de transactivation (section 2.2.3.).

Pour le mutant E203N, l'acide glutamique chargé négativement est substitué par l'asparagine qui est un acide aminé polaire non chargé. D'après le code proposé par Suzuki *et al*, ce mutant devrait perdre sa spécificité pour un ERE et gagner une nouvelle spécificité pour le motif **GTTCA** (sonde TT). Les expériences de retard sur gel, comme les essais de transactivation, n'ont pas permis de montrer un tel changement de spécificité. Par retard sur gel, figure 13A, on observe une liaison conservée sur un ERE et une liaison supplémentaire sur la sonde AT. Ces observations en retard sur gel sont confirmées par les essais de transactivation dans les cellules Cos1. Sur la figure 13B on montre que le mutant E203N permet aussi bien la transactivation via un ERE que via la sonde AT.

La mutation E203H apporte une charge positive en position 203. D'après le code proposé par Suzuki *et al*, ce mutant devrait perdre sa spécificité pour un ERE et gagner une nouvelle spécificité pour le motif **GCTCA** (sonde CT). Sur les figures 13C et 13D on montre que le mutant E203H conserve sa spécificité pour un ERE sans gagner de spécificité pour la sonde CT.

La mutation E203R apporte elle aussi une charge positive mais contrairement à E203H, le mutant E203R a perdu toute capacité à lier l'une des sondes ou à transactiver via l'un des HRE (figure 13E et 13F). La plus

grande basicité de l'arginine interdit l'interaction entre le ER-E203R et l'ERE. Cela pourrait être dû à une incompatibilité avec la présence de la lysine 206. Cette lysine interagit normalement avec l'acide glutamique 203 (Schwabe *et al* 1993).

La mutation E203G substitue l'acide glutamique par un petit acide aminé apolaire. Sur la figure 13G, on montre une liaison de ce mutant avec les sondes GT, GA et AA. Cependant aucune transactivation n'a été possible avec aucun des HRE testés (figure 13H). On montre donc qu'une fixation d'un récepteur sur un élément de réponse observé en retard sur gel n'implique pas toujours une activation de la transcription lorsqu'un seul élément de réponse est placé en amont du gène rapporteur.

L'ensemble des résultats, sur les mutants de substitution de l'acide glutamique 203 du ER, montre qu'un code de reconnaissance, basé sur une reconnaissance un acide aminé / une paire de base, est insuffisant pour permettre une prédiction sûre des changements de spécificité. On constate que le ER wt a une très grande spécificité pour son ERE. Si la plupart des mutations permettent de conserver une spécificité pour l'ERE, elles autorisent souvent la possibilité de liaisons supplémentaires.

3.4.3. Mutations en position 204 du récepteur aux oestrogènes

D'après les études cristallographiques, la glycine en position 204 n'établit pas de lien direct avec l'élément de réponse. Le modèle proposé par Suzuki *et al*, ne tient pas compte de cette position qui ne devrait donc pas affecter la spécificité pour les différents éléments de réponse.

a- Spécificité du récepteur aux oestrogènes mutant G204A

L'alanine est un acide aminé structuralement proche de la glycine et trouvé en position équivalente dans des séquences de *C. elegans* codant pour des homologues de récepteurs nucléaires.

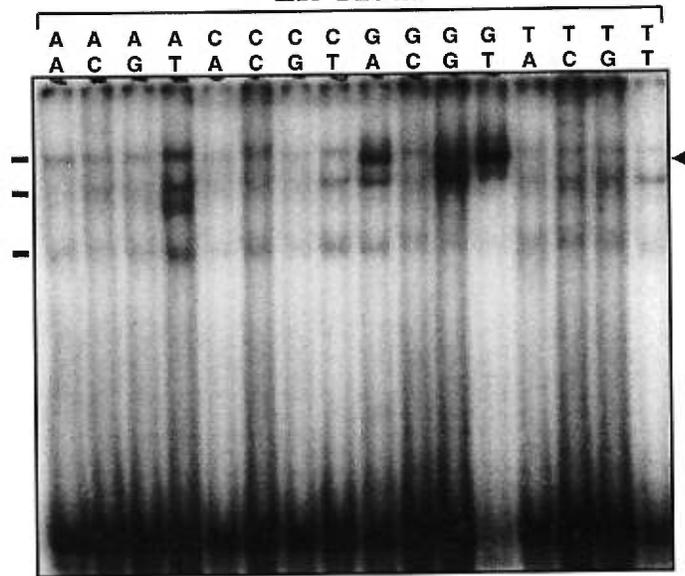
Sur la figure 14A on montre que si le mutant ER-G204A se fixe comme ERwt sur les sondes GT et GG, il possède une spécificité supplémentaire pour la sonde GA. Sur la figure 14B, une expérience similaire a permis de montrer que le mutant G204A pouvait également se fixer sur un GRE (sonde AA). La bande de faible intensité observée avec ERwt et la sonde GA peut être non spécifique ou représenter une liaison de très faible affinité.

Les essais de transactivation montrent que le mutant G204A possède une capacité à activer la transcription via un ERE qui est de 50% inférieure par rapport à ERwt. On n'observe pas de transactivation avec l'élément de réponse GA (figure 14C). Une fixation d'un récepteur sur un élément de réponse observé en retard sur gel n'implique donc pas toujours une activation de la transcription détectable lorsqu'un seul élément de réponse est placé en amont du gène rapporteur.

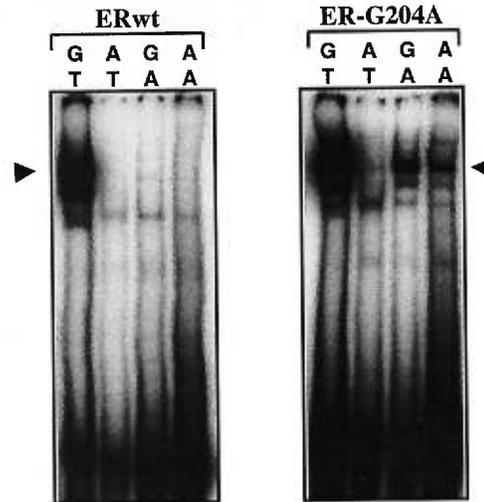
Nous avons voulu vérifier si la moins grande capacité de ER-G204A à transactiver la transcription via un ERE, comparée à ERwt, était due à une moins grande capacité du récepteur mutant à lier l'ERE. La stabilité des récepteurs ERwt et ER-G204A sur un ERE peut être comparée par compétition avec un excès de sonde froide (section 2.7.). L'intensité de chaque bande retardée, sur la figure 15A, par rapport à l'intensité des deux bandes (sonde totale) est exprimée en prenant arbitrairement le chiffre 100

Figure n° 14 : Spécificité du récepteur aux oestrogènes mutant G204A pour différents éléments de réponse. (A) Retard sur gel en utilisant les mêmes conditions que pour l'expérience précédente avec des extraits contenant ER-G204A. Cette figure est représentative de deux expériences indépendantes. (B) Même expérience qu'en (A) en utilisant deux fois plus d'extrait et deux fois plus de sonde marquée. Les sondes utilisées sont ERE, GRE et les deux intermédiaires GATCA et GGACA. (C) Essais de transactivation par le récepteur ER-G204A réalisés de la même manière que pour ERwt dans l'expérience précédente. Les différents essais ont été normalisés en donnant la valeur 100 à la valeur obtenue avec l'activation du gène CAT par ERwt (deuxième barre). Cette figure est représentative de trois expériences indépendantes.

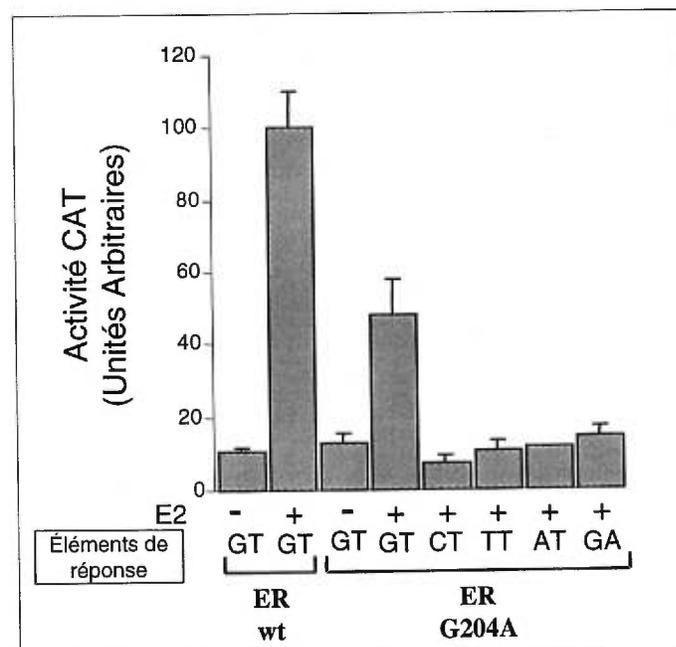
ER-G204A



A.

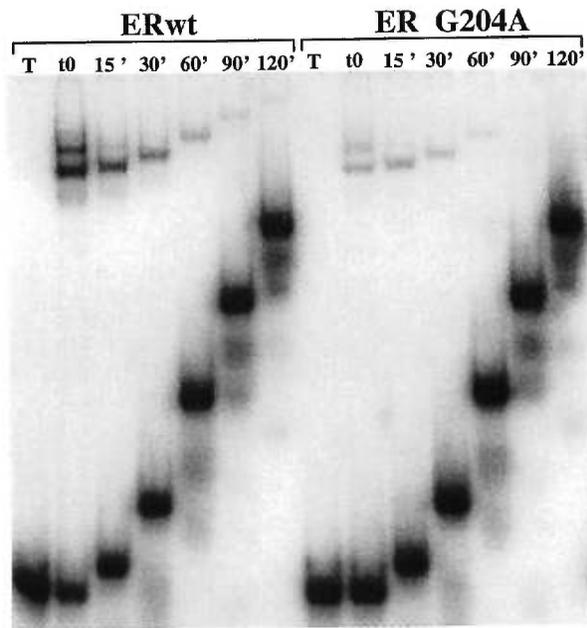


B.

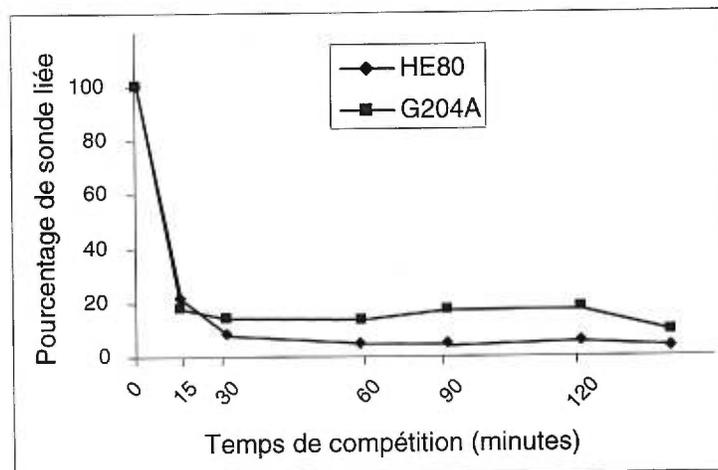


C.

Figure n° 15 : Stabilité de la fixation du récepteur aux oestrogènes sauvage et récepteur mutant ER-G204A sur un élément de réponse aux oestrogènes. (A) On utilise des extraits cellulaires contenant ERwt à gauche et ER-G204A à droite. Dans le puits T on a ajouté un excès de sonde froide ERE en même temps que la sonde marquée au ^{32}P . Le puits t_0 correspond à l'état des complexes formés avant l'ajout de sonde froide. 15, 30, 60, 90 et 120 minutes après l'ajout de 90 pMol de sonde froide, des aliquots de 5 μl sont prélevés et chargés sans arrêter la migration. La migration se poursuit pendant une heure à 180 volts. Le gel est autoradiographié après avoir été séché. (B) L'intensité des bandes a été mesurée par "phospho-imager". On a mesuré le pourcentage de sonde marquée liée (bande retardée) par rapport à la quantité de sonde totale (somme des intensités des bandes retardées et non retardées). Pour comparer les résultats obtenus pour ERwt avec ceux obtenus pour ER-G204A, la valeur obtenue dans le puits t_0 a été normalisée à 100. Cette figure est représentative de deux expériences indépendantes.



A.



B.

comme exprimant l'intensité maximale obtenue avant l'ajout de compétiteur. Les résultats sont présentés sur la figure 15B. On constate que les deux récepteurs ont une stabilité comparable lorsqu'ils sont fixés sur un ERE. Ainsi la plus faible capacité à transactiver du récepteur G204A n'est probablement pas due à une moindre capacité à lier l'ERE.

b- Spécificité du récepteur aux oestrogènes mutant G204S

La glycine 204 du ER est l'un des trois acides aminés de la boîte P. Nous avons voulu tester l'effet d'une substitution de cet acide aminé par la sérine qui est à cette position dans le GR. Il est intéressant de noter que la sérine est un acide aminé hydrophobe comme l'alanine.

La figure 16 montre le résultat d'un retard sur gel effectué en utilisant les seize différents HRE. On observe, dans le premier puits à gauche, la bande retardée montrant la fixation du récepteur mutant G204S sur la sonde ERE marquée. À la même hauteur une bande nette est observée avec la sonde GA. Une bande plus diffuse est observée avec la sonde GG et l'on peut distinguer une bande très ténue avec la sonde AA.

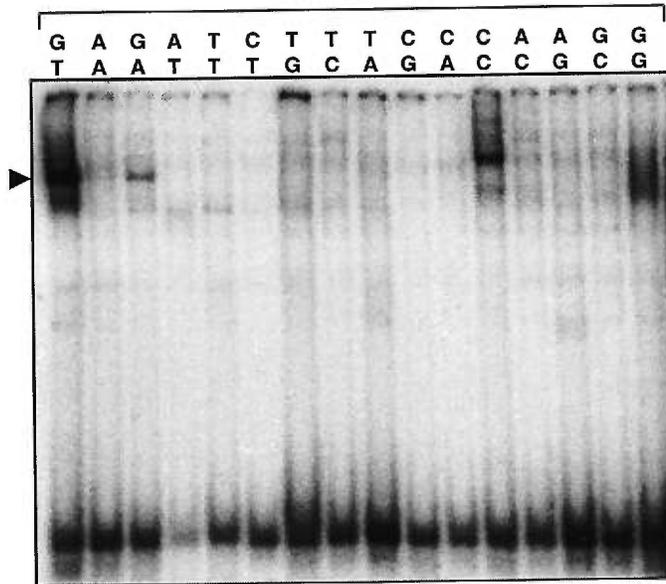
Un complexe avec la sonde CC est également observé, suggérant une interaction spécifique avec cette sonde. Cependant la hauteur de la bande n'étant pas la même que pour les interactions récepteur-HRE, on peut penser qu'il s'agit d'une interaction avec un autre facteur cellulaire.

Les mutants G204A et G204S semblent donc avoir la même spécificité. Ils se fixent tout deux préférentiellement à un ERE (sonde GT) mais aussi assez fortement à la sonde GA et plus faiblement aux sondes GG et AA.

D'après les études cristallographiques, la glycine 204 du ER n'établit

Figure n° 16 : Spécificité du récepteur aux oestrogènes mutant G204S pour différents éléments de réponse. Le gel retard à été réalisé dans les mêmes conditions que pour ER-G204A (figure 6A). Cette figure est représentative de deux expériences indépendantes.

ER-G204S



pas de contact spécifique avec l'ADN et n'a qu'un contact via une molécule d'eau avec un phosphate de l'ADN. Cet acide aminé est néanmoins très important puisqu'il est l'un des trois acides aminés impliqué dans la discrimination de reconnaissance entre un GRE et un ERE (Mader *et al* 1989). Ce petit acide aminé est d'autre part connu pour modifier la structure de l'ADN lorsqu'il se trouve dans une hélice α . Son rôle pourrait donc être conférer au DBD de ER une conformation particulière qui assurerait une plus grande spécificité pour un ERE. Cette conformation particulière aurait en outre une influence sur la capacité du récepteur à transactiver la transcription.

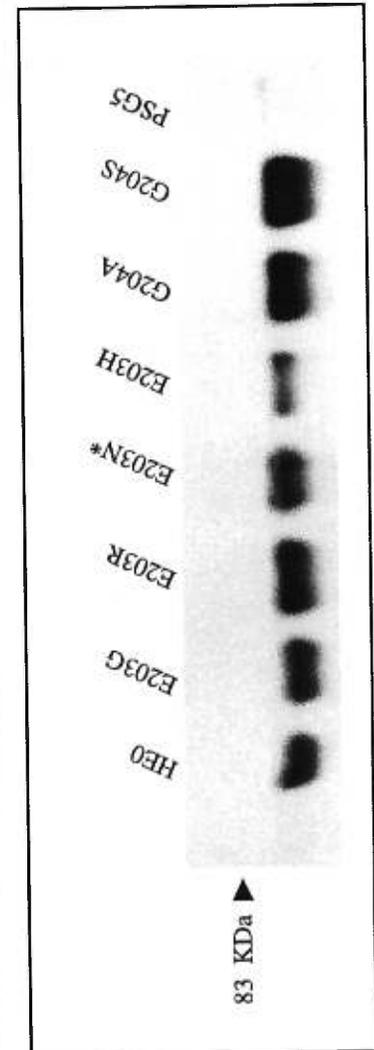
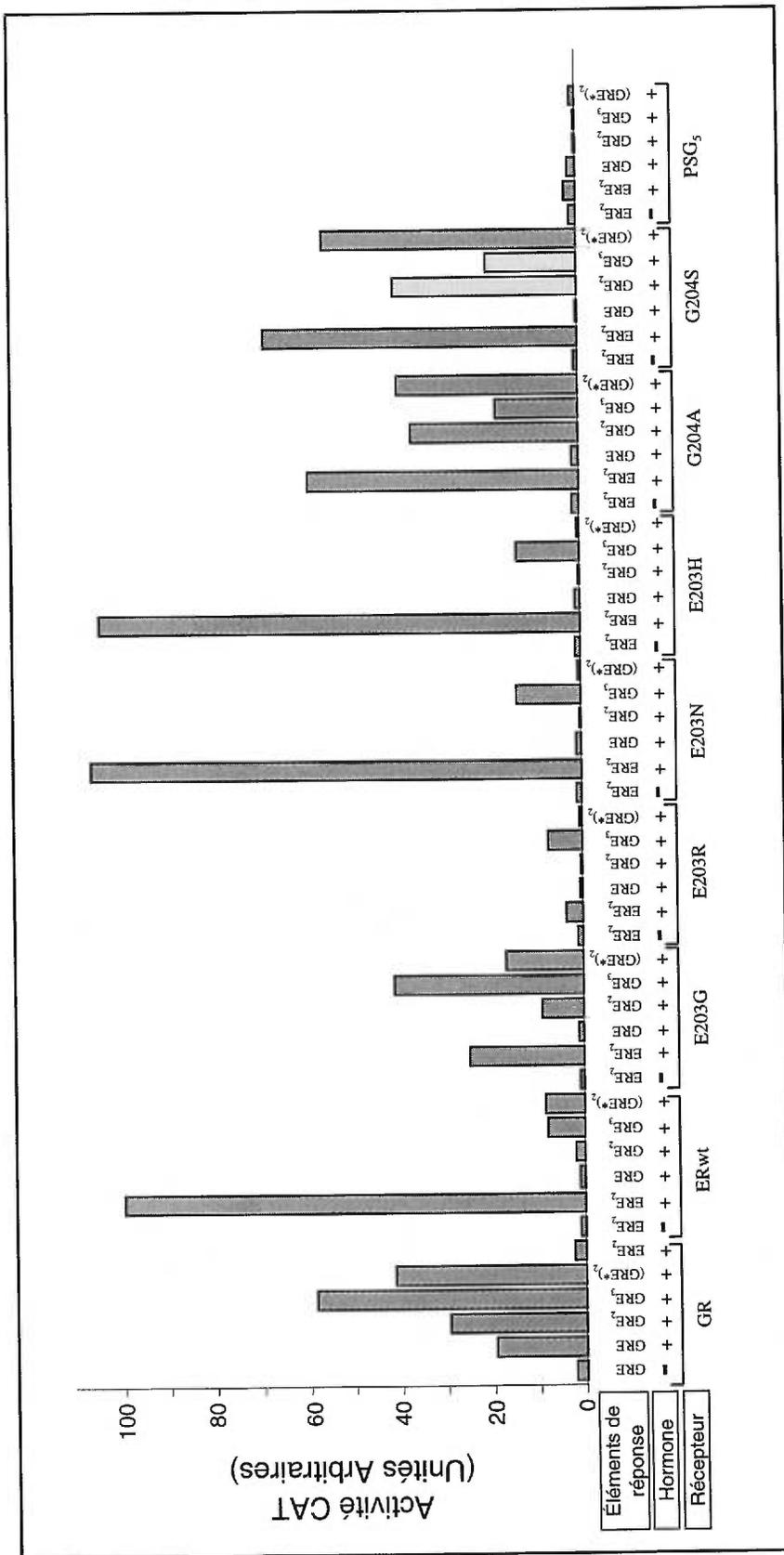
3.5. Effets de coopérativité en présence de plusieurs éléments de réponse

Il a déjà été démontré que plusieurs éléments de réponse juxtaposés en amont d'un gène pouvaient avoir un effet coopératif (Schmid W *et al* 1989; Tsai SY *et al* 1989). Nos résultats précédents nous ont montré qu'une fixation d'un récepteur sur un élément de réponse observé en retard sur gel n'implique pas toujours une activation de la transcription détectable lorsqu'un seul élément de réponse est placé en amont du gène rapporteur. Nous avons voulu vérifier si l'effet coopératif que représente la juxtaposition de deux ou trois éléments de réponse pouvait permettre d'observer une activation de la transcription. Pour cela nous avons utilisé les mêmes essais de transactivation que précédemment en utilisant des vecteurs rapporteurs ayant deux ou trois éléments de réponse en amont du gène CAT. Les éléments de réponse que nous avons testés sont ERE (deux éléments de réponse successifs), GRE (un, deux ou trois éléments de réponse) et GRE* dont le motif est GGACA (deux éléments de réponse successifs). Pour

Figure n° 17 : **Effets de coopérativité entre plusieurs éléments de réponse.** (A) Les vecteurs d'expression des récepteurs ont été cotransfectés avec différents vecteurs rapporteurs (section 2.2.3.). Ces vecteurs rapporteurs diffèrent par le ou les éléments de réponse en amont du gène CAT : ERE₂, GRE, GRE₂, GRE₃ et (GRE*)₂ où GRE* est un élément de réponse ayant le motif GGACA. Pour chaque vecteur d'expression, la transfection avec GRE₂ a été réalisée en duplicata, et une des deux boîtes a servi à vérifier le niveau d'expression des récepteurs par Western-Blot (B) (section 2.6.2.).

Notes :

- pour E203N, figure 17A, deux fois moins d'extrait a été utilisé, la bande est donc deux fois moins intense que ce qu'elle devrait être;
- pour G204S, figure 17B, les essais avec GRE₂ et GRE₃ ont été refaits à part en raison d'un problème expérimental.



A.

B.

chaque récepteur étudié, le niveau d'expression a été vérifié par Western-Blot en parallèle des expériences de transfection.

Le Western-Blot montre une expression comparable pour les récepteurs ERwt, E203G, E203R et E203N, une expression un peu plus faible pour E203H et une expression un peu plus forte pour G204A et G204S. Le témoin négatif correspond à des extraits de cellules transfectées par le vecteur d'expression pSG₅ sans insert : une petite bande non spécifique apparaît juste au dessus des bandes spécifique du récepteur aux oestrogènes (figure 17B).

En retard sur gel (figure 13) les récepteurs ERwt, E203R, E203N et E203H ne montraient pas de liaisons sur les sondes AA (GRE) ou GA (GRE*), ils ne montrent pas de transactivation même si deux éléments de réponse sont juxtaposés (figure 17A). Si trois GRE sont juxtaposés, le niveau de transcription est augmenté pour les mutants E203H et E203N (environ deux fois par rapport à ERwt) surtout avec E203H puisque ce récepteur est relativement moins exprimé (figure 17B). Les récepteurs E203N et E203H activent fortement, comme ERwt, avec ERE₂ contrairement aux autres mutants surtout E203R qui a perdu la capacité à transactiver la transcription via un ERE₂.

Les récepteurs E203G, G204A et G204S qui montraient une fixation sur la sonde GA (figure 13G, 14A et 16 respectivement) sans montrer de capacité à transactiver lorsqu'un seul élément de réponse de motif GGACA est placé en amont du gène rapporteur (figure 13H pour E203G, résultats non montrés pour G204A et G204S) sont capables d'activer la transcription via deux éléments de réponse (figure 17A). D'autre part, on ne peut détecter de capacité à transactiver de ces récepteurs via un GRE sauf si plusieurs

éléments de réponse sont juxtaposés. De façon surprenante, les récepteurs G204A et G204S transactivent mieux lorsque que deux plutôt que trois GRE sont juxtaposés. Cela n'est pas observé ni pour GR ni pour E203G. On remarque enfin que l'effet coopératif des GRE est plus important pour le mutant E203G (environ 25 fois plus de stimulation pour 3 GRE) que pour le GR (environ trois fois) (figure 17A).

L'effet de coopération dû à la présence de trois GRE est pratiquement nul sur le ERwt ce qui confirme la haute spécificité du récepteur sauvage.

4. DISCUSSION

4.1. Spécificité des récepteurs aux androgènes et aux glucocorticoïdes

Le récepteur aux androgènes, comme le récepteur aux glucocorticoïdes, se fixe sur un GRE consensus. Cela est dû à une homologie de séquences des acides aminés impliqués dans la reconnaissance spécifique de l'ADN entre ces deux récepteurs. En effet, les 13 acides aminés de l'hélice α impliquée dans la reconnaissance de l'ADN sont les mêmes pour AR et GR (figure 10). Ainsi n'est-il pas surprenant que les éléments de réponse ayant un motif de type GNACA soient reconnus par les deux récepteurs (fig 7,8 et 9). En transfection transitoire, les récepteurs aux androgènes et aux glucocorticoïdes peuvent tout deux activer la transcription d'un gène rapporteur via les mêmes éléments de réponse. Cela ne signifie pas que *in vivo* les hormones androgènes et glucocorticoïdes ont les mêmes effets. D'une part les récepteurs aux androgènes et aux glucocorticoïdes ne sont pas exprimés dans les mêmes tissus, d'autre part AR et GR n'interagiraient pas avec les mêmes cofacteurs. On connaît en effet des co-activateurs spécifiques de AR (Kang *et al* 1999).

4.2 Lien entre la mutation G577R du récepteur aux androgènes et syndrome d'insensibilité partielle aux androgènes

Il ne nous a pas été possible de détecter de différence de stabilité de liaison à un ARE entre les DBD de ARwt et AR-G577R en raison de la faible stabilité

des complexes DBD/ARE. Afin de mettre en évidence de possibles différences de stabilité des complexes formés par le ARwt et le AR-G577R, il faudrait mettre au point des conditions expérimentales dans lesquelles ces complexes soient plus stables (paramètres de température et de concentration en sels des réactions de retard sur gel). On pourrait également tester la stabilité des récepteurs complets. On sait en effet qu'un récepteur complet homodimérisé en présence de son ligand est plus stable que le DBD isolé (Kumar *et al* 1988). Ainsi le comportement des récepteurs complets pourrait permettre de déterminer s'il existe une différence de stabilité entre les complexes AR/ARE. Il serait enfin intéressant de réaliser des expériences de cotransfection avec un vecteur d'expression du récepteur ARwt ou AR-G577R d'une part et un vecteur rapporteur ayant un ARE en amont du gène CAT d'autre part. Nous pourrions ainsi tester la capacité des deux récepteurs à transactiver via un ARE.

Si l'on n'a pas pu montrer de différence de stabilité de fixation entre les DBD de ARwt et AR-G577R sur un ARE, on a pu montrer que la stabilité de ces deux DBD sur un ARE était inférieure à la stabilité de fixation d'un DBD de ER sur un ERE. Ceci peut s'expliquer par la différence des liaisons établies par les DBD de AR ou de ER sur leurs éléments consensus de réponse respectifs (figure 3B). Les études de cristallographie ont en effet montré que le DBD de ER établissait davantage de liaisons avec un ERE que le DBD de GR avec un GRE (Luisi *et al* 1991; Schwabe *et al* 1993). AR et GR ayant la même hélice de reconnaissance, il est probable que les contacts entre DBD et élément de réponse sont les mêmes. Ainsi le DBD de ER établirait

davantage de liaisons directes avec un ERE que le DBD de AR avec un ARE de motif GAACA. Le DBD de ER établirait également davantage de liaisons faisant intervenir des molécules d'eau. Une certaine prudence est cependant requise dans ces conclusions à cause de la plus grande résolution des études cristallographique sur le ER que sur le GR (Schwabe *et al* 1993). Une autre différence importante est que le GR établit une liaison hydrophobe entre la valine 443 (6) et la thymine 3 alors que ER n'établit que des liaisons hydrogène.

Les deux grandes familles d'éléments de réponse se distinguent au niveau de deux bases du motif GNNCA. L'utilisation de 16 sondes oligonucléotidiques, représentant les 16 possibilités de combinaisons de deux bases, nous a permis de montrer que les DBD des récepteurs ARwt et AR-G577R pouvaient lier les éléments de réponses dont le motif est GNACA. Cela peut s'expliquer par le fait qu'aucun acide aminé du DBD de AR n'établit de contacts avec la base en position -4 (figure 4B). Cependant, on remarque que l'identité de la base en position -4 à un effet sur l'affinité du récepteur pour l'élément de réponse. La mesure de l'intensité des bandes nous a permis de montrer que ARwt avait plus d'affinité pour la sonde AA que pour les sondes GA ou TA et une plus faible affinité pour la sonde CA. Cela pourrait être expliqué par la présence d'une lysine, conservée entre ER et AR, en position 9 sur l'hélice de reconnaissance. Cette lysine établit plusieurs contacts dans le cas d'une interaction ER/ERE dont deux contacts avec la guanine en position -4. La lysine (chargée positivement) peut interagir avec une guanine (chargée négativement). Par contre la substitution de la guanine

-4 par une cytosine (chargée positivement) pourrait être moins compatible avec la présence de la lysine 9 expliquant la plus faible affinité observée par la sonde CA.

Pour AR-G577R (figure 7B), l'ordre de préférence a été modifié. Le récepteur mutant reconnaît avec la meilleure affinité la sonde AA, puis CA et TA tandis qu'il ne lie presque plus GA. La présence d'une charge positive apportée par la mutation G577R pourrait modifier les interactions entre acides aminés du DBD et bases de l'élément de réponse. Cela pourrait être aussi dû à l'encombrement stérique qui est plus grand avec une arginine qu'avec une glycine. Enfin cette modification de spécificité pourrait être due à un changement dans la forme de l'hélice α de reconnaissance puisque l'on sait que la présence d'un acide aminé glycine produit une déformation des hélices- α .

Cette différence de spécificité ne peut pas être sans conséquences importantes *in vivo* d'autant que le motif GGACA a été décrit comme constituant un élément de réponse aux androgènes (Roche *et al* 1992). En conclusion, il est vraisemblable que la différence de spécificité entre ARwt et AR-G577R soit responsable du phénotype d'insensibilité partielle aux androgènes du porteur de cette mutation.

4.3. Spécificité du récepteur aux oestrogènes

D'après le code de Suzuki *et al*, le récepteur aux oestrogènes sauvage pourrait reconnaître le motif GTTCA en plus de l'ERE. Nous n'avons pas pu

détecter de liaison en retard sur gel ni de transactivation dans les essais de transfection transitoire en utilisant ce motif. Nous avons par contre constaté une fixation en retard sur gel avec un élément de réponse de motif GGGCA en plus de ERE. Ceci est compatible avec les liaisons existant entre ER et ERE : la lysine 210 (#9) contacte la thymine -3 de l'ERE, une guanine (chargée négativement) en -3 peut conserver ce contact; l'acide glutamique 203 (#2) établit un contact avec l'adénine en position 3, une cytosine (chargée positivement) à cette position peut conserver un contact avec l'acide glutamique (charge négative).

Le fait de ne pas avoir pu détecter de contact avec le motif GTTCA ne signifie pas que ce contact ne pourrait être détecté par des tests plus sensibles. Cependant nos résultats suggèrent que l'affinité de cette interaction est faible et inférieure à celle des liaisons entre ER et les motifs GGGCA et GGTC.

Si l'on compare nos résultats à ceux obtenus par Zilliacus *et al* (1995a), des différences importantes apparaissent. Ces derniers ont utilisé une construction hybride constituée de la région AF1 (acides aminés 77 à 262) et du DBD (acides aminés 370 à 500) du récepteur aux glucocorticoïdes avec une substitution des trois acides aminés de la boîte P par ceux du ER (GSV→EGA). Ils étudient la capacité de cette construction à transactiver la transcription d'un gène rapporteur sous la dépendance d'un des 16 éléments de réponse de motif GNNCA. Afin de déterminer le rôle du premier acide aminé de la boîte P, ils ont substitué l'acide glutamique (203) par les 19

autres acides aminés et chaque mutant ainsi obtenu a été testé pour sa capacité à transactiver un gène rapporteur via l'un des 16 HRE.

D'après leur étude, la construction ayant la boîte P de ER transactive comme ER via les motifs **GGTCA** et **GGGCA** mais aussi avec **GTTCA** comme le prévoit le code de Suzuki *et al* (1994b). De façon surprenante la construction de Zilliacus *et al* (1995a) a une plus faible efficacité transcriptionnelle avec un motif **GGTCA** (ERE) qu'avec les deux autres motifs. Il s'agit d'un premier indice montrant que la construction utilisée dans cette étude se comporte différemment du récepteur aux oestrogènes sauvage complet. De plus nous pouvons conclure que le code de Suzuki ne prévoit pas toutes les possibilités de contacts puisque la liaison de ER sur un motif **GGGCA** n'a pas été prédite tandis que l'interaction avec le motif **GTTCA** n'a pu être détectée.

4.4. Rôle de l'acide aminé 203 du récepteur aux oestrogènes

Nous avons choisi différentes substitutions afin de déterminer quelles propriétés de l'acide glutamique sont impliquées dans la reconnaissance spécifique de l'ERE et de vérifier la validité du code de reconnaissance proposé par Suzuki *et al* (1994b).

Le modèle de Suzuki prévoit que si la charge négative de l'acide glutamique en position 203 (2) était substituée par une charge positive, une liaison s'établirait préférentiellement avec une guanine (chargée négativement) en position 4 de l'élément de réponse, soit avec le motif **GCTCA** (la cytosine -4, en gras, est complémentaire de la guanine 4). Nos résultats obtenus avec le

mutant E203R ne vérifient pas cette logique puisque nous n'avons pu détecter aucun contact en retard sur gel avec les motifs **GGTCA**, **GCTCA**, **GTTCA** et **GATCA**, ni de transactivation avec les mêmes motifs ou avec le motif **GGACA**. De plus, nos résultats diffèrent de ceux de Zilliacus *et al* (1995a) puisque la construction hybride ayant une arginine en position 2 de l'hélice- α de reconnaissance transactive via les motifs **GTTCA**, **GCACA** et plus faiblement via le motif **GCTCA**.

Lorsque E203 est remplacé par une histidine, on observe une liaison et une transactivation conservée avec ERE sans nouvelle spécificité. L'histidine est aussi un acide polaire mais dont la charge positive est moins marquée et est moins éloignée de la liaison peptidique ce qui expliquerait la différence de résultat par rapport à la mutation E203R. Si trois GRE sont juxtaposés en amont du gène rapporteur, on peut détecter une activation de la transcription par E203H. D'après Zilliacus *et al* (1995a) la construction ayant une histidine transactive via les motifs **GATCA**, **GACCA**, **GAACA** (GRE) et plus faiblement avec les motifs **GGTCA** (ERE) et **GAGCA**. Nous n'avons pas testé toutes ces sondes mais on peut remarquer que les spécificités de la construction hybride de Zilliacus *et al* et de notre ER mutant ne sont pas les mêmes puisque nos résultats montrent une grande affinité pour le motif **GGTCA** (ERE) alors qu'aucune liaison n'est détectée avec le motif **GATCA**. Nous n'avons, pas plus que Zilliacus *et al*, pu observer de fixation de E203H au motif **GCTCA** comme le prévoyait Suzuki *et al* (1994b).

Pour le mutant E203N, le code de Suzuki prévoit la perte de spécificité pour ERE et le gain d'une nouvelle spécificité pour le motif **GTTCA**. D'après Zilliacus *et al* (1995a) E203N reconnaît les motifs **GATCA**, **GACCA**, **GAACA** (GRE) et plus faiblement **GGTCA** (ERE) et **GTTCA**. D'après nos résultats E203N conserve son affinité pour ERE et gagne une nouvelle spécificité pour le motif **GATCA**. En outre on observe une transactivation de la transcription si trois GRE sont juxtaposés en amont du gène rapporteur CAT.

Une substitution par une glycine n'est pas prévue par le code de Suzuki parce que cet acide aminé serait trop petit pour établir une liaison avec l'élément de réponse. D'après nos expériences le mutant E203G peut fixer les motifs **GGTCA** (ERE), **GGACA** et **GAACA**(GRE) en retard sur gel mais aucune transactivation n'est possible via ces motifs si un seul élément de réponse est placé en amont du gène rapporteur. On constate d'autre part que si au moins deux de ces éléments de réponse sont juxtaposés, on peut alors détecter une activation de la transcription. D'après Zilliacus *et al* (1995a) la construction E203G transactive via les motifs **GAACA** (GRE), **GTTCA** et plus faiblement avec les motifs **GGACA** et **GTACA**.

Très clairement la construction utilisée par Zilliacus *et al* ne représente pas exactement le comportement du récepteur aux oestrogènes. Cela s'explique par le rôle important que jouent les acides aminés autres que ceux de la boîte P. Pour la même raison les prévisions de Suzuki *et al* ne sont pas fiables.

Contrairement aux prévisions du modèle de Suzuki (1994b), la plupart des mutations de l'acide glutamique 203 (2) permettent de conserver une spécificité pour l'ERE et autorisent souvent la possibilité de liaisons supplémentaires d'affinité en général plus faible. Certaines mutations comme par exemple E203R sont incompatibles avec la présence d'une guanine en position -4 de l'HRE. Cela pourrait s'expliquer par une incompatibilité de charge entre un acide aminé chargé positivement et la proximité d'une cytosine également positive en position 4.

La forte restriction de la spécificité en présence d'un acide glutamique en position 203 semble donc s'expliquer par plusieurs mécanismes : (i) le fait que cet acide aminé ait une influence plus ou moins directe sur les contacts qui s'établissent avec trois paires de bases de l'ERE. En effet cet acide aminé établit une liaison hydrogène avec la cytosine en position 4, une liaison faisant intervenir une molécule d'eau avec l'adénine en position 3 et une liaison avec la lysine 206 (5) qui elle même établit une liaison avec la guanine en position -5 (Schwabe et al 1993) (figure 4B), (ii) l'analyse des interactions stériques par ordinateur suggère une interaction négative unique à l'acide glutamique entre le groupement carbonyle de cet acide aminé et le groupement méthyle de la thymine (Zilliacus *et al* 1995), cela impliquerait l'impossibilité de liaison avec un HRE présentant une thymine en position 4 comme cela est le cas pour un GRE, (iii) l'acide glutamique permettrait au DBD de ER d'adopter une conformation particulière. En plus d'une liaison avec la lysine 206 (5) comme on l'a vu, l'acide glutamique 203 (2) établit un

contact avec la sérine 193 (-8). Cette sérine est en contact avec l'histidine 196 (-5) qui elle même est en liaison avec un phosphate du squelette de l'ADN au niveau de l'adénine -6, (iv) la conformation particulière adoptée par ER est non seulement importante pour la liaison à ERE mais elle est également importante pour permettre la transactivation. On voit en effet que le mutant E203G est capable de lier un ERE mais ne permet pas d'activer la transcription lorsqu'un seul élément de réponse est placé en amont d'un gène rapporteur (figure 13G).

4.5. Rôle de l'acide aminé 204 du récepteur aux oestrogènes

L'acide aminé 204 n'établit pas de contact avec les bases de l'élément de réponse et n'est de ce fait pas pris en compte par le code de Suzuki (1994b). Nous avons montré qu'une substitution de la glycine 204 en alanine procurait une affinité comparable avec un ERE tout en diminuant d'environ 50% la capacité à transactiver. Cette observation est en accord avec les travaux de Nelson *et al* (1993) sur le récepteur à l'hormone thyroïdienne. Ce récepteur possède les mêmes acides aminés de la boîte P que ER. La substitution du deuxième acide aminé de la boîte P, la glycine, par une alanine montre que le récepteur à l'hormone thyroïdienne mutant est affecté dans la fonction d'activation de la transcription mais pas au niveau de sa liaison à l'élément de réponse. Ceci démontre que les domaines fonctionnels des récepteurs nucléaires ne sont pas aussi indépendants que les études de dissection moléculaire le suggéraient. Un acide aminé du domaine de liaison peut avoir un effet sur la fonction d'activation de la transcription.

Le récepteur G204A peut également fixer les éléments de réponse ayant pour motif **GGACA** et **GAACA** (GRE). Comme nous l'avons déjà observé pour des mutants en position 203, la fixation observée en retard sur gel n'implique pas toujours une capacité à transactiver lorsqu'un seul élément de réponse est placé en amont du gène rapporteur. Si deux éléments de réponses sont juxtaposés, on peut alors observer une activation de la transcription.

Pour les récepteurs de la famille du récepteur aux glucocorticoïdes, on trouve une sérine en position 440 correspondant à la position de la glycine 204 du récepteur aux oestrogènes. Dans le récepteur aux glucocorticoïdes, cette sérine établit un contact par l'intermédiaire du groupement hydroxyle avec une arginine en position 470. Il a été proposé que cette liaison induirait un changement conformationnel qui restreindrait la spécificité du GR pour le GRE en particulier en empêchant la liaison à l'ERE puisqu'une mutation de cette serine en alanine (suppression du groupement hydroxyle) permet la liaison à un ERE (Zilliacus *et al* 1994). Par contre nos résultats indiquent que le mutant de ER-G204S comme G204A reconnaît en retard sur gel, les motifs **GGTCA** (ERE) et plus faiblement **GGGCA** et **GGACA**. De plus, ces deux mutants ont les mêmes niveaux d'activation transcriptionnelle sur des vecteurs rapporteurs contenant deux copies d'ERE, de GRE ou d'éléments **GGACA**. Les mutants G204A et G204S du récepteur aux oestrogènes ayant le même comportement, on peut conclure que le groupement hydroxyle de la

sérine ne joue aucun rôle dans la spécificité dans le cadre du récepteur aux oestrogènes, même si l'arginine en position 234 est conservée dans le ER. Encore une fois, les conclusions de Zilliacus *et al* (1995a) basées sur une construction dont le cadre est celui du GR ne s'appliquent donc pas au récepteur des estrogènes de type sauvage. Cependant, nous pouvons conclure que dans le cadre du ER, la glycine en position 204 induirait une conformation du DBD qui permettrait de restreindre la spécificité à l'ERE. Ainsi, la spécificité du ER est déterminée non seulement par les acides aminés interagissant directement avec l'ADN mais aussi par les acides aminés avoisinants de par leur influence sur la conformation du DBD.

4.6. Peut-il exister un code de reconnaissance pour les récepteurs nucléaires?

Le code de Suzuki (1994b) ne tient pas compte des changements conformationnels de la protéine engendrés par les substitutions d'acides aminés, ni des contacts entre acides aminés. Ce code ne tient également pas compte des changements de conformation de l'ADN en fonction de la séquence de l'élément de réponse. Le motif **GGGTCA** a probablement une conformation différente du motif **GTTCA** du fait de la différence entre les appariements de la guanine avec une cytosine ou de la thymine avec une adénine (trois liaisons hydrogènes entre guanine et cytosine contre deux seulement entre thymine et adénine). Un code uniquement basé sur des interactions un acide aminé / une base est donc clairement insuffisant pour prédire la spécificité des récepteurs nucléaire pour leurs éléments de

réponse. Vu l'importance des conformations tridimensionnelles autant de la protéine que de l'élément de réponse, l'établissement d'un code d'interaction même pour des mutations ponctuelles d'un récepteur donné s'avère problématique.

4.7. Perspectives

Parmi tous les récepteurs nucléaires connus, seulement deux motifs sont reconnus. Il serait intéressant de concevoir un récepteur ayant une spécificité "non naturelle". Un tel récepteur pourrait être utilisé pour créer un système d'expression. Le gène d'intérêt sous contrôle du nouvel HRE ne pourrait être activé que par ce récepteur exogène.

Afin d'éviter que l'induction du récepteur exogène n'entraîne la stimulation des récepteurs endogènes, il est envisageable de modifier le LBD afin que ce nouveau récepteur ne soit activé que par une hormone de synthèse. En effet, il existe un mutant du GR qui peut être activé en présence de stéroïdes synthétiques tels que la dexamétasone mais pas en présence de glucocorticoïdes naturels tels que le cortisol ou la corticostérone (Roux *et al* 1996).

Ce nouveau système d'expression pourrait être utilisé dans le cadre de thérapies génique en ayant, par rapport aux systèmes existant comme VP16 (Gallia *et al* 1998), l'avantage d'échapper au système immunitaire du fait de sa quasi-identité avec les récepteurs endogènes.

5. BIBLIOGRAPHIE

Adams CC and Workman JL (1993) Nucleosome displacement in transcription. *Cell* **72** : 305-308

Bamerger CM, Bamerger AM, DeCastro M, Chrousos GP (1995) Glucocorticoid β , a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *Journal of clinical investigations* **95** : 2435-2441

Baniahmad A, Köhne AC and Renkawitz R (1992) A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor. *EMBO journal* **11** : 1015-1023

Beato M, Chalepakis G, Schauer M, Slater EP (1989) DNA regulatory elements for steroid hormones. *Journal of steroid biochemistry* **32** : 737-747

Beato M, (1991) Transcriptional control by nuclear receptors. *FASEB journal* **5** : 2044-2051

Beato M, Chávez S and Truss M (1996) Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* **61** : 240-251

Breg JN, van Opheusden JH, Burgering MJ, Boelens R and Kaptein R (1990) Structure of Arc repressor in solution: evidence for a family of beta-sheet DNA-binding proteins. *Nature* **346** : 586-589

Brinkmann AO, Faber PW, van Rooij HC, Kuiper GC, Ris C, Klaassen P, van der Korput JA, Voorhorst MM, van Laar JH, Mulder E *et al* (1989) The human androgen receptor : domain structure, genomic organisation and regulation of expression. *Journal of steroid biochemistry* **34** : 307-310

Derman E, Krauter K, Walling L, Weinberger C, Ray M and Darnell JE (1981) Transcriptional control in the production of liver-specific mRNAs. *Cell* **23**(3) : 731-739

Diamond MI, Miner JN, Yoshinaga SK and Yamamoto KR (1990) Transcription factor interactions : selectors of positive or negative regulation from a single DNA element. *Science* **249** : 1266-1272

Felsenfeld G (1992) Chromatine as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* **355** : 219-224

Felsenfeld G (1996) Chromatine structure and gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93** : 9384-9388

Freedman LP, Luisi BF, Korszun ZR, Basavappa R, Sigler PJ and Yamamoto KR (1988) The fonction and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature* **334** : 543-546

Gallia GL and Khalili K (1998) Evaluation of an autoregulatory tetracycline regulated system. *Oncogene* **16**(14) : 1879-1884

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P and Chambon P (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **320** : 134-139

Green S, Issemann I and Sheer E (1988) A versatile in vivo and in vitro eukaryotic expression vector for protein engineering. *Nucleic Acids Research* **16**(1):369

Green S, Kumar V, Theulaz I, Whali W and Chambon P (1988) The N-terminal DNA binding zing finger of the oestrogen and glucocorticoid receptors determinates target gene specificity. *EMBO journal* **7** : 3037-3044

Hård T, Kellenbach E, Boelens R, Maler BA, Dahlman K, Freedman LP, Carlstedt-Duke J, Yamamoto KR, Gustafsson J-Å, Kaptein R (1990) Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. *Science* **249** : 157-160

Higuchi R, Krummel B, Saiki RK (1988) A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments : study of protein and DNA interactions. *Nucleic acids research* **16** : 7351-7367

Kadonaga JT and Tjian R (1986) *Proc. Natl. Aca. of Sci.* **83** : 5889-

Kostrouch Z, Kostrouchova M, Rall JE (1995) Steroid / thyroid hormone receptor genes in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**(1):156-9

Kang HY, Yeh S, Fujimoto N and Chang C (1999) Cloning and characterization of human prostate coactivator ARA54, a novel protein that associates with the androgen receptor. *Journal of biological chemistry* **274**(13) : 8570-8576

Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Heitlinger E, Cato AC (1988) A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic acids research* **16** : 647-663

Kliwer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM (1992) Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signaling. *Nature* **355** : 446-449

Knegtel RM, Katahira M, Schilthuis JG, Bonvin AM, Boelens R, Eib D, van der Saag PT, Kaptein R (1993) The solution structure of the human retinoic acid receptor-beta DNA-binding domain. *Journal of biomolecular RMN* **3** : 1-17

Klock G, Strähle U and Schütz G (1987) Oestrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct. *Nature* **329** : 734-736

Kumar V and Chambon P (1988) The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* **55** : 145-156

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S and Gustafsson JA (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**(12) : 5925-5930

Lee MS, Kliewer SA, Provençal J, Wright PE, Evans RM (1993) Structure of the retinoid X receptor- α DNA-binding domain : a helix required for homodimeric DNA binding. *Science* **260** : 11117-11121

Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB (1991) Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* **352** : 497-505

Mader S, Kumar V, Vereneuil H, Chambon P (1989) Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive receptor. *Nature* **338** : 271-274

Mader S, Chambon P and White JH (1993) Defining a minimal estrogen receptor DNA binding domain. *Nucleic Acids Research* **21**(5):1125-32

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P and Evans R (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83** : 835-839

Meyer M, Gronemeyer H, Turcotte B, Bocquel M, Tasset D and Chambon P (1989) Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell* **57** : 433-442

Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics. p 433. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

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

Nelson CC, Faris JS, Hendy SC and Romaniuk PJ (1993) Functional analysis of the amino acids in the DNA recognition alpha-helix of the thyroid hormone receptor. *Molecular Endocrinology* **7** (9) : 1185-1195

Pabo CO and Sauer RT (1992) Transcription factors : structural families and principles of DNA recognition. *Annual revue of biochemistry* **61** : 1053-1095

Peterson CL and Tamkun JW (1995) The SWI-SNF complex : a chromatine remodeling machine? *Trends in biochemical sciences* **20** : 143-146

Picard D, Khursheed B, Garabedian MJ, Fortin MG, Lindquist S, Yamamoto KR (1990) Reduced level of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature* **348**: 166-168

Ponglikimongkol M, Green S and Chambon P (1988) Genomic organisation of the human oestrogen receptor gene. *EMBO journal* **7** : 3385-3388

Renoir JM, Mercier-bodard C, Hoffmann K, Lebihan S, Ning YM, Sanchez ER, Handschumcher RE, Baulieu EE (1995). Cyclosporin A potentiates the dexamethasone-induced mouse mammary tumor virus-chloramphenicol acetyltransferase activity in LMCAT cells : a possible role for different heat shock protein-binding immunophilins in glucocorticoid receptor-mediated gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92** : 4977-4981

Roche PJ, Hoare SA and Parker MG (1992) A consensus DND-binding site for the androgène receptor. *Molecular endocrinology* **6** : 2229-2235

Roux S, Terouanne B, Balaguer P, Jausons-Loffreda N, Pons M, Chambon P, Roux S, Terouanne B, Balaguer P, Jausons-Loffreda N, Pons M, Chambon P, Gronemeyer H and Nicolas JC (1996) Mutation of isoleucine 747 by a threonine alters the ligand responsiveness of the human glucocorticoid receptor. *Molecular endocrinology* **10** : 1214-1226

Rosenberg AH, Lade BN, Chui DS, Lin SW, Dunn JJ and Studier FW (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56**(1):125-35

Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Heitlinger E and Cato AC (1988) A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Research* **16**(2):647-63

Sadavsky Y, Webb P, Lopez G, Baxter JD, Fitzpatrick PM, Gizang-Ginsberg E, Cavailles V, Parker MG and Kushner PJ (1995) Transcriptional activators differ in their responses to overexpression of TATA-box-binding-protein. *Molecular endocrinology* **15** : 1554-1563

Salinovich O and Montelaro RC (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anales of Biochemistry* **156**(2) : 341-347

Scheidereit C, Westphal HM, Carlson C, Bosshard H, Beato M (1986) Molecular model of the interaction between the glucocorticoid receptor and the regulatory elements of inducible genes. *DNA* **5** : 383-391

Schmid W, Strähle U, Schütz G, Schmitt J and Stunnenberg H (1989) Glucocorticoid receptor binds cooperatively to adjacent recognition sites. *EMBO journal* **8** : 2257-2263

Schüle R, Muller M, Otsuka-Murakami H and Renkawitz R(1988) Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors. *Science* **242** : 1418-1420

Schüle R and Evans RM (1991) Cross-coupling of signal transduction pathways – Zinc finger meets leucine zipper. *Trends in genetics* **7** : 337-381

Schwabe JW, Neuhaus D, Rhodes D (1990) Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature* **348** : 458-461

Schwabe JW, Chapman L, Finch JT, Rhodes D (1993) The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA : how receptors discriminate between their response elements. *Cell* **75** : 567-578

Seed B and Sheen J Y (1988) A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acyltransferase activity. *Gene* **67**(2), 271-277

Segnitz B, Gehring U (1995) Subunit structure of the nonactivated human estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92** : 2179-2183

Min Xu, Chakraborti PK, Garabedian MJ, Yamamoto K and Simons SS (1996) Molecular structure of glucocorticoid receptor domain is not equivalent to functional independence. *Journal of biological chemistry* **271** (35) : 21430-21438

Suzuki M (1993) Common features in DNA recognition helices of eukaryotic transcription factors. *EMBO journal* **12** (8) : 3221-3226

Suzuki M, Gerstein M and Yagi N (1994a) Stereochemical basis of DNA recognition by Zn fingers. *Nucleic acids research* **22** : 3397-3405

Suzuki M and Yagi N (1994b) DNA recognition code of transcription factors in the helix-turn-helix, probe helix, hormone receptor and zinc finger families. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91** : 12357-12361

Suzuki M (1994c) A framework for the DNA-protein recognition code of the probe helix in transcription factors : the chemical and stereochemical rules. *Structure* **2** (4) : 317-326

Tasset D, Tora L, Fromental C, Scheer E and Chambon P (1990) Distinct classes of transcriptional activation domains function by different mechanisms. *Cell* **62** : 1177-1187

Torchia J, Glass C and Rosenfeld MG (1998) Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Current opinion in cell biology* **10** : 373-383

Travers A (1999) An engine for nucleosome remodeling. *Cell* **96** : 311-314

Tsai SY, Carlstedt-Duke J, Weigel NL, Dahlman K Gustafsson J-Å, Tsai MJ, O'Malley BW (1988) Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. *Cell* **55** : 361-399

Tsai SY, Tsai MJ, and O'Malley BW (1989) Cooperative binding of steroid hormone receptors contributes to transcriptional synergism at target enhancer elements. *Cell* **57** : 443-448

Umesco K and Evans RM (1989) Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* **57** : 1139-1146

Vallée BL, Coleman JE, Auld DS (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88** : 999-1003

Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, Mc Donnell DP (1993) Human progesterone receptor-A form is a cell-specific and promoter-specific repressor of human progesterone receptor-B function. *Molecular endocrinology* **7** : 1244-1255

White JH, McCuaig KA and Mader S (1994) A simple and sensitive high-throughput assay for steroid agonists and antagonists. *Biotechnology* **12** (10):1003-1007

Zilliacus J, Wright APH, Norinder U, Gustafsson J-Å, and Carlstedt-Duke J (1992) Determinant for DNA-binding site recognition by the glucocorticoid receptor. *Journal of biological chemistry* **267** : 24941-24947

Zilliacus J, Carlstedt-Duke J, Gustafsson J-Å and Wright APH, (1994) Evolution of distinct DNA-binding specificity within the nuclear receptor family of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91** : 4175-4179

Zilliacus J, Wright APH, Carlstedt-Duke J, Nilsson L and Gustafsson J-Å (1995a) Modulation of DNA-binding specificity within the nuclear receptor family by substitutions at a single amino acid position. *Proteins* **21** : 57-67

Zilliacus J, Wright APH, Carlstedt-Duke J, and Gustafsson J-Å (1995b) Structural determinants of DNA-binding specificity by steroid receptors. *Molecular endocrinology* **9** (4) : 389-400

Zlatanova J, Yaneva J (1991) Histone H1-DNA interactions and their relation to chromatin structure and function. *DNA Cell Biology* **10**(4) : 239-48