

Université de Montréal

**Caractérisation de l'activité Nur77 et de ses complexes en
essais BRET par complémentation**

par

Xavier Giner

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté de Pharmacie

en vue de l'obtention du grade de Ph.D

en Sciences Pharmaceutiques

option Pharmacologie

Juin, 2015

© Xavier Giner, 2015

Résumé

Dans le système nerveux central, la dopamine joue un rôle crucial dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que : l'apprentissage, le mouvement volontaire, la motivation, la cognition et la production hormonale. Il a été aussi démontré que le système de signalisation dopaminergique est altéré dans plusieurs maladies neurologiques et psychiatriques comme la maladie de Parkinson et la schizophrénie. Des études, effectuées dans le laboratoire du Dr. Daniel Lévesque (laboratoire d'accueil), ont montré que les récepteurs nucléaires Nur77 (NR4A1, NGFI-B) et RXR γ (retinoid X receptors γ) sont impliqués dans la régulation des effets de la dopamine dans le système nerveux central. De plus, ces données suggèrent que le complexe Nur77 et RXR joueraient un rôle crucial dans l'effet des médicaments antipsychotiques et antiparkinsoniens. Toutefois, très peu de médicaments ciblant Nur77 ont été identifiés à ce jour et les médicaments agissant sur RXR γ restent mal caractérisés. En outre, les analyses actuellement disponibles ne peuvent pas résumer la complexité des activités des NRs et génèrent des mesures indirectes des activités des drogues. Afin de mieux comprendre comment est régulée l'interaction Nur77/RXR γ dans ces processus, mon projet a été de mettre au point un essai BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) et PCA-BRET (Protein Complementation Assay-BRET) basé sur le recrutement d'un motif mimant un co-activateur fusionné avec la YFP. Nos différents essais ont été validés par courbes dose-réponse en utilisant différents composés RXR. Les EC⁵⁰ (concentration efficace médiane, qui permet de mesurer l'efficacité d'un composé) obtenues étaient très semblables aux valeurs précédemment rapportées dans la littérature. Nous avons aussi pu identifier un composé le

SR11237 (BMS649) qui semble posséder une sélectivité pour le complexe Nur77/RXR γ par rapport aux complexes Nurr1/RXR γ et RXR γ /RXR γ . Nos résultats indiquent que ces essais de BRET peuvent être utilisés pour évaluer la sélectivité de nouveaux composés pour les complexes Nur77/RXR γ , Nurr1/RXR γ et RXR γ /RXR γ .

Un autre aspect de mon projet de doctorat a été de mettre en évidence par BRET l'importance de la SUMOylation dans la régulation de l'activité de Nur77 dans sa forme monomérique, homodimérique et hétérodimérique. Nous avons ainsi identifié que Nur77 recrute principalement SUMO2 sur sa lysine 577. Il est intéressant de noter que le recrutement de la SUMO2 à Nur77 est potentialisé en présence de la SUMO E3 Ligase PIAS γ . Aussi, la perte de la SUMOylation sur la lysine 577 entraîne l'incapacité de Nur77 de recruter divers motifs de co-activation mais pas pour ses formes homo- et hétérodimérique. Cependant, la présence de PIAS γ ne potentialise pas le recrutement du co-activateur, suggérant que cette SUMO E3 Ligase est seulement impliquée dans le processus de recrutement de la SUMO mais pas dans celui du co-activateur. Nous avons ainsi déterminé une nouvelle modification post-traductionnelle sur Nur77 régulant spécifiquement son activité monomérique

Ces projets pourraient donc apporter de nouvelles données cruciales pour l'amélioration du traitement de la maladie de Parkinson ou de la schizophrénie, ainsi que d'obtenir une meilleure compréhension sur les mécanismes permettant la régulation de la fonction de Nur77.

Mots-clés : Nur77, RXR γ , dopamine, parkinson, schizophrénie, SR11237, BRET, PCA-BRET, SUMOylation

Abstract

In the central nervous system, dopamine plays a critical role in many physiological functions such as learning, voluntary movement, motivation, cognition and hormone production. It was also shown that the dopamine signaling system is altered in many neurological and psychiatric disorders like Parkinson's disease and schizophrenia. Studies conducted in the laboratory of Dr. Daniel Lévesque (host laboratory) have shown that nuclear receptors Nur77 (NR4A1, NGFI-B) and RXR γ (retinoid X receptor γ isoform) are involved in the regulation of dopamine effects. These data suggest that the Nur77/RXR complex plays a crucial role in the effect of antipsychotic and anti-parkinsonian drugs. However, very few drugs targeting Nur77 have been identified to date and drugs acting at RXR γ remain poorly characterized. Furthermore, currently available tests cannot recapitulate the complexity of nuclear receptor activities and generate indirect measures of drug activities. To better understand Nur77/RXR γ complex activity we developed a new and original Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)-luciferase Protein Complementation Assay (PCA) based on the recruitment of a co-activator motif fused with YFP. The assays have been validated by dose-response curves using different RXR compounds. EC₅₀ obtained were very similar to the values previously reported in the literature. We were also able to identify a compound, SR11237 (BMS649), which appears to have specificity for the complex Nur77/RXR γ compared to Nurr1/RXR γ and RXR γ /RXR γ . Our results indicate that these BRET assays can be used to evaluate the selectivity of compounds at Nur77/RXR γ , Nurr1/RXR γ or RXR γ /RXR γ complexes.

Another aspect of my PhD project was to better understand how Nur77 activity is regulated by post-translational modifications. We were able to highlight the importance of Nur77 SUMOylation in the activity of monomeric, homodimer and heterodimer forms of Nur77 using various BRET assays. We identified that Nur77 preferentially recruits SUMO2 mainly on its lysine 577 residue. It is interesting to note that SUMO2 recruitment by Nur77 is potentiated in the presence of SUMO E3 ligase PIAS4 (PIAS γ). Also, the loss of SUMOylation on lysine 577 strongly reduced co-activator motif recruitment by monomeric form of Nur77, but not for homo- and hetero-dimer complexes. However, PIAS4 by itself does not potentiate co-activator recruitment, suggesting that this SUMO E3 ligase is only involved in the recruitment process of SUMO, but not in the co-activator recruitment. Thus, we identified a new post-translational modification on Nur77 that specifically regulates its monomeric activity.

These results provide critical new data that will help to identify new compounds targeting selective nuclear receptor complexes (Nur77/RXR) that may improve the treatment of Parkinson's disease and schizophrenia, as well as to get a better understanding of the mechanisms regulating the activity of Nur77.

Keywords : Nur77, RXR γ , dopamine, parkinson, schizophrenia, SR11237, BRET, PCA-BRET, SUMOylation

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xvi
Introduction.....	1
Les récepteurs nucléaires.....	2
Généralités.....	2
Mécanisme d'action des NRs.....	6
La Structure des récepteurs nucléaires.....	8
La Famille des NR4A.....	12
Structure générale des récepteurs nucléaires de la famille des NR4A.....	12
Activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires de la famille des NR4As.....	14
Le rôle des NR4As.....	15
Les rôles des NR4As en périphérie.....	16
Les rôles des NR4As dans le système nerveux central.....	19
Les récepteurs X des rétinoïdes.....	27
Mécanisme d'action des RXRs.....	27
Rôles des RXRs.....	29
Les Co-régulateurs de la transcription.....	33
Les Nurs et les co-régulateurs.....	34
Les modifications post-traductionnelles.....	36
La phosphorylation.....	36
L'ubiquitination.....	38
La SUMOylation.....	40
Le BRET.....	45

Hypothèses et objectifs	51
Article 1: Activité sélective des ligands au complexes Nur/ RXR révélé par la formation de dimère spécifiques par un senseur BRET	53
Contribution du candidat.....	53
Selective ligand activity at Nur/retinoid X receptor complexes revealed by dimer-specific bioluminescence resonance energy transfer-based sensors	53
Article 2: Rôle de la SUMOylation de Nur77	105
Contribution du candidat.....	105
Discussions et Perspectives.....	138
Développement d'outils moléculaires pour étudier les interactions des récepteurs nucléaires	138
Nur77, un « vrai » récepteur orphelin ?	146
La SUMOylation affecte l'activité fonctionnelle de Nur77	149
Applications physiologiques et en développement du médicament	154
Annexe 1	i
Bibliographie.....	ii

Liste des tableaux

- Tableau 1:** Les récepteurs nucléaires chez l'humain p 4
- Tableau 2:** Pharmacological characterization of rexinoids for recruitment of a co-activator motif to RXR γ , RXR γ /RXR γ , Nur77/RXR γ and Nurr1/RXR γ complexes in BRET and PCA-BRET assays p 79
- Tableau 3:** Pharmacological characterization of rexinoids in a Nur77 + RXR γ gene reporter assay p 81

Liste des figures

Figure 1: La superfamille des récepteurs nucléaire (NRs).	p 5
Figure 2: Régions d'homologie et domaines fonctionnels des NRs	p 8
Figure 3: Structure des membres de la famille NR4A	p 13
Figure 4: Les différents mécanismes d'action des Nurs	p 15
Figure 5: Rôle de Nur77 et RXR γ dans les dyskinésies induites par les antipsychotiques	p 23
Figure 6: Rôle de Nur77 et RXR γ dans les dyskinésies induites par la L-Dopa	p 26
Figure 7: Distribution des Nurs et de RXR γ dans le système dopaminergique	p 31
Figure 8: Les différentes étapes de l'ubiquitination	p 39
Figure 9: Le processus de SUMOylation	p 41
Figure 10: Le principe du BRET	p 47
Figure 11: Schematic representation of the PCA-BRET assay	p 82
Figure 12: A PCA assay for RXR dimer complexes	p 83
Figure 13: Nuclear receptor-Luc fusion constructs remain transcriptionally active	p 85
Figure 14: Differential activity of RXR ligands on specific RXR dimeric complexes	p 86
Figure 15: Rexinoid transactivation dose-response curves on a DR-5 element	p 88
Figure 16: Effect of rexinoids on dimer conformation	p 89
Figure 17: Titration curves for Nur77-F1 and F2-RXR γ fragments	p 90
Figure 18: XCT0135908 induces a distinct Nurr1/RXR \square complex conformation	p 91
Figure S1: Nuclear localization of the CoA-YFP motif	p 92

Figure S2: Comparison of co-activator motif recruitment in simple BRET and PCA-BRET assays	p 93
Figure S3: Comparison between RXR γ -Luc and RXR γ -F1/F2-RXR γ BRET assays	p 94
Figure S4: Mutated co-activator motif recruitment by Nur77-F1/F2-RXR γ is ligand independent or produced a non specific BRET signal	p 95
Figure 19: Nur77 preferentially recruited SUMO2/3.	p 124
Figure 20: Residue K577 participate in SUMO2 recruitment by Nur77	p 125
Figure 21: Nur77 K577 SUMO site is specifically potentiated by PIAS4	p 127
Figure 22: K577R mutation reduces co-activator recruitment by Nur77	p 128
Figure 23: SUMO E3-ligase PIAS1 and PIAS γ family do not promote co-activator recruitment by Nur77	p 129
Figure 24: The K577R mutation affects co-activator recruitment and reporter gene transcription for the monomeric but not the homodimeric form of Nur77	p 130
Figure 25: The K577R mutation alters SR11237 potency for co-activator recruitment at the Nur77/RXR γ complex	p 132
Figure 26: Structures chimique de quelques ligands RXR	p 142
Figure 27: Courbes de titrations des fragments Nur77-F1 et F2-RXR γ	p 144
Figure 28: Effets des ligands Nurs en BRET et en essai rapporteur	p 148
Figure 29: Sites de SUMOylation de Nur77	p 153
Figure 30: Le rôle de Nur77 dans l'apoptose	p 156
Figure S5: Optimisation du PCA-BRET	<i>i</i>

Quoi qu'il arrive! (Rugby XV de Montréal)

Liste des abréviations

3-Cl-AHPC : 4-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-3-chlorocinnamic acid

5-HT2A : Récepteur à la sérotonine de type 2A

9 cis-RA : 9-cis-retinoic acid

ACTH : Corticotropine (Adrenocorticotropic hormone)

ADN : Acide désoxyribonucléique

AF-1 : Domaine d'activation de la transcription 1

AF-2 : Domaine d'activation de la transcription 2

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

AR : Récepteur des androgènes

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine triphosphate

ATV : Aire tegmentaire ventrale

Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*

BRET : *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*

BPA : Bisphenol A

CAR : *Constitutive Androstane Receptor*

ChAT : Choline acétyltransférase

COMT : Catéchol-o-méthyltransférase

CoREST : *[Co]Repressor for Element-1-Silencing Transcription factor*

CoRNR : *Corepressor Nuclear Receptor box motif*

CRH : Hormone de libération de la corticotropine (*Corticotropin –Releasing Hormone*)

D1 : Récepteur à la dopamine de type 1

D2 : Récepteur à la dopamine de type 2

DAT : Transporteur de la dopamine (*Dopamine transporter*)

DBD : Domaine de liaison à l'ADN (*DNA-binding domain*)

DES : *Diethylstilbestrol*

DHA : Acide docosahexaénoïque (*Docosahexaenoic acid*)

DIM-C-pPhOCH₃: 1,1-bis(3'-Indolyl)-1-(p-methoxyphenyl)methane; 3,3'-[(4-

Methoxyphenyl)methylene]bis-1H-indole

DR-5: *Direct repeat spaced by 5 nucleotides*

DYN : Dynorphine

E2 : Estradiol

ENK : Enképhaline

ER : Récepteur des œstrogènes

ERK: Extracellular signal-regulated kinases FRET : *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

FXR : *Farnesoid X Receptor*

IEG : *Immediate Early Gene*

GFP : Green fluorescent protein

GPCR : Récepteur couplé aux protéine G

GR : Récepteur glucocorticoïdes

HDAC : Histone déacétylase

HPA: Hypothalamo-hypophyso-surrénalien

HPG: Hypothalamo-pituitaire-gonadique

HTS : Criblage à haut débit

LBD : Domaine de liaison du ligand (*Ligand-binding domain*)

LBP : Poche de liaison au ligand (*Ligand-binding pocket*)

L-DOPA : L-3,4-dihydroxy-phénylalanine

LID : *L-dopa-induced dyskinesia*

LXR : *Liver X Receptor*

MAPK : Protéines kinases activées par des signaux mitogéniques

MR : Récepteur aux minéralocorticoïdes

NAc : Noyau accumbens

NBRE : *NGFI-B responsive element*

NCoR : *Nuclear receptor Corepressor*

NLS : Séquence de localisation nucléaire

NMR : Résonance magnétique nucléaire

NR4A : *Nuclear receptors 4A subgroup*

NRs: Récepteurs nucléaires

NT: Neurotensine

NuRE: *Nur-response element*

PCA-BRET : *Protein Complementation Assay-BRET*

PFC : Cortex préfrontal

PI3K : *Phosphatidylinositol 3-kinase*

PIAS : *Protein Inhibitors of Activated STAT*

Pin1 : *Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase NIMA-interacting 1*

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinsase C

POMC : Pro-opiomélanocortine

PPAR : Récepteur activés par les proliférateurs des peroxysomes

PR : Récepteur de la progestérone

PTMs : Modifications post-traductionnelles (*Post-translational modifications*)

PXR : *Pregnane X Receptor*

RAR : Récepteur de l'acide rétinoïque

RLuc : Luciférase de la renilla reniformis

ROR : *Retinoic acid receptor–related Orphan Receptor*

RSK : *Ribosomal protein S6 kinase*

RXR : Récepteur X des rétinoïdes

SENP : *Sentrin-Specific Protease*

SEM : *Standard error of the mean*

SERD : *Selective estrogen receptor downregulator*

SMRT : *Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptor*

SNc : Substance noire compacte

SNC : Système nerveux central

SRET : *Sequential resonance energy transfer*

SRC : *Steroid Receptor Coactivator*

SUMO : *Small Ubiquitin-related Modifier*

TH : Tyrosine hydroxylase

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale α

TPA : (12-*O*-tetradecanoyl-13-phorbol acetate)

TR : Récepteur aux hormones thyroïdiennes

Ubi: Ubiquitine

VAD : Syndrome de déficience en vitamine A (*Vitamin A Deficiency*)

VCM : *Vacuous chewing movements*

VMAT : Transporteur vésiculaire des monoamines

YFP : *Yellow fluorescent protein*

Remerciements

Je voudrais remercier mon directeur de thèse le Dr Daniel Lévesque pour m'avoir accueilli dans son équipe et pour la confiance dont il m'a fait preuve. Je tiens aussi à le remercier pour ces judicieux conseils, son écoute, d'avoir été autant disponible et de m'avoir fait sentir plus qu'un simple étudiant. Je tiens à souligner que le Dr Daniel Lévesque a toujours pris en compte mes objectifs de vie et mon avenir professionnel et a toujours été prêt à m'aider dans ce sens. Je tiens également à remercier la Dre Sylvie Mader et le Dr Marc Servant pour leur aide et leurs précieux conseils dans le cadre de mon projet.

La thèse n'est pas qu'une aventure scientifique et intellectuelle, mais aussi une aventure humaine où en 4 ans on fait une multitude de belles rencontres. Je tiens donc tout d'abord à remercier les membres du laboratoire que j'ai pu côtoyer pour leur amitié ainsi que pour les échanges scientifiques : « Lord » Jérôme Maheux, David « Communiste » Voyer, Souha Mahmoudi, Olivier « Peon » Perreault et Catherine Lévesque. Je n'oublie pas non plus mes petits stagiaires qui ont dû subir mon rythme de travail spartiate : Bastien Morel, Jennifer Fontaine, William St-Pierre et Mareva Faure, merci encore à vous les petits. Je remercie aussi les autres étudiants de la Faculté de Pharmacie, tels que Guitou, Morgan, Katia, Paul, Anne, Jean-Michel, Souhde, Alex Marineau, Alex Melkoumov, Warren, Aurore, Jimmy, Augustine, Nicolas, Priscilla, Monique, ainsi que tous les autres. Ayant effectué une bonne proportion de mes expériences à l'IRIC, je tiens également à remercier les membres du laboratoire du Dre Sylvie Mader : Sam, Justyna, Tatiana, Mohamed, Khalid, David, Martine, Marieke et Alice. Je remercie aussi les autres personnes avec qui j'ai eu le plaisir d'évoluer soit, Angélique

« mamie » Bellemare-Pelletier, Audrey « panpan » Connolly, Etienne Gagnon, Xavier, Dev, Marianne, Barbara, Alexandre, Brigitte, Monique, Bianca, Florence pour nommer seulement eux.

Un immense merci à mes parents Claude et Anne-Marie, mon frère Laurent, ma belle-sœur Alice, mes nièces Anna et Indylou, ainsi que le petit dernier Elliot pour leur soutien et leur encouragement tout au long de mon doctorat. J'en profite pour remercier mon chien Phoebe qui grâce à nos longues marches et à sa joie explosive, a toujours su me « remonter à bloc ». Enfin, la personne à qui j'attribue le plus grand remerciement revient à ma conjointe Edith qui a toujours crû en moi, lorsque moi-même j'y croyais pas et qui m'a toujours soutenu. Sans toi je n'en serai pas là et je suis fier que tu sois la mère de notre petite Marine.

Introduction

Les récepteurs nucléaires

Généralités

Les récepteurs nucléaires (NRs) forment une vaste famille constituée de 48 facteurs de transcription, activés généralement par un ligand, permettant de réguler l'expression de gènes (**Tableau 1**). Ces récepteurs agissent sur une grande variété de processus biologiques tels que le développement embryonnaire, la différenciation, la reproduction, la réponse immunitaire, le métabolisme, l'homéostasie, la croissance cellulaire et l'apoptose (Nagy and Schwabe 2004, Sonoda, Pei et al. 2008). Les NRs sont aussi impliqués dans le développement de plusieurs pathologies, telles que le cancer, le diabète, l'athérosclérose, l'inflammation, les troubles endocriniens et de la reproduction, les maladies cardiovasculaires, et le syndrome métabolique (Sladek 2003, Burris, Solt et al. 2013). Les NRs sont classés en 3 grandes classes selon leurs mécanismes d'actions (**Figure 1**) et 7 sous-familles selon leur homologie de structure (Gronemeyer, Gustafsson et al. 2004, Germain, Staels et al. 2006, Bain, Heneghan et al. 2007, Sonoda, Pei et al. 2008). La classe I correspond à la famille des récepteurs stéroïdiens qui comprend le récepteur des œstrogènes (ER), le récepteur des glucocorticoïdes (GR), le récepteur des androgènes (AR), le récepteur de la progestérone (PR) et le récepteur des minéralocorticoïdes (MR). La deuxième classe de NRs est la classe des récepteurs des hormones thyroïdiennes et de l'acide rétinoïque. Initialement, cette classe ne comprenait pas les récepteurs de ces deux ligands, mais depuis des récepteurs connaissant d'autres types de molécule ont intégré cette classe. Les récepteurs de classe II correspondent donc maintenant aux récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TR), le récepteur X des rétinoïdes (RXR), le

récepteur de l'acide rétinoïque (RAR), les PXR (Pregnane X Receptor), les LXR (Liver X Receptor), les FXR (Farsenoïd X Receptor), le CAR (Constitutive Androstane Receptor) et les récepteurs activés par les proliférateurs des peroxyosomes (PPAR). Il est important de noter que chez les récepteurs de classe II on retrouve des récepteurs nucléaires dits orphelins « adoptés ». En effet, on ne connaissait pas de ligands endogènes pour les PPARs, LXRs, FXRs, PXR et CAR, mais ces derniers ont fini par être caractérisés et cela a ainsi permis d'identifier leurs interactions avec les RXRs (Evans and Mangelsdorf 2014). La dernière et troisième classe de NRs est la classe des récepteurs nucléaires dits « orphelins ». Cette famille est définie comme étant un ensemble de protéines identifiées par homologie de séquence comme appartenant à la superfamille des NRs, mais pour lesquels aucun ligand correspondant n'est connu. On retrouve dans cette classe, par exemple les Nurs (comprenant Nur77, Nurr1 et Nor1), les ROR (Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor) et les ERR (Estrogen-Related Receptor) (Bain, Heneghan et al. 2007, Imai, Youn et al. 2013). Les 7 sous-familles basées selon leur homologie de séquence sont: NR1 (TR-like), NR2 (RXR-like), NR3 (ER-like), NR4 (NGFIB-like), NR5 (SF1-like), and NR6 (GCMF-like). La septième sous-famille, NR0, contient deux récepteurs, DAX-1 et SHP, et ont la propriété de ne pas posséder de domaine de liaison à l'ADN (DBD) (Germain, Staels et al. 2006).

Table 1 Human nuclear receptors			
Name	Abbreviation	Nomenclature	Ligand
Thyroid hormone receptor	TR α TR β	NR1A1 NR1A2	Thyroid hormone Thyroid hormone
Retinoic acid receptor	RAR α RAR β RAR γ	NR1B1 NR1B2 NR1B3	Retinoic acid Retinoic acid Retinoic acid
Peroxisome proliferator-activated receptor	PPAR α PPAR β PPAR γ	NR1C1 NR1C2 NR1C3	Fatty acids, leukotriene B ₄ , fibrates Fatty acids Fatty acids, prostaglandin J ₂ ,
Reverse erbA	Rev-erb α Rev-erb β	NR1D1 NR1D1	Orphan Orphan
RAR-related orphan receptor	ROR α ROR β ROR γ	NR1F1 NR1F2 NR1F3	Cholesterol, cholesteryl sulphate Retinoic acid Retinoic acid
Liver X receptor	LXR α LXR β	NR1H3 NR1H2	Oxysterols, T0901317, GW3965 Oxysterols, T0901317, GW3965
Farnesoid X receptor	FXR α FXR β *	NR1H4 NR1H5	Bile acids, Fexaramine Lanosterol
Vitamin D receptor	VDR	NR1H1	1,25-dihydroxy vitamin D ₃ , lithocholic acid
Pregnane X receptor	PXR	NR1I2	Xenobiotics, PCN
Constitutive androstane receptor	CAR	NR1I3	Xenobiotics, phenobarbital
Human nuclear factor 4	HNF4 α HNF4 γ	NR2A1 NR2A2	Orphan Orphan
Retnoid X receptor	RXR α RXR β RXR γ	NR2B1 NR2B2 NR2B3	Retinoic acid Retinoic acid Retinoic acid
Testis receptor	TR2 TR4	NR2C1 NR2C2	Orphan Orphan
Tailless	TLL	NR2E2	Orphan
Photoreceptor-specific nuclear receptor	PNR	NR2E3	Orphan
Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor	COUP-TF COUP-TFI	NR2F1 NR2F2	Orphan Orphan
ErbA2-related gene-2	EAR2	NR2F6	Orphan
Oestrogen receptor	ER α ER β	NR3A1 NR3A2	Oestradiol-17 β , tamoxifen, raloxifene Oestradiol-17 β , various synthetic compounds
Oestrogen receptor-related receptor	ERR α ERR β ERR γ	NR3B1 NR3B2 NR3B3	Orphan DES, 4-OH tamoxifen DES, 4-OH tamoxifen
Glucocorticoid receptor	GR	NR3C1	Cortisol, dexamethasone, RU486
Mineralocorticoid receptor	MR	NR3C2	Aldosterone, spiro lactone
Progesterone receptor	PR	NR3C3	Progesterone, medroxyprogesterone acetate, RU486
Androgen receptor	AR	NR3C4	Testosterone, flutamide
NGF-induced factor B	NGFIB	NR4A1	Orphan
Nur related factor 1	NURR1	NR4A2	Orphan
Neuron-derived orphan receptor 1	NOR1	NR4A3	Orphan
Steroidogenic factor 1	SF1	NR5A1	Orphan
Liver receptor homologous protein 1	LRH1	NR5A2	Orphan
Germ cell nuclear factor	GCNF	NR6A1	Orphan
DSS-AHC critical region on the chromosome, gene 1	DAX1	NR0B1	Orphan
Short heterodimeric partner	SHP	NR0B2	Orphan

*FXR β is a pseudogene in humans and does not encode a functional receptor. DES, diethylstilbestrol; DSS-AHC, dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita; NGF, nerve growth factor; PCN, pregnenolone 16 α -carbonitrile.

Tableau 1: Les récepteurs nucléaires chez l'humain (Gronemeyer, Gustafsson et al. 2004)

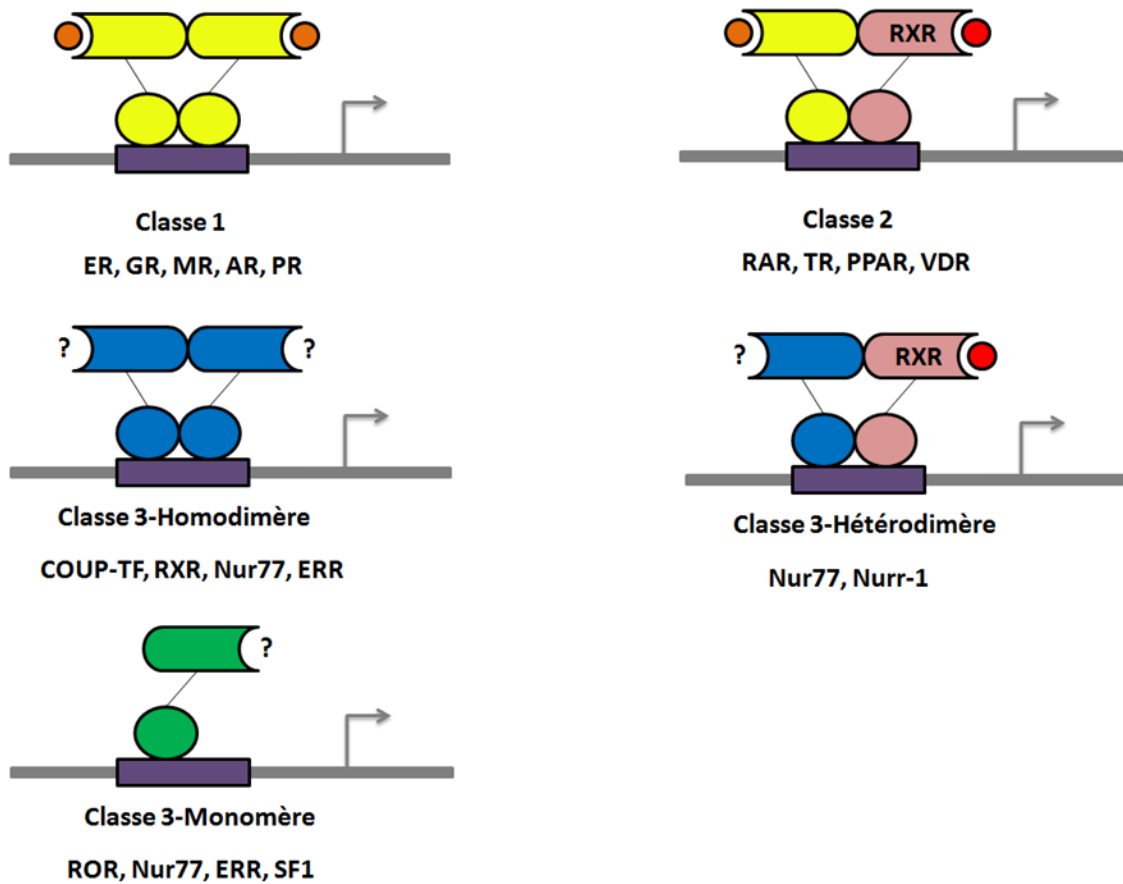


Figure 1: La superfamille des récepteurs nucléaire (NRs).

Les membres de la superfamille des NRs sont divisés en 3 grands groupes dépendant de leurs mécanismes d'actions. Les NRs de la classe 1 vont fonctionner comme homodimères suite à la fixation de leurs ligands (*en haut à gauche*) alors que les NRs de classe II vont fonctionner sous forme d'hétérodimères avec RXR (*en haut à droite*). Le dernier groupe de NRs réfère au groupe des NRs orphelins pour lesquels aucun ligand endogène n'est connu (*en bas*). Les NRs peuvent se fixer à leurs éléments de réponse sous forme de monomère, homodimère ou hétérodimère.

Mécanisme d'action des NRs

Bien que tous les NRs régulent l'expression des gènes, il existe des différences mécanistiques subtiles parmi les trois classes de NRs afin d'accomplir leurs fonctions. Pour la classe I, le modèle proposé veut qu'en absence de ligand les récepteurs soient couplés à un grand complexe multiprotéique, comprenant les protéines de choc thermique Hsp90, HSP56, Hsp70, et p23. Ce complexe demeure séquestrer dans le cytoplasme et rend incapable les récepteurs d'influencer le niveau de transcription de leurs promoteurs cibles (Leo and Chen 2000). Lors de la liaison de leurs ligands, les récepteurs stéroïdiens se dissocient du complexe de protéines de choc thermique, et transloquent dans le noyau pour s'homodimériser. Ces homodimères vont se lier à des éléments de réponse palindromiques contenant la séquence 5'- AGAACA -3' en amont des promoteurs cibles, à l'exception faite des ERs qui reconnaissent une séquence 5'- AGGTCA -3' (Leo and Chen 2000, Claessens, Verrijdt et al. 2001, Bain, Heneghan et al. 2007). Il est aussi important de noter que contrairement aux autres récepteurs stéroïdiens, les PRs et les ERs sont déjà localisés dans le noyau (Hager, Lim et al. 2000, Wan, Coxé et al. 2001).

Les récepteurs de classe II fonctionnent typiquement comme des hétérodimères. TR, VDR, RAR, et PPAR s'associent avec le récepteur rétinolique X (RXR) et se lient à un des éléments de réponse comportant une séquence consensus répétée 5'- AGGTCA-3' dits « directs de répétition » (DR) (Bain, Heneghan et al. 2007). D'un point de vue fonctionnel, cette classe de récepteur reste liée constitutivement à leurs éléments de réponses, indépendamment de la

présence d'agonistes. En effet, en absence de ligand, l'interaction d'un corépresseur avec l'hétérodimère lié à l'ADN va empêcher l'activation du gène cible (Leo and Chen 2000). La liaison du ligand sur le complexe va libérer le corépresseur lié alors à l'hétérodimère et va permettre le recrutement du co-activateur, conduisant ainsi à l'activation de la transcription (Leo and Chen 2000).

La troisième classe de NRs, qui correspond à la classe des NRs orphelins, est définie comme expliqué plus tôt, par l'absence de ligands identifiables pour le contrôle de leurs fonctions *in vivo*. Cependant, des ligands endogènes ont été identifiés pour certains membres de cette classe. Toutefois, contrairement aux récepteurs classiques aux hormones stéroïdiennes qui possèdent une très haute affinité (nM voire même pM) et sélectivité pour leur ligand respectif, les ligands, ou familles de ligands, identifiés pour les récepteurs maintenant définis comme NRs orphelins « adoptés » (par exemple PXR (NR1I2), LXR (NR1H2 et NR1H3), FXR (NR1H4), CAR (NR1I3 et NR1I4), PPAR (NR1C2, NR1C3, et NR1C4) se lient avec une faible affinité (uM) et sélectivité. La cause en serait que la poche de liaison du ligand (LBP) de ces récepteurs « adoptés » soit plus grande que celle des NRs classiques. Cela permettrait à une grande diversité de molécules avec une faible affinité d'activer ces récepteurs (Laudet 1997, Giguere 1999). Alors que la plupart des NRs orphelins se lient à l'ADN sous forme d'homodimères sur les éléments de répétition directe, certains peuvent se lier à l'ADN en interagissant avec RXR sous forme d'hétérodimère (par exemple : Nur77, Nurr1, FXRs, LXRs et PPAR) (Perlmann and Jansson 1995, Germain, Chambon et al. 2006, Mukherjee and Mani 2010). D'autres récepteurs orphelins (dont les NURs, RORs, SF-1 et ERRs) ont également la

capacité de se lier à l'ADN sous une forme monomérique (Germain, Staels et al. 2006, Mukherjee and Mani 2010).

La Structure des récepteurs nucléaires

La comparaison des séquences de l'ensemble des NRs a révélé cinq régions d'homologie (régions A/B à F) (**Figure 2**).

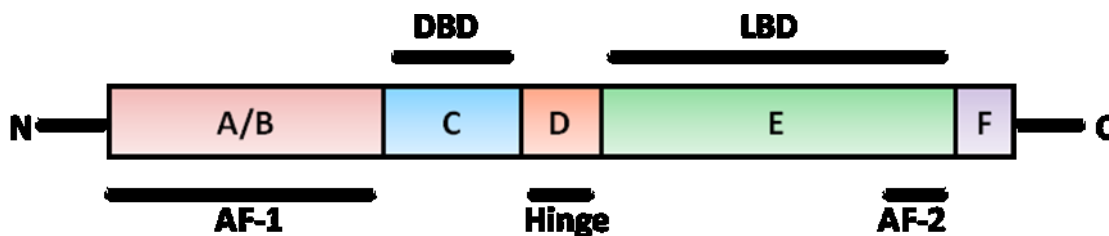


Figure 2 : Régions d'homologie et domaines fonctionnels des NRs.

La conservation des séquences des NRs est variable de l'extrémité N- à C-terminal. La région A/B contient la région d'activation transcriptionnelle indépendante du ligand, AF-1 (Activation Function-1). La région C contient le domaine de liaison à l'ADN (DBD), formé de deux doigts de zinc contenant 4 résidus de cystéines. La région D correspond au domaine charnière ou « Hinge ». En C-terminal on retrouve les régions E et F qui contiennent le domaine de liaison au ligand (LBD) ainsi que le domaine d'activation de la transcription dépendant du ligand AF2 (Activation Function-2).

À la partie N-terminale, la région A/B est la plus divergente parmi les NRs. Cette région contient aussi le domaine AF-1 (Activation Function-1) qui est impliqué dans la régulation de l'activité du récepteur indépendante au ligand, qui va conférer une activité constitutive aux

NRs. Cette activité indépendante du ligand serait modulée par la présence de corégulateurs, ainsi que par des modifications post-traductionnelles (PTMs) (Rochette-Egly 2003).

La région C est le domaine le plus conservé parmi les récepteurs nucléaires des NRs, celle-ci contient le domaine de liaison à l'ADN (DBD). Ce domaine est codé par 66 à 70 acides aminés et une extension en C-terminal (CTE) d'environ 25 résidus (Giguere 1999). Le DBD est constitué de deux structures en doigt de Zinc qui contiennent chacune 4 cystéines hautement conservées. La première structure en doigt de Zinc permet les interactions spécifiques avec les séquences d'ADN situées dans la région promotrice de ces gènes cibles. Quant à la seconde structure en doigt de Zinc, elle participe à la capacité du récepteur nucléaire à s'homodimériser ou s'hétérodimériser. L'extension CTE du DBD joue un rôle variable. Cette portion du DBD va soit stabiliser la liaison à l'ADN du NR ou va participer à la dimérisation des NRs (Helsen, Kerkhofs et al. 2012, Helsen and Claessens 2014). On retrouve aussi dans cette région la séquence de localisation nucléaire (NLS) qui va permettre le transport du récepteur au noyau (Germain, Staels et al. 2006).

La région D est aussi appelée le domaine charnière (« Hinge ») en raison de son emplacement entre le DBD et le domaine de liaison du ligand (LBD). C'est une région relativement courte avec un faible degré de conservation. Cette région, de par sa localisation entre le DBD et le LBD, permettrait d'adopter différentes conformations fonctionnelles sans créer de problèmes d'encombrement stérique. De plus, la région D est impliquée aussi dans la localisation nucléaire des récepteurs de par la présence d'une séquence NLS (Germain, Staels et al. 2006).

La région E ou LBD est un domaine multifonctionnel complexe, formé de douze hélices alpha (H1 à H12), et d'un feuillet β entre les hélices 5 et 6, qui montre une très haute conservation de séquence inter- et intra-espèces (Laudet, Hanni et al. 1992, Aranda and Pascual 2001). Cette région contient une surface de dimérisation, un site de liaison aux co-régulateurs, la poche de liaison au ligand (LBP) et un domaine de transactivation dépendant du ligand nommé AF-2 (Activation Function-2) (Chambon 1996, Germain, Staels et al. 2006, Burris, Solt et al. 2013). Le LBP est généralement situé derrière l'hélice 3 et à l'avant des hélices 7 et 10, et est bordé par des acides aminés essentiellement hydrophobes. Des résidus polaires situés dans le fond du LBP joueraient un rôle en tant que point d'ancrage assurant sa reconnaissance sélective au ligand et/ou un rôle essentiel pour le bon positionnement de la poche au ligand (Germain, Staels et al. 2006). La taille du LBP varie aussi entre les différents récepteurs, par exemple le LBP de PPAR γ est très grand et permet la liaison de ligands de tailles très différentes (Uppenberg, Svensson et al. 1998). La forme du LBP peut aussi varier d'un sous-type de récepteur à l'autre, ce qui va avoir pour effet de moduler la sélectivité du ligand (Germain, Kammerer et al. 2004).

Le positionnement de l'hélice 12 (H12) est crucial pour la formation de la surface de liaison du co-activateur avec le LBD. En effet, l'hélice 12 forme un "couvercle" mobile au-dessus de l'entrée de la LBP, et contient des résidus critiques pour la fonction de transactivation ligand-dépendante de AF-2 (Burris, Solt et al. 2013). Le dogme actuel suggère que l'hélice 12, en l'absence de ligand, est ouverte et permet la liaison des corépresseurs. En présence d'un agoniste, l'hélice 12 se comporte comme un couvercle se repliant sur le ligand qui se trouve dans le LBP et permettrait ainsi la liaison de coactivateurs. Le domaine adopte alors

différentes conformations possibles en présence d'un agoniste, d'un agoniste inverse ou partiel, d'un antagoniste ou en l'absence de ligand (Aranda and Pascual 2001, Bain, Heneghan et al. 2007). Il a été montré que le motif LXXLL (L=Leucine et X= n'importe quelle acide aminé), appelé aussi NR BOX, était présent chez de nombreux corégulateurs notamment les membres de la famille P160, CBP/p300 et TRAP/DRIP et qu'il interagissait avec le domaine AF-2 en présence d'agonistes ou dans une conformation similaire (Savkur and Burris 2004). Selon la conformation adoptée, le domaine AF-2 va recruter différents types de co-régulateurs (Savkur and Burris 2004).

La région F se situe à la partie carboxy-terminal (COOH) des récepteurs nucléaires. Cette région est faiblement conservée chez les NRs, voire même absent pour certains (Germain, Staels et al. 2006). Cependant, on a pu déterminer quelques fonctions de cette région pour les RARs. L'absence de la région F change l'activité des RARs en inhibiteurs de la transcription (Damm, Heyman et al. 1993). De plus, pour RAR α , la présence de cette région semble primordiale pour l'activation du domaine AF-2 (Tate, Allenby et al. 1996).

La Famille des NR4A

Structure générale des récepteurs nucléaires de la famille des NR4A

NR4A1(Nur77 ou NGFI-B pour« Nerve-Growth Factor Inducible gene B»), NR4A2 (Nurr1) et NR4A3 (Nor1) constituent une sous-famille de récepteurs nucléaires orphelins, connus aussi sous le nom des Nurs. D'un point de vue structural, le domaine AF-1 de Nurr1 et Nor-1 ont respectivement 26% et 28% d'homologie avec celui de Nur77 (**Figure 3**). Le DBD (DNA Binding Domain) est la région la mieux conservée avec une homologie de séquence avec Nur77 de 95% et 94% pour Nurr1 et Nor-1 respectivement. Le LBD quant à lui, est aussi relativement variable, avec une similitude de 65% pour Nurr1 et 58% pour Nor1 comparativement avec Nur77 (Martinez-Gonzalez and Badimon 2005). Bien que la structure des DBD des Nurs soit bien caractérisée, leur activité transcriptionnelle ne semble pas être régulée par des ligands endogènes comme c'est le cas pour les récepteurs nucléaires stéroïdiens (Benoit, Malewicz et al. 2004). En effet, les structures cristallines du LBD de Nur77 et Nurr1 ont montré que le site de liaison se trouve dans une conformation fermée qui serait inaccessible à un ligand (Flaig, Greschik et al. 2005). Cette particularité est due à l'absence de cavité dans le LBD des Nurs, en raison de la présence de chaînes volumineuses latérales d'acides aminés hydrophobes et de l'absence d'un sillon classique de liaison du co-activateur (Wang, Benoit et al. 2003, Flaig, Greschik et al. 2005). Cette caractéristique du LBD est également observée chez le récepteur DHR38 qui est le récepteur orthologue des récepteurs Nurs chez la drosophile (Baker, Shewchuk et al. 2003). Cependant, certaines

études ont montré une activité possible de ligands sur NR4A. En effet, il a été montré que le Cytosporone B, la 6-mercaptopurine et la 1,1-bis(3'-Indolyl)-1-(p-methoxyphenyl)methane;3,3'-[(4-Methoxyphenyl)methylene]bis-1H-indole (DIM-C-pPhOCH₃) auraient la faculté d'induire l'activité transcriptionnelle des Nurs (Wansa and Muscat 2005, Cho, Yoon et al. 2007, Zhan, Du et al. 2008). Malgré tout, le mécanisme d'action de ces drogues reste à être déterminé. Néanmoins, l'activité des Nurs serait régulée via leur expression génique, leurs modifications post-traductionnelles ainsi que leurs interactions avec d'autres protéines (Campos-Melo, Galleguillos et al. 2013, Kurakula, Koenis et al. 2014).

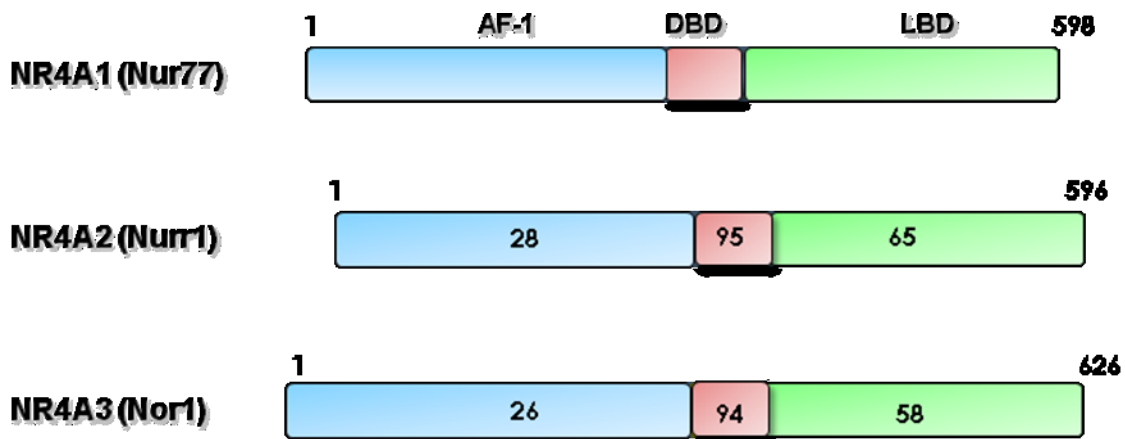


Figure 3 : Structure des membres de la famille NR4A.

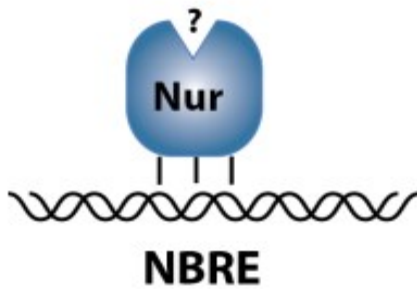
L'alignement des séquences d'acides aminés des Nurs et le pourcentage de similitude des acides aminés avec les régions correspondantes sont indiqués par rapport à Nur77.

Abréviations: AF, domaine de transactivation; DBD, domaine de liaison à l'ADN; LBD, domaine de liaison au ligand (adapté de Martinez-Gonzalez et Badimon, 2005) (Martinez-Gonzalez and Badimon 2005).

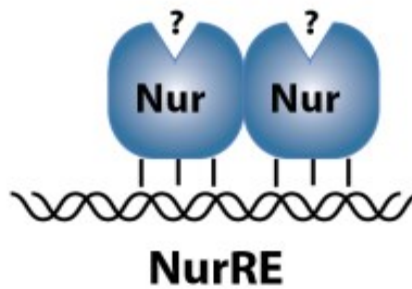
Activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires de la famille des NR4As

Les NR4As peuvent se lier à l'ADN pour réguler leurs gènes cibles de trois manières différentes (**Figure 4**). Tout d'abord, ils peuvent se lier à l'élément « Nerve-Growth-Factor Inducible gene B (NGFI-B)-responsive element» (NBRE ; 5'-AAAGGTCA-3') en tant que monomères (Wilson, Fahrner et al. 1991). Ils peuvent aussi se lier à l'élément « Nur-response element » (NurRE ; 5'-TGACCTTTX₆AAAGGTCA-3') sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères avec un autre membre de la famille NR4A (Philips, Lesage et al. 1997, Maira, Martens et al. 1999). De plus, Nurr1 et Nur77, mais pas Nor-1, peuvent former des hétérodimères avec les RXR et se lier à un élément de réponse « *Direct-Repeat 5 responsive element* » (DR-5; 5'-GGTTCA₅AGGTCA-3') ou sur une séquence NBRE (Perlmann and Jansson 1995, Zetterstrom, Solomin et al. 1996, Maira, Martens et al. 1999, Aarnisalo, Kim et al. 2002, Levesque and Rouillard 2007). Ainsi, l'activité transcriptionnelle de Nur77 et Nurr1 peut être régulée indirectement par la modulation de leur partenaire d'hétérodimérisation RXR via des drogues sélectives RXR, appelées réxinoïdes (Perlmann and Jansson 1995, Zetterstrom, Solomin et al. 1996, Levesque and Rouillard 2007).

A) Monomère



B) Homodimère



C) Hétérodimère

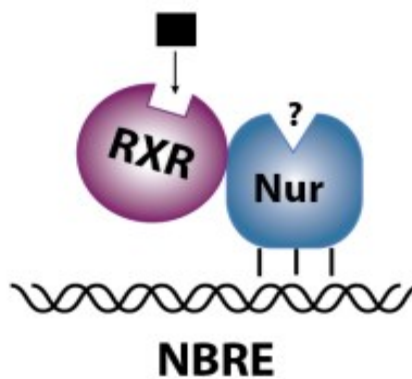
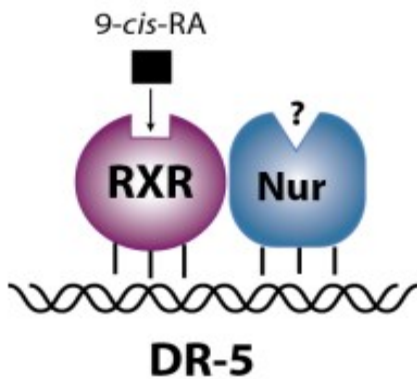


Figure 4: Les différents mécanismes d'action des Nurs.

Les Nurs peuvent se lier à différents éléments de réponse de l'ADN en tant que monomère sur des éléments NBRE (A), homodimère sur des éléments NuRE (B) ou hétérodimère avec RXR pour Nur77 et Nurr1 sur des éléments DR-5 ou NBRE (C). (Adapté de (Levesque and Rouillard, 2007))

Le rôle des NR4As

L'expression des trois membres du sous-groupe NR4A est rapidement induite de façon transitoire par une large gamme de stimuli (facteurs de croissance, acides gras, cytokines,

hormones peptidiques, esters de phorbol, le stress, le calcium, des neurotransmetteurs, et des stimuli de nature physique tels que les champs magnétiques, l'agitation mécanique et la dépolarisation membranaire) dans différents tissus et lignées cellulaires (Maxwell and Muscat 2006). En raison de l'induction de l'expression aiguë des membres du sous-groupe NR4A (généralement de 15 à 90 min après les stimuli), ceux-ci ont été classés comme étant des gènes de réponse précoce immédiate (IEG pour *Immediate Early Gene*). Dans de nombreux cas, les stimuli qui induisent un membre du sous-groupe de NR4A induisent également l'expression des deux autres membres (Pearen and Muscat 2010). Les Nurs sont donc impliqués dans de nombreux processus physiologiques, tant au niveau périphérique que dans le système nerveux central (SNC).

Les rôles des NR4As en périphérie

Le patron d'expression des récepteurs NR4As en périphérie est relativement étendu. Chez les rongeurs adultes, *Nur77* est exprimé dans les glandes surrénales, la thyroïde et les glandes pituitaires, ainsi que le foie, les testicules, les ovaires, le thymus, le muscle, du poumon, la prostate et est aussi surexprimé dans les cellules T en apoptose (Giguere 1999). *Nurr1* est exprimé dans le foie, la glande pituitaire, le thymus, et les ostéoblastes alors que *Nor1* est exprimé à des niveaux élevés dans la glande pituitaire et à de plus bas niveaux dans les glandes surrénales, le cœur, les muscles squelettiques, le thymus, les reins et l'épididyme (Giguere 1999).

Au niveau métabolique, les NR4As sont associés aux mécanismes de régulation énergétique et de l'homéostasie des lipides et du glucose (Pearen, Myers et al. 2008, Pearen and Muscat

2010, Veum, Dankel et al. 2012). Dans les muscles squelettiques et le tissu adipeux, l'expression des Nurs est induite par les agonistes des récepteurs β -adrénergiques dont l'activité est essentielle dans la régulation de la fonction métabolique et inhibée par leurs antagonistes (Pearen and Muscat 2010). Cette augmentation de l'expression des NR4As serait régulée par la MAPK, la PKA et l'AMPc (Pearen and Muscat 2010). Aussi, les Nurs sont induits dans les muscles squelettiques lors de la période de récupération suite à un effort physique suivant une période de restriction calorique (Oita, Mazzatti et al. 2009).

Les récepteurs Nurs sont impliqués aussi au sein de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) et hypothalamo-pituitaire-gonadiques (HPG). Pour l'axe HPG, même si les 3 membres de la famille NR4A sont exprimés dans le testicule, Nur77 joue un rôle prédominant dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la stéroïdogenèse et de la différenciation sexuelle mâle tels que les gènes *Star*, *Hsd3b1*, *Cyp17a1* et *Insl3* chez la souris et *HSD3B2* chez l'humain (Hong, Park et al. 2004, Martin and Tremblay 2005, Robert, Martin et al. 2006, Martin and Tremblay 2008). Au niveau de l'ovaire, Nur77 régule aussi la transcription de gènes qui ont un rôle important dans la synthèse d'hormones stéroïdiennes comme les gènes *20 α -HSD*, *StAR*, *CYP11A1*, *CYP17* et *HSD3B2* (Stocco, Lau et al. 2002, Li, Xue et al. 2010). Concernant l'axe HPA, les Nurs vont induire l'expression de la *CRH*, la *POMC* et l'*ACTH* (Philips, Lesage et al. 1997, Murphy, McEvoy et al. 2001, Kovalovsky, Refojo et al. 2002, Martens, Bilodeau et al. 2005). De plus, dans les glandes surrénales, Nur77 régule l'expression du gène *CYP21A2* qui joue un rôle crucial lors de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes (Wilson, Mouw et al. 1993).

Il a été aussi montré que les Nurs étaient impliqués dans le cycle cellulaire et plus particulièrement dans le processus de l'apoptose. En effet, les récepteurs nucléaires NR4As peuvent induire l'apoptose en agissant sur des gènes proapoptotiques et antiprolifératifs (Safe, Kim et al. , Yoon, Lee et al. 2011). Lors de la sélection négative des lymphocytes T, Nur77 induit aussi l'apoptose par interaction directe avec Bcl-2 au niveau de la mitochondrie, ce qui va avoir pour effet d'exposer le domaine proapoptotique BH3 de Bcl-2 (Thompson and Winoto 2008). L'apoptose par Nur77 peut aussi se produire de manière indirecte, comme il a été montré avec la stimulation d'autres protéines proapoptotiques cytosoliques, tel que BAX qui va se lier à la mitochondrie pour initier la cascade apoptotique (Wilson, Arango et al. 2003). De plus, alors que les souris *Nur77*^{-/-} et *Nor-1*^{-/-} présentent un phénotype d'apparence normale, il a été observé que les souris double *knock-out* *Nur77*^{-/-}; *Nor-1*^{-/-} ne sont pas viables. Ces dernières meurent rapidement de leucémie myéloïde après leur naissance, suggérant une nouvelle fois un rôle de la famille NRA4A dans le processus apoptotique (Mullican, Zhang et al. 2007). L'hétérodimérisation entre Nur77 et les RXRs aurait aussi la faculté d'induire l'apoptose en présence de TPA (12-*O*-tetradecanoyl-13-phorbol acetate) dans les cellules de cancer de la prostate LNCaP ou avec le 3-Cl-AHPC (4-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-3-chlorocinnamic acid) dans les cellules de cancer du poumon H460 (Cao, Liu et al. 2004).

Paradoxalement, l'apoptose dépendante de Nur77 peut être bloquée par la formation d'hétérodimères avec RXRs suite à des traitements avec des ligands réxinoïdes (Cao, Liu et al. 2004). Les Nurs peuvent aussi favoriser la survie cellulaire via leur activité transcriptionnelle. Par exemple, en réponse à la voie de signalisation du TNF- α , Nur77 reste

dans le noyau et n'est pas délocalisé dans le cytoplasme, ce qui est nécessaire pour induire l'apoptose. Aussi, de par sa localisation nucléaire, Nur77 réprimerait potentiellement la transcription des gènes de la caspase 3 et 6 (Wingate and Arthur 2006).

Il est important de noter qu'au niveau de la périphérie, il semble y avoir une redondance fonctionnelle dans la famille NR4A. En effet, en absence de *Nur77*, *Nor1* peut réguler l'apoptose à la place de celui-ci dans les lymphocytes T (Lee, Wesselschmidt et al. 1995, Cheng, Chan et al. 1997). Aussi, les souris doubles mutantes *Nur77*^{-/-}; *Nor1*^{-/-} meurent de leucémie myéloïde peu de temps après la naissance comme mentionné plus tôt, suggérant une nouvelle fois une redondance fonctionnelle entre *Nur77* et *Nor1* (Mullican, Zhang et al. 2007). De plus, malgré le rôle prépondérant de *Nur77* dans la stéroïdogenèse, les souris *Nur77*^{-/-} possèdent un phénotype reproducteur normal. Ce phénotype normal serait associé à une compensation des autres membres de la famille NR4A, notamment *Nurr1* qui se trouve être surexprimé chez ces animaux (Crawford, Sadovsky et al. 1995).

Les rôles des NR4As dans le système nerveux central

Le profil d'expression des membres de la famille des Nurs montre que ces trois membres sont exprimés de manière prédominante dans le système nerveux central (Bookout, Jeong et al. 2006). Ils sont à la fois exprimés dans des régions bien distinctes, mais aussi au sein de zones identiques (Saucedo-Cardenas and Conneely 1996, Xiao, Castillo et al. 1996, Zetterström, Williams et al. 1996). Chez la souris, l'expression de *Nurr1* débute au dixième jour du développement embryonnaire (E10.5) dans les neurones dopaminergiques de la partie compacte de la substance noire (SNc) et de l'aire tegmentaire ventrale (ATV), l'hippocampe,

l'hypothalamus, le cortex, le mésencéphale et le bulbe olfactif, alors que l'expression de *Nur77* débute au jour post-natal 14 (P14) dans ces structures cibles (Zetterström, Williams et al. 1996). *Nor-1*, quant à lui, est exprimé dans des structures semblables à *Nur77* telles que le cortex préfrontal (PFC), le striatum, le noyau accumbens (NAc), le tubercule olfactif, l'hippocampe, l'hypothalamus, et l'amygdale (Zetterstrom, Solomin et al. 1996, Zetterström, Williams et al. 1996, Beaudry, Langlois et al. 2000, Lévesque and Rouillard 2009).

Chez les souris *knock-out* NR4As, on a pu ainsi observer différents phénotypes au niveau du système nerveux central. En effet, lors du développement embryonnaire chez les souris *Nurr1*^{-/-}, les neurones précurseurs de la dopamine dans le mésencéphale adoptent un phénotype et une localisation normale, mais ne se différencient pas en neurones dopaminergiques (Zetterstrom, Solomin et al. 1997, Castillo, Baffi et al. 1998, Saucedo-Cardenas, Quintana-Hau et al. 1998). Cette absence de différenciation dopaminergique dans le mésencéphale entraîne une hypoactivité et les souris meurent peu après la naissance (Zetterstrom, Solomin et al. 1997). Ce phénotype serait dû au fait que *Nurr1* ne pourrait plus remplir sa fonction d'activateur de la transcription des gènes nécessaire à la fonction dopaminergique tels que la tyrosine hydroxylase (TH), le transporteur de la dopamine (DAT) et le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT) (Sakurada, Ohshima-Sakurada et al. 1999, Sacchetti, Mitchell et al. 2001, Hermanson, Joseph et al. 2003). Quant aux souris *Nur77*^{-/-}, elles présentent un phénotype d'apparence normale, alors que les souris *Nor-1*^{-/-} développent un léger défaut de l'oreille interne (Lee, Wesselschmidt et al. 1995, Ponnio, Burton et al. 2002). Cependant, on a observé chez un autre modèle de souris transgénique de *Nor-1* dans lequel on a supprimé 37 % de la région AF-1, que les embryons mourraient entre le jour 8.5 et 9.5 de gestation (DeYoung, Baker et al. 2003). Dans le système dopaminergique, les niveaux de base de

l'ARNm de *Nor-1* sont extrêmement faibles ou absents dans les neurones dopaminergiques du SNc et l'ATV alors que son expression augmente significativement dans les neurones dopaminergiques du mésencéphale après l'administration d'antagonistes du récepteur de la dopamine D2 (Zetterstrom, Solomin et al. 1996, Maheux, Ethier et al. 2005).

Malgré que les animaux *Nur77 knock-out* soient normaux, il a été montré que *Nur77* est intimement relié à la régulation de l'homéostasie du système dopaminergique. En effet, la modulation pharmacologique de la neurotransmission dopaminergique influence l'expression de *Nur77* dans ses structures cibles et inversement, la modulation de l'expression de *Nur77* va altérer les réponses physiologiques contrôlées par la dopamine (Levesque and Rouillard 2007).

Chez les souris *Nur77 knock-out*, on observe l'augmentation des niveaux d'expression de la *tyrosine hydroxylase (TH)* ainsi qu'une diminution des niveaux d'expression de la *catéchol-O-méthyltransférase (COMT)*. Ces deux gènes sont impliqués respectivement dans la synthèse et la dégradation de la dopamine. Aussi, ces animaux sont plus sensibles à une faible dose de la quinpirole (agoniste du récepteur D₂ de la dopamine) qui agit principalement sur les autorécepteurs présynaptiques (Gilbert, Morissette et al. 2006). En outre, l'ARNm de *Nur77* est fortement induit dans le striatum, dans le NAc et dans le PFC suite à un traitement à l'halopéridol (un antipsychotique typique), alors que la clozapine (un antipsychotique atypique) n'augmente pas l'expression de *Nur77* dans le striatum (Beaudry, Langlois et al. 2000, Maheux, Ethier et al. 2005). En effet, la modulation de l'expression de *Nur77* par les antipsychotiques semble directement corrélée avec le ratio d'affinité de ces drogues pour les récepteurs 5HT_{2A} /D₂ (Maheux, Ethier et al. 2005). On observe aussi chez les souris *Nur77^{-/-}*, une baisse de la réponse cataleptique (durée de l'immobilité de l'animal) et une augmentation

de la dyskinésie tardive mesurée via les VCM (*vacuous chewing movements*) suite à un traitement à l'halopéridol (Ethier, Beaudry et al. 2004, Ethier, Kagechika et al. 2004). Ces observations sont importantes, car chez les patients schizophrènes, l'administration aiguë d'antipsychotiques provoque un symptôme extrapyramidal (qui est similaire à la catalepsie chez les animaux) et de la dyskinésie tardive en administration chronique. Aussi, un polymorphisme génétique du gène *Nur77* chez l'humain a été associé au développement des dyskinésies tardives dans une cohorte caucasienne de patients schizophrènes (Novak, Gallo et al. 2010). L'ensemble de ces données laisse suggérer que *Nur77* pourrait être un bon marqueur afin de déterminer le profil clinique des antipsychotiques. De plus, le DHA aurait la faculté de réduire les VCMs chez les souris *Nur77^{+/+}* par rapport aux souris *Nur77 knock-out*, lors d'un traitement chronique à l'halopéridol (Ethier, Kagechika et al. 2004). Cette étude a aussi montré que le HX531, un antagoniste RXR, induisait l'augmentation des VCMs chez les souris *Nur77^{+/+}*, mais pas chez les souris *Nur77^{-/-}* (**Figure 5 D**), confirmant l'implication du complexe *Nur77/RXR* dans l'apparition de la dyskinésie tardive induite par les antipsychotiques (Ethier, Kagechika et al. 2004). Les effets de l'halopéridol sur les niveaux d'ARNm des neuropeptides enképhalines (ENK) et neurotensine (NT) sont également significativement réduits chez les souris *Nur77 knock-out*, suggérant un rôle préférentiel de *Nur77* dans les neurones exprimant le récepteur D2 de la dopamine (Ethier, Beaudry et al. 2004). Une autre étude a mis en évidence que chez des souris traitées avec de l'amphétamine, le HX531 réduisait l'activité locomotrice des animaux *wild-type*, mais pas des souris *Nur77^{-/-}*, appuyant ainsi une fois de plus l'importance de *Nur77* dans l'activité des ligands RXRs associés à la neurotransmission dopaminergique (Bourhis, Maheux et al. 2009).

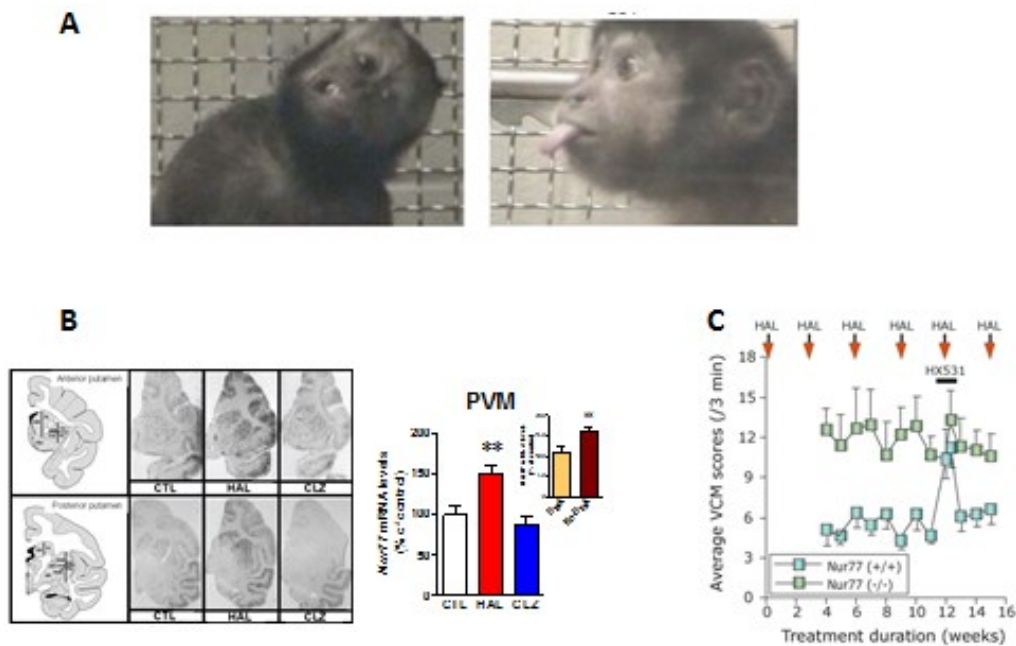


Figure 5: Rôle de Nur77 et RXR γ dans les dyskinésies induites par les antipsychotiques.

(A) Photographies représentatives de manifestations de dyskinésie tardive chez deux capucins femelles présentant une rétraction musculaire du front, une torsion du cou et de la lèvre (à gauche), et une protrusion de la langue (à droite) (Mahmoudi et al.2013). (B)Hybridation *in situ* à partir d'une sonde radiomarqué d'ARNm de Nur77 de coupes coronales de cerveaux de capucins traités avec le véhicule (CTL), l'halopéridol (HAL) ou la clozapine (CLZ). Le graphique montre une augmentation de l'expression de Nur77 dans le noyau caudé ventro-médian (PVM) suite au traitement à l'halopéridol. Cette augmentation de l'ARNm de Nur77 est présente chez les individus ne présentant pas de dyskinésie (Mahmoudi et al.2013).(C) Effet du HX531, un antagoniste RXR, sur l'induction de VCMs par l'halopéridol chez les souris *Nur77*^{+/+} et *Nur77*^{-/-} (Ethier, Kagechika et al. 2004).

Nur77, de par son rôle de régulateur de l'homéostasie du système dopaminergique, semble être aussi impliqué dans le traitement de la maladie de Parkinson. Il a été montré que l'administration répétée de L-DOPA va entraîner des mouvements involontaires anormaux appelés "dyskinésies induites par la L-Dopa" (*L-dopa-induced dyskinesia* ou LID) (Calabresi, Di Filippo et al. 2010). Les souris *Nur77*^{-/-} lésées unilatéralement à l'aide de la 6-OHDA (une neurotoxine ciblant les neurones dopaminergiques) ont montré une réponse rotatoire exacerbée suite à l'administration chronique à la L-DOPA. Chez les souris *wild-type*, on observe une augmentation de l'expression de *Nur77* du côté lésé dans les cellules exprimant les neuropeptides enképhaline et le récepteur D2 (St-Hilaire, Bourhis et al. 2006). Aussi, la lésion de la voie nigrostriée augmente les niveaux d'ARNm d'ENK et de NT chez les souris *Nur77* *wild-type* et *Knock-out*. Cependant, la régulation à la hausse de ces neuropeptides était significativement réduite chez les individus *Nur77*^{-/-} (St-Hilaire, Bourhis et al. 2006). En outre, on observe chez ces mêmes animaux une augmentation de l'expression de *Nur77* dans les cellules exprimant le neuropeptide dynorphine et le récepteur de la dopamine D1 du côté non-lésé, suggérant que ce déséquilibre pourrait représenter un mécanisme de compensation ou d'adaptation suite à la dénervation des neurones dopaminergiques (St-Hilaire, Bourhis et al. 2006).

Notre laboratoire a mis aussi en évidence qu'un traitement par la DHA, un agoniste naturel des RXRs, réduisait les LIDs dans un modèle de primate non humain traité à la MPTP (une neurotoxine qui cause une dénervation totale des neurones dopaminergiques) (Samadi, Gregoire et al. 2006)(**Figure 6 A**). On a observé chez ces animaux une augmentation de l'expression de *Nur77* traité à la L-DOPA, mais aussi une corrélation inverse entre le niveau d'expression de *Nur77* et les scores de LIDS (**Figure 6 B**). En effet, une augmentation de

l'expression de *Nur77* semble être associée avec des scores de LIDs inférieurs (Mahmoudi, Samadi et al. 2009). Ces données suggèrent ainsi que *Nur77* et les RXRs pourraient exercer une activité protectrice contre l'apparition de mouvements involontaires anormaux induits par des antiparkinsoniens (dyskinésie induite par la lévodopa) et suite au traitement prolongé avec des agents antipsychotiques (dyskinésie tardive). Ces observations sont à la base du présent projet de recherche qui vise à développer de nouveaux outils nous permettant de mieux comprendre l'activité de cette classe de facteurs de transcription, mais également de nous permettre d'identifier de nouveaux agents pharmacologiques pour cette classe de récepteurs nucléaires.

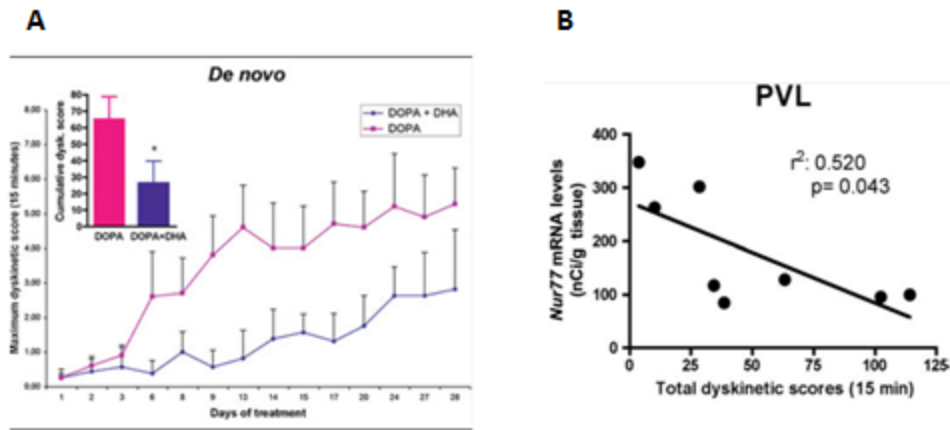


Figure 6: Rôle de Nur77 et RXR γ dans les dyskinésies induites par la L-Dopa.

(A) Développement des scores dyskinétiques au cours du temps lors d'un traitement à la L-DOPA avec ou sans DHA, chez des singes traités préalablement avec du MPTP (Samadi et al. 2006) (B) Corrélation entre les niveaux d'ARNm de Nur77 dans la région ventrolatérale du putamen (PVL) et le score de dyskinésie induite par la L-DOPA (LID) chez des singes traités avec du MPTP (Mahmoudi, Samadi et al. 2009).

Les récepteurs X des rétinoïdes

Les récepteurs de l'acide rétinoïque sont impliqués dans de nombreux aspects du développement des vertébrés et de l'homéostasie. Ces récepteurs nucléaires, qui sont régulés par l'acide rétinoïque et certains de ses dérivés (les rétinoïdes), sont les RARs et les RXRs. Chez ces deux familles, on retrouve 3 membres soit RAR α , RAR β , RAR γ pour les RARs et RXR α , RXR β , RXR γ pour les RXRs (Duong and Rochette-Egly 2011).

Mécanisme d'action des RXRs

Tel que mentionné dans le chapitre 1 de cette introduction, les RXRs vont jouer un rôle de partenaire pour les NRs de classe II, afin d'activer la transcription selon trois types de mécanisme différents (Lefebvre, Benomar et al. 2010). Tout d'abord, ceux-ci peuvent agir sous forme d'hétérodimère dit « conditionnel », comme pour les complexes de type RAR/RXR. Pour cette catégorie, le ligand RXR ne va pas activer le complexe, mais va agir en synergie avec un agoniste de l'autre partenaire de dimérisation (Germain, Chambon et al. 2006, Mark, Ghyselinck et al. 2006, Lefebvre, Benomar et al. 2010, Imai, Youn et al. 2013). Ensuite, les RXRs peuvent adopter une configuration d'hétérodimère de type « non permissif ». C'est-à-dire que le complexe sera seulement activé suite à l'action d'un agoniste du partenaire de RXR (par exemple, pour RXR/TR ou encore RXR/VDR (Germain, Chambon et al. 2006, Lefebvre, Benomar et al. 2010, Imai, Youn et al. 2013). Enfin, la forme d'hétérodimère dite « permissive » devient transcriptionnellement active grâce à un ligand

RXR ou un ligand associé au NR partenaire. On retrouve dans ce groupe les complexes RXR/FXR, RXR/LXR, RXR/PPAR, mais aussi RXR/Nurr1 ou RXR/Nur77 (Germain, Chambon et al. 2006, Levesque and Rouillard 2007, Lefebvre, Benomar et al. 2010, Imai, Youn et al. 2013). RXR peut également réguler l'expression de gènes sous forme d'homodimères sur des éléments DR-1, mais aussi sous forme homotétramères (A, Tan et al. 2004, Lefebvre, Benomar et al. 2010, Yasmin, Kannan-Thulasiraman et al. 2010).

Il a été montré que les RXRs sont modulés par des ligands, tels que le 9-*cis* RA (*9-cis retinoic acid*), le DHA (*Docosahexaenoic acid*), l'acide phytanique ou encore l'honokiol (Germain, Chambon et al. 2006, Yamada and Kakuta 2014). Concernant le 9 *cis*-Ra, celui-ci peut également réguler en tant qu'agoniste les 3 membres des RARs (Allenby, Bocquel et al. 1993). Le LBP des RARs et RXRs présenterait une configuration différente l'une de l'autre. En effet, une étude a montré que le LBP de RXR α adopterait une conformation sous forme de L plus restrictif et plus court que la forme en I observé pour le LBP de RAR γ en présence de 9 *cis*-Ra (Klaholz, Renaud et al. 1998). Ainsi, cette caractéristique structurale entre les LBP des RXRs et RARs pourrait se révéler cruciale dans le cadre du développement de molécules qui permettraient de cibler spécifiquement les RXRs ou les RARs.

Au cours des dernières années, différents ligands RXRs ont été générés. Le LG100268 et LG101506 sont deux réxinoïdes synthétiques qui possèdent des activités bien distinctes. Alors que le LG100268 est un agoniste pan-RXR, le LG101506 va activer sélectivement PPAR γ /RXR et PPAR α /RXR. Ce dernier ligand peut aussi antagoniser la signalisation RAR/RXR par un changement allostérique qui entraînerait le retrait de RAR du complexe

RAR/RXR (Dawson and Xia 2012). Le LG100754 lui va agir en tant qu'antagoniste sur l'homodimère RXR/RXR, mais aussi comme agoniste sélective sur les complexes PPAR γ /RXR et PPAR α /RXR. De par leur sélectivité aux complexes PPAR γ /RXR et PPAR α /RXR, le LG100754 et le LG101506 pourraient posséder un potentiel thérapeutique intéressant pour les maladies inflammatoires, ainsi que le diabète (Dawson and Xia 2012, Pérez, Bourguet et al. 2012). Le LGD100268 posséderait lui aussi des propriétés antidiabétiques. Cependant, celui-ci induirait aussi des effets secondaires importants tels qu'une augmentation du niveau de triglycéride dans le sang et de l'hypothyroïdisme (Dawson and Xia 2012). Aussi, le Bexarotène (LG100269 ou Targretin[®]), un autre réxinoïde synthétique qui agit en tant qu'agoniste pan-RXR, a été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration américaine) comme un agent antinéoplasique pour le traitement par voie orale des lymphomes T cutané (Yamada and Kakuta 2014).

Rôles des RXRs

RXR β est exprimé de manière ubiquitaire alors que RXR α est exprimé dans de nombreux tissus incluant le foie, les poumons, la peau, l'intestin, le rein, l'épiderme, les reins et le coeur. Quant à RXR γ , il est intéressant de noter que celui-ci est exprimé dans le cœur, les muscles squelettiques, l'hypophyse et le cerveau (Bookout, Jeong et al. 2006, Germain, Staels et al. 2006).

Les souris *Rxra*^{-/-} meurent au jour embryonnaire E14.5 suite à des malformations cardiaques. Ce phénotype est similaire avec celui observé chez les souris souffrant du syndrome de déficience en vitamine A (VAD) suggérant un rôle important de *Rxra* dans la signalisation des

rétinoïdes durant le développement embryonnaire (Kastner, Messaddeq et al. 1997). Quant aux souris *Rxrβ*^{-/-}, 50 % d'entre elles meurent avant ou lors de la naissance. Les animaux survivants présentent un phénotype normal, hormis les mâles qui sont totalement stériles dû à de l'oligo-astheno-tératozoospermie (Kastner, Mark et al. 1996). Les souris *Rxrγ*^{-/-} présentent un phénotype normal qui serait dû à la compensation de *Rxra* et *Rxrβ* (Krezel, Dupe et al. 1996). Par ailleurs, il a été observé chez les souris mutantes *Rxra*^{+/-} /*Rxrβ*^{-/-} /*Rxrγ*^{-/-} que l'expression d'une seule allèle du gène *Rxra* était suffisante pour garder ces animaux viables et ainsi maintenir la fonction des RXRs (Krezel, Dupe et al. 1996). Une étude a aussi mis en avant le rôle des RXRs dans la locomotion associée à neurotransmission dopaminergique. En effet, les souris doubles *knock-out* pour *Rarβ-Rxrβ*, *Rarβ-Rxrγ* et *Rxrβ-Rxrγ* présentent une réduction de la coordination motrice et de l'activité ambulatoire. De plus, on retrouve chez ces animaux une réduction de l'expression des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 dans le striatum, suggérant une relation étroite entre la signalisation des rétinoïdes et le système dopaminergique (Krezel, Ghyselinck et al. 1998).

Des souris *knock-out* pour l'isoforme 1 de RXRγ (*Rxrγ1*) ont également été générées. Ces animaux ont montré une réduction de l'activité de la choline acetyltransferase (ChAT) dans le striatum, ainsi qu'une réponse réduite de la catalepsie suite à l'administration d'antagoniste dopaminergique tel que l'halopéridol et la chlorpromazine par rapport aux souris *wild-type* (Saga, Kobayashi et al. 1999). De plus, une autre étude confirme l'importance du rôle des RXRs dans le système dopaminergique, notamment de par son hétérodimérisation avec Nurr1. Il a été observé qu'on est capable d'induire la survie des neurones dopaminergiques via le complexe RXR/Nurr1 en présence de ligands RXR tel que le LG100268 (LG268) ou encore le

SR11237 (BMS649) (Wallen-Mackenzie, Mata de Urquiza et al. 2003). Il est intéressant de noter que Nur77 et Nor-1 sont exprimés dans le striatum et le NAc, alors que Nurr1 est présent dans la SNc et la VTA. Il se trouve que le patron d'expression des Nurs dans le système nerveux central correspond à la distribution de RXR γ 1 (Levesque and Rouillard 2007) (**Figure 7**). Cette colocalisation Nur/RXR dans ces structures confirme un possible rôle de ces complexes dans des désordres comme la schizophrénie, la maladie de Parkinson et la dépendance aux drogues d'abus, tel que déjà mentionné dans le chapitre 2 de cette introduction (Levesque and Rouillard 2007).

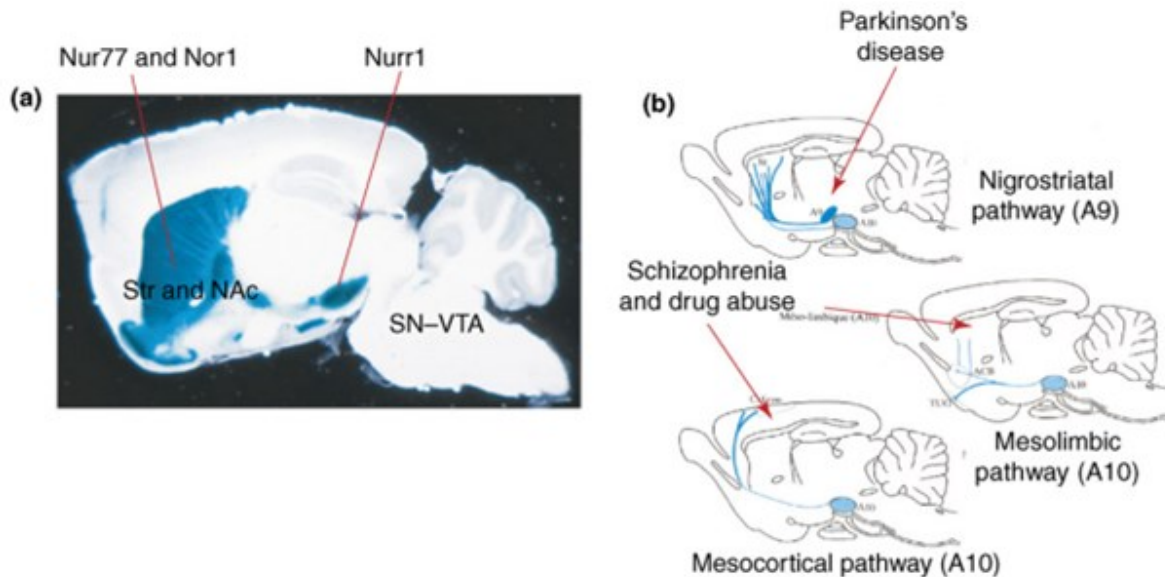


Figure 7 : Distribution des Nurs et de RXR γ dans le système dopaminergique

(A) L'isoforme RXR γ 1 est représenté par une coloration bleu sur une coupe sagittale d'un cerveau adulte d'une souris RXR γ 1^{+/+}. Nur77 et Nor1 sont exprimés dans des zones, tels que le striatum (Str), le noyau accumbens (NAc), tandis que Nurr1 est exprimé dans les neurones dopaminergiques de la substantia nigra et de l'aire tegmentale ventrale (SN-VTA). (B) On observe une corrélation de la distribution de RXR γ 1 avec la voie dopaminergique

nigrostriatale (qui est associée avec le contrôle des comportements moteurs et la maladie de Parkinson) et les voies dopaminergiques mésolimbique et mésocorticales (qui sont impliqués dans des fonctions associatives et limbiques et dans la schizophrénie et la dépendance aux drogues) (Levesque and Rouillard 2007).

Les Co-régulateurs de la transcription

Tel que mentionné plus tôt, l'activité transcriptionnelle des NRs dépend généralement de la liaison d'un ligand dans le LBD à l'extrémité C-terminale. Cependant, pour que les NRs puissent moduler leurs gènes cibles, ceux-ci ont besoin du recrutement de co-régulateurs. On retrouve deux grandes catégories, les co-activateurs tels que les membres de la famille SRC (Steroid Receptor Coactivator), ou p300/CBP qui vont permettre l'activation de la transcription et les co-répresseurs tels que NCoR (Nuclear receptor Corepressor) ou SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptors) qui eux vont réprimer la transcription (Savkur and Burris 2004, Gurevich, Flores et al. 2007).

Le dogme général du mode d'action des co-régulateurs veut que les co-répresseurs interagissent avec les NRs qui ne sont pas liés par un ligand, ce qui entraîne la répression de la transcription des gènes cibles. Ainsi, les co-répresseurs vont favoriser la condensation de la chromatine via le recrutement d'histones déacétylases (HDACs) au complexe ou encore par la SUMOylation des histones (Shiio and Eisenman 2003, White, Fernandes et al. 2004). La liaison d'un agoniste au NR va induire un changement de conformation qui va libérer le co-répresseur et permettre le recrutement d'un co-activateur qui va à son tour recruter la machinerie transcriptionnelle. Cependant, ce mécanisme d'action des co-régulateurs a récemment été remis en question, notamment par l'observation d'une induction de l'action des co-répresseurs grâce à des agonistes (Gurevich, Flores et al. 2007). De plus, les modifications post-traductionnelles joueraient un rôle crucial dans la sélectivité des interactions NRs/co-

régulateurs, impliquant ainsi un niveau supplémentaire dans la complexité de la régulation de la transcription (McKenna and O'Malley 2002).

Les Nurs et les co-régulateurs

Pour les membres de la famille NR4A, le recrutement des co-régulateurs et notamment des coactivateurs se déroule de manière non classique par rapport aux autres NRs. En effet, comme mentionné précédemment, lors de la liaison d'un ligand dans le LBD, le NR va adopter une conformation qui va permettre le recrutement de co-régulateurs par son domaine AF-2 (Aranda and Pascual 2001, Savkur and Burris 2004, Bain, Heneghan et al. 2007). Cependant, les membres de la famille Nurs ne possèdent pas une cavité dans leurs LBDs qui permettrait le recrutement d'un co-activateur au niveau de leur domaine AF-2 suite à la liaison du NR à un ligand (Wang, Benoit et al. 2003, Flaig, Greschik et al. 2005). Néanmoins, il semblerait que, dépendamment du type cellulaire, les Nurs soient capables d'activer la transcription à partir du recrutement d'un co-activateur à leur domaine AF-2 (Castro, Arvidsson et al. 1999, Sohn, Kwak et al. 2001).

Plusieurs études ont aussi mis en évidence le rôle du domaine AF-1 des Nurs dans leur faculté à recruter un co-activateur et à initier la transcription (Wansa, Harris et al. 2002, Maira, Martens et al. 2003, Wansa, Harris et al. 2003). Ces résultats sont compatibles avec le fait que les récepteurs Nurs sont des récepteurs nucléaires orphelins et que le co-activateur doit être recruté au domaine AF-1 pour l'activation de la transcription indépendamment de ligands (Rochette-Egly 2003, Bain, Heneghan et al. 2007). Les Nurs sont capables de recruter comme

co-activateur au niveau de leur domaine AF-1 les membres de la famille SRC, p300, pCAF, et TRAP220/DRIP205 (Maira, Martens et al. 2003, Wansa, Harris et al. 2003, Wansa and Muscat 2005).

Quant aux co-répresseurs, il a été observé que Nur77 pouvait interagir avec SMRT grâce à son LBD (Sohn, Kwak et al. 2001). SMRT possède une séquence d'interaction (I/L)XX(E/H)I (avec H indiquant un résidu hydrophobe) connue sous le nom de CoRNR (Corepressor Nuclear Receptor) box motif qui chevauche la poche du NR Box qui permet la liaison avec le co-activateur (Sohn, Kwak et al. 2001, Gurevich, Flores et al. 2007). Cette légère différence entre le motif LXXL du NR Box et du motif (I/L)XX(E/H)I du CoRNR est essentielle pour le recrutement spécifique de co-activateurs par rapport aux co-répresseurs. En effet, le motif CoRNR va interagir avec l'hélice H3 et H5 du LBD et former une longue hélice à trois tours qui va empêcher l'hélice H12 d'acquiescer une conformation active afin de recruter un co-activateur (Bain, Heneghan et al. 2007, Gurevich, Flores et al. 2007). Le co-répresseur CoREST ([Co]Repressor for Element-1-Silencing Transcription factor) peut aussi interagir avec Nur-1 pour réprimer l'expression de gènes pro-inflammatoires (Saijo, Winner et al. 2009). Concernant les complexes Nur/RXR, il a été montré que Nur-1/RXR pouvait interagir avec les co-répresseurs SMRT et NCoR (Nuclear receptor CoRepressor) via le LBD de Nur-1. Cette même étude a montré que suite à l'ajout de 9cis-RA ou de SR11237, deux agonistes RXRs, les co-répresseurs n'interagissaient plus avec Nur-1/RXR, mais avec le complexe RAR/RXR, suggérant ainsi un moyen de déplacer l'activité permissive du complexe Nur-1/RXR et non permissive des complexes RXR/RAR (Lammi, Perlmann et al. 2008).

Les modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles (PTMs) représentent un type de mécanisme qui permet de réguler l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires. En effet ces PTMs permettent de générer une hétérogénéité structurale et fonctionnelle de ces protéines en réalisant une modification chimique de certains acides aminés. Les PMTs vont influencer une multitude de processus cellulaires, tels que la régulation de cascades de signalisation, la division cellulaire, la localisation cellulaire, et les interactions protéine-protéines incluant par exemple le recrutement des corégulateurs transcriptionnels, l'interaction avec l'ADN et la dégradation et le renouvellement des protéines, ainsi que la sensibilité aux ligands. Ici, nous allons principalement discuter de la phosphorylation, de la sumoylation et de l'ubiquitination avec notamment l'illustration d'exemples avec les membres de la famille des NR4As et plus particulièrement Nur77. Les autres PTMs tels que l'acétylation et la méthylation ne seront pas évoquées (Rochette-Egly 2003, Rochette-Egly 2005, Hunter 2007, Zhao 2007, Anbalagan, Huderson et al. 2012).

La phosphorylation

La phosphorylation est un processus enzymatique hautement réversible qui se définit comme l'ajout d'un groupement phosphate sur une protéine cible. La phosphorylation est catalysée par des protéines connues sous le nom de kinases. Ces dernières vont permettre l'ajout covalent du groupement phosphate, provenant de l'adénosine triphosphate (ATP) sur l'un des

trois acides aminés cibles, soit la sérine (S), la thréonine (T) et la tyrosine (Y) (Johnson 2009). Le processus réversible de cette réaction, la déphosphorylation consiste au retrait de ce groupement phosphate par les phosphatases. Au niveau fonctionnel, la phosphorylation ou la déphosphorylation, peut changer la conformation d'une protéine (Johnson and Lewis 2001, Rochette-Egly 2003). Ces changements de conformation vont entraîner une augmentation ou une diminution de l'activité transcriptionnelle, une modulation de la stabilité ou encore la capacité à interagir avec d'autres partenaires (interactions protéine-protéine) (Rochette-Egly 2003, Johnson 2009).

La phosphorylation va jouer différents rôles sur l'activité de Nur77. Tout d'abord, celle-ci peut affecter sa localisation nucléaire. En effet, la phosphorylation par la voie de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt sur la Ser351, se situant dans le DBD de Nur77 va permettre la séquestration de Nur77 dans le noyau (Han, Cao et al. 2006). Nur77 peut aussi être phosphorylé en Ser351 par RSK (ribosomal protein S6 kinase), mais cette voie provoque la délocalisation de Nur77 vers le cytoplasme pour ensuite induire l'apoptose des cellules T (Wang, Rud et al. 2009). Aussi, la phosphorylation sur certains résidus va aussi moduler l'activité transcriptionnelle de Nur77. En effet, la phosphorylation de Nur77 par Akt sur la Sérine 351 va diminuer son activité transcriptionnelle de 50 à 85 % dans les HEK293 (Pekarsky, Hallas et al. 2001). Une autre étude a montré que la voie de signalisation PKA (Protein Kinase A) induisait spécifiquement l'activité transcriptionnelle de l'homodimère Nur77/Nur77, par rapport au monomère dans les lignées cellulaires CV-1 et AtT-20 (Maira, Martens et al. 2003). Quant au complexe Nur77/RXR, la stimulation par le NGF (Nerve Growth Factor) dans les cellules PC12, va entraîner la phosphorylation de Nur77 sur sa

Ser105 ce qui va entraîner la délocalisation du complexe Nur77/RXR dans le cytoplasme (Katagiri, Takeda et al. 2000)

L'ubiquitination

L'ubiquitination (ou ubiquitylation) est une modification post-traductionnelle rapide et réversible effectuée par l'ubiquitine (Ubi), une protéine ubiquitaire. Cette modification est impliquée dans de nombreux processus biologiques tels que le trafic membranaire, l'endocytose, la réplication virale, l'inflammation, la réparation de l'ADN, la traduction de protéines, mais principalement dans la dégradation de protéines via le protéasome ou le lysosome (Ikeda and Dikic 2008). L'ubiquitination consiste en la liaison covalente de l'ubiquitine, une protéine de 76 acides aminés, à une lysine de sa protéine cible. Lors de cette réaction, il peut se produire la liaison d'une seule ubiquitine (mono-ubiquitination) ou de plusieurs ubiquitines (poly-ubiquitination). L'ubiquitination va se produire en trois étapes (Ikeda and Dikic 2008) :

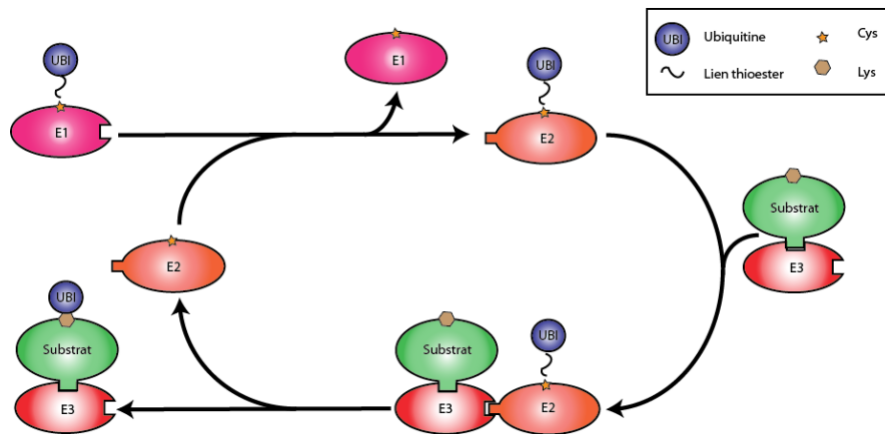


Figure 8 : Les différentes étapes de l'ubiquitination. Tiré de (Ye and Rape 2009)).

- 1) Lors de la première étape, l'Ubi va être activé par une enzyme de type E1 (UBA1, UBA6) qui va agir de manière dépendante de l'ATP. L'enzyme de type E1 va se lier à l'Ubi et catalyser une réaction d'adénylation dans la portion C-terminale de l'Ubi.
- 2) La deuxième étape est une étape de conjugaison. L'Ubi va se conjuguer avec une enzyme de type E2 (UBE2B, UBE2D2). L'enzyme de type E2 va interagir avec l'Ubi et E1, afin de transférer l'Ubi activé de E1 à E2 via un résidu cystéine.

3) Enfin, la troisième et dernière étape de l'ubiquitination consiste en un transfert de l'Ubi par une liaison covalente entre sa Glycine 76 et une Lysine de sa protéine cible par une E3 ligase (par exemple: RNF6, TRAF6, SKP2 et Nedd4).

Comme mentionnée précédemment, cette réaction étant réversible, la déubiquitination se produit par l'intermédiaire d'isopeptidases spécifiques, les déubiquitinases.

Chez les Nurs, il y a peu d'évidence du rôle de l'ubiquitination dans la régulation de leur fonction. Il a été montré que la région en N-terminal entre l'acide aminé 1 et 31 de Nurr1 est essentielle dans la reconnaissance de l'ubiquitine pour la dégradation via le protéasome de Nurr1 (Alvarez-Castelao, Losada et al. 2013). Quant à Nur77, il semblerait que son interaction avec Pin1 (Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase NIMA-interacting 1) inhiberait son ubiquitination lui conférant ainsi une meilleure stabilité (van Tiel, Kurakula et al. 2012).

La SUMOylation

Tout comme l'ubiquitination, la SUMOylation est une modification post-traductionnelle réversible qui consiste en l'ajout d'une protéine SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) sur une Lysine de sa protéine cible par une liaison covalente. Tout comme avec l'ubiquitination, les protéines cibles vont être soit mono-SUMOylé ou poly-SUMOylé. Chez l'humain, on retrouve quatre membres de la famille SUMO soit SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3, et SUMO-4 (Geiss-Friedlander and Melchior 2007). En termes d'homologie, SUMO-1 est identique à 45 % avec SUMO-2 et SUMO-3, alors que ces deux derniers sont identiques à

96 % (Ayaydin and Dasso 2004). Quant à SUMO-4, celui-ci aurait 86 % d'homologie avec SUMO-2 (Bohren, Nadkarni et al. 2004). La distribution de SUMO-1, SUMO-2 et SUMO-3 est ubiquitaire alors que SUMO-4 semble restreint à des tissus bien spécifiques tels que le rein, la rate et les ganglions lymphatiques (Bohren, Nadkarni et al. 2004, Guo, Li et al. 2004). Au niveau fonctionnel, cette modification joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle, le transport nucléaire, la stabilité protéique, l'intégrité du génome et la régulation du cycle cellulaire (Zhao 2007).

D'un point de vue mécanistique, la SUMOylation se produit de la manière suivante (Geiss-Friedlander and Melchior 2007) :

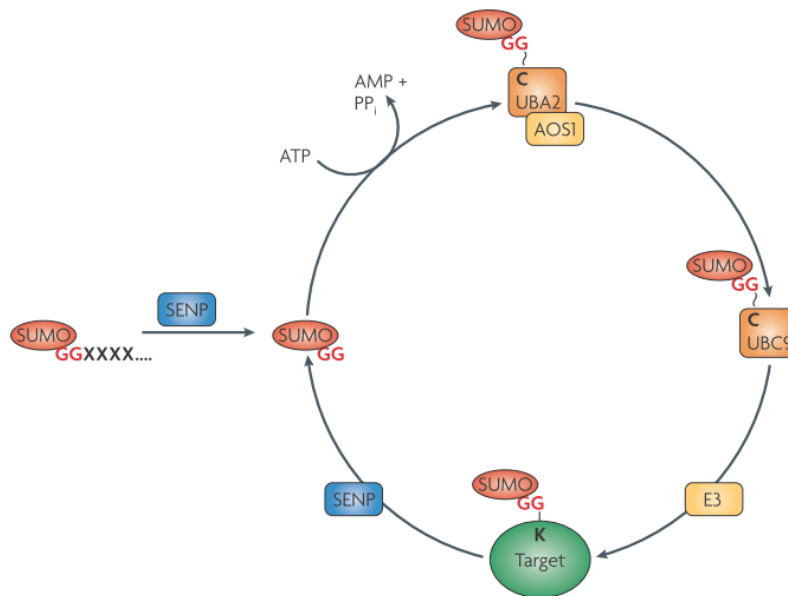


Figure 9 : Le processus de SUMOylation. (Tiré de (Geiss-Friedlander and Melchior 2007))

- 1) Avant la première conjugaison, la SUMO immature doit être clivée par voie protéolytique pour révéler son motif Glycine-Glycine en C-terminal. Cette étape est réalisée par des SUMO isopeptidases spécifiques connus sous le nom de SENPs (Sentrin-Specific Proteases).
- 2) Une fois sous sa forme mature, la SUMO va être transférée de manière ATP-dépendante au complexe enzymatique d'activation hétérodimérique, E1, nommé aussi SAE1/SAE2 chez les mammifères, grâce à la formation d'un lien thioesther entre la Glycine de la SUMO et la Cystéine du complexe SAE1/SAE2.
- 3) Ensuite, la SUMO est une nouvelle fois transférée, cette fois-ci sur le site catalytique de la Cystéine 93 de l'enzyme de conjugaison E2. Actuellement, une seule E2 est connue dans le processus de sumoylation, soit la protéine Ubc9.

Enfin, Ubc9 va transférer la SUMO sur son substrat en formant un lien isopeptidique entre le résidu Glycine en C-terminal et une lysine de sa protéine cible. Cette étape est généralement catalysée par une ligase E3 telle que les PIAS (Protein Inhibitors of Activated STAT) ou encore RanBP2. Cependant, Ubc9 seul pourrait être suffisante pour la liaison de la SUMO au site accepteur ψ KXE de la protéine cible (ψ représentant un acide aminé hydrophobe tels la Valine, la Leucine, ou Isoleucine et X n'importe quel acide aminé), et les E3 ligases joueraient un rôle d'adaptateur qui serait important pour l'efficacité de la réaction, mais aussi pour sa spécificité sur son substrat (Gareau and Lima 2010). Concernant le motif ψ KXE, il semblerait que ce motif ne soit pas obligatoire pour la SUMOylation (Hay 2005). La SUMOylation étant un processus réversible, les protéines cibles SUMOylées peuvent être déconjuguées de leur SUMO par les SENPs (Geiss-Friedlander and Melchior 2007). Il a été montré que les NRs sont aussi ciblés par la SUMOylation. Par exemple, le récepteur des androgènes (AR) peut être

modifié par SUMO-1 sur les lysines 386 et 520 (Poukka, Karvonen et al. 2000). La mutation de ces résidus bloque la SUMOylation et augmente la capacité de transactivation de AR, ce qui suggère que la SUMOylation régule négativement l'activité de AR (Poukka, Karvonen et al. 2000). Aussi, ER α est rapidement et fortement SUMOylé en présence du Fulvestrant (Faslodex ®), un antioestrogène de type SERD (Selective estrogen receptor downregulator) (Hilmi, Hussein et al. 2012). De plus, la répression de la SUMOylation de ER α par SENP-1, entraîne l'augmentation de son activité transcriptionnelle en présence de SERDs, indiquant ainsi que la SUMOylation de ER α jouerait un rôle important dans l'action pharmacologique des SERDs (Hilmi, Hussein et al. 2012). Concernant les RXRs, il apparaît que la SUMOylation serait un acteur important dans les mécanismes qui régulent l'activation transcriptionnelle de RXR α . En effet, la SUMOylation de RXR α par SUMO-1 réprimerait son activité transcriptionnelle alors qu'en présence de SENP6, cette activité serait rétablie (Choi, Chung et al. 2006). Il a été aussi observé que la mutation de la lysine 108 en arginine dans la portion AF-1 de RXR α , induisait la formation de RXR α en hétérodimère avec RAR α et PPAR γ , suggérant ainsi que la SUMOylation sur RXR α affecterait son activité hétérodimérique (Choi, Chung et al. 2006).

Concernant les NURS, il y a peu d'évidence du rôle de la SUMOylation dans la régulation de leur fonction. Cependant, deux sites de SUMOylation ont été identifiés chez Nurr1 soit les résidus Lysine 91 et 577. La SUMOylation sur la Lysine 91 semble avoir un effet répresseur sur l'activité transcriptionnelle de Nurr1, alors que la SUMOylation sur la Lysine 577 induirait son activité transcriptionnelle (Galleguillos, Vecchiola et al. 2004). De plus, la SUMOylation de la Lysine 91 de Nurr1 semble être spécifique du complexe SUMO-

2/Ubc9/PIAS γ . Aussi, PIAS γ seul aurait le potentiel de réprimer la transactivation de Nurr1 indépendamment de son activité de E3 ligase (Galleguillos, Vecchiola et al. 2004, Arredondo, Orellana et al. 2013). Il a également été montré que la SUMOylation avec la SUMO-2 ou SUMO-3 dans la portion C-terminale de Nurr1 est nécessaire pour la liaison du co-répresseur CoREST et pour réprimer ainsi l'expression de gènes pro- inflammatoire (Saijo, Winner et al. 2009). Cette étude a aussi montré que les mutations en Arginine de la Lysine 558 et 576 de Nurr1 chez la souris (équivalente du 577 humains pour cette dernière), étaient moins capables d'activer la transcription via un élément NBRE et par contre augmentent la transcription via un élément DR-5, suggérant ainsi que la SUMOylation de Nurr1 favoriserait une activité transcriptionnelle de la forme monomérique (Saijo, Winner et al. 2009). La SUMOylation pourrait donc jouer aussi un rôle dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de Nurr1. Concernant Nur77, il n'existe actuellement aucune évidence d'un rôle de la SUMOylation dans la régulation de son activité.

Le BRET

Le BRET (Bioluminescence resonance energy transfer) est une technique biophysique permettant d'étudier les interactions protéines-protéines ou la formation de complexes en utilisant un transfert d'énergie de résonance non radiative (RET). Un RET se produit lorsqu'une partie de l'énergie d'une molécule dite donneur est transférée à un fluorophore accepteur, qui va re-émettre de l'énergie à une longueur d'onde différente. Le RET n'a lieu que si le spectre d'émission du donneur et le spectre d'excitation de l'accepteur se chevauchent suffisamment. Le RET dépend de la distance entre le donneur et l'accepteur (qui doit être comprise entre 10 et 100 Å) et également de leur orientation l'un par rapport à l'autre (Boute, Jockers et al. 2002). Le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) est un autre type de RET que le BRET. Dans le cas du FRET, le donneur et l'accepteur sont deux fluorophores. Le donneur d'énergie est une molécule fluorescente, qui lorsqu'il est excité par un faisceau lumineux à une longueur d'onde donnée va transférer son énergie à l'accepteur qui possède un autre fluorophore (Boute, Jockers et al. 2002). Pour le BRET, le donneur sera fusionné à une protéine bioluminescente et l'accepteur à une protéine fluorescente. Le BRET est un phénomène naturel retrouvé notamment chez les organismes marins, tels que l'espèce *Renilla reniformis* ou *Aequorea victoria*. Ces derniers émettent de la lumière à une longueur d'onde de 480 nm environ suite à l'oxydation catalytique d'un substrat, coelentérazine H, par l'enzyme Renilla Luciférase (RLuc). L'énergie libérée par la RLuc va exciter une protéine GFP, qui à son tour émet de la fluorescence à une longueur d'onde donnée (Xu, Piston et al. 1999).

Dans le cas du BRET¹, une protéine fusionnée à la RLuc sera le donneur et la protéine fusionnée avec la YFP l'accepteur. Lors de l'ajout du substrat de la luciférase, la coelentérazine H, la luciférase va oxyder cette dernière pour produire de la bioluminescence à une longueur d'onde de 480 nm. Si les deux partenaires n'interagissent pas, un seul signal sera alors émis, par la luciférase. Par contre, si la protéine fusionnée à la YFP est à proximité alors, on aura un transfert d'énergie, qui engendrera une émission à 530 nm (Pfleger and Eidne 2006). L'efficacité du transfert d'énergie est déterminée par le rapport entre la lumière provenant de la YFP et la lumière émise par la luciférase (ratio BRET).

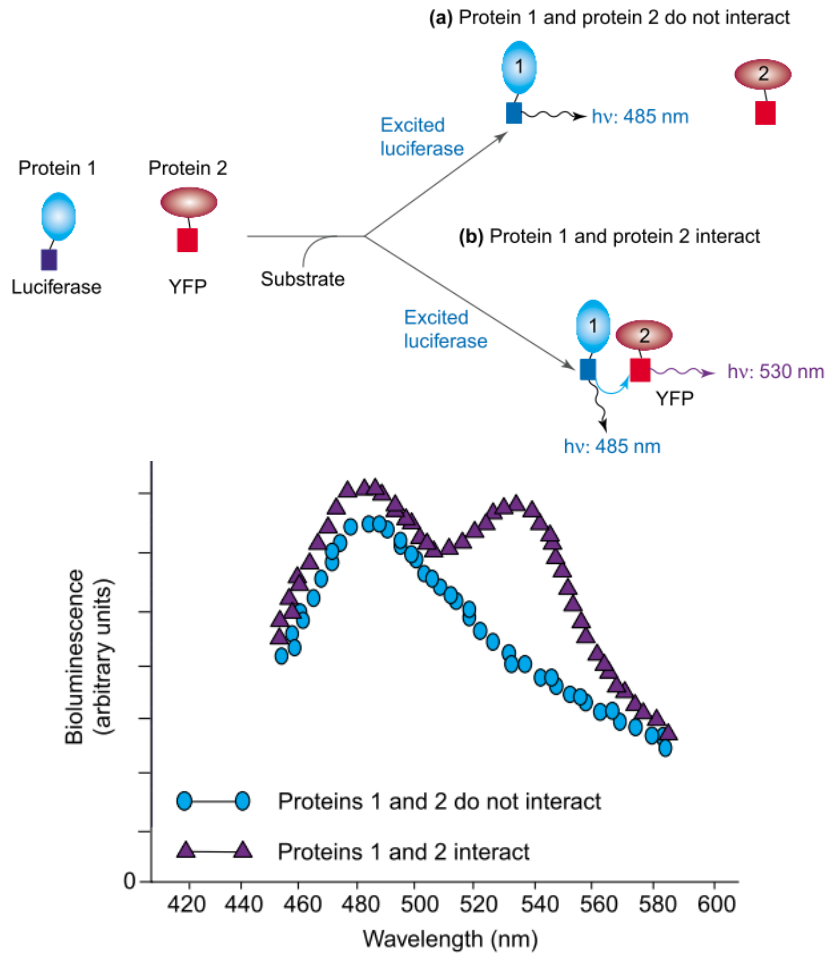


Figure 10: Le principe du BRET.

Pour étudier l'interaction entre deux protéines, la protéine 1 est fusionnée à une luciférase et la protéine 2 est fusionnée à une protéine fluorescente comme la YFP. La réaction est initiée par l'ajout du substrat de la luciférase, la coelentérazine H. Si la distance entre les deux protéines est supérieure à 100 Å, alors seulement la lumière de la luciférase sera émise (**a** et **courbe bleu**). Si la distance entre les 2 protéines est de 10 à 100 Å, l'énergie est transférée de la luciférase de la YFP, résultant en un signal supplémentaire émis par la YFP (**b** et **courbe mauve**). Le ratio BRET ratio est défini comme: $[(\text{émission à } 530 \text{ nm}) / (\text{émission à } 485 \text{ nm})]$ (Tiré et adapté de(Boute, Jockers et al. 2002)

Il existe plusieurs variantes au sein du BRET, qui dépend de la nature du donneur et de l'accepteur. Ainsi dans le BRET², le donneur est la RLucII qui émet de la luminescence à 400 nm suite à l'oxydation de son substrat spécifique la coelentérazine 400a (DeepBlueC) et l'accepteur est la GFP² ou GFP¹⁰ qui émet à son tour à 510 nm suite au transfert d'énergie (Mercier, Salahpour et al. 2002). Le BRET³, quant à lui, nécessite la RLuc8 comme donneur qui émettra à une longueur d'onde de 485 nm en présence de coelentérazine H et la mOrange comme protéine fluorescente acceptrice qui elle émettra après excitation à 574 nm (De, Ray et al. 2009). Chacun de ces types de BRET offre des avantages spécifiques. En effet, le BRET¹ génère un signal plus élevé, grâce notamment au haut rendement quantique de la YFP, permettant ainsi de détecter l'interaction entre des protéines ayant une faible expression. Le BRET², possède lui un meilleur ratio signal/bruit de fond, ce qui lui permet de détecter de faibles changements dans le BRET de l'interaction des protéines cibles. Quant au BRET³, le fait que l'accepteur mOrange a un spectre d'émission dans le rouge faciliterait la détection du BRET au sein de tissus biologiques *in vivo* (De, Ray et al. 2009, Ayoub and Pflieger 2010).

Cependant, ces techniques ne nous permettent pas de détecter l'interaction de complexes de plus de deux protéines. C'est dans cette optique que furent développés le SRET (Sequential resonance energy transfer) et le PCA-BRET (Protein Complementation Assay-BRET). Le SRET fonctionne en combinant le BRET et le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Ici, il va tout d'abord avoir un échange d'énergie entre la RLuc (Renilla Luciferase) et la YFP comme dans un BRET normal, puis la YFP va transférer son énergie vers une autre protéine fluorescente, soit la DsRed dans ce cas précis, permettant ainsi l'évaluation d'une

hétéro-oligomérisation de trois GPCRs (Récepteurs couplés aux protéines G) (Carriba, Navarro et al. 2008). Le PCA-BRET, quant à lui, est basé sur la reconstitution de deux fragments de la Rluc, afin de reformer la Rluc en entier (Stefan, Aquin et al. 2007). Si les deux protéines qui chacune possèdent un des fragments de la RLuc en permettant la reconstitution, on aura alors émission luminescence. Si ce dimère interagit avec le troisième partenaire qui est fusionné avec l'accepteur, alors on aura l'émission d'un signal BRET (Rebois, Robitaille et al. 2008, Armando, Quoyer et al. 2014).

En termes d'application, le BRET peut nous permettre d'obtenir plusieurs données précises concernant les complexes formés. Par exemple, lors d'expériences de courbes de titration, le BRET₅₀ (50 % du BRET max atteint) peut être considéré comme une mesure de l'affinité relative entre les complexes mesurés (Boute, Jockers et al. 2002, Ayoub and Pflieger 2010). De plus, un changement dans le BRET max peut résulter d'une capacité de recrutement différent ou d'un remaniement de la conformation du complexe (Boute, Jockers et al. 2002, Ayoub and Pflieger 2010). Ces différentes mesures sont effectuées en temps réel dans des cellules vivantes, ce qui représente un avantage par rapport à d'autres techniques mesurant les interactions protéine-protéines de manière plus invasive comme la co-immunoprécipitation, ou moins fiables comme la microscopie confocale.

En comparaison au FRET, le BRET présente à la fois des avantages et des inconvénients. En effet, la méthode BRET ne requiert aucune excitation lumineuse de source extérieure, évitant ainsi les problèmes rencontrés lors du FRET c'est-à-dire principalement du photoblanchiment, de l'autofluorescence ainsi que l'excitation simultanée des deux fluorophores qui agissent en

tant que donneur ou accepteur dans le cas du FRET (Pfleger and Eidne 2006). Cependant, le FRET présente l'avantage de mesurer l'interaction protéines-protéines dans des compartiments cellulaires précis et de suivre leur dynamique (Boute, Jockers et al. 2002, Ayoub and Pfleger 2010). Néanmoins, il a été montré récemment que le BRET pouvait lui être aussi utilisé en microscopie (Xu, Peter et al. 2013).

Le BRET s'est révélé être une technique d'intérêt pour l'étude de l'interaction protéines-protéines des NRs. En effet, il a été montré par BRET que la mutation de la phénylalanine 347 en alanine (F347A) dans le LBD de PPAR γ déstabilise l'interaction de ce dernier avec le DBD de RXR α (Mulero, Perroy et al. 2013). Cette mutation affecterait aussi la capacité de ce complexe à se lier à l'ADN pour induire la transcription et modifierait la location nucléaire de l'hétérodimère (Mulero, Perroy et al. 2013). Aussi, grâce au BRET, il a été observé que le récepteur de glucocorticoïdes (GR) recrutait le co-répresseur NCoR en présence de RU486 (un antagoniste) et le co-activateur SRC-1 en présence de dexaméthasone (un agoniste) (Garside, Stevens et al. 2004). Concernant le récepteur des œstrogènes ER α , une étude a mis en évidence que E2 (estradiol), le BPA (bisphenol A) et le DES (diethylstilbestrol) induisait son homodimérisation de manière dose dépendante (Michelini, Mirasoli et al. 2004). De plus, E2 induirait l'interaction entre ER α et le co-activateur SRC-1 (Koterba and Rowan 2006). Aussi, on a pu observer grâce au BRET, que le motif LXXLL, et l'hélice H12 de ER α était cruciale pour la liaison du corépresseur LCoR en présence de E2 et DES (Fernandes, Bastien et al. 2003). Quant au complexe Nur/RXR, il a été montré que le Bexarotène induisait le recrutement de l'hétérodimère Nurr-1/RXR α comparativement à l'homodimère RXR α /RXR α (McFarland, Spalding et al. 2013).

Hypothèses et objectifs

Tel que discuté précédemment, Nur77 est intimement relié à la neurotransmission dopaminergique et notamment de par son rôle protecteur avec RXR γ dans l'induction des dyskinésies induites par des antipsychotiques ou par la L-DOPA. Ces observations nous interpellent quant à l'importance de mieux connaître les mécanismes cellulaires et moléculaires régulant la neurotransmission dopaminergique. Aussi, le rôle physiologique de nombreux NRs reste difficile à comprendre et la caractérisation des composés ciblant ces récepteurs reste incomplète. En effet, les ligands réxinoïdes synthétiques ou les nouveaux composés identifiés comme des agonistes de Nur77 pourraient éventuellement être testés comme traitements pour les troubles liés au système dopaminergique. Cependant, ces réxinoïdes ne sont pas sélectifs des complexes hétérodimères spécifiques, ce qui limite leur potentiel thérapeutique. Quant aux ligands Nur77, leurs mécanismes d'action restent obscurs. De plus, il existe peu d'évidence en dehors de la phosphorylation sur les différentes modifications post-traductionnelles pouvant influencer sur l'activité de Nur77.

La principale raison qui explique cette situation est le manque d'essais disponibles pour évaluer les activités des NRs qui peuvent récapituler la complexité de leurs actions. En outre, les essais actuellement disponibles ne peuvent pas récapituler toutes les activités NR (homo- ou hétéro-dimérisation et le recrutement de co-régulateur) et générer des mesures indirectes des activités de médicaments (essais rapporteurs). Dans la présente thèse, nous proposons donc de développer et optimiser un essai en temps réel dans des cellules vivantes basées sur le BRET et le PCA-BRET pour mesurer l'activité spécifique de Nur77 en monomère et homo- ou

hétérodimères (avec RXR γ). Cette technologie devrait se révéler cruciale pour identifier de nouveaux composés avec une spécificité pour des espèces de dimères spécifiques formés par les NRs, ainsi que de nous aider à mieux comprendre le rôle de certains PTMs comme la SUMOylation dans la régulation de leurs activités.

Cette thèse comporte donc deux objectifs spécifiques :

- 1) Développer et optimiser un essai afin de mesurer l'activité des complexes de récepteurs nucléaires (homodimère, hétérodimère) de Nur77 et RXR de manière spécifique en utilisant une approche en BRET par complémentation de la luciférase.
- 2) Utiliser l'approche du BRET avec différentes constructions plasmidiques afin de mettre en évidence le rôle de certaines modifications post-traductionnelles (principalement la sumoylation) afin d'étudier l'impact fonctionnel de ces modifications sur l'activité de Nur77 (recrutement d'un motif co-activateur et sur la transcription).

Article 1: Activité sélective des ligands au complexes Nur/ RXR révélé par la formation de dimère spécifiques par un senseur BRET

Contribution du candidat

La majorité des plasmides utilisés lors de cette étude ont été générés par David Cotnoir-White. Le candidat quant à lui a optimisé la méthode de BRET et PCA-BRET et a effectué l'ensemble des expériences de ce manuscrit. Tous les auteurs ont participé à l'analyse et l'interprétation des résultats. Cet article est actuellement sous presse dans le journal *FASEB J.*

Selective ligand activity at Nur/retinoid X receptor complexes revealed by dimer-specific bioluminescence resonance energy transfer-based sensors

Xavier C Giner¹, David Cotnoir-White², Sylvie Mader² and Daniel Lévesque^{1*}

¹ *Faculté de Pharmacie and Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament (GRUM),
Université de Montréal and* ² *Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie (IRIC),
Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada*

Running title: BRET-based sensors for Nur/RXR complexes

Abstract

Retinoid X receptors (RXR) play a role as master regulators due to their capacity to form heterodimers with other nuclear receptors. Accordingly, retinoid signaling is involved in multiple biological processes, including development, cell differentiation, metabolism and cell death. However, the role and functions of RXR in different heterodimer complexes remain unsolved, mainly because most RXR drugs (called rexinoids) are not selective to specific heterodimer complexes. This also strongly limits the use of rexinoids for specific therapeutic approaches. In order to better characterize rexinoids at specific nuclear receptor complexes, we have developed and optimized luciferase protein complementation-based Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) assays, which can directly measure recruitment of a co-activator motif fused to yellow fluorescent protein (YFP) by specific nuclear receptor dimers. To validate the assays, we compared rexinoid modulation of co-activator recruitment by RXR homodimer, and heterodimers Nur77/RXR and Nurr1/RXR. Results reveal that some rexinoids display selective co-activator recruitment activities with homo- or hetero-dimer complexes. In particular, SR11237 (BMS649) has increased potency for recruitment of co-activator motif and transcriptional activity with the Nur77/RXR heterodimer compared to other complexes. This technology should prove useful to identify new compounds with specificity for individual dimeric species formed by nuclear receptors.

Keywords: nuclear receptors, pharmacological parameters, co-factor recruitment, receptor dimerization, protein conformation

Introduction

Nuclear receptors (NRs) constitute a large superfamily of transcription factors regulating the expression of genes and controlling a wide range of physiological processes through ligand signaling (Germain, Kammerer et al. 2004, Bookout, Jeong et al. 2006). In addition to forming homo- and hetero-dimers with other NR partners, NRs rely on co-regulator proteins to modulate transcription of target genes (Germain, Kammerer et al. 2004, Gurevich, Flores et al. 2007). NR co-regulators can be broadly subdivided into co-activators (CoA, e.g. SRC or p300/CBP), which potentiate transcription and co-repressors (CoR, e.g. NCoR or SMRT), which silence gene transcription. Co-repressors recruit multiprotein complexes implicated in transcriptional repression and histone deacetylation (HDAC). On the other hand, several co-activators possess histone acetyltransferase activity (HAT) required for chromatin remodeling and subsequent access of the transcriptional machinery to promoters or recruit other proteins essential for transactivation, such as the CREB binding protein (CBP). In the absence of agonist, many nuclear receptors interact with co-repressors. Upon agonist binding, conformational change in the receptor causes the shedding of co-repressor complexes and the binding of co-activators, often via a conserved short LXXLL motif (Heery, Kalkhoven et al. 1997). However, agonist-mediated co-repression has also been described (Gurevich, Flores et al. 2007).

NRs are defined by common structural motifs composed of four functional modules, the N-terminal transcription Activation Function domain (AF-1), DNA-binding domain (DBD), the ligand-binding domain (LBD) and the C-terminal Activation Function domain (AF-2) (Burris, Solt et al. 2013). The AF-2 transcription regulation domain supports ligand-dependent transactivation of the receptor, whereas the AF-1 domain activity can be modulated by phosphorylation (Germain, Kammerer et al. 2004). Co-regulator molecules (co-activators or co-repressors) that modulate the activity of NRs can interact with the AF-1 and/or AF-2 domains. NRs can bind DNA as monomers, homodimers, and heterodimers. DNA recognition sites, also referred to as NR response elements, contain one or two consensus core half-site sequences. For example, numerous NRs bind to elements containing the half-site consensus motif AGGTCA. For response elements involved in dimeric NR activity, the half-sites can be configured as inverted, everted or direct repeats (DR). In monomeric response elements, the 5'-flanking sequence, such as the A/T-rich sequence in the Nur77 responsive element (NBRE), can increase the affinity and specificity of interaction with NRs (Zhao and Bruemmer 2009).

The retinoid X receptor (RXR) subgroup (NR2B) of NRs is composed of 3 members: RXR α (NR2B1), RXR β (NR2B2), and RXR γ (NR2B3). RXR α is detected in multiple tissues including muscle, liver, lung, in skin, intestine, epidermis and kidney, whereas RXR β (NR2B2) is ubiquitously expressed (Bookout, Jeong et al. 2006, Germain, Chambon et al. 2006). Unlike RXR α and β , RXR γ expression pattern is less widely spread. Indeed, RXR γ is expressed specifically in brain, pituitary, and cardiac and skeletal muscles (Bookout, Jeong et al. 2006, Germain, Chambon et al. 2006). RXRs mediate retinoid signaling through the action

of their ligand 9-*cis* retinoic acid (9 *cis*-RA) (Heyman, Mangelsdorf et al. 1992). In addition, it has been shown that poly-unsaturated fatty acids, such as docosahexaenoic acid (DHA), represent endogenous ligands for RXR in the mature brain (Mata de Urquiza, Liu et al. 2000). The transcriptional activity of RXR mainly results from its capacity to act as a cognate partner for other NRs. RXR can be generally engaged in 3 types of partnerships, permissive, conditional and non-permissive heterodimers. Non-permissive heterodimers, such as RXR/VDR (vitamin D receptor) and RXR/TR (thyroid hormone receptor), are activated only by agonists of the partner. Conditional heterodimers, such as RXR/RAR (retinoic acid receptor), are not activated by RXR agonists, but the activity of agonists of the RXR partner receptor is enhanced by RXR agonists (synergistic effect). RXR agonists alone, partner receptor agonists alone or a combination of both can activate permissive heterodimers. Such complexes include heterodimers formed with PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor), FXR (farnesoid X receptor), LXR (liver X receptor), and the orphan NRs Nur77 and Nurr1 (Forman, Umesono et al. 1995, Mangelsdorf and Evans 1995).

The NR4A subgroup of nuclear receptors includes Nur77 (NR4A1, also known as NGFI-B or TR3), Nurr1 (NR4A2) and Nor-1 (NR4A3). NR4A members are immediate early response genes and can be induced by a diverse range of signals, including growth factors, cytokines, hormones and neurotransmitters (Maxwell and Muscat 2005, Safe, Jin et al. 2014). Accordingly, the NR4A family is implicated in multiple functions including cell cycle regulation, apoptosis, steroidogenesis, inflammation, carcinogenesis, atherogenesis, insulin resistance, neoglucogenesis, lipid metabolism, endocrine functions and neurotransmission (Maxwell and Muscat 2005, Safe, Jin et al. 2014). Nur77 and the others NR4A members can

bind to DNA in three different ways to regulate target gene expression. First, these receptors can bind to the Nerve-Growth-Factor Inducible gene B (NGFI-B)-responsive element (NBRE) as monomers (Wilson, Fahrner et al. 1991). Second, they can bind to the Nur-response element (NurRE) as homodimers or heterodimers with another NR4A family member (Philips, Lesage et al. 1997, Maira, Martens et al. 1999). In addition, as mentioned before, Nurr1 and Nur77, but not Nor-1, can form heterodimers with RXR, to mediate the retinoid signaling on direct repeat (DR) responsive elements or through binding to a NBRE sequence (Perlmann and Jansson 1995, Zetterstrom, Solomin et al. 1996, Maira, Martens et al. 1999). Thus, Nur77 and Nurr1 transcriptional activities can be indirectly manipulated through modulation of their heterodimeric partner RXR, using RXR selective drugs, called rexinoids (Perlmann and Jansson 1995, Zetterstrom, Solomin et al. 1996, Maira, Martens et al. 1999).

Nur family receptors are members of the orphan nuclear receptor class, i.e. no known endogenous ligand has been described for these receptors. In fact, the NR4A LBD contains no apparent cavity due to bulky hydrophobic amino acid side chains, and lacks a classical co-activator-binding cleft (Wang, Benoit et al. 2003, Flaig, Greschik et al. 2005). However, co-activator recruitment is possible via the AF-1 region of Nur receptors and, within the context of Nur-RXR heterodimers, via the AF-2 activation function of RXR (Wansa, Harris et al. 2002). Further, some reports have evidenced ligand-induced NR4A activity, although the mechanism of activation has not been clearly demonstrated (Dubois, Hengerer et al. 2006, Zhan, Du et al. 2008, Anbalagan, Huderson et al. 2012). In the periphery, numerous genes involved in endocrine and metabolic processes have NR4A responsive elements (mainly NBRE) in their promoters that have been validated experimentally (Philips, Lesage et al. 1997,

Pei, Waki et al. 2006, Chao, Zhang et al. 2007, Audet, Lagace et al. 2010). However, activities of Nur77 and Nurr1 in heterodimer complexes with RXR are still poorly characterized. In the central nervous system, Nurr1 plays a critical role in the development and maintenance of the dopaminergic phenotype of mesencephalic neurons (*substantia nigra*), whereas Nurr1/RXR heterodimer can drive a pro-survival activity of RXR compounds on dopamine cells in culture (Wallen-Mackenzie, de Urquiza et al. 2003, Kadkhodaei, Ito et al. 2009). In addition, Nur77 is associated with dopamine-mediated locomotor activity (Levesque and Rouillard 2007). Using Nur77 knockout mice and RXR drug treatments, we observed that dopamine receptor antagonist-induced abnormal involuntary movements (dyskinesia) are sensitive to rexinoids but only in wild-type animals (Ethier, Beaudry et al. 2004). Thus, activity of both receptors can be associated with RXR heterodimer activity in the brain, but it is not possible at present time to selectively target this activity. Indeed, numerous RXR compounds have been identified, but their activity at various RXR heterodimer species is not well characterized, due to the lack of assays to monitor cofactor recruitment by specific dimers in live cells. Interpretation of results from reporter assays are complicated by the expression of endogenous receptors with overlapping DNA binding patterns, and by the variety of co-activator proteins present in the host cell.

Here we describe new highly sensitive sensors that can detect recruitment of a co-activator by specific receptor dimers in live cells and in real time. These assays combine the Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) and luciferase Protein fragment Complementation Assay (PCA) technologies (Paulmurugan and Gambhir 2003, Michnick, Ear et al. 2007, Martel, Dugre-Brisson et al. 2010) to enable detection of simultaneous interactions

between three partners (NR homo- or hetero-dimer and a co-regulator). We applied these assays to characterize presently available RXR ligands for their intrinsic activity for co-activator LXXLL motif recruitment to specific homo- (RXR/RXR) or hetero-dimer (Nur77/RXR and Nurr1/RXR) complexes.

Materials and methods

Drugs

Nine-*cis* retinoic acid (9-*cis* RA) (RAR and RXR agonist), bexarotene (RXR agonist), docosahexaenoic acid (RXR agonist), 6-mercaptopurine (Nur77 agonist), **1,1-bis(3'-Indolyl)-1-(p-methoxyphenyl)methane; 3,3'-[(4-Methoxyphenyl)methylene]bis-1H-indole** (DIM-C-pPhOCH₃) (Nur77 agonist) and cytosporone B (Nur77 agonist) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Inc. (Oakville, ON, Canada), whereas fluorobexarotene (RXR agonist), SR11237 (BMS 649) (RXR agonist), LG1506 (PPAR/RXR agonist), LG268 (RXR agonist) and UVI3003 (RXR antagonist) were purchased from Tocris (Ellisville, MI, USA). XCT0135908 was custom synthesized by the Medicinal Chemistry Platform of the Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie (IRIC) of the University of Montreal. HX600, HX630 (RXR agonists) and HX531 (RXR antagonist) were kindly provided by Dr. Hiroyuki Kagechika and Koichi Shudo (School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University and Research Foundation Itsuu Laboratory, Tokyo, Japan).

Plasmids

Human Nur77, Nurr1 and RXR γ cDNAs were amplified by PCR. PCR products were then subcloned into a pcDNA3.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing the *Renilla* luciferase (Luc) sequence. We generated constructs in which the Luc was fused at the N- or C-terminal portion of the NR. For protein fragment complementation assay (PCA), we used split luciferase Luc-F1 (a.a. 1-110) and Luc-F2 (a.a. 111-310) fragments, as previously described (Paulmurugan and Gambhir 2003, Michnick, Ear et al. 2007). Again, we generated constructs in which the Luc-F1 or -F2 fragment was fused at N- and C-terminal portions for each NR. The construct encoding the co-activator motif (CoA-YFP) consisted in a LXXLL motif tandem repeat flanked at both extremities by a Yellow Fluorescent Protein (YFP). The construct also contains two Nuclear Localisation Signal sequences derived from the glucocorticoid receptor to ensure nuclear transport of the construct. This sequence was then subcloned into the pCMV-TOPAZ expression vector (Clontech, Mountain View, CA, USA). To confirm the specificity of NR and CoA-YFP motif, we used similar CoA-YFP motif constructs in which leucine residues were replaced by alanine (AXXAA) or phenylalanine residues (FXXFF).

Cell culture and Transient transfection

Human embryonic kidney 293T (HEK-293T) cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 2 mL/500 mL glutamine, and

100 U/ml penicillin-streptomycin (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) at 37°C in 5% CO₂. We transiently transfected HEK-293T cells in 96-well plates (White Optiplate; PerkinElmer, Waltham, MA) at a density of 9×10^4 cells per well (about 80% confluency) with a maximum of 120 ng of cDNA per well encoding the fusion proteins using the polyethylenimine (PEI; Polysciences Inc, Warrington, PA, USA) method (300 ng of linear PEI plus 100 ng of branched PEI for 100 ng of DNA). Preliminary experiments were performed in order to determine the amounts of constructs, in both simple and PCA-BRET configurations, which generate optimal net BRET signals. So, in a typical PCA-BRET dose-response curve assay, 35 ng of each NR partners and 30 ng of the CoA-YFP construct are transfected per well in 96-well plates. To maintain the same ratio of DNA in co-transfections, we used the empty vector pcDNA3.1, to equilibrate the amount of total DNA transfected.

BRET and PCA-BRET assays

The BRET assays were performed essentially as described in previous reports (Llopis, Westin et al. 2000, Pflieger and Eidne 2006, Lupien, Jeyakumar et al. 2007, Duplessis, Koterba et al. 2009). Adherent cells were stimulated by drugs for 20 min, 48 hours after transfection. All ligands used were solubilized in DMSO and then diluted in Hanks' balanced salt solution (HBSS). BRET was read immediately after exposing the cells to 5 μ M of the Luc substrate coelenterazine H (NanoLight Technology, Pinetop, AZ, USA) using the Mithras LB 940 microplate reader (Berthold Technologies, Oak Ridge, TN, USA). Signal detections were performed at a wavelength of 485 nm for Luc emission (energy donor) and at 530 nm for YFP emission (energy acceptor) (Fig. 11). Net BRET signals were derived from the emission

detected with the energy acceptor filter divided by the emission detected with the energy donor filter (YFP/Luc), with subtraction of the background ratio obtained from cells expressing only the energy donor. In PCA-BRET experiments (see scheme in Fig. 11), BRET signals depend both on Luc fragment complementation due to receptor dimerization and on interaction of the Luc-fused proteins with at least one of the YFP-fused co-activator LXXLL motif (Fig. 8). This allows specific dimer activity measurements by fusion of receptor monomers with Luc fragments.

Reporter assays

HEK-293T cells were transfected in 24-well plates by the calcium–phosphate co-precipitation method. Briefly, HEK-293T cells were plated at 150,000 cells/well prior to transfection. The next day, media were changed and cells were transfected with 0.6 µg of the DR-5 element from the RARβ promoter construct fused to the Firefly luciferase reporter gene (graciously provided by Dr. Jacques Drouin, IRCM), 100 ng of each transcription factor (Nur77, RXRγ, Nur77-F1 and/or F2-RXRγ), 100 ng pCMV-Topaz expression vector, used as an internal control, and pcDNA3.1 as carrier DNA to normalize transfected DNA quantity up to 1.5 µg/well, so that same amount of DNA was used in all experiments. One day later, HEK-293T cells were treated with either 1 µM 9-*cis* RA or with vehicle (DMSO, 0.001%), or increasing concentration of drugs for generation of dose-response curves for 24 h. Then, cells were harvested and luciferase activities were measured upon addition of luciferin (500 µM, NanoLight, Pinetop, AZ, USA) with the Veritas microplate luminometer (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA, USA). Results were normalized using the Topaz signal with a Spectramax

190 plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Data reported represent the average of at least three experiments, each performed in duplicate using different DNA preparations.

Results

Luciferase PCA assays for RXR dimer complex formation

In order to assess for co-activator (CoA) recruitment by specific dimers, we developed *Renilla* luciferase (Luc) protein complementation assays for receptor dimer formation. Reconstitution of Luc activity would then allow testing recruitment of a CoA LXXLL motif-containing peptide fused to two YFP acceptor proteins by BRET (Fig. 11). As both N-terminal and C-terminal fusions are possible for receptor monomers fused to either the Luc-F1 or Luc-F2 fragments, we first assessed the combinations that led to optimal Luc reconstitution.

For the Nur77/RXR γ heterodimer, transient transfections of HEK-293T cells with the 8 possible combinations of F1 or F2 fragment fused at the N- or C-terminus of Nur77 or RXR γ were performed with increasing but equal amounts of both transfected plasmid (Fig. 12A). The results showed dose-dependent bioluminescent signals for multiple combinations, with optimal signals for the Nur77-F1/F2-RXR γ configuration (Fig. 12A), which was chosen for the following experiments. The Nur77-F1/RXR γ -F2 also yielded a good signal, but signals obtained with other pairs were 3-4 fold lower. Similarly, we also determined that the homodimeric RXR γ -F1/F2-RXR γ and heterodimeric Nurr1-F1/F2-RXR γ heterodimer

configurations represent optimal fusion protein orientations for Luc reassembly (unpublished observations, X. Giner). Thus, Luc PCA assays enable live detection of RXR γ homodimers and of Nur77 or Nurr1 heterodimer formation with RXR.

9-cis RA induces rapid co-activator recruitment to Nur-RXR heterodimers

BRET assays have been successfully used to monitor co-activator (CoA) peptide recruitment by activated NRs (Koterba and Rowan 2006, Duplessis, Koterba et al. 2009). Here, we optimized BRET assays for CoA peptide recruitment by RXR. We tested constructs fusing RXR γ with Luc at its N- or C-terminus, and the LXXLL co-activator (CoA) motif with nuclear localization signals and YFP at both extremities in order to maximize the probability of energy transfer from NR-Luc complexes and to ensure nuclear localization (see supplementary Fig. S1 for sub-cellular localization). In BRET assays, we identified the RXR γ -Luc construct as being optimal for recruitment of CoA-YFP (unpublished observation, X. Giner).

In order to determine the optimal donor/acceptor ratio for signal detection, we performed titration curves in which a fixed amount of the energy donor (RXR γ -Luc or Nur77-F1/F2-RXR γ) was co-transfected with increasing amounts of the acceptor CoA-YFP motif. In a standard BRET assay (RXR γ -Luc and CoA-YFP), increasing amounts of CoA-YFP results in a linear curve, reflecting nonspecific energy transfer in the absence of ligand (Fig. 12B, treatment with DMSO vehicle). Similar results were obtained with a mutated, non-interacting CoA-YFP motif in which leucine residues were replaced by alanines, confirming the non-

specific nature of these interactions. On the other hand, a strong and saturable increase in BRET signal was observed upon treatment with the RXR agonist *9-cis* RA when using the wild type (LXXLL), but not the mutated (AXXAA) CoA-YFP motif (Fig. 12B). By plotting the net BRET signal in function of the amount of CoA-YFP plasmid transfected (see Fig. S2A), we estimate that the amount of CoA-YFP necessary to generate a BRET₅₀ signal is 17 ng (with a RXR γ -Luc plasmid content fixed at 10 ng). We obtained a similar BRET₅₀ value in the Nur77-F1/RXR γ -F2 PCA-BRET configuration (16 ng, Fig. S2B). For comparison, net BRET₅₀ signals for CoA-YFP recruitment in the presence of DMSO are 51 and 55 ng for RXR γ -Luc and Nur77-F1/F2-RXR γ constructs, respectively (Fig. S2). Net BRET signal comparison of RXR γ -Luc and RXR γ -F1/F2- RXR γ assays also produced similar BRET₅₀ values (Fig. S3A). However, Luc light emission at 485 nm is reduced by about 6-fold with the reconstituted split Luc (Fig. S3B). These data indicate that despite reduced Luc emission NR constructs containing the reconstituted split Luc are recruiting the co-activator with a similar affinity as the NR constructs containing the unsplit luciferase.

When using the Nur77-F1/F2-RXR γ complex as an energy donor, we observed basal CoA-YFP recruitment in the absence of ligand compared to unfused YFP (Fig. 12C). This suggests constitutive recruitment of the LXXLL motif-containing co-activators by the unliganded heterodimer. However, CoA-YFP motif recruitment was strongly upregulated upon addition of *9-cis* RA (Fig. 12C). Co-transfection of unfused YFP generated identical linear, nonspecific signals in the presence as well as absence of *9-cis* RA (Fig. 12C). Unexpectedly, basal recruitment (in the absence of *9-cis* RA) of the mutated leucine/alanine CoA-YFP motif generated a BRET signal that is slightly superior to the CoA-YFP motif in basal condition, but

this interaction was not affected by ligand addition (see supplementary Fig. S4A). These observations indicate that this mutated CoA motif is still able to interact with the NR complex, but that this interaction is not ligand-sensitive. Since we replaced leucine by alanine residues, which are structurally very close, it is possible that some constitutive interactions can still occur. In order to confirm the specificity of this CoA-YFP motif recruitment in the PCA-BRET configuration, we generated another mutant in which leucine were replaced by phenylalanine residues (which contain a larger side chain) (Fig. S4B). This mutant generated nonspecific signals both in basal and agonist-stimulated conditions, as compared to the native CoA-YFP motif, confirming the specificity of the agonist-induced interaction between the 3 partners.

We next compared kinetics of co-activator recruitment by RXR γ -Luc and Nur77-F1/F2-RXR γ (Fig. 12D). Both the BRET and PCA-BRET signals reached a plateau very fast (less than 5 min) after addition of *9-cis* RA (10 μ M) (Fig. 12D) and the net BRET signal remained stable for up to 2 hours. This indicates that Luc fragment complementation in the PCA-BRET assay did not reduce the velocity of CoA recruitment by the NR complex.

We also determined if the NR fused to Luc constructs are still able to transactivate a reporter gene using a classic direct repeat element that is sensitive to Nur77/RXR complex (DR-5) (Fig. 13). Although we noted a reduction of total firefly/YFP ratio signal with the Nur77-F1/F2-RXR γ constructs and basal transactivation activity with introduction of fused Luc fragments to Nur77 in the gene reporter assay, fusion proteins used for Luc PCA assays were able to transactivate a reporter gene through a classic DR-5 sequence in *9-cis* RA-

dependent manner (Nur77/RXR γ = 3.7 ± 0.4 ; Nur77/F2-RXR γ = 11.9 ± 0.5 ; Nur77-F1/RXR γ = 24.0 ± 2.0 and Nur77-F1/F2-RXR γ = 11.8 ± 2.0 fold induction) (Fig. 3).

Differential activity of RXR ligands on specific RXR dimeric complexes.

To compare the potency of known RXR ligands in the BRET sensor assays for specific RXR dimers, we performed dose-response curves (see examples in Fig. 14 and summarized data in Table 2). In the single RXR γ -Luc BRET assay, most drugs tested showed potencies (EC₅₀) similar to values in the literature obtained using standard gene reporter assays for RXR γ , when available (Table 2). The natural agonist 9-*cis* RA displayed similar potencies in all BRET and PCA-BRET assays tested (Table 2). Interestingly however, although all rexinoids were active with each PCA-BRET assay, some displayed different potencies with various RXR dimeric complexes in the PCA-BRET assays (Table 2 and Fig. 14A-C). In particular, SR11237 had a markedly higher potency (5.6 nM) with the Nur77/RXR γ heterodimer assay than with the Nurr1/RXR γ heterodimer (144 nM) or the RXR γ /RXR γ homodimer (214 nM) in PCA-BRET assays (Table 2 and Fig. 14A-C). Of note, the EC₅₀ observed in the RXR BRET assay is intermediate (30 nM). This suggests that SR11237 has selectivity for RXR γ bound to Nur77 vs Nurr1 and for Nur-RXR heterodimer vs RXR γ homodimer. This data also suggests potential contributions of other intracellular RXR partners present in the cell system when using the RXR γ -Luc BRET assay. The putative endogenous RXR ligand docosahexanoic acid (DHA) displayed a low micromolar activity (Table 2) in all the BRET and PCA-BRET assays tested, which is consistent with what is reported in the literature (Mata de Urquiza, Liu et al. 2000, Goldstein, Dobrzyn et al. 2003). We also tested

the activity of Nur ligands, including 6-mercaptopurine, DIM-C-pPhOCH₃ and cytosporone B, in the present PCA-BRET assays. All the compounds remained inactive with RXR γ /RXR γ , Nur77/RXR γ and Nurr1/RXR γ complexes (unpublished observations, X. Giner).

Of interest, some compounds had also different relative efficacies compared to 9-*cis* RA (Table 2 and Fig. 14A-C) with the dimer-specific assays *versus* the RXR BRET assay. LG1506, a selective PPAR/RXR ligand, displayed only low relative activities in the RXR γ /RXR γ homodimer or the Nur77/RXR γ heterodimer PCA-BRET assay (19%), but higher partial activity in the RXR γ -Luc BRET assay (38% compared to 9-*cis* RA). HX630 displayed a partial relative maximal activity with the RXR γ /RXR γ homodimer (about 60%), which is consistent with the partial agonist activity reported in the literature (Umemiya, Fukasawa et al. 1997), but it had near full relative maximal activity with the Nur77/RXR γ heterodimer selective PCA-BRET assay (see Fig. 14A,B and Table 2). On the other hand, SR11237, a pan RXR agonist, showed the opposite profile, with a partial maximal activity at the Nur77/RXR γ complex relative to 9-*cis*-RA (about 40%), while its maximal activity was comparable to that of 9-*cis* RA at RXR γ /RXR γ homodimer (see Fig. 14A,B and Table 2). Interestingly, bexarotene showed partial apparent efficacies except for Nurr1/RXR γ heterodimer to which it displayed full activity. Further, LG268 and HX600 have variable degrees of relative efficacy compared to 9-*cis* RA in the different PCA-BRET assays, whereas fluorobexarotene displayed full relative activity for all assays (Table 2 and Fig. 14A-C).

We also evaluated two RXR antagonists, HX531 and UVI3003, using 9-*cis* RA (50 nM) competition assays (Table 1 and Fig. 11D). Although the HX531 IC₅₀ was somewhat lower, as compared to the literature (Sakaki, Konishi et al. 2007, Morishita, Yakushiji et al. 2009), IC₅₀'s obtained with UVI3003 compound were similar in the BRET and PCA-BRET assays and are consistent with the literature (Nahoum, Perez et al. 2007) (Table 2 and Fig. 14D). Thus, these assays can also be used to monitor antagonist activities in competition assays.

For most rexinoids, relative transactivation efficacy data are not available in the literature. So, to directly compare the efficacy of co-activator recruitment as measured in the present Nur77/RXR γ PCA-BRET assay with transcriptional activation by the different rexinoids, we conducted a gene reporter assay using a DR-5 response element reporter construct previously described (Maira, Martens et al. 1999), combined with co-transfection of native Nur77 and RXR γ full-length proteins. All the compounds tested displayed an apparent partial maximal capacity compared to 9-*cis* RA (Fig. 15 and Table 3). Note that in a report by Lippert and colleagues (2009), SR11237 also displayed a partial maximal efficacy of 77% compared to 9-*cis* RA for a Gal4-RXR β activation in Hela cells (Lippert, Burschka et al. 2009). Rexinoid potencies obtained in the reporter assay are generally somewhat lower compared to potencies obtained in Nur77/RXR γ PCA-BRET assays (compare Table 2 and Table 3 EC₅₀ data), except for HX630 and XCT0123908 compounds, possibly due to the need for higher ligand concentrations to achieve transcriptional activation *via* full-length endogenous co-activators than for recruitment of overexpressed LXXLL motifs. Interestingly, SR11237 maintained its selectivity at Nur77/RXR γ over Nurr1/RXR γ using a DR-5 reporter gene assay combined with

native Nurr1 and RXR γ (Nurr1/RXR γ EC₅₀: 632 \pm 207 nM and E_{MAX}: 14 \pm 4 %, as compared to EC₅₀: 28 \pm 9 nM and E_{MAX}: 40 \pm 10 % for Nur77/RXR γ , see Table 3).

Effect of rexinoids on dimer conformation

Differential relative maximal activity may reflect different capacity for co-activator recruitment (see above). Alternatively, specific conformational changes at different dimer constructs may alter the efficiency of energy transfer. The Luc PCA assay directly allows investigating the effect of drugs on protein conformation. The very fast recruitment of co-activator obtained in the PCA-BRET assays (Fig. 12D) is consistent with ligands inducing a conformational change in constitutively preformed homo- or hetero-dimers of NRs. To estimate the effect of agonists on NR complex conformation, we compared their impact on the Luc bioluminescent signals (Fig. 16). We observed that high concentrations of the vehicle (DMSO), as well as for some compounds like HX630 or bexarotene, reduced Luc bioluminescent signal (see examples in Fig. 16). This effect can be explained, at least in part, by nonspecific effects of DMSO at high concentrations on protein-protein interactions and by the fact that some of these compounds are colored, so that they can absorb a part of the emitted light. Note that while this reduction of Luc emission will also reduce fluorescence emission by the YFP acceptor, this effect has no impact on BRET results, which are expressed as YFP/Luc ratios.

Interestingly, despite the fact that high concentration of DMSO reduce YFP emission, SR11237 was able to increase light emission of the reconstituted Luc compared to 9-*cis* RA in

Nur77-F1/F2-RXR γ (*9-cis* RA = 1.03 ± 0.08 RLU_{max}; SR11237 = 1.41 ± 0.07 RLU_{max}, $p < 0.01$) and Nurr1-F1/F2-RXR γ (*9-cis* RA = 1.21 ± 0.06 RLU_{max}; SR11237 = 1.54 ± 0.15 RLU_{max}, $p < 0.05$), but not with the RXR γ -F1/F2-RXR γ (*9-cis* RA = 0.32 ± 0.08 RLU_{max}; SR11237 = 0.31 ± 0.07 RLU_{max}, NS) complex (Fig. 16A-C). This effect was confirmed in additional experiments, where we performed titration curves produced by increasing amounts of one Luc fragment of the Nur77-F1/F2-RXR γ complex in the presence of vehicle, *9-cis* RA or SR11237 (Fig. 17). Both experimental conditions (increasing Nur77-F1 or F2-RXR γ fragment concentration) generated a higher light emission capacity in the presence of SR11237, as compared to *9-cis* RA or vehicle (Fig. 17). However, plasmid concentrations at half-maximum light emission were similar (*9-cis* RA = 18 ± 4 ng; SR11237 = 16 ± 2 ng, Fig. 17B). This result suggests that SR11237 did not alter the affinity of NR complex formation, but instead induced a conformational change in the protein complex that facilitated Luc reconstitution. Interestingly, the relative potencies of these changes with the Nur77/RXR and Nurr1/RXR PCA assays mirrored those of co-activator recruitment in the PCA-BRET assays, suggesting that the variations in Luc PCA intensity detected are part of conformational rearrangements induced by SR11237 that lead to co-activator recruitment in the PCA-BRET assay.

XCT0135908 has been shown to display a high selectivity for Nurr1/RXR heterodimer, as compared to other RXR complexes in Gal4-NR constructs co-transfected with full-length RXR in CV-1 cells (Wallen-Mackenzie, de Urquiza et al. 2003). In the present Luc PCA BRET assays, XCT0135908 displayed similar potencies with Nur77-F1/F2-RXR γ and Nurr1-F1/F2-RXR γ , whereas potency with RXR γ -F1/F2-RXR γ was about 3-fold lower (Table 2).

The compound also displayed higher apparent partial efficacies in Nur-F1/F2-RXR γ heterodimers as compared to the RXR γ -F1/F2-RXR γ complex (Table 2 and Fig. 14C). In addition, we observed a low micromolar transactivation activity and partial efficacy in our reporter assay for Nur77/RXR γ (Table 3 and Fig. 15). Interestingly, XCT0135908 increased light emission of the reconstituted Luc in Nurr1-F1/F2-RXR γ heterodimer ($F_{2,20} = 6.074$, $p = 0.0087$, $N = 8$; *post hoc* Tukey's multiple comparisons test, $p < 0.01$), but not RXR γ -F1/F2-RXR γ complexes (Fig. 18). The effect of XCT0135908 on the reconstitution of Luc activity with the Nur77-F1/F2-RXR γ heterodimer was of lower amplitude and did not reach statistical significance. Together, these data indicate that XCT0135908 induces selective conformational changes at the Nurr1/RXR γ complex and displays partial activation of Nur/RXR dimers compared to RXR/RXR homodimer.

Discussion

A central question in rexinoid biology and pharmacology research is the role and functions of RXR in specific heterodimers. In the present report, we have developed and optimized sensitive sensor assays to measure intrinsic ligand activity at specific NR dimer (homo- or hetero-dimer) complexes including RXR γ /RXR γ , Nur77/RXR γ and Nurr1/RXR γ . These novel assays monitor ligand-induced co-activator recruitment by a specific NR dimer complex activity in live cells. Although recent reports described BRET assays that are selective for nuclear receptor complexes (RXR/TRH, PPAR/RXR, RXR/RXR and Nurr1/RXR), BRET signals generated in these assays reflect receptor dimerization alone (McFarland, Spalding et

al. 2013, Mulero, Perroy et al. 2013). NR dimerization does not necessarily correlate with NR activity, as observed for instance with estrogen receptor agonists and antagonists (Lupien, Jeyakumar et al. 2007). In the present assays, the BRET signal is generated by co-activator motif recruitment, while nuclear receptor selectivity is achieved by luciferase fragment complementation. Fusion proteins used for Luc PCA retain transcriptional activity and titration experiments can reveal ligand-induced effects on the conformation of specific RXR-containing complexes. For instance, SR11237 and XCT0135908 were unique among tested compounds in their ability to induce specific conformations of Nur/RXR γ heterodimers. Interestingly, the selectivity of SR11237 (both potency and efficacy) for Nur77/RXR complex, as evidence in the present PCA-BRET assay, was confirmed in a classic DR-5 reporter assay for Nur77/RXR and Nurr1/RXR complexes.

Pharmacological characterization of rexinoids in these assays confirmed activity of most rexinoids on the different RXR dimers, but revealed previously uncharacterized preferential activity of SR11237 (BMS649) on the Nur77/RXR heterodimer, which was activated with higher potency compared to Nurr1/RXR heterodimer and RXR/RXR homodimer. This suggests that the conformational changes observed in Luc PCA assays with SR11237, also with higher potency for Nur77/RXR vs Nurr1/RXR, reflect the activation of the dimers for recruitment of LXXLL motif peptides. High-resolution crystallography comparing RXR-9-*cis* RA and RXR-SR11237 complexes structural data indicated that the RXR-SR11237 complex can undergo conformational fluctuation attributed to the reorientation of one single side-chain residue (N306) that is sufficient to reduce the volume of the cavity by up to 10% (Egea, Mitschler et al. 2002). This side chain motion that generates additional stabilizing contacts is

most probably the result of an attraction by the partial negative charge of the SR11237 oxygen atoms. As a result of the change of volume, the level of occupancy of the ligand binding pocket by the SR11237 ligand is higher than that with 9-*cis* RA (Egea, Mitschler et al. 2002). Thus, it is tempting to speculate that this additional interaction of SR11237 with RXR might confer a greater stability to selective heterodimer complexes and might be responsible for the higher apparent potency of SR11237 to recruit co-activator motif at Nur77/RXR γ (and to a lesser extent Nurr1/RXR γ), compared to the RXR γ /RXR γ complex.

Using our dimer-specific PCA-BRET assays, it is also possible to perform competition of agonist-induced co-activator recruitment by antagonists for specific NR homo- or heterodimer complex. Here we show that two previously characterized RXR antagonists, HX531 and UVI3003, can directly compete for 9-*cis* RA co-activator motif recruitments with IC₅₀ values similar to those obtained for their antagonist activities in gene reporter transactivation assays (Nahoum, Perez et al. 2007, Sakaki, Konishi et al. 2007, Morishita, Yakushiji et al. 2009). Both antagonists displayed similar activities at RXR/RXR and Nur77/RXR complexes (Table 2).

Nur77 compounds were found to be inactive in the Nur77/RXR γ PCA-BRET assay, suggesting that Nur77 remains silent for co-activator motif recruitment by Nur77/RXR complex. A similar suggestion has been made previously for Nurr1/RXR complex (Wallen-Mackenzie, de Urquiza et al. 2003). We are aware however that co-activator recruitment via other determinants than the LXXLL binding motifs assessed in this study remains possible in the presence of these compounds.

Although most pharmacological parameters were compatible with published data obtained in reporter assays, discrepancies were noted between pharmacological parameters obtained in single RXR-Luc BRET assay and in dimer specific PCA-BRET assays. These might result from endogenously expressed components that can dimerize with RXR-Luc, as suggested by the use of PPAR selective ligands (Table 2). Similar limitations apply for reporter assays, although specificity is enhanced by the use of a specific binding motif that can recruit only certain types of dimers. On the other hand, a current limitation of the BRET assays is the assessment of recruitment of isolated LXXLL co-activator motif peptides rather than native co-activators, and may also explain differences in potency or efficacy between the two systems. In future developments of this technology, receptor interacting domains for different co-activators could also be tested alternatively to isolated LXXLL motifs.

In summary, direct measurements of co-activator recruitment potency and efficacy using PCA-BRET sensor assays provides rapid and sensitive measures of intrinsic pharmacological properties of ligands at specific NR complexes in live cells that can be complemented by observation of conformational changes in the PCA assays. These assays possess many advantages compared to presently available assays that monitor NR activity. Short exposure to ligands (20-30 min) minimizes interference caused by the toxicity of some compounds in assays requiring longer incubations. In addition, BRET-based assays do not require light excitation as opposed to fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based assays, and so are not subjected to quenching or autofluorescence. They generate low background signals and high signal-to-noise ratios. The low variability and high reproducibility of PCA-BRET assays

using spectrometric detection are important assets for future amenability of these assays to high throughput screening.

A new generation of selective modulators of heterodimers, such as LG1506, has been developed that separate the physiological activities of the RXR and its partner receptor and might be considered part of the so-called specific NR modulators group (de Lera, Bourguet et al. 2007). However, no precise structural rules have yet emerged to guide chemical engineering of heterodimer-specific ligands for drug design. The present technology should prove useful to identify new compounds with specificity for individual dimeric species formed by RXRs.

Acknowledgments

We thank Drs Hyroyuki Kagechika and Koichi Shudo (School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University and Research Foundation Itsuu Laboratory, Tokyo, Japan) for generously providing HX600, HX630 and HX531 compounds and Dr Jacques Drouin (Institut de Recherche Clinique de Montréal, IRCM) for β RARE DR-5 element plasmid construct. We also thank Dr Michel Bouvier's Lab members at the Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie (IRIC) of the University of Montreal for helpful discussions for BRET-based assay optimizations. This work was supported by a grant from the "Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament (GRUM)" at Université de Montréal to DL and by a grant from the Canadian Institute for Health Research to SM.

Disclosure

The authors declare no conflict of interest.

Table 2. Pharmacological characterization of rexinoids for recruitment of a co-activator motif to RXR γ , RXR γ /RXR γ , Nur77/RXR γ and Nurr1/RXR γ complexes in BRET and PCA-BRET assays.

Drug	RXR \square -RLuc		RXR \square -F1/F2-RXR \square		Nur77-F1/F2-RXR \square		Nurr1-F1/F2-RXR \square		Literature ^a	
	EC ₅₀ (nM)	E _{MAX} (%)	EC ₅₀ (nM)	E _{MAX} (%)	EC ₅₀ (nM)	E _{MAX} (%)	EC ₅₀ (nM)	E _{MAX} (%)	EC ₅₀ (nM)	Ref.
9- <i>cis</i> RA	22 ± 8	100 ± 1	40 ± 11	100 ± 2	27 ± 12	100 ± 2	26 ± 2	100 ± 2	10-150	(Boehm, McClurg et al. 1994, Umemiya, Fukasawa et al. 1997, Goldstein, Dobrzyn et al. 2003, Morita, Kawana et al. 2005, Farmer, Marron et al. 2006)
HX600	577 ± 164	56 ± 8	187 ± 13	33 ± 3	288 ± 151	57 ± 5	ND	ND	500-1000	(Umemiya, Fukasawa et al. 1997, Morita, Kawana et al. 2005)
HX630	727 ± 125	79 ± 7	966 ± 162	61 ± 2	584 ± 50	97 ± 12	356 ± 81	79 ± 1	620	(Umemiya, Fukasawa et al. 1997)
SR11237	30 ± 4	84 ± 4	214 ± 73	87 ± 7	5.6 ± 4.7	38 ± 8	144 ± 26	71 ± 5	232	(Takamatsu, Takano et al. 2008)
Bexarotene	9 ± 7	67 ± 12	2 ± 1	70 ± 13	1.1 ± 0.5	50 ± 13	13 ± 6	94 ± 12	5-30	(Boehm, Zhang et al. 1994, Boehm, Zhang et al. 1995, Umemiya, Fukasawa et al. 1997, Takamatsu, Takano et al. 2008)
Fluorobexarotene	0.7 ± 0.2	97 ± 13	5 ± 2	102 ± 14	1.5 ± 1.3	93 ± 7	8 ± 3	100 ± 10	43	(Wagner, Jurutka et al.

LG268	0.4 ± 0.2	95 ± 7	0.2 ± 0.1	75 ± 6	5.8 ± 5.7	69 ± 15	1.6 ± 1.2	38 ± 7	4-40	2009) (Boehm, Zhang et al. 1995, Michellys, D'Arrigo et al. 2004, Leibowitz, Ardecky et al. 2006)
XCT0135908	ND	ND	486 ± 19	18 ± 1	148 ± 90	31 ± 3	181 ± 54	32 ± 2	NA	-
LG1506	196 ± 80	38 ± 4	76 ± 12	19 ± 3	93 ± 67	19 ± 5	ND	ND	4-11	(Michellys, D'Arrigo et al. 2004, Leibowitz, Ardecky et al. 2006)
DHA	> 5 000	ND	> 5 000	ND	> 5 000	ND	ND	ND	>5000	(Mata de Urquiza, Liu et al. 2000, Goldstein, Dobrzyn et al. 2003)
HX531 ^b	2400 ± 200	ND	> 5 000	ND	> 5 000	ND	ND	ND	400-900	(Sakaki, Konishi et al. 2007, Morishita, Yakushiji et al. 2009)
UVI3003 ^b	193 ± 37	ND	328 ± 160	ND	293 ± 63	ND	ND	ND	~300	(Nahoum, Perez et al. 2007)

^a EC₅₀ or inhibitory constant (K_i) values were obtained by gene reporter assays for the RXR γ isoform from cited literature references; ^b values correspond to IC₅₀ for 9-*cis* RA (50 nM) competition. Values represent means ± SEM from 3-5 independent experiments. Abbreviations: EC₅₀ = effective concentration at 50% of maximal activity; E_{max} = maximal response in percent (%) compared to 9-*cis* RA; NA, not available; ND = not determined; 9-*cis* RA = 9-*cis* retinoic acid; DHA = docosahexaenoic acid. Retinoid pharmacological data can also

be found in the in-depth review published by Dawson and Xia (Dawson and Xia 2012). $EC_{50} > 5000$ nM indicates that curve fitting did not converge at the concentration range used.

Table 3. Pharmacological characterization of rexinoids in a Nur77 / RXR γ gene reporter assay¹.

Drug	EC₅₀ (nM)	E_{max} (%)
9- <i>cis</i> RA	60 ± 16	100 ± 4
HX600	1180 ± 230	25 ± 9
HX630	104 ± 33	30 ± 5
SR11237	28 ± 9	40 ± 10
Bexarotene	45 ± 26	53 ± 10
Fluorobexarotene	28 ± 16	32 ± 4
LG268	24 ± 23	44 ± 4
XCT0135908	2980 ± 670	48 ± 15

¹ for a DR-5 reporter element in HEK-293T cells. Values represent means ± SEM from 3-4 independent experiments. EC_{50} = effective concentration at 50% of maximal activity; E_{max} = maximal response in percent (%) compared to 9-*cis* RA.

Figures

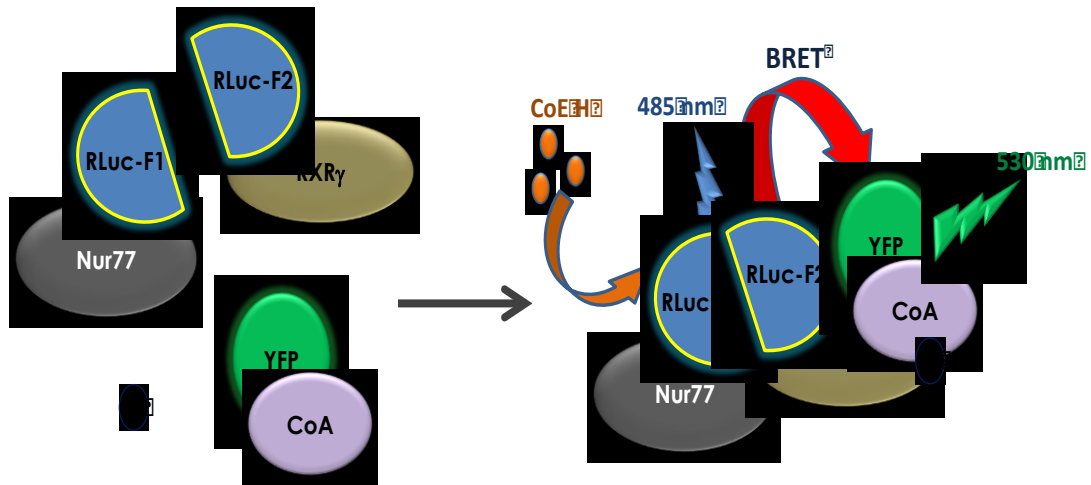


Figure 11. Schematic representation of the PCA-BRET assay.

In the protein fragment complementation assay (PCA-BRET), split *Renilla Luciferase* (Luc) fragments are fused to Nur77 and RXR γ , respectively, to generate Nur77-Luc-F1 (Nur77-F1) and RXR γ -Luc-F2 (RXR γ -F2) constructs. Upon hetero-dimerization, Luc fragments will complement and the reconstituted Luc will emit light in the presence of its substrate Coelenterazine H (CoE H) with an emission peak at 485 nm. In the presence of an agonist (A), the nuclear receptor complex will recruit the co-activator motif fused to the yellow fluorescent protein (CoA-YFP) and the energy will be transferred from the reconstituted Luc to the YFP, resulting in a second light emission peak at 530 nm. Since nuclear receptor dimerization is mandatory to trigger Luc reconstitution and initiate energy transfer, this assay detects ligand activation of a specific dimer.

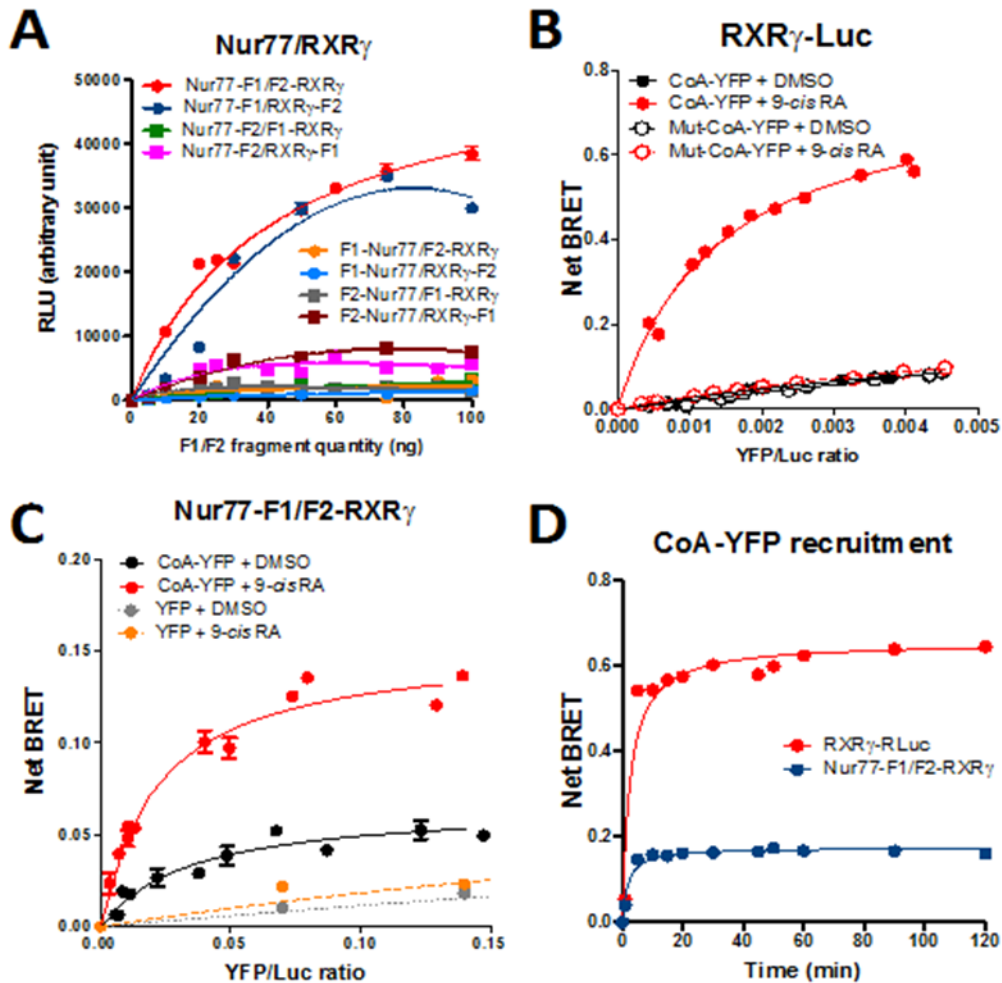


Figure 12. A PCA assay for RXR dimer complexes.

(A) To identify the constructs that will give an optimal bioluminescent signal in the PCA-BRET assay, HEK-293T cells were transiently transfected with increasing amounts of the indicated nuclear receptors and split *Renilla luciferase* (Luc) constructs (combinations of Luc-F1 and -F2 fragments). Luc activity was measured 48 hours following transfection. Luc bioluminescent signals (relative light units, RLU) were measured upon coelenterazine H

exposure and light detection at 485 nm. **(B)** In order to determine the specificity of the CoA recruitment of Nur77-F1/F2-RXR γ complex, HEK-293T cells were co-transfected with a constant amount of RXR γ - (RXR γ -Luc) (10 ng) and increasing amounts of the tagged co-activator motif (CoA-YFP) or a mutant version of the motif (Mut-CoA-YFP) (0 to 100 ng), in which leucine were replaced by alanine residues (AXXAA), in the presence of vehicle (DMSO) or RXR agonist 9-*cis* retinoic acid (9-*cis* RA, 1 μ M). The YFP/Luc ratio represents the fluorescence emitted by the energy acceptor (Mut-CoA-YFP) over luminescence emitted by the energy donor (Nur77-F1/F2-RXR γ) (Fluorescence/Luminescence light emission). BRET signals were measured upon coelenterazine H exposure and light detection at 530 nm, 48 hours following transfection. **(C)** In the PCA-BRET assay, titrations of constant amounts of Nur77-F1 (35 ng) and F2-RXR γ (35 ng) constructs with increasing amounts of CoA-YFP or only the YFP protein (0 to 100 ng) in the presence of DMSO or 9-*cis* RA (1 μ M) were performed. The YFP/Luc ratio represents the fluorescence emitted by the energy acceptor (CoA-YFP) over luminescence emitted by the energy donor (Nur77-F1/F2-RXR γ) (Fluorescence/Luminescence light emission). The curves were fitted using nonlinear regression analysis. **(D)** Comparison of RXR γ -Luc and Nur77-F1/F2-RXR γ co-activator recruitment kinetics. HEK-293T cells were treated 48h after transfection with 9-*cis* RA (1 μ M). BRET (RXR γ -Luc) and PCA-BRET (Nur77-F1/F2-RXR γ) signals were measured from 0 to 120 min after addition of the Luc substrate coelenterazine H. Data represent means \pm SEM of three experiments conducted in quadruplicate. BRET signals were normalized with the signal of each group treated with vehicle (DMSO). BRET signal generation is very fast and remains stable for up to 2 hours.

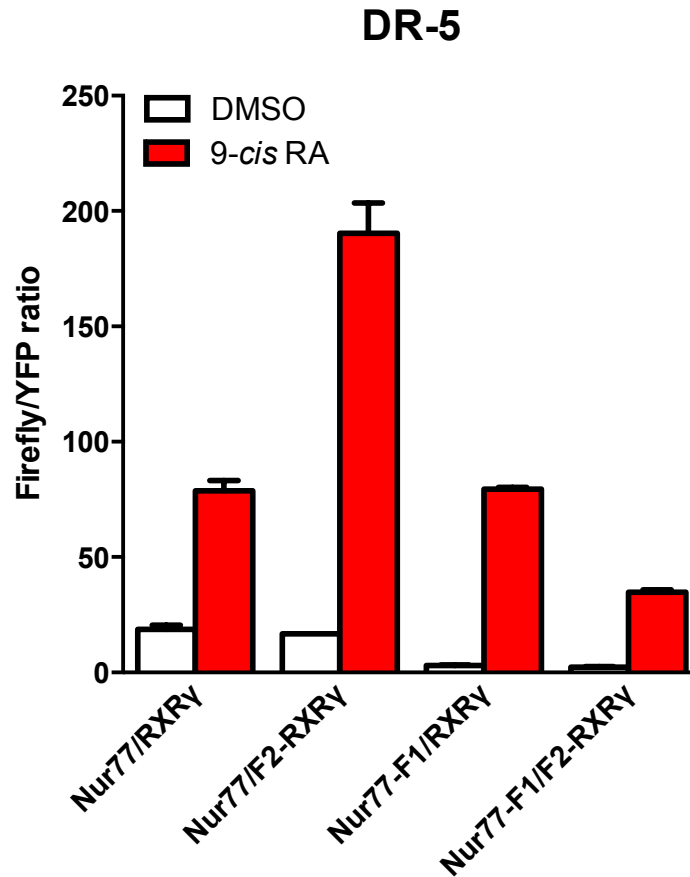


Figure 13. Nuclear receptor-Luc fusion constructs remain transcriptionally active.

Histogram bars represent relative transcriptional activity of nuclear receptor constructs used to generate PCA-BRET sensor assays and native Nur77 and RXR γ upon exposure with DMSO or 9-*cis* RA (1 μ M) at a previously characterized DR-5 response element in HEK-293T cells. As a control, cells were transfected with the same amount of pcDNA3.1 plasmid. Values represent mean Firefly/YFP ratios \pm SEM (N = 3).

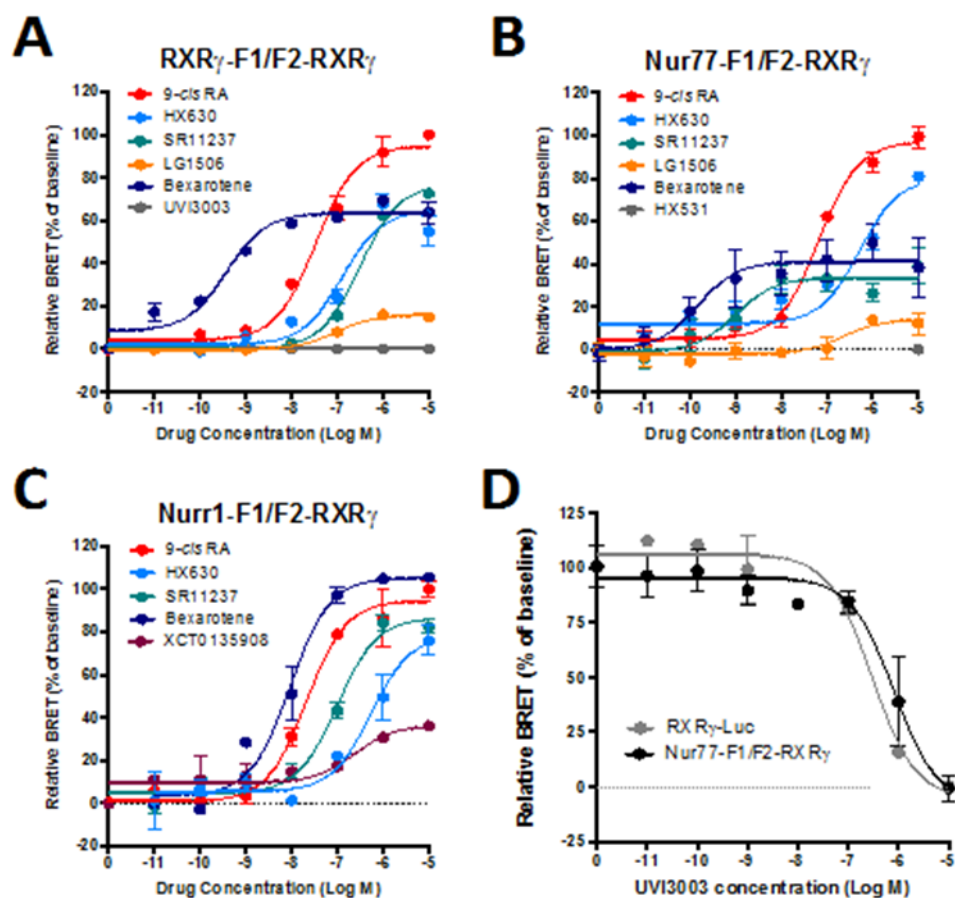


Figure 14. Differential activity of RXR ligands on specific RXR dimeric complexes.

HEK-293T cells were co-transfected with RXR γ -F1 and F2-RXR γ (A), Nur77-F1 and F2-RXR γ (B) or Nurr1-F1 and F2-RXR γ (35 ng for all constructs) (C), and the CoA-YFP construct (30 ng). Cells were treated with increasing concentrations of the indicated RXR ligands for 20 min. BRET signals were measured at 530 nm immediately following addition of coelenterazine H. Data are expressed as percent (%) of basal net BRET signal (relative BRET). Each data point represents means \pm SEM of quadruplicate. Each curve is representative of 3-5 independent experiments. Curves were fitted using nonlinear regression

analysis to determine 50% effective concentration (EC_{50}) and maximal capacity (E_{max}) of the compounds (pharmacological parameters can be found in Table 1). **(D)** For competition curves, HEK-293T cells were co-transfected with RXR γ -Luc or Nur77-F1 and F2-RXR γ , and the CoA-YFP construct. Cells were then treated with increasing concentrations of the RXR antagonist UVI3003 for 20 min in the presence of 9-*cis* RA at 50 nM. Data are expressed as percent (%) of baseline BRET signal and represent means \pm SEM from 3 experiments conducted in quadruplicate. Curves were fitted using nonlinear regression analysis to determine 50% inhibitory concentration (IC_{50}).

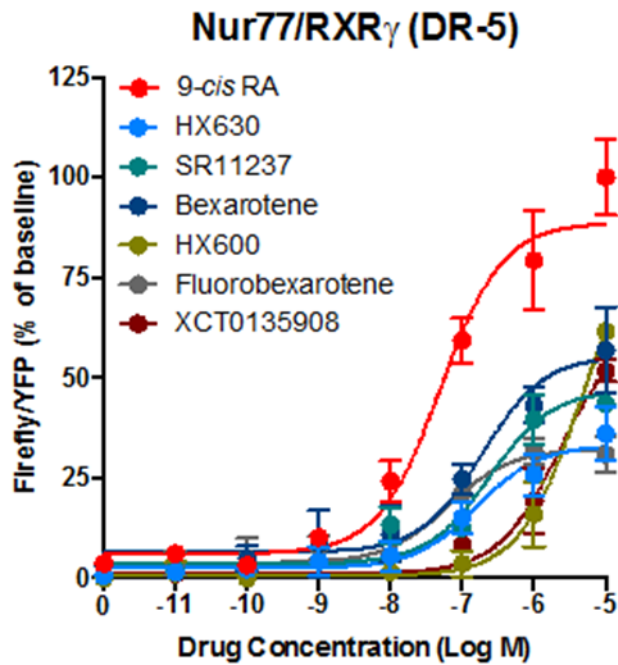


Figure 15. Retinoid transactivation dose-response curves on a DR-5 element.

Dose-response curves were obtained by exposure to increasing concentrations of rexinoids in a gene reporter assay after co-transfection of Nur77, RXR γ and a reporter gene containing a DR-5 responsive element in HEK-293T cells. Data points represent means \pm SEM expressed in percent of baseline Firefly/YFP ratios. These curves are representative of 3-5 independent experiments (pharmacological parameters can be found in Table 2).

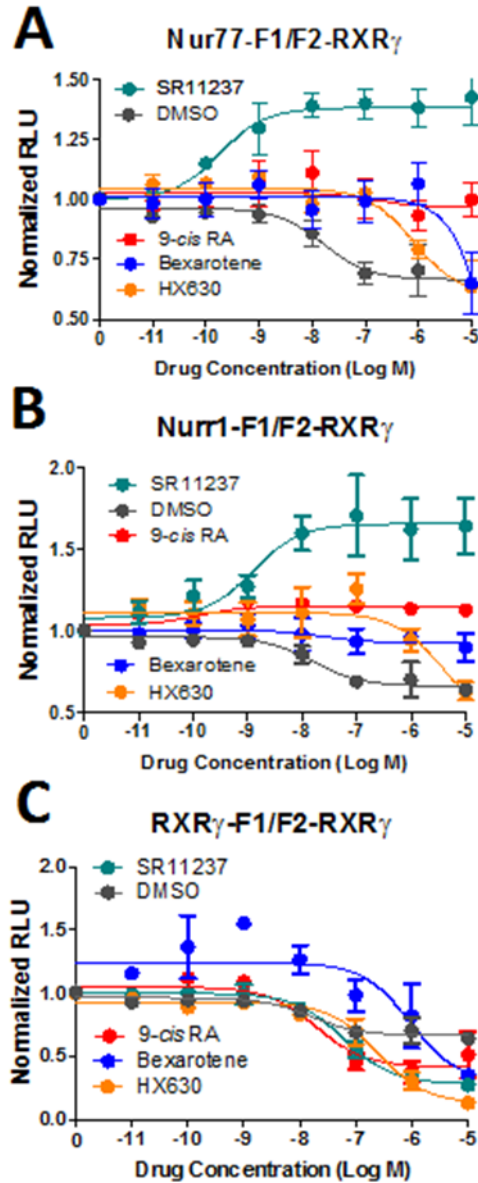


Figure 16. Effect of rexinoids on dimer conformation.

HEK-293T cells were co-transfected with Nur77-F1 (A), Nurr1-F1 (B) or RXR γ -F1 (C), and F2-RXR γ . Cells were then treated with increasing concentrations of RXR ligands or vehicle (DMSO) for 20 min. Data represent means \pm SEM from 3 independent experiments

conducted in quadruplicate. Values are expressed as normalized relative light units (RLU) obtained at 485 nm.

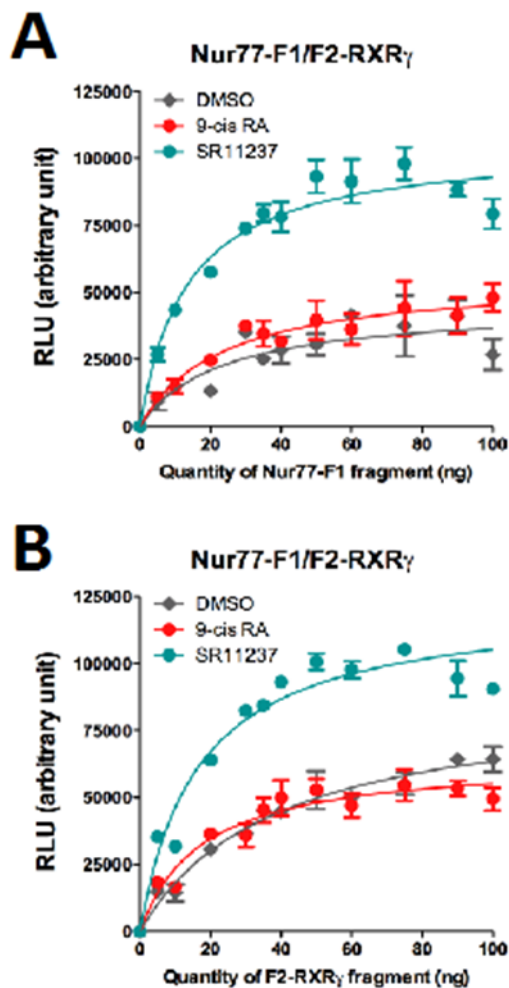


Figure 17. Titration curves for Nur77-F1 and F2-RXR γ fragments.

Cells were co-transfected with a constant amount of F2-RXR γ (35 ng) and an increasing amount of Nur77-F1 (0 to 100 ng) (A) or a constant amount of Nur77-F1 (35 ng) and an increasing amount of F2-RXR γ (0 to 100 ng) (B) in the presence of vehicle (DMSO),

SR11237 (1 μ M) or 9-*cis* RA (1 μ M) for 20 min. Data represent means \pm SEM from 3 independent experiments conducted in triplicata. Values are expressed as relative light units (RLU) obtained at 485 nm. Curves were fitted using nonlinear regression analysis.

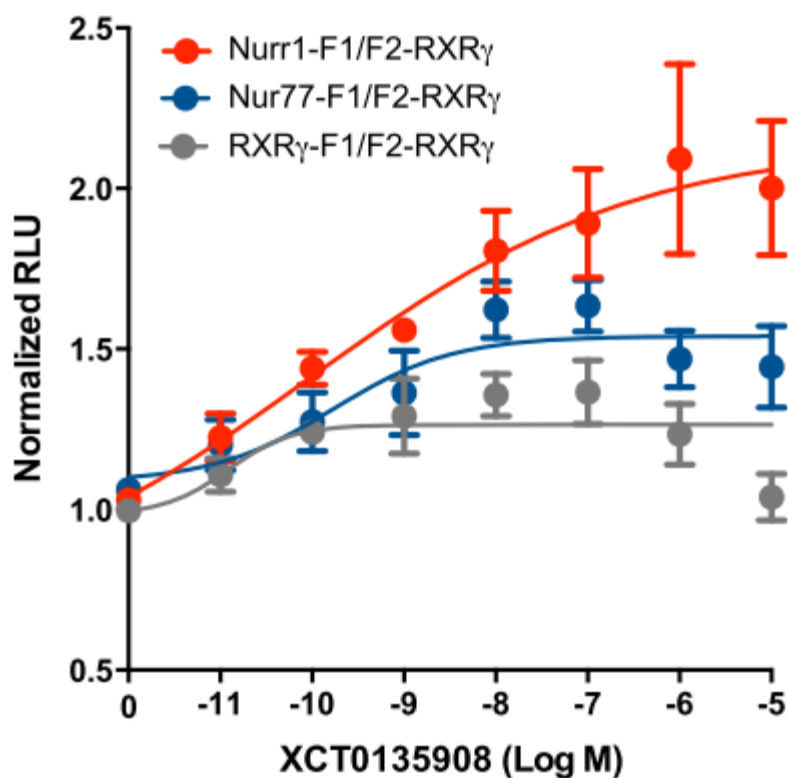


Figure 18. XCT0135908 induces a distinct Nurr1/RXR γ complex conformation.

HEK-293T cells were co-transfected with Nur77-F1, Nurr1-F1 or RXR γ -F1, and F2-RXR γ . Cells were then treated with increasing concentrations of XCT0125908 for 20 min. Data represent means \pm SEM from 5-8 independent experiments conducted in quadruplicata. Values are expressed as normalized relative light units (RLU) obtained at 485 nm.

Supplementary methods

Microscopy

Lived imaging was carried out on a DeltaVision Elite widefield microscope system (GE Healthcare/Applied Precision, Issaquah, Washington, USA) equipped with a CoolSnap HQ2 camera (Photometrics, Tucson, AZ) and a 60X PlanApo oil immersion objective (Olympus, Richmond Hill, ON, Canada), at room temperature, using Softworx acquisition software (GE Healthcare/Applied Precision, Issaquah, Washington, USA). HEK-293T cells were transfected with CoA-YFP, Nur77-F1 and F2-RXR γ in the same conditions as previously described. YFP and Hoechst signals were detected 48 h later using appropriate filters.

Supplementary figures

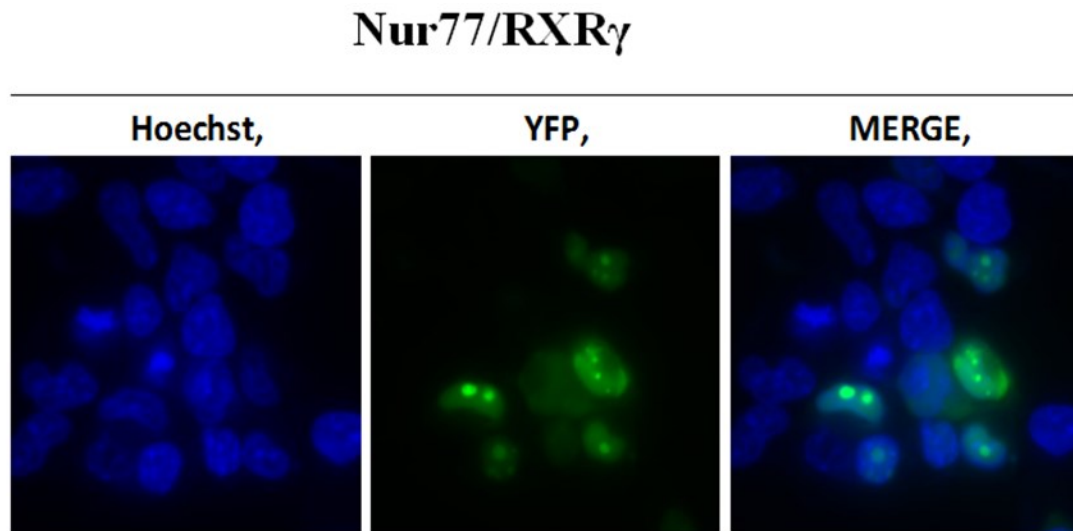


Figure S1. Nuclear localization of the CoA-YFP motif.

Fluorescent microscopy for detection of CoA-YFP (green) and the nucleus marker Hoechst (blue). HEK-293T cells were transfected with CoA-YFP, Nur77-F1 and F2-RXR γ in the same conditions as previously described. YFP and Hoechst signals were detected 48 h later using appropriate filters.

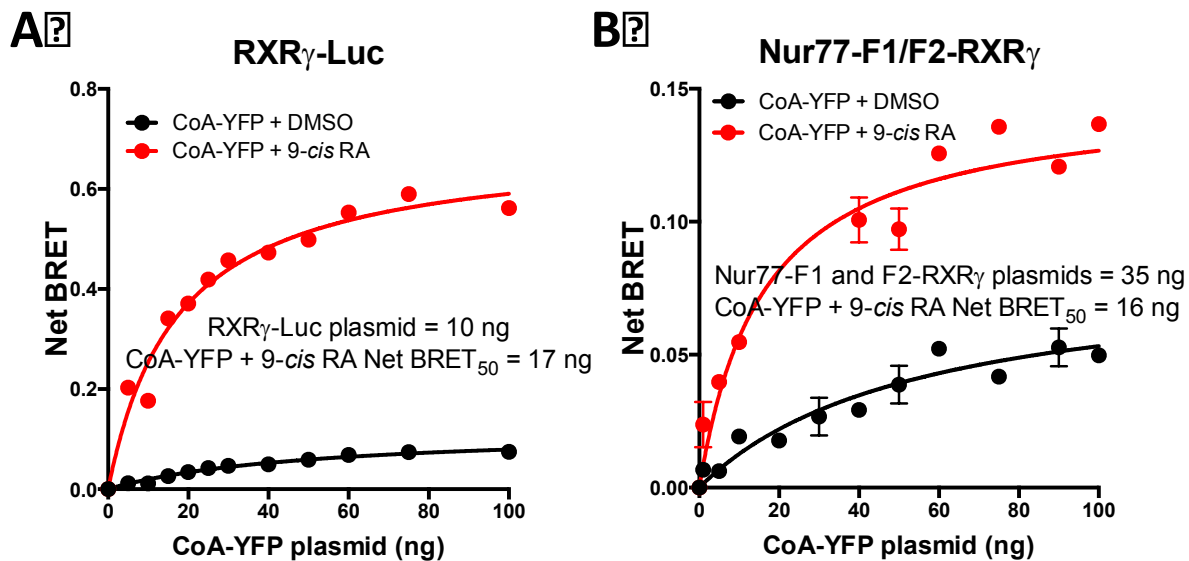


Figure S2. Comparison of co-activator motif recruitment in simple BRET and PCA-BRET assays.

(A) HEK-293T cells were co-transfected with a constant amount of the RXR γ -Luc (10 ng) construct with increasing amounts of the co-activator (CoA-YFP) (0 to 100 ng) in the presence of vehicle only (DMSO) or 9-*cis* RA (1 μ M). (B) HEK-293T cells were co-transfected with a constant amount of the Nur77-F1 and F2-RXR γ (35 ng each) constructs with increasing amounts of the co-activator (CoA-YFP) (0 to 100 ng) in the presence of vehicle only (DMSO) or 9-*cis* RA (1 μ M). The curves were fitted using nonlinear regression analysis. Note that net BRET₅₀ signals for CoA-YFP recruitment in the presence of 9-*cis* RA are similar (17 and 16 ng) in the BRET and PCA-BRET configurations. For comparison, net BRET₅₀ signals for CoA-YFP recruitment in the presence of DMSO are 51 and 55 ng for RXR γ -Luc and Nur77-F1/F2-RXR γ constructs, respectively.

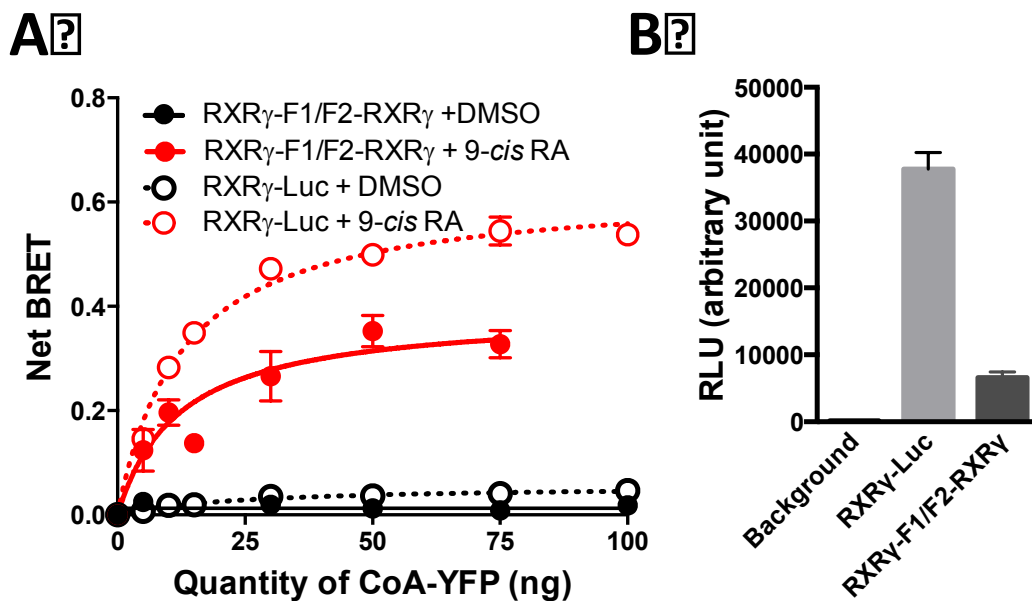


Figure S3. Comparison between RXR γ -Luc and RXR γ -F1/F2-RXR γ BRET assays.

(A) HEK-293T cells were co-transfected with a constant amount of the RXR γ -Luc (10 ng) or RXR γ -F1/F2-RXR γ (35 ng) constructs with increasing amounts of the co-activator (CoA-YFP) motif (0 to 100 ng) in the presence of vehicle only (DMSO) or 9-*cis* RA (1 μ M). The curves were fitted using nonlinear regression analysis. Net BRET₅₀ values for CoA-YFP recruitment in the presence of 9-*cis* RA are 12 and 13 ng for RXR γ -Luc and RXR γ -F1/F2-RXR γ **(B)** Representative comparison of luciferase light emission at 485 nm by the RXR γ -Luc and reconstituted split Luc from the RXR γ -F1/F2-RXR γ constructs. Reconstituted split Luc generated a light emission that is reduced by about 6-fold compared to RXR γ -Luc construct. Background activity levels represent 127 ± 7 RLU.

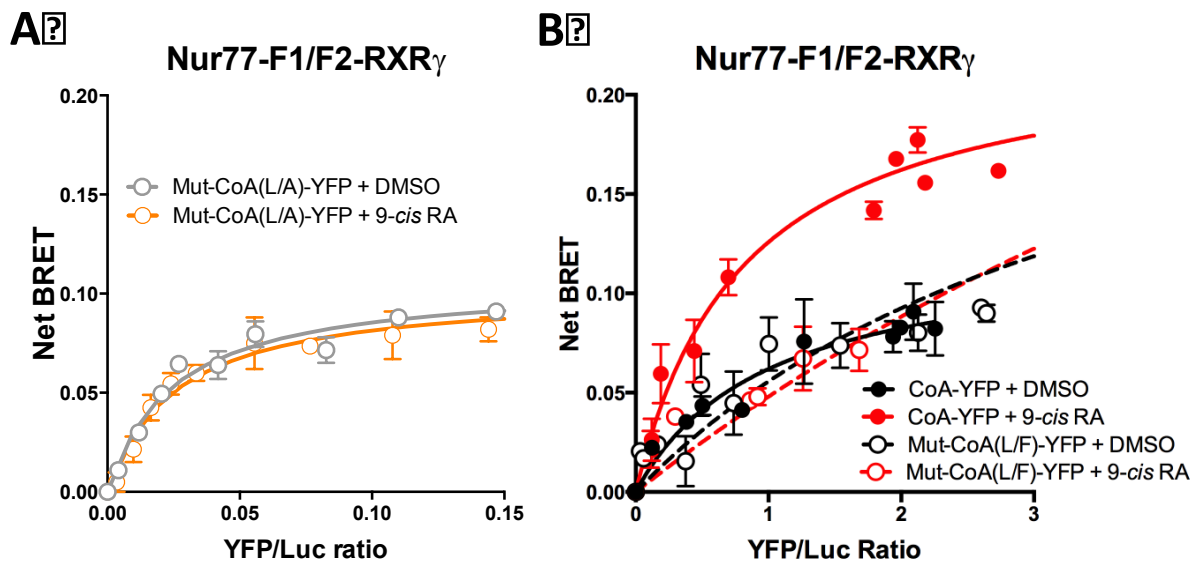


Figure S4. Mutated co-activator motif recruitment by Nur77-F1/F2-RXR γ is ligand independent or produced a non specific BRET signal.

HEK-293T cells were co-transfected with a constant amount of Nur77-F1 (35 ng) and F2-RXR γ (35 ng) constructs with **(A)** increasing amounts of the mutated CoA motif in which leucine (L) were replaced by alanine (A) residues (AXXAA) (CoA(L/A)-YFP) (0 to 100 ng) or **(B)** increasing amounts of the native CoA-YFP motif (LXXLL) or mutated motif in which leucine (L) were replaced by phenylalanine (F) (FXXFF) (CoA(L/F)-YFP) (0 to 100 ng) in the presence of vehicle only (DMSO) or 9-*cis* RA (1 μ M). The YFP/Luc ratio represents the fluorescence emitted by the energy acceptor (CoA-YFP or Mut-CoA-YFP) over luminescence emitted by the energy donor (Nur77-F1/F2-RXR γ) (Fluorescence/Luminescence light emission). The curves were fitted using nonlinear regression analysis.

References

1. Bookout, A. L., Jeong, Y., Downes, M., Yu, R. T., Evans, R. M., and Mangelsdorf, D. J. (2006) Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* **126**, 789-799
2. Gronemeyer, H., Gustafsson, J. A., and Laudet, V. (2004) Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 950-964
3. Gurevich, I., Flores, A. M., and Aneskievich, B. J. (2007) Corepressors of agonist-bound nuclear receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **223**, 288-298
4. Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M. G. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* **387**, 733-736
5. Burris, T. P., Solt, L. A., Wang, Y., Crumbley, C., Banerjee, S., Griffett, K., Lundasen, T., Hughes, T., and Kojetin, D. J. (2013) Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators. *Pharmacol. Rev.* **65**, 710-778
6. Zhao, Y., and Bruemmer, D. (2009) NR4A Orphan Nuclear Receptors in Cardiovascular Biology. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* **6**, e43-e48
7. Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., and Laudet, V. (2006) Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol. Rev.* **58**, 685-704
8. Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., Stein, R. B., Eichele, G., Evans, R. M., and Thaller, C. (1992) 9-*cis* retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* **68**, 397-406

9. Mata de Urquiza, A., Liu, S., Sjöberg, M., Zetterström, R. H., Griffiths, W., Sjövall, J., and Perlmann, T. (2000) Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* **290**, 2140-2144
10. Forman, B. M., Umesono, K., Chen, J., and Evans, R. M. (1995) Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* **81**, 541-550
11. Mangelsdorf, D. J., and Evans, R. M. (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**, 841-850
12. Maxwell, M. A., and Muscat, G. E. O. (2005) The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl. Recept. Signal.* **4**, e002 Epub
13. Safe, S., Jin, U. H., Hedrick, E., Reeder, A., and Lee, S. O. (2014) Minireview: role of orphan nuclear receptors in cancer and potential as drug targets. *Mol. Endocrinol.* **28**, 157-172
14. Wilson, T. E., Fahrner, T. J., Johnston, M., and Milbrandt, J. (1991) Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* **252**, 1296-1300
15. Philips, A., Lesage, S., Gingras, R., Maira, M.-H., Gauthier, Y., Hugo, P., and Drouin, J. (1997) Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5946-5951
16. Maira, M., Martens, C., Philips, A., and Drouin, J. (1999) Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7549-7557
17. Perlmann, T., and Jansson, L. (1995) A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev.* **9**, 769-782

18. Zetterström, R. H., Solomin, L., Mitsiadis, T., Olson, L., and Perlmann, T. (1996) Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Mol. Endocrinol.* **10**, 1656-1666
19. Flaig, R., Greschik, H., Peluso-Iltis, C., and Moras, D. (2005) Structural basis for the cell-specific activities of the NGFI-B and the Nurr1 ligand-binding domain. *J. Biol. Chem.* **280**, 19250-19258
20. Wang, Z., Benoit, G., Liu, J., Prasad, S., Aarnisalo, P., Liu, X., Xu, H., Walker, N. P., and Perlmann, T. (2003) Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* **423**, 555-560
21. Wansa, K. D. S. A., Harris, J. M., and Muscat, G. E. (2002) The activation function-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity, and coactivator recruitment. *J. Biol. Chem.* **277**, 33001-33011
22. Zhan, Y., Du, X., Chen, H., Liu, J., Zhao, B., Huang, D., Li, G., Xu, Q., Zhang, M., Weimer, B. C., Chen, D., Cheng, Z., Zhang, L., Li, Q., Li, S., Zheng, Z., Song, S., Huang, Y., Ye, Z., Su, W., Lin, S. C., Shen, Y., and Wu, Q. (2008) Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 548-556
23. Dubois, C., Hengerer, B., and Mattes, H. (2006) Identification of a potent agonist of the orphan nuclear receptor Nurr1. *ChemMedChem* **1**, 955-958
24. Li, X., Lee, S. O., and Safe, S. (2012) Structure-dependent activation of NR4A2 (Nurr1) by 1,1-bis(3'-indolyl)-1-(aromatic)methane analogs in pancreatic cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 1445-1155

25. Chao, L. C., Zhang, Z., Pei, L., Saito, T., Tontonoz, P., and Pilch, P. F. (2007) Nur77 coordinately regulates expression of genes linked to glucose metabolism in skeletal muscle. *Mol. Endocrinol.* **21**, 2152-2163
26. Pei, L. M., Waki, H., Vaitheesvaran, B., Wilpitz, D. C., Kurland, I. J., and Tontonoz, P. (2006) NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism. *Nat. Med.* **12**, 1048-1055
27. Martin, L. J., and Tremblay, J. J. (2010) Nuclear receptors in Leydig cell gene expression and function. *Biol. Reprod.* **83**, 3-14
28. Wallen-Mackenzie, A., de Urquiza, A. M., Petersson, S., Rodriguez, F. J., Friling, S., Wagner, J., Ordentlich, P., Lengqvist, J., Heyman, R. A., Arenas, E., and Perlmann, T. (2003) Nurr1-RXR heterodimers mediate RXR ligand-induced signaling in neuronal cells. *Genes & Development* **17**, 3036-3047
29. Kadkhodaei, B., Ito, T., Joodmardi, E., Mattsson, B., Rouillard, C., Carta, M., Muramatsu, S., Sumi-Ichinose, C., Nomura, T., Metzger, D., Chambon, P., Lindqvist, E., Larsson, N. G., Olson, L., Bjorklund, A., Ichinose, H., and Perlmann, T. (2009) Nurr1 is required for maintenance of maturing and adult midbrain dopamine neurons. *J. Neurosci.* **29**, 15923-15932
30. Lévesque, D., and Rouillard, C. (2007) Nur77 and retinoid X receptors: crucial factors in dopamine-related neuroadaptation. *Trends Neurosci.* **30**, 22-30
31. Ethier, I., Kagechika, H., Shudo, K., Rouillard, C., and Lévesque, D. (2004) Docosahexaenoic acid reduces haloperidol-induced dyskinesias in mice: Involvement of Nur77 and retinoid receptors. *Biol. Psychiatry* **56**, 522-526

32. Stefan, E., Aquin, S., Berger, N., Landry, C. R., Nyfeler, B., Bouvier, M., and Michnick, S. W. (2007) Quantification of dynamic protein complexes using Renilla luciferase fragment complementation applied to protein kinase A activities *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 16916-16921
33. Paulmurugan, R., and Gambhir, S. S. (2003) Monitoring protein-protein interactions using split synthetic renilla luciferase protein-fragment-assisted complementation. *Anal. Chem.* **75**, 1584-1589
34. Michnick, S. W., Ear, P. H., Manderson, E. N., Remy, I., and Stefan, E. (2007) Universal strategies in research and drug discovery based on protein-fragment complementation assays. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 569-582
35. Martel, C., Dugre-Brisson, S., Boulay, K., Breton, B., Lapointe, G., Armando, S., Trepanier, V., Duchaine, T., Bouvier, M., and Desgroseillers, L. (2010) Multimerization of Stauf1 in live cells. *RNA* **16**, 585-597
36. Llopis, J., Westin, S., Ricote, M., Wang, Z., Cho, C. Y., Kurokawa, R., Mullen, T. M., Rose, D. W., Rosenfeld, M. G., Tsien, R. Y., and Glass, C. K. (2000) Ligand-dependent interactions of coactivators steroid receptor coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor binding protein with nuclear hormone receptors can be imaged in live cells and are required for transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4363-4368
37. Lupien, M., Jeyakumar, M., Hebert, E., Hilmi, K., Cotnoir-White, D., Loch, C., Auger, A., Dayan, G., Pinard, G. A., Wurtz, J. M., Moras, D., Katzenellenbogen, J., and Mader, S. (2007) Raloxifene and ICI182,780 increase estrogen receptor- α association with a nuclear compartment via overlapping sets of hydrophobic amino acids in activation function 2 helix 12. *Mol. Endocrinol.* **21**, 797-816

38. Pflieger, K. D., and Eidne, K. A. (2006) Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat. Methods* **3**, 165-174
39. Duplessis, T. T., Koterba, K. L., and Rowan, B. G. (2009) Detection of ER α -SRC-1 interactions using bioluminescent resonance energy transfer. *Methods Mol. Biol.* **590**, 253-263
40. Koterba, K. L., and Rowan, B. G. (2006) Measuring ligand-dependent and ligand-independent interactions between nuclear receptors and associated proteins using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). *Nucl. Recept. Signal.* **4**, e021
41. Goldstein, J. T., Dobrzyn, A., Clagett-Dame, M., Pike, J. W., and DeLuca, H. F. (2003) Isolation and characterization of unsaturated fatty acids as natural ligands for the retinoid-X receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* **420**, 185-193
42. Umemiya, H., Fukasawa, H., Ebisawa, M., Eyrolles, L., Kawachi, E., Eisenmann, G., Gronemeyer, H., Hashimoto, Y., Shudo, K., and Kagechika, H. (1997) Regulation of retinoidal actions by diazepinylbenzoic acids. Retinoid synergists which activate the RXR-RAR heterodimers. *J. Med. Chem.* **40**, 4222-4234
43. Morishita, K., Yakushiji, N., Ohsawa, F., Takamatsu, K., Matsuura, N., Makishima, M., Kawahata, M., Yamaguchi, K., Tai, A., Sasaki, K., and Kakuta, H. (2009) Replacing alkyl sulfonamide with aromatic sulfonamide in sulfonamide-type RXR agonists favors switch towards antagonist activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 1001-1003
44. Sakaki, J., Konishi, K., Kishida, M., Gunji, H., Kanazawa, T., Uchiyama, H., Fukaya, H., Mitani, H., and Kimura, M. (2007) Synthesis and structure-activity relationship of RXR antagonists based on the diazepinylbenzoic acid structure. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 4808-4811

45. Nahoum, V., Perez, E., Germain, P., Rodriguez-Barrios, F., Manzo, F., Kammerer, S., Lemaire, G., Hirsch, O., Royer, C. A., Gronemeyer, H., de Lera, A. R., and Bourguet, W. (2007) Modulators of the structural dynamics of the retinoid X receptor to reveal receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 17323-17328
46. Lippert, W. P., Burschka, C., Gotz, K., Kaupp, M., Ivanova, D., Gaudon, C., Sato, Y., Antony, P., Rochel, N., Moras, D., Gronemeyer, H., and Tacke, R. (2009) Silicon analogues of the RXR-selective retinoid agonist SR11237 (BMS649): chemistry and biology. *ChemMedChem* **4**, 1143-1152
47. Mulero, M., Perroy, J., Federici, C., Cabello, G., and Ollendorff, V. (2013) Analysis of RXR/THR and RXR/PPARG2 heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *PLoS One* **8**, e84569
48. McFarland, K., Spalding, T. A., Hubbard, D., Ma, J. N., Olsson, R., and Burstein, E. S. (2013) Low dose bexarotene treatment rescues dopamine neurons and restores behavioral function in models of Parkinson's disease. *ACS Chem. Neurosci.* **4**, 1430-1438
49. Egea, P. F., Mitschler, A., and Moras, D. (2002) Molecular Recognition of Agonist Ligands by RXRs. *Mol. Endocrinol.* **16**, 987-997
50. de Lera, A. R., Bourguet, W., Altucci, L., and Gronemeyer, H. (2007) Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 811-820
51. Farmer, L. J., Marron, K. S., Canan Koch, S. S., Hwang, C. K., Kallel, E. A., Zhi, L., Nadzan, A. M., Robertson, D. W., and Bennani, Y. L. (2006) Aza-retinoids as novel retinoid X receptor-specific agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 2352-2356

52. Morita, K., Kawana, K., Sodeyama, M., Shimomura, L., Kagechika, H., and Makishima, M. (2005) Selective allosteric ligand activation of the retinoid X receptor heterodimers of NGFI-B and Nurr1. *Biochem. Pharmacol.* **71**, 98-107
53. Boehm, M. F., McClurg, M. R., Pathirana, C., Mangelsdorf, D., White, S. K., Hebert, J., Winn, D., Goldman, M. E., and Heyman, R. A. (1994) Synthesis of high specific activity [³H]-9-*cis*-retinoic acid and its application for identifying retinoids with unusual binding properties. *J. Med. Chem.* **37**, 408-414
54. Takamatsu, K., Takano, A., Yakushiji, N., Morishita, K., Matsuura, N., Makishima, M., Ali, H. I., Akaho, E., Tai, A., Sasaki, K., and Kakuta, H. (2008) Reduction of lipophilicity at the lipophilic domain of RXR agonists enables production of subtype preference: RXR α -preferential agonist possessing a sulfonamide moiety. *ChemMedChem* **3**, 454-460
55. Boehm, M. F., Zhang, L., Zhi, L., McClurg, M. R., Berger, E., Wagoner, M., Mais, D. E., Suto, C. M., Davies, J. A., Heyman, R. A., and Nadzan, A. M. (1995) Design and synthesis of potent retinoid X receptor selective ligands that induce apoptosis in leukemia cells. *J. Med. Chem.* **38**, 3146-3155
56. Boehm, M. F., Zhang, L., Badea, B. A., White, S. K., Mais, D. E., Berger, E., Suto, C. M., Goldman, M. E., and Heyman, R. A. (1994) Synthesis and structure-activity relationships of novel retinoid X receptor-selective retinoids. *J. Med. Chem.* **37**, 2930-2941
57. Wagner, C. E., Jurutka, P. W., Marshall, P. A., Groy, T. L., van der Vaart, A., Ziller, J. W., Furmick, J. K., Graeber, M. E., Matro, E., Miguel, B. V., Tran, I. T., Kwon, J., Tedeschi, J. N., Moosavi, S., Danishyar, A., Philp, J. S., Khamees, R. O., Jackson, J. N., Grupe, D. K., Badshah, S. L., and Hart, J. W. (2009) Modeling, synthesis and biological evaluation of potential retinoid X receptor (RXR) selective agonists: novel analogues of 4-[1-(3,5,5,8,8-

pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydro-2-naphthyl)ethynyl]benzoic acid (bexarotene). *J. Med. Chem.* **52**, 5950-5966

58. Leibowitz, M. D., Ardecky, R. J., Boehm, M. F., Broderick, C. L., Carfagna, M. A., Crombie, D. L., D'Arrigo, J., Etgen, G. J., Faul, M. M., Grese, T. A., Havel, H., Hein, N. I., Heyman, R. A., Jolley, D., Klausning, K., Liu, S., Mais, D. E., Mapes, C. M., Marschke, K. B., Michellys, P. Y., Montrose-Rafizadeh, C., Ogilvie, K. M., Pascual, B., Rungta, D., Tyhonas, J. S., Urcan, M. S., Wardlow, M., Yumibe, N., and Reifel-Miller, A. (2006) Biological characterization of a heterodimer-selective retinoid X receptor modulator: potential benefits for the treatment of type 2 diabetes. *Endocrinology* **147**, 1044-1053

59. Michellys, P. Y., D'Arrigo, J., Grese, T. A., Karanewsky, D. S., Leibowitz, M. D., Mais, D. A., Mapes, C. M., Reifel-Miller, A., Rungta, D., and Boehm, M. F. (2004) Design, synthesis and structure-activity relationship of novel RXR-selective modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 1593-1598

60. Dawson, M. I., and Xia, Z. (2012) The retinoid X receptors and their ligands. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 21-56

Article 2: Rôle de la SUMOylation de Nur77

Contribution du candidat

Le candidat a effectué la majorité des expériences de ce manuscrit. Mme Mareva Faure à quant elle assisté et procédé à plusieurs expériences dans le cadre de ce projet. Le candidat, ainsi que la Dre Sylvie Mader et le Dr Daniel Lévesque ont participé à l'analyse, l'interprétation des résultats et la révision du texte. Ce manuscrit est actuellement en cours de préparation et devrait être soumis à la revue *Journal of Biological Chemistry*.

SUMO2 protein recruitment modulates Nur77 (Nr4a1) interaction with co-activators and response elements

Xavier Giner¹, Mareva Faure¹, Sylvie Mader² and Daniel Lévesque^{1*}

¹ *Faculté de Pharmacie and Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament (GRUM), Université de Montréal and* ² *Institut de Recherche en Immunologie et Cancerologie (IRIC), Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada*

* Corresponding author: Dr Daniel Lévesque, PhD
Faculté de Pharmacie, Université de Montréal,
Pavillon Jean-Coutu, C.P. 6128, Succursale Centre-ville
Montréal, Québec
H3C 3J7
Phone: 1-514-343-6339
Fax: 1-514-343-2102

Running title: Nur77 activity and sumoylation

Abstract

Nur77 (NGFI-B) is a nuclear receptor that belongs to the orphan receptor NR4A subfamily (NR4A1). This subfamily has been implicated in the regulation of multiple functions, such as cell cycle regulation, apoptosis, steroidogenesis, inflammation, carcinogenesis, glucose and lipid metabolisms, endocrine systems, as well as brain functions. Although Nur77 is involved in all these processes, very little is known about the mechanism regulating its different functions. Using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays of Nur77 fused to luciferase (Nur77-RLucII) with various interactor proteins fused to YFP, we report that Nur77 preferentially preferentially recruits the small ubiquitin-related modifier type 2 (SUMO2). This interaction also involves SUMO E3 ligase, PIAS γ . We identified lysine 577 as a SUMOylation motif, which is essential for SUMO2 recruitment and potentiation of SUMO2 recruitment by PIAS γ . Interestingly, the Nur77K577R-RLucII mutant has a reduced capacity to constitutively recruit various co-activator motives and selectively reduced the activity of the monomeric form of the nuclear receptor at a Nur77 responsive element (NBRE). Another putative SUMOylation site at lysine 102 in Nur77, which has been shown to modulate the activity of Nurr1 (Lys91), remained without effect. In an heterodimer configuration with the retinoid X receptor (RXR), Nur77K577R-F1/F2-RXR mutant affected the potency of a RXR agonist to induce co-activator recruitment, as compared to the native Nur77-F1/F2-RXR complex. Thus, post-translational sumoylation modification of Nur77 modulates the interaction of the receptor with co-activators and may promote selective transcriptional activity of the receptor.

Introduction

In mammals, the NR4A subfamily of nuclear receptors consists of three members: Nur77 (Nr4a1, also known as Nerve-growth factor inducible gene B, [NGFI-B]), Nurr1 (Nr4a2), and Nor-1 (Nr4a3). This subfamily is involved in several essential physiological processes such as adaptive and innate immune cell differentiations, glucose and lipid metabolisms, as well as endocrine, vascular, cardiac and brain functions (Maxwell and Muscat 2005; Pearen and Muscat 2010; Safe et al, 2014). Also, the NR4As are classified as early response genes and are induced by a variety of signals, including growth factors, cytokines, peptide hormones, neurotransmitters and stress. Their ability to sense and rapidly respond to changes in the cellular environment appears to be a hallmark of this subgroup of transcription factors (Lévesque and Rouillard 2009).

NR4A members can bind to the promoter sequence of their target genes in three different ways. They can bind as monomers on the NGFI-B response element (NBRE; AAAGGTCA) and as a homodimer or heterodimers with another NR4A family member to the Nur-response element (NurRE; TGATATTTX₆AAATGCCA) (Wilson, Fahrner et al. 1991, Philips, Lesage et al. 1997, Maira, Martens et al. 1999). Also, Nur77 and Nurr1, but not Nor-1, can form heterodimers with retinoid X receptor (RXR) through direct repeat (DR) responsive elements or a NBRE sequence (Perlmann and Jansson 1995, Zetterstrom, Solomin et al. 1996, Maira, Martens et al. 1999). NR4A family belongs to the orphan nuclear receptor class, which is characterized by the fact that no endogenous ligands have been identified yet. This particularity seems to be due to the absence of a cavity in the ligand-binding domain (LBD) of

the NR4A family because of the presence of bulky hydrophobic amino acid side chains and lacks of a classical co-activator-binding cleft (Wang, Benoit et al. 2003, Flaig, Greschik et al. 2005). In fact, Nurs display an important constitutive transcriptional activity that is independent of exogenously added ligand. The crystal structures of Nur77 and Nurr1 LBD have shown that the ligand binding site is in a closed conformation that would be inaccessible to a ligand (Wang, Benoit et al. 2003, Flaig, Greschik et al. 2005).

Even though some studies have shown some potential ligand-induced NR4A activities, the mechanism of action of these ligands remains unclear (Dubois, Hengerer et al. 2006, Zhan, Du et al. 2008, Anbalagan, Huderson et al. 2012). Overall, these observations point to a ligand-independent function for NR4A nuclear receptors, suggesting that their activity might instead be regulated their gene expression, post-translational modifications (PTMs) or interaction with co-regulatory proteins. PTMs such as phosphorylation, sumoylation, ubiquitination and acetylation are known to modulate nuclear receptor activity and function by inducing conformational changes (references). However, Nur77 and Nurr1 activities can be indirectly targeted by rexinoids (RXR selective drugs) in the context of Nur/RXR complexes (Perlmann and Jansson, 1995).

Recently, it has been shown that SUMOylation is an important contributor of Nurr1 transcriptional activity (Galleguillos, Vecchiola et al. 2004, Saijo, Winner et al. 2009, Arredondo, Orellana et al. 2013). SUMOylation by SUMO2 on Lysine 91 (K91) on the N-terminal portion of Nurr1 reduced its transcriptional activity on NBRE-3X-tk-LUC reporter gene assay (Arredondo, Orellana et al. 2013). Also, SUMOylation of the mouse C-terminal

portion of Nurr1 on Lysine 558 (K558) and 576 (K576) residues with SUMO2 is required to bind the co-repressor CoREST and to repress pro-inflammatory gene expression (Saijo, Winner et al. 2009). Although all NR4A members possess SUMO consensus motifs in their sequences, only Nurr1 SUMOylation has been studied.

Here, we show for the first time a regulatory role of SUMO recruitment for Nur77 activity. We reported using BRET assays that Nur77 can recruit SUMO2/3 proteins on Lysine 577 (K577) and that this recruitment is potentiated in the presence of the SUMO E3 ligase, PIASy. Also, mutation of the putative K577 SUMO site leads to a conformational change that interferes with recruitment of co-activator motifs by Nur77 monomers as opposed to homodimers and heterodimers. This selective effect at the monomeric form of Nur77 is also observed at the transcriptional level. Altogether, these data suggest a new role of SUMOylation for the regulation of Nur77 activity.

Results

Nur77 recruits SUMO2

To assess the regulatory role of post-translational modification such as SUMOylation at Nur77 activity, we designed a BRET assay for the detection of SUMO interaction with Nur77 in living cells by fusing Nur77 to the Renilla luciferase II (Nur77-RlucII) and SUMO1, 2 or 3 isoform to the YFP (YFP-SUMO1, 2 or 3). We performed BRET titration assays in which a

fixed amount of the energy donor Nur77-RlucII was co-transfected with increasing concentrations of the energy acceptors YFP-SUMO1, YFP-SUMO2, YFP-SUMO3, or pCMV-TOPAZ, as a negative control (Fig. 16A). BRET signals were plotted as a function of YFP/RlucII ratios (which represents the fluorescence emitted by the energy acceptor (YFP-SUMO1-3) over luminescence emitted by the energy donor (Nur77-RlucII) (Fluorescence/Luminescence light emission) in order to take into account potential variations in the expression of individual constructs (Fig. 16B). BRET signals increased hyperbolically with concentrations of YFP-fused proteins, indicating the existence of a spontaneous and saturable interaction between Nur77-RlucII and SUMO2/3 proteins tagged with the YFP, compared to the control (pCMV-TOPAZ) (Mercier, Salahpour et al. 2002). The Nur77-RlucII/YFP-SUMO1 titration curve showed a low hyperbolic function saturated at lower BRET levels that is indistinguishable to the non specific signal generated by the empty plasmid pCMV-TOPAZ, suggesting that Nur77 preferentially interacts with SUMO2/3 proteins (Fig. 16B).

In order to identify lysine (K) residues involved the interaction between Nur77 and SUMO2/3, we performed an *in silico* analysis of putative SUMOylation site using the consensus sequence $\psi KX(E/D)$ (ψ being a hydrophobic residue such as valine, leucine, or isoleucine, and X any residues, whereas E is for glutamic and D for aspartic acids) in the Nur77 amino acid sequence. Using SUMOplot™ software (Fig. 17A), we identified lysine residues 102 and 577 as the most probable SUMOylation sites (Fig. 17A). To assess the involvement of these lysine residues in SUMO2 recruitment by Nur77, we generated Nur77 mutants in which lysine (K) 102 or 577 was replaced by an arginine (R) residue (Fig. 17A). BRET titration

experiments using Nur77-RlucII or Nur77K102R-RlucII, together with the SUMO2-GFP10 fusion construct produced superimposable titration curves, indicating that K102 does not mediate SUMO2 recruitment. On the other hand, the titration curve generated with the Nur77K577R-RlucII mutant construct showed a reduction of the net BRET signal compared Nur77-RlucII (Fig. 17C), suggesting that the K577 residue is involved in SUMO2 recruitment. Since lysine residues are also target residues for ubiquitination, we tested the possibility that these sites can recruit ubiquitin using a BRET energy acceptor construct composed of the ubiquitin protein fused to YFP (Ubi-YFP) (Fig. 17B). Interestingly, we observed no differences between Nur77-RlucII, Nur77K102R-RlucII, Nur77K577R-RlucII BRET signals with Ubi-YFP, suggesting that neither site recruit ubiquitin and that the K577 site is specifically involved in SUMO2 recruitment. To discard the possibility that K577R and K102R Nur77 mutations might alter subcellular distribution of the nuclear receptor, we performed fluorescent microscopy to detect Nur77-RlucII constructs (Fig.17D). All Nur77 constructs fused to YFP are expressed in the nucleus, indicating that mutations did not alter subcellular localisation of Nur77.

It has been shown that PIAS γ (PIAS4) is involved in the SUMOylation of Nurr1 (Galleguillos, Vecchiola et al. 2004, Arredondo, Orellana et al. 2013). To assess if PIAS γ also participates in the interaction between SUMO2 and Nur77 (Fig. 18), we evaluated the impact of overexpressing PIAS γ in titration experiments with Nur77-RLucII or Nur77K577R-RLucII and SUMO2-GFP10 constructs. In the presence of PIAS γ , we observed an enhancement of SUMO2-GFP10 recruitment with Nur77-RlucII compared to empty pcDNA3.1 plasmid transfection. Another PIAS isoform, PIAS1, remained without effect (Fig. 18). This suggests

that PIAS γ promotes SUMO2-GFP10 recruitment by Nur77. Moreover, the Nur77K577R-RlucII mutant, which reduced the capacity to recruit SUMO2-GFP10 as previously observed (Fig. 17B), also prevented potentialization of the BRET signal by PIAS γ .

Since K577 site is located in helix H11 of the LBD of Nur77, SUMO2 interaction at this residue may modulate recruitment of coactivators (Flaig, Greschik et al. 2005). To test this hypothesis, we measured BRET signals corresponding to the recruitment of various co-activator motifs (Fig. 19A). These include, a short synthetic motif of 65 amino acids containing two LXXLL sequences fused to two YFP proteins at both extremities known as L2N2Y2 (previously described in (Giner, Cotnoir-White et al. 2015)) (Fig. 19A), a motif of 209 amino acids from the steroid receptor co-activator 1 (SRC1) (from amino acid 1051 to 1260), that has been shown to interact with the AF-1 domain of ER α (Zwart, de Leeuw et al. 2010) (also flanked with 2 YFP motifs) that we identified as AF1-ID-(YFP)2 motif (Fig. 19B), and a 75 amino acid sequence also taken from SRC1 protein but containing three LXXLL motives (a.a from 712 to 787), referred as CoA1-(YFP)2 motif (Fig. 19C). The interaction of the L2N2Y2 motif with Nur77-RlucII was totally abrogated by the Nur77K577R mutation, whereas the Nur77K102R mutation remained without effect, suggesting that Nur77K577R-RlucII is less effective to recruit the LXXLL motif (Fig. 19A). Similar results were observed with the AF1-ID-(YFP)2 motif (Fig. 19B). Interestingly, the CoA1-(YFP)2 motif displayed milder reduction in the BRET signal (BRET50: Nur77K577: 0,123 \pm 0,034; Nur77K102R: 0,023 \pm 0,007; Nur77: 0,017 \pm 0,007), suggesting a compensatory effect due to the presence of three LXXL sequences in the CoA1-(YFP)2 motif (Fig. 19C).

Furthermore, using a short synthetic motif flanked by 2 GFP10 instead of YFP (to measure BRET2 signals, L2N2GFP2), CoA recruitment was not potentiated in presence of PIAS1 or PIAS γ with Nur77-RlucII or Nur77K577R-RlucII (Fig. 20). Altogether, these data suggest that the putative K577 SUMO2 site plays a role in co-activator recruitments by Nur77.

To better understand the role K577 residue in various Nur77 activities, we compared the effect of the K577R mutation on the monomer, homodimer and heterodimer forms of Nur77 (Fig. 21). To do so, we used a luciferase protein complementation (PCA) BRET assay where Luc-F1 or Luc-F2 fragments were fused to Nur77 or RXR α in order to specifically measure Nur77/Nur77 homodimer (Nur77-F1/F2-Nur77) or Nur77/RXR heterodimer (Nur77-F1/F2-RXR α) activity (see description in (Giner, Cotnoir-White et al. 2015)). In the PCA-BRET assay, the reconstituted Luciferase will act as a donor, so that BRET signal is generated only in the presence of luciferase reconstitution, thus uniquely reflecting the activity of the homodimer. As previously observed, Nur77K577R-RLucII mutant construct completely abolished CoA-YFP recruitment in a simple BRET assay (Fig. 21A). In contrast, PCA-BRET titration assays showed no differences between the native Nur77-F1/F2-Nur77 and Nur77K577R-F1/F2-Nur77K577R mutant constructs for the recruitment of the CoA-YFP motif by the homodimer complex (Fig. 21C). Interestingly, this differential effect of CoA recruitment observed in these BRET assays can be paralleled with the activity of these Nur77 construct at specific gene reporter assays. Indeed, we observed no difference between Nur77 and Nur77K577R mutant in presence of the 3XNuRE reporter assays, which is associated with the activity of the homodimer form (Fig. 21D), whereas we have a decrease (30%) in the activity of the Nur77K577R mutant, compared to the native Nur77 in the presence of the

3XNBRE reporter gene, which has been shown to recognize the monomeric form of Nur77 (Fig. 21B). These data suggest an important role of K577 residue for co-activator recruitment and transcriptional activity of the monomeric form of Nur77.

Regarding the Nur77/RXR γ heterodimeric form, PCA-BRET titration assays did not show any difference between the wild type (Nur77-F1/F2-RXR \square) and Nur77K577R-F1/F2-RXR \square mutant for the recruitment of the co-activator motif (data not shown). However, we observed a significant alteration of the EC₅₀ of CoA-YFP motif recruitment between Nur77-F1/F2-RXR γ and Nur77K577R-F1/F2-RXR γ by PCA-BRET dose-response curves in the presence of SR11237 ($p < 0,05$; $p = 0.0407$) (Fig. 22C-D), but not with 9-cis retinoic acid (Fig. 22A-B) or bexarotene (data not shown). These data suggest that the SUMOylation state of Nur77 at K577 residue may modulate selective ligand-induced co-activator recruitment by the Nur77/RXR γ complex.

Discussion

In the present study, we used BRET and PCA-BRET assays to monitor SUMO recruitment by Nur77. The BRET assay offers high sensitivity and reproducibility as well as quantitative real-time monitoring of SUMO recruitment in living cells. We were able to determine that Nur77 preferentially recruits SUMO2/3 compared to SUMO1. SUMO1 shares only 45% of homology with SUMO2 and SUMO3, whereas SUMO2 and SUMO3 share 96% homology (Ayaydin and Dasso 2004), suggesting that the specificity of the sequence of SUMO2/3 is necessary for SUMO recruitment by Nur77. These data are consistent with a previous report

showing that Nurr1 is preferentially SUMOylated by SUMO2 (Arredondo, Orellana et al. 2013). However, they were not able to detect an interaction with SUMO3. This difference might be due to the use of co-immunoprecipitation technique rather than BRET assay. Indeed, BRET assay is performed in living cells, which avoid signal alterations coming from cell lysis, protein solubilization or purification steps performed in *in vitro* experiments. In addition, BRET assay can detect dynamic interactions in real time (Perroy, Pontier et al. 2004, Bacart, Corbel et al. 2008). However, the addition of the fused luciferase or YFP to target proteins may affect their three-dimensional structures and interaction with other proteins. Another study has shown that Nurr1 is SUMOylated by SUMO2 and SUMO3 on K558, in an anti-inflammatory response in a microglia context, suggesting a preferential interaction of SUMO2/3 with the NR4A family (Saijo, Winner et al. 2009). SUMOylation complex targets lysine residues within consensus motifs corresponding to the sequence $\psi KX(E/D)$, even though it has been shown that this motif is not necessarily mandatory for SUMOylation (Hay 2005, Gareau and Lima 2010). Unlike the lysine 91 (K91) of Nurr1, it appears that the main target for SUMO recruitment by Nur77 is the lysine 577 (K577), and not the lysine 102 (K102), which is the homologous residue of K91 in Nurr1. In Nurr1, the K91 sumoylation site $\psi KX(E/D)$ is better preserved than in Nur77 (94% and 85% respectively) (Arredondo, Orellana et al. 2013). Also, it is important to note that the $\psi KX(E/D)$ site for K577 is fully conserved between Nur77 and Nurr1. Interestingly, we observed that the K577 residue is not involved in the recruitment of ubiquitin and when the lysine 577 is replaced by an arginine (K577R), Nur77 is still expressed in the nucleus, suggesting that the K577 residue is specifically associated with SUMO recruitment and that this site regulates nuclear functions of Nur77.

SUMO E3 ligases function is known to act as scaffold proteins, which are important for the efficiency of the sumoylation reaction and for the specificity of its substrate recognition (Gareau and Lima 2010). Our results show that SUMO E3 Ligase PIAS4 (PIAS γ), but not PIAS1, enhanced SUMO2 recruitment by Nur77. Also, PIAS4 effect on SUMO2 recruitment is lost with the mutant K577R, supporting that the K577 residue is essential for an efficient SUMO2 recruitment by Nur77. PIAS4 has been shown to be involved in the SUMOylation of Nurr1 (Arredondo, Orellana et al. 2013). This suggests that the E3 ligase PIAS4 might be responsible for SUMOylation of the NR4A family.

To understand the role of SUMOylation on Nur77 functions, we performed BRET assays for the recruitment of three different co-activator motives. All YFP-tagged co-activators are constitutively recruited by the native Nur77-RlucII construct. We observed that the Nur77K577R-RlucII construct mutant was not able to recruit either L2N2Y2 or AF1-ID-(YFP)2, which interact with the AF-2 and AF-1 domain of nuclear receptors, respectively (references). Recruitment of the CoA1-(YFP)2 motif was less affected by the mutation. This may be due to the fact that CoA1-(YFP)2 has a larger interaction surface compared to the co-activator sequences used. Altogether these data implied that lysine 577 is crucial for constitutive co-activator recruitment by Nur77.

However, although PIAS4 potentiation of SUMO2 recruitment by Nur77 is altered by K577R mutation, addition of SUMO E3 ligase PIAS1 or PIAS4 did not potentiate co-activator recruitment of native Nur77-RlucII or Nur77K577R-RLucII mutant. These results suggest that the SUMO E3 Ligase PIAS4 activity on Nur77 is restricted to the SUMOylation process. It

has been shown that PIAS4 represses Nurr1 transcriptional activity in two different ways. One mechanism involves PIAS4-mediated SUMOylation at K91 site in Nurr1, resulting in a reduction of its transcriptional activity, whereas the other is regulated through a direct interaction between Nurr1 and PIAS4 independently of its E3 ligase activity (Galleguillos et al 2004). We can hypothesize that a different mechanism is involved for Nur77. It is interesting to note that the K577R mutant of Nurr1 decreased its transcriptional activity, suggesting a functional redundancy between Nurr1 and Nur77 (Galleguillos, Vecchiola et al. 2004). However, when the helix 11-12 region, which contains K577 residue of Nurr1, was exchanged for the Nur77 sequence, a reduction of the transcriptional activity of Nurr1 LBD was observed, whereas the reverse experiment led to a modest increase of activity, suggesting a different role for this portion of the protein in these nuclear receptor homologues (Flaig, Greschik et al. 2005). Moreover, the K102R mutant (homologous of K91 of Nurr1) did not alter co-activator motif recruitments in the present BRET assays. These observations reveal a distinct role of SUMOylation on transcriptional activity of Nurr1 and Nur77.

To selectively determine the role of K577 residue in homo- and hetero-dimer activities of Nur77, we have designed PCA-BRET assays that are able to specifically monitor the activity of these nuclear receptor complexes. We investigated the possibility that SUMO2 recruitment by Nur77 at K577 site may affect co-activator recruitment by these Nur77 complexes. To test this possibility, we performed PCA-BRET titration assays. We found that there was no difference in L2N2Y2 co-activator recruitment between the native Nur77-F1/F2-Nur77 homodimer and the corresponding mutant Nur77K577R-F1/F2-Nur77K577R homodimer. Also, we observed no difference in the transcriptional activity of a 3XNurRE gene reporter

assay between the wild type and mutant homodimer forms. However, we obtained a decreased of 30% of the transcriptional activity at a 3XNBRE gene reporter with the Nur77K577R mutant compared to Nur77 native form. Moreover, Nur77-F1/F2-RXR γ and Nur77K577R-F1/F2-RXR γ heterodimer complexes also displayed similar L2N2Y2 co-activator recruitment in PCA-BRET assays (data not show). This suggests that K577 may favour a monomeric activity as opposed to homodimeric or heterodimeric activity of Nur77. Consistent with this observation, it has been shown that K558R and K576R mutants of the mouse Nurr1 were less active at a NBRE reporter element as compared to a DR5 reporter element (Saijo, Winner et al. 2009). These results are also consistent with other studies showing that SUMOylation can regulate the activity of liganded nuclear receptors (Le Drean, Mincheneau et al. 2002, Pascual, Fong et al. 2005, Hilmi, Hussein et al. 2012). Interestingly,, we observed that Nur77K577R-F1/F2-RXR γ mutant construct produced a decreased of the intrinsic affinity of co-activator recruitment in presence of SR11237, as compared to the native Nur77-F1/F2-RXR γ construct, whereas dose-responses curves generated with 9-*cis* RA or bexarotene were not altered by the Nur77 mutant. SR11237 is known to induce a specific conformational change of the RXR ligand-binding pocket that is linked to the reorientation of the side-chain of residue N306 (Egea, Mitschler et al. 2002). We have previously shown that SR11237 is able to increase the potency for co-activator motif recruitment and transcriptional activity with the Nur77/RXR γ heterodimer compared to Nurr1/RXR γ or RXR γ /RXR γ complexes, suggesting a partial selectivity of this compound for Nur77/RXR γ heterodimer (Giner, Cotnoir-White et al. 2015). These results suggest that SUMOylation of lysine 577 residue in the helix H11 of the LBD of Nur77 may produce a conformational change that may alter the response of some RXR ligands

for co-activator recruitment at the Nur77/RXR γ complex, and that this post-translational modification may contribute to ligand selectivity observed for this NR complex.

Several studies have shown the importance of SUMOylation on the transcriptional activity of nuclear receptors such as the glucocorticoid receptor (GR), progesterone receptor (PR), androgen receptor (AR), estrogen receptor (ER) and Nurr1 (Abdel-Hafiz, Takimoto et al. 2002, Nishida and Yasuda 2002, Tian, Poukka et al. 2002, Sentis, Le Romancer et al. 2005, Anbalagan, Huderson et al. 2012, Hilmi, Hussein et al. 2012, Arredondo, Orellana et al. 2013). Even though gene reporter assay will be necessary to confirm the role of SUMOylation on the regulation of Nur77 transcriptional activity, Nur77 SUMO recruitment at K577 appears to have distinct functions depending on Nur77 forms. K577 site is crucial for co-activator recruitment of the monomeric constitutive activity of Nur77, but it is not essential for the Nur77/Nur77 homodimeric form.

Overall, this study demonstrates that Nur77 selectively recruits SUMO2/3 and brings new insights on the regulation of Nur77 activity. Since the SUMOylation process has been proposed to contribute into the pathogenesis of neurodegenerative disorders such Parkinson's disease (Henley, Craig et al. 2014), and that Nur77 represents an important homeostatic regulator of dopamine neurotransmission in the CNS (Levesque & Rouillard, 2007), a better understanding of the activity of this transcription factor may help to develop new therapeutic approaches for dopamine-related disorders.

Acknowledgements

This work is supported by an operating grant from the Canadian Institute for Health Research (CIHR) MOP-130407. We would like to thank Dr. David Cotnoir-White and Mohamed El-Ezzy, for generously provided co-activator expression plasmids.

Materials and methods

Drugs

Nine-*cis* retinoic acid (9-*cis* RA) (RAR and RXR agonist) and bexarotene (RXR agonist) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Inc. (Oakville, ON, Canada), whereas SR11237 (BMS 649) (RXR agonist) was purchased from Tocris (Ellisville, MI, USA).

Plasmids

Nur77 and RXR γ BRET and PCA-BRET constructs were generated as described previously (Giner and al. 2015). The construct encoding the co-activator motif L2N2Y2 consisted in a LXXLL motif tandem repeat flanked at both extremities by a Yellow Fluorescent Protein (YFP) or a GFP2 motif (L2N2GFP2₋). The AF1-ID-(YFP)₂ motif is based on the portion of the co-activator SRC-1 sequence, which is known to interact with the AF1 domain of ER α (references), and is also surrounded by two YFP in each of these extremities. The constructs also contain two Nuclear Localisation Signal (NLS) sequences derived from the glucocorticoid receptor to ensure nuclear transport of the constructs. These sequences were then subcloned into the pCMV-TOPAZ expression vector (Clontech, Mountain View, CA, USA). YFP-SUMO1, YFP-SUMO2, YFP-SUMO3 and Ubi-YFP were obtained from Muriel Aubry Lab (IRIC) and the SUMO2-GFP10 from Sylvie Mader Lab (IRIC).

Cell culture and Transient transfection

Human embryonic kidney 293T (HEK-293T) cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 2 mL/500 mL glutamine, and 100 U/ml penicillin-streptomycin (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) at 37°C in 5% CO₂. We transiently transfected HEK-293T cells in 96-well plates (White Optiplate; PerkinElmer, Waltham, MA) at a density of 9×10^4 cells per well (about 80% confluency) with a maximum of 120 ng of cDNA per well encoding the fusion proteins using the polyethylenimine (PEI; Polysciences Inc, Warrington, PA, USA) method (300 ng of linear PEI plus 100 ng of branched PEI for 100 ng of DNA). In a typical PCA-BRET dose-response curve assay, 35 ng of each NR partners and 30 ng of SUMO or co-activator motif tagged with YFP are transfected per well in a 96-well plate. To maintain the same ratio of DNA in co-transfections, we used the empty vector pcDNA3.1, to equilibrate the amount of total DNA transfected.

BRET and PCA-BRET assay

The BRET assays were performed essentially as described in previous reports (Llopis, Westin et al. 2000, Pflieger and Eidne 2006, Lupien, Jeyakumar et al. 2007, Duplessis, Koterba et al. 2009). Cells were stimulated by drugs for 20 min, 48 hours after transfection. All ligands used were solubilized in DMSO and then diluted in Hanks' balanced salt solution (HBSS). BRET assays were read immediately after exposing the cells to 5 μ M of Coelenterazine H for BRET¹ or 2.5 μ M of Deepblue C for BRET² (NanoLight Technology, Pinetop, AZ, USA) using the Mithras LB 940 microplate reader (Berthold Technologies, Oak Ridge, TN, USA). Signal detections were performed at a wavelength of 485 nm for RLuc emission (energy donor) and

at 530 nm for YFP emission (energy acceptor) for BRET¹ and at a wavelength of 400 nm for RLucII emission and at 510 nm for GFP2 or GFP10 emission. Net BRET signals were derived from the emission detected with the energy acceptor filter divided by the emission detected with the energy donor filter (YFP/RLuc or GFP10/RLucII), with subtraction of the background ratio obtained from cells expressing only the energy donor. In PCA-BRET experiments, the BRET signal depends on Luc fragment complementation due to receptor dimerization and on interaction of the RLuc-fused proteins with at least one of the YFP-fused protein.

Microscopy

Lived imaging was carried out on a DeltaVision Elite widefield microscope system (GE Healthcare/Applied Precision, Issaquah, Washington, USA) equipped with a CoolSnap HQ2 camera (Photometrics, Tucson, AZ) and a 60X PlanApo oil immersion objective (Olympus, Richmond Hill, ON, Canada), at room temperature, using Softworx acquisition software (GE Healthcare/Applied Precision, Issaquah, Washington, USA). HEK-293T cells were transfected with 10 ng of Nur77-YFP, Nur77K102R-YFP, Nur77K577R-YFP (50 ng) or CMP-YFP plasmid. YFP and DAPI-labeled nucleus signals were detected 48 h later using appropriate filters.

Figures

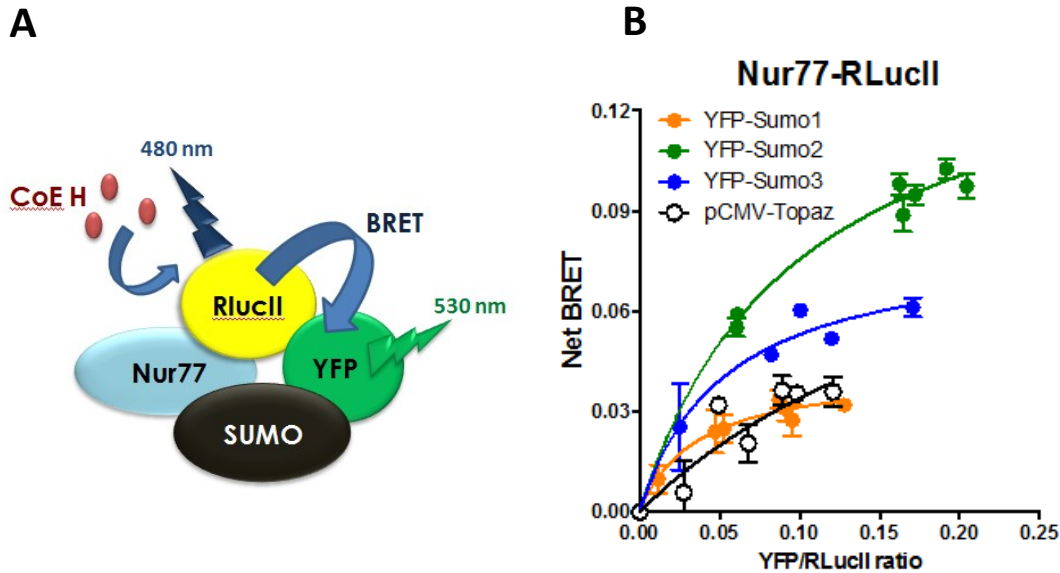


Figure 19: Nur77 preferentially recruited SUMO2/3.

(A) Schematic representation of the BRET assay. Here Nur77 is fused with the Renilla Luciferase II (RLucII) and the SUMO1, SUMO2 or SUMO3 proteins are fused to the YFP. Upon dimerization, Nur77-RLucII emits light in the presence of its substrate Coelenterazine H (CoE H) with an emission peak at 485 nm and the energy will be transferred to the SUMO-YFP constructs, resulting in a fluorescence light emission peak at 530 nm. **(B)** BRET assay titration curves of Nur77/SUMO complexes. HEK-293T cells were transiently transfected with a fixed amount of donor (Nur77RLucII, 2ng per well in a 96 well plate) and increasing amounts of acceptor (YFP-SUMO1, YFP-SUMO2, YFP-SUMO3 or pCMV-Topaz, from 0 to 100 ng). BRET signals were measured upon CoE H exposure and light detection at 530 nm, 48

h following transfection. Data correspond to a representative example of three independent experiments carried out in quadruplicate (means +/- SEM of quadruplicates are shown). Net BRET refers to the YFP/RLucII ratios. The curves were fitted by nonlinear regression (Graphpad Prism).

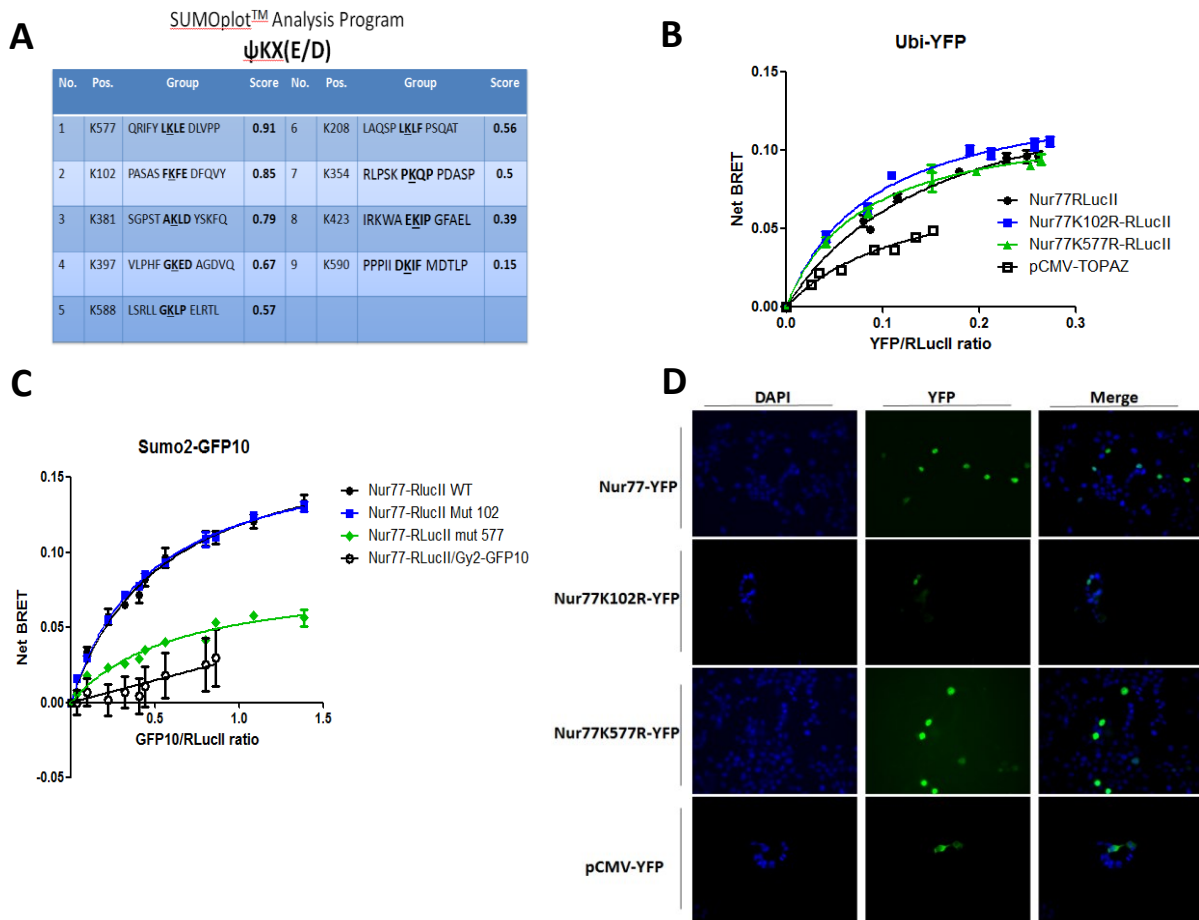


Figure 20: Residue K577 participate in SUMO2 recruitment by Nur77

(A) Putative SUMOylation sites identified by SUMOplot™ software analysis. The table shows the sequences of potential SUMOylation sites in the human Nur77 sequence sorted by their probability scores. Putative SUMO acceptor lysine (K) residues are underlined, and

potential SUMO sites are highlighted in bold. **(B-C)** BRET assay titration curves of Nur77RLucII or the mutants Nur77K102-RLucII and Nur77K577-RLucII for SUMO2-GFP10 or Ubi-YFP construct recruitment. HEK-293T cells were transiently transfected with a fixed amount of donor (10 ng per well for Nur77RLucII and Nur77K102-RLucII and 50 ng for Nur77K577-RLucII in a 96-well plate) and an increasing amount of acceptor (SUMO2-GFP10 or Ubi-YFP, from 0 to 100 ng). BRET signals were measured upon DeepBlue C or CoE H **(C)** exposure and light detection at 530 nm **(B)** or CoE H exposure and light detection at 510 nm **(C)**, 48 hours following transfection. Data correspond to a representative example of three independent experiments carried out in quadruplicate (means +/- SEM of quadruplicates are shown). The ratio refers to the GFP10/RLucII measurement (C) or YFP/RLucII (B). The curves were fitted by nonlinear regression. **(D)** Fluorescent microscopy for detection of Nur77-YFP, Nur77K102R-YFP, Nur77K577R-YFP and pCMV-YFP (green) and the nucleus marker Hoechst (DAPI). Cells were transfected with Nur77-YFP or mutants in the same conditions as previously described. YFP and Hoechst signals were detected 48 h later using appropriate filters.

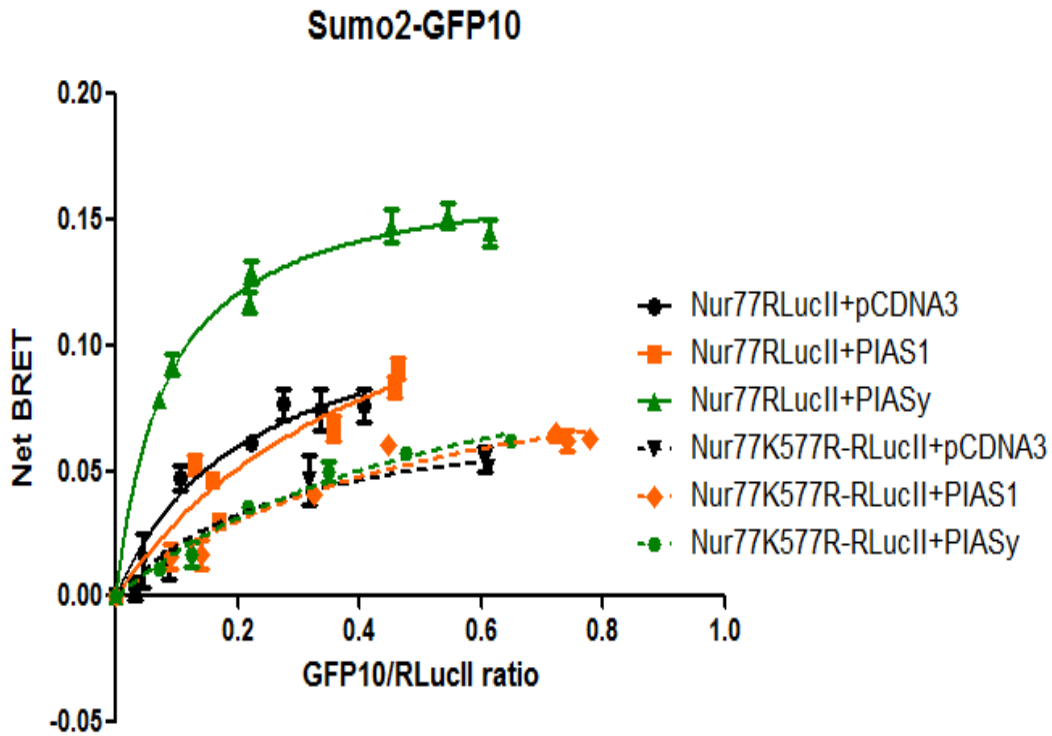


Figure 21: Nur77 K577 SUMO site is specifically potentiated by PIAS4.

BRET titration curves of Nur77RLucII and Nur77K577-RLucII for SUMO2-GFP10 recruitment in the presence of members of the PIAS E3 ligase family. HEK-293T cells were transiently transfected with a fixed amount of PIAS1, PIAS γ or pcDNA3.1 (30 ng) and a fixed amount of donor (10 ng per well for Nur77RLucII and 50 ng for Nur77K577-RLucII in a 96-well plate) and increasing amounts of acceptor (SUMO2-GFP10, from 0 to 100ng). BRET signals were measured upon DeepBlue C exposure and light detection at 510 nm, 48 hours following transfection. Data correspond to one experiment of three independent experiments carried out in quadruplicate (means \pm SEM of quadruplicates are shown). The ratio refers to the GFP10/RLucII measurements.

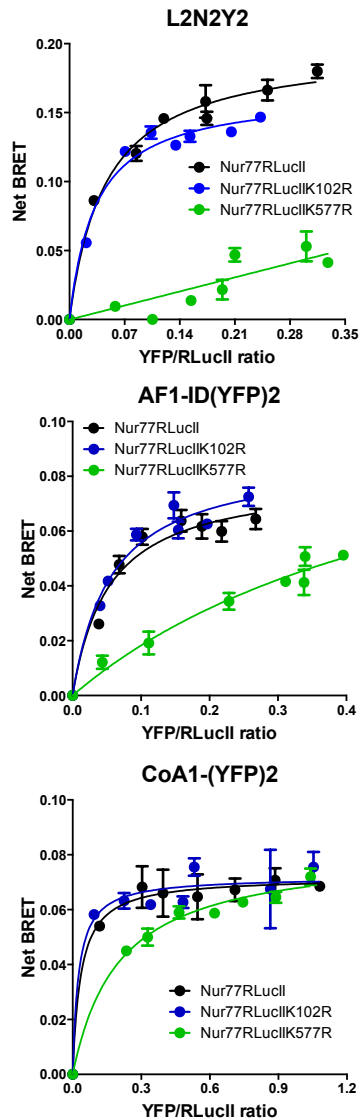


Figure 22: K577R mutation reduces co-activator recruitment by Nur77. BRET assay titration curves of Nur77RLucII or the mutants Nur77K102-RLucII and Nur77K577-RLucII with co-activator motifs such as L2N2Y2(A), AF1-ID-(YFP)2 (B) and CoA1-(YFP)2 (C). HEK-293T cells were transiently transfected with a fixed amount of donor (10 ng per well for Nur77RLucII and Nur77K102-RLucII and 50 ng for Nur77K577-RLucII in a 96-well plate) and increasing amounts of the acceptor (from 0 to 100 ng). BRET signals were measured upon CoE H exposure and light detection at 510 nm, 48 h following transfection. Data correspond

to a representative example of three independent experiments carried out in quadruplicate (means +/- SEM of quadruplicates are shown). Net BRET represents GFP10/RLucII emission ratios. The curves were fitted by nonlinear regression.

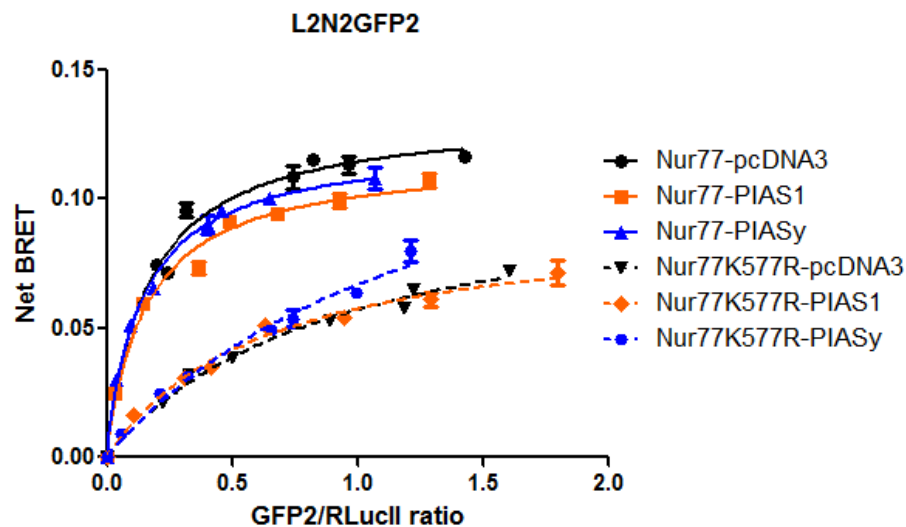


Figure 23: SUMO E3-ligase PIAS1 and PIASy family do not promote co-activator recruitment by Nur77.

BRET assay titration curves of Nur77RLucII or the mutants Nur77K102-RLucII and Nur77K577-RLucII for L2N2GFP2 recruitment in presence of PIAS family members are shown. HEK-293T cells were transiently transfected with a fixed amount of PIAS members (30 ng) and of donor (10 ng per well for Nur77RLucII and 50 ng for Nur77K577-RLucII in a 96-well plate) and increasing amounts of acceptor (L2N2GFP2, from 0 to 100 ng). BRET signals were measured upon Deep Blue C exposure and light detection at 510 nm, 48 h

following transfection. Data correspond to a representative example of three independent experiments carried out in quadruplicate (means \pm SEM of quadruplicates are shown). Net BRET refers to GFP10/RLucII emission ratios. The curves were fitted by nonlinear regression.

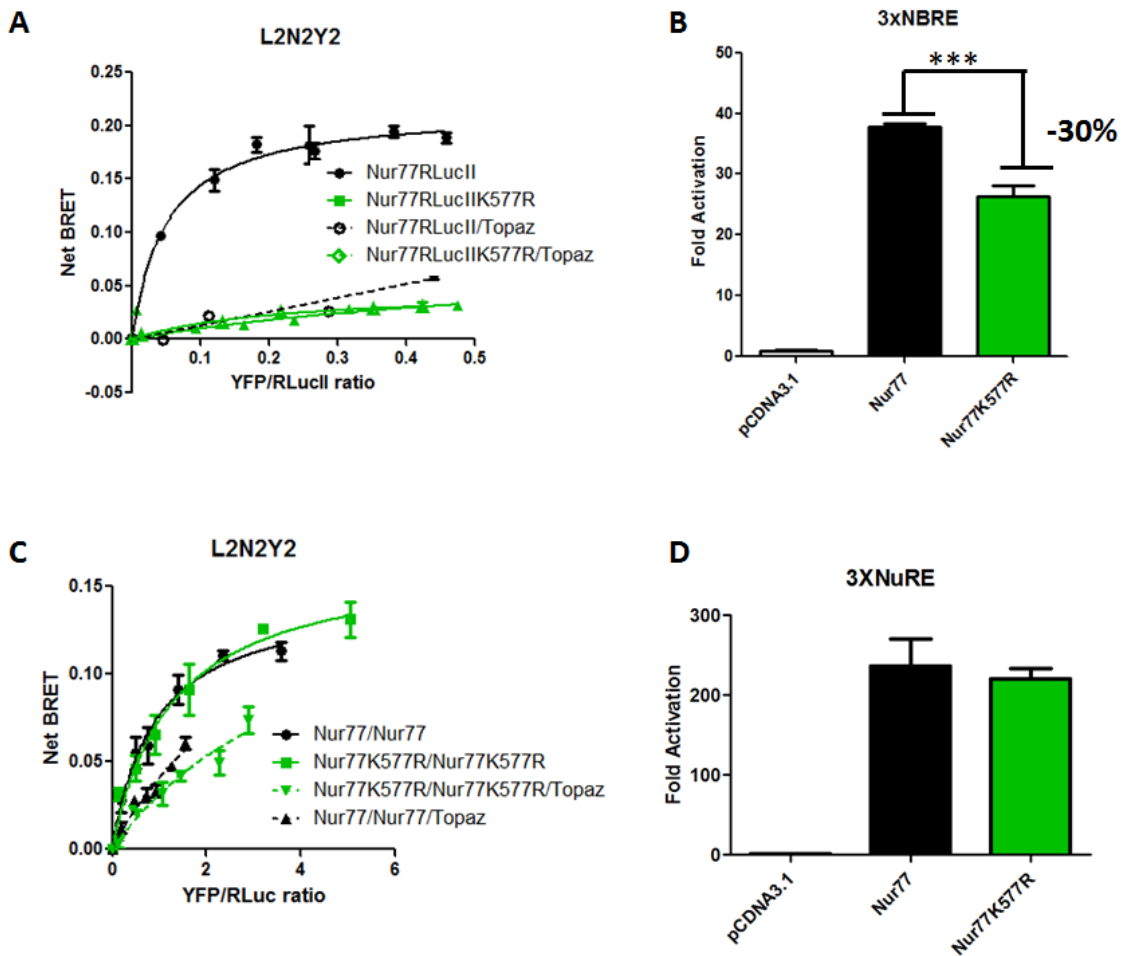


Figure 24: The K577R mutation affects co-activator recruitment and reporter gene transcription for the monomeric but not the homodimeric form of Nur77.

(A) BRET assay titration curves of Nur77-RLucII or (C) Nur77-F1/F2-Nur77 for L2N2Y2 co-activator recruitment compared with the Nur77K577R or Nur77K577R-F1/F2-Nur77K577R mutant constructs. HEK-293T cells were transiently transfected with a constant amounts of F1

(30 ng) and F2 (30 ng) fragment containing constructs with increasing amounts of L2N2Y2 (0 to 100 ng) in 96-well plates. BRET signals were measured upon CoE H exposure and light detection at 530 nm, 48 h following transfection. Data correspond to a representative example of three independent experiments carried out in quadruplicate (means \pm SEM of quadruplicates are shown). Net BRET refers to the ratio of YFP/RLucII emissions. The curves were fitted by nonlinear regression. Reporter assays for the 3XNBRE (**B**) or 3XNuRE (**D**) in the presence of either pcDNA3.1, Nur77-RLucII or Nur77K577R-RLucII and Nur77-F1/F2-Nur77 or Nur77K577R-F1/F2-Nur77K577R, respectively. Histograms represent relative transcriptional activity in HEK293T cells. As a control, cells were transfected with the same amount of pcDNA3.1 plasmid. Data are expressed as fold activation of the Firefly/Renilla ratio of light emission with the value in presence of pcDNA3.1 set to 1 for normalization \pm SEM (n = 3).

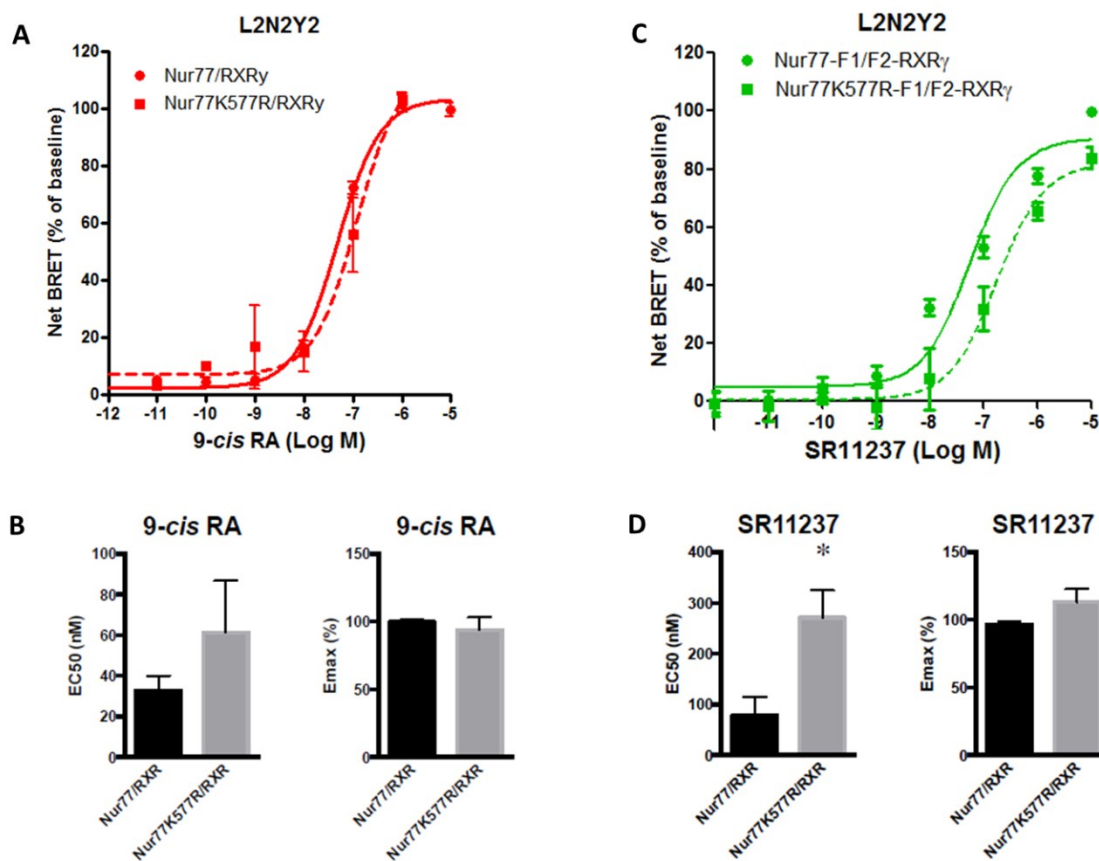


Figure 25: The K577R mutation alters SR11237 potency for co-activator recruitment at the Nur77/RXR γ complex.

PCA-BRET dose-response curves of Nur77-F1/F2-RXR γ or Nur77K577R-F1/F2-RXR γ for L2N2Y2 CoA motif recruitment. HEK-293T cells were transiently transfected with 30 ng of either Nur77-F1, Nur77K577R-F1, F2-RXR γ or L2N2Y2 constructs with increasing amounts of 9-*cis* RA (A) or SR11237 (C) for 20 min in 96-well plates. BRET signals were measured upon CoE H exposure and light detection at 530 nm, 48 h following transfection. Data correspond to a representative example of three independent experiments carried out in quadruplicate (means \pm SEM of quadruplicates are shown). Net BRET refers to the ratio of YFP/RLuc light emissions. Curves were fitted using nonlinear regression analysis to determine

50% effective concentration (EC_{50}) and maximal capacity (E_{max}) of the compounds. Comparison of EC_{50} and E_{max} between Nur77-F1/F2-RXR γ and Nur77K577R-F1/F2-RXR γ for L2N2Y2 recruitment in the presence of 9-*cis* RA (B) or SR11237 (D) are presented. Histogram bars represent means \pm SEM of quadruplicate of 3 independent experiments. * $p < 0.05$ vs native Nur77-F1/F2-RXR \square complex.

References

- Abdel-Hafiz, H., G. S. Takimoto, L. Tung and K. B. Horwitz (2002). "The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression." J Biol Chem **277**(37): 33950-33956.
- Anbalagan, M., B. Huderson, L. Murphy and B. G. Rowan (2012). "Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease." Nucl Recept Signal **10**: e001.
- Arredondo, C., M. Orellana, A. Vecchiola, L. A. Pereira, L. Galdames and M. E. Andres (2013). "PIASgamma enhanced SUMO-2 modification of Nurr1 activation-function-1 domain limits Nurr1 transcriptional synergy." PLoS One **8**(1): e55035.
- Ayaydin, F. and M. Dasso (2004). "Distinct in vivo dynamics of vertebrate SUMO paralogues." Mol Biol Cell **15**(12): 5208-5218.
- Bacart, J., C. Corbel, R. Jockers, S. Bach and C. Couturier (2008). "The BRET technology and its application to screening assays." Biotechnol J **3**(3): 311-324.
- Egea, P. F., A. Mitschler and D. Moras (2002). "Molecular recognition of agonist ligands by RXRs." Mol Endocrinol **16**(5): 987-997.
- Flaig, R., H. Greschik, C. Peluso-Iltis and D. Moras (2005). "Structural basis for the cell-specific activities of the NGFI-B and the Nurr1 ligand-binding domain." J Biol Chem **280**(19): 19250-19258.
- Galleguillos, D., A. Vecchiola, J. A. Fuentealba, V. Ojeda, K. Alvarez, A. Gomez and M. E. Andres (2004). "PIASgamma represses the transcriptional activation induced by the nuclear receptor Nurr1." J Biol Chem **279**(3): 2005-2011.
- Gareau, J. R. and C. D. Lima (2010). "The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(12): 861-871.

Hay, R. T. (2005). "SUMO: a history of modification." Mol Cell **18**(1): 1-12.

Hilmi, K., N. Hussein, R. Mendoza-Sanchez, M. El-Ezzy, H. Ismail, C. Durette, M. Bail, M. J. Rozendaal, M. Bouvier, P. Thibault, J. L. Gleason and S. Mader (2012). "Role of SUMOylation in full antiestrogenicity." Mol Cell Biol **32**(19): 3823-3837.

Le Drean, Y., N. Mincheneau, P. Le Goff and D. Michel (2002). "Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation." Endocrinology **143**(9): 3482-3489.

Levesque, D. and C. Rouillard (2007). "Nur77 and retinoid X receptors: crucial factors in dopamine-related neuroadaptation." Trends Neurosci **30**(1): 22-30.

Lévesque, D. and C. Rouillard (2009). Role of Members of the Nur (NR4A) Transcription Factors in Dopamine-Related Neurodegenerative and Neuropsychiatric Disorders. The Handbook of Neuropsychiatric Biomarkers, Endophenotypes and Genes. M. Ritsner, Springer Netherlands: 195-210.

Maira, M., C. Martens, A. Philips and J. Drouin (1999). "Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation." Mol Cell Biol **19**(11): 7549-7557.

Mercier, J.-F., A. Salahpour, S. Angers, A. Breit and M. Bouvier (2002). "Quantitative Assessment of β 1- and β 2-Adrenergic Receptor Homo- and Heterodimerization by Bioluminescence Resonance Energy Transfer." Journal of Biological Chemistry **277**(47): 44925-44931.

Nishida, T. and H. Yasuda (2002). "PIAS1 and PIAS α function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription." J Biol Chem **277**(44): 41311-41317.

Pascual, G., A. L. Fong, S. Ogawa, A. Gamliel, A. C. Li, V. Perissi, D. W. Rose, T. M. Willson, M. G. Rosenfeld and C. K. Glass (2005). "A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma." Nature **437**(7059): 759-763.

Perlmann, T. and L. Jansson (1995). "A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1." Genes Dev **9**(7): 769-782.

Perroy, J., S. Pontier, P. G. Charest, M. Aubry and M. Bouvier (2004). "Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET." Nat Meth **1**(3): 203-208.

Philips, A., S. Lesage, R. Gingras, M. H. Maira, Y. Gauthier, P. Hugo and J. Drouin (1997). "Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells." Mol Cell Biol **17**(10): 5946-5951.

Saijo, K., B. Winner, C. T. Carson, J. G. Collier, L. Boyer, M. G. Rosenfeld, F. H. Gage and C. K. Glass (2009). "A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death." Cell **137**(1): 47-59.

Sentis, S., M. Le Romancer, C. Bianchin, M. C. Rostan and L. Corbo (2005). "Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity." Mol Endocrinol **19**(11): 2671-2684.

Tian, S., H. Poukka, J. J. Palvimo and O. A. Janne (2002). "Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor." Biochem J **367**(Pt 3): 907-911.

Wang, Z., G. Benoit, J. Liu, S. Prasad, P. Aarnisalo, X. Liu, H. Xu, N. P. Walker and T. Perlmann (2003). "Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors." Nature **423**(6939): 555-560.

Wilson, T. E., T. J. Fahrner, M. Johnston and J. Milbrandt (1991). "Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast." Science **252**(5010): 1296-1300.

Zetterstrom, R. H., L. Solomin, T. Mitsiadis, L. Olson and T. Perlmann (1996). "Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1." Mol Endocrinol **10**(12): 1656-1666.

Discussions et Perspectives

Développement d'outils moléculaires pour étudier les interactions des récepteurs nucléaires

Actuellement, il existe plusieurs outils pour mesurer et comprendre la régulation des interactions protéines-protéines. Il est possible d'utiliser les techniques de co-immunoprécipitation, de GST pull-down, de double-hybride, de spectrométrie de masse, de spectrométrie à résonance magnétique nucléaire (NMR), de SAXS (Small Angle X-Ray Scattering) ou encore de co-localisation par immunofluorescence. La majorité des techniques qui étudient ces interactions se déroulent dans des conditions *in vitro*. En effet, des techniques telles que la co-immunoprécipitation et le double-hybride mesurent les interactions protéines-protéines suite à une lyse cellulaire, ce qui pourrait influencer de façon artificielle l'interaction mesurée au sein du complexe. Par exemple, avec la technique de co-immunoprécipitation, qui est probablement la technique la plus populaire à ce jour pour étudier les interactions protéines-protéines, il existe un risque de mesurer une interaction indirecte. En effet, cette technique se déroulant dans un premier temps dans un contexte cellulaire, il est possible que d'autres partenaires protéiques puissent servir d'intermédiaires dans l'interaction mesurée et permettrait donc d'isoler les protéines d'intérêt alors que celles-ci n'interagissent pas directement ensemble. Quant au système double hybride, en plus de ne pouvoir détecter de partenaire intermédiaire, présente le désavantage d'entraîner un taux important de résultats « faux négatifs » et « faux positifs ». Aussi, le double hybride chez la bactérie ne permet pas de mesurer l'effet des modifications post-traductionnelles chez les protéines cibles, mais cela reste possible dans les cellules eukaryotes.

Dans cette optique, le BRET et le FRET sont des méthodes puissantes pour mesurer la formation de complexes protéiques. Néanmoins, ces techniques présentent aussi leurs limites. Comme les autres techniques de mesure d'interactions protéine-protéine, la mesure du signal de BRET ou de FRET pourrait être la conséquence d'une interaction favorisée par la présence d'un autre partenaire. Cependant, cette possibilité reste réduite, car comparativement aux autres techniques évoquées, il est nécessaire que le donneur et l'accepteur se trouvent entre 10 et 100 Å pour l'obtention d'un signal BRET ou FRET. De plus, il peut arriver que le signal mesuré provienne de collisions aléatoires dû à une agglomération des protéines dans des compartiments cellulaires. Lors de ces expériences, nous sommes dans des conditions de surexpression, ce qui pourrait entraîner des interactions non spécifiques sans pertinence physiologique. Aussi, l'ajout de la luciférase ou de la YFP aux protéines cibles serait susceptible d'altérer leurs structures tridimensionnelles et affecter ainsi leurs fonctions. Afin de remédier à ces problèmes, il est primordial d'utiliser des contrôles négatifs tels qu'une protéine qui serait exprimée dans le même compartiment cellulaire que les protéines d'intérêts ou encore un mutant d'un des deux partenaires qui ne pourrait interagir avec son partenaire. Il est nécessaire aussi de vérifier que l'ajout de notre tag bioluminescent ou fluorescent n'affecte pas l'activité des protéines cibles, via des techniques complémentaires.

Dans le cadre de cette thèse de doctorat, nous avons développé un essai de BRET par complémentation (PCA-BRET) afin de mesurer l'interaction simultanée entre trois partenaires (d'homo- ou d'hétéro-NR dimères et d'un co-régulateur). Cette technique, telle que vu dans l'article 1, nous a permis de caractériser l'activité de plusieurs ligands RXR pour le

recrutement d'un motif de co-activation LXXLL au niveau du complexe homodimérique RXR γ /RXR γ ou des complexes hétérodimériques Nur77/RXR γ et Nurr1/RXR γ . Nous avons ainsi pu mettre en avant l'activité sélective de certains ligands pour un complexe NR/co-activateur spécifique. Par exemple, le LG268 (LG100268) présente la meilleure sélectivité pour le complexe RXR γ /RXR γ alors que le SR11237 (BMS649) semble être plus sélectif pour le complexe Nur77/RXR γ . Le LG268 et le SR11237 sont deux pan-agonistes (aussi appelés « dual agonists », un pan-agoniste étant une drogue qui peut agir sur plus de deux isoformes du récepteur ciblé) RXR, qui sont dépourvus de toute activité RAR. Lorsqu'on regarde de plus près au niveau de la structure de ces deux molécules, celles-ci sont relativement semblables, mais on peut cependant noter des différences. La différence la plus notable réside dans le fait que le LG268 possède un groupement cyclopropane alors que le SR11237 possède un groupement 1,3-dioxalane (**Figure 26**). Ce dernier groupement pourrait se révéler crucial pour la sélectivité du SR11237 au complexe Nur77/RXR. Il a été montré que comparativement au 9-cis-RA, le SR11237 pourrait induire la réorientation du résidu N306 de l'hélice H5 du LBP de RXR, qui entraînerait la réduction du volume de la poche de liaison. Ainsi, cette variation de volume ferait en sorte que le niveau d'occupation du LBP de RXR par le SR11237 serait supérieur à celui du 9-cis RA. Ce changement de conformation au niveau de la chaîne latérale du résidu N306 aurait la propriété de générer des contacts supplémentaires, dû très probablement à l'attraction par la charge négative partielle des atomes d'oxygène du SR11237 (Egea, Mitschler et al. 2002).

En plus de mesurer l'interaction entre les trois partenaires, le PCA-BRET nous permet aussi de mesurer l'interaction entre les deux NRs qui sont fusionnés à un fragment de la RLucII.

Celui-ci une fois reconstituée, pourra émettre de la luminescence suite à l'ajout de son substrat. Grâce au PCA-BRET, on peut ainsi mesurer deux types d'interactions, soit la dimérisation des NRs grâce à la mesure de luminescence générée par la reconstitution de la Rluc et le recrutement du motif de co-activation avec le signal BRET. Nous avons ainsi pu montrer que le SR11237 induirait un changement de conformation dans la formation des complexes de récepteurs nucléaires Nur77/RXR γ et Nurr1/RXR γ , mais pas avec RXR γ /RXR γ . La liaison non-canonique du SR11237 au LBD de RXR γ suggère donc qu'on affecterait aussi la dimérisation, en produisant une conformation qui favorise l'interaction de Nur77 ou Nurr1 avec RXR.

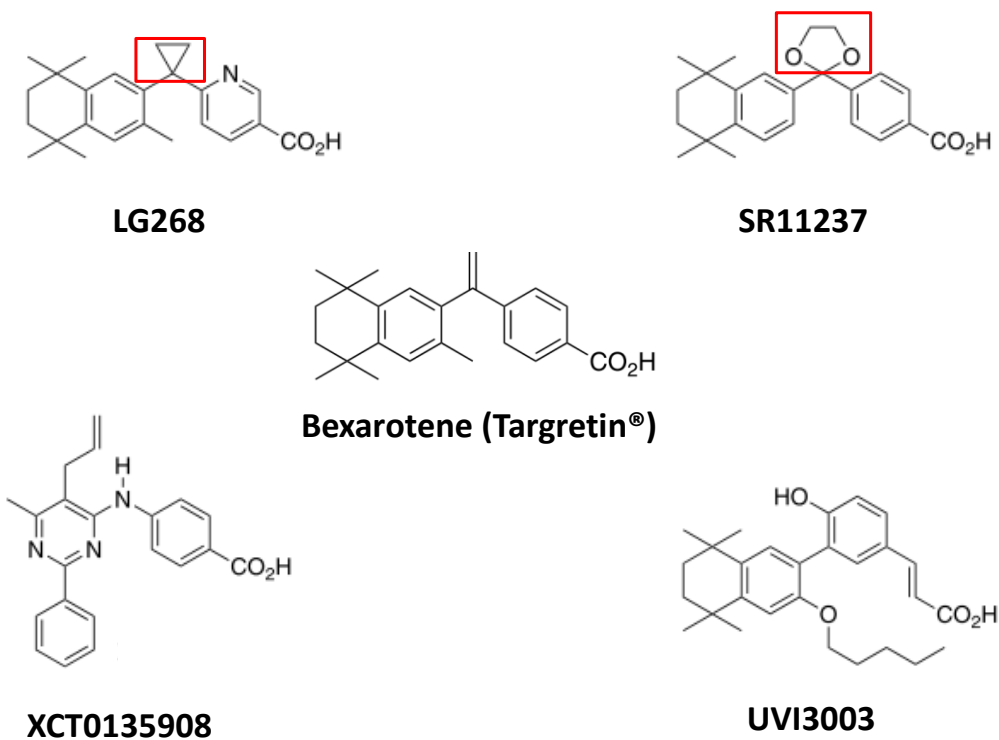


Figure 26: Structures chimiques de quelques ligands RXR.

Le LG268 est un ligand qui a montré une sélectivité pour l'homodimère RXR/RXR. Dans l'encadré rouge on retrouve le groupement cyclopropane du LG268, qui est remplacé par un groupement 1,3-dioxalane dans le SR11237. Ce groupement pourrait être à la base de la sélectivité du SR pour le complexe Nur77/RXR. On peut voir aussi que le Bexarotene a une structure fortement homologue à celle du LG268 ou du SR11237. Il est suggéré que le XCT0135908 soit un agoniste sélectif Nurr1/RXR. Le UVI3003 un pan antagoniste RXR.

Pour mieux évaluer l'affinité du SR11237 au complexe Nur77/RXR, nous avons repris la figure 7 de l'article «Selective ligand activity at Nur/retinoid X receptor complexes revealed

by dimer-specific bioluminescence resonance energy transfer-based sensors» en normalisant le maximum d'activité de RLU de chaque drogue à 100% (**Figure 27**). Ainsi, lorsqu'on ajoute de manière croissante du F2-RXR γ , on n'observe pas de différence entre l'affinité du 9cis-RA (17.5 \pm 4.18 ng) et du SR11237 (16.54 \pm 2.44 ng) avec le complexe Nur77/RXR γ (**Figure 27A**). Par contre, si on augmente la quantité de Nur77-F1, on peut voir que le SR11237 possède une meilleure affinité pour le complexe Nur77/RXR γ (13.40 \pm 2.37 ng) que le 9cis-RA (23.49 \pm 7.65 ng) (**Figure 27B**). Ces données suggèrent donc que Nur77 jouerait un rôle partiellement actif pour l'activité du SR11237 au niveau de la formation du dimère Nur77/RXR γ .

Une autre molécule le XCT0135908 a aussi montré un changement de conformation sélectif pour le dimère Nurr1/RXR γ par rapport à Nur77/RXR γ et RXR γ /RXR γ . Toutefois, ce ligand présente exactement le même profil pharmacologique lorsqu'on le compare en PCA-BRET avec Nurr1/RXR γ et Nur77/RXR γ pour le recrutement du motif de co-activation (Giner et al, sous presse). Cela suggère donc que le XCT0135908 favoriserait la formation du dimère Nurr1/RXR γ , mais ne montre pas de sélectivité pour le recrutement du co-activateur.

Le PCA-BRET se révèle donc être une nouvelle méthode afin d'identifier de nouveaux composés spécifiques pour des complexes de récepteurs nucléaires bien précis. Dans cette optique, nous avons réussi à optimiser notre essai PCA-BRET pour être en mesure de réaliser un criblage à haut débit (HTS). Cette optimisation a été réalisée par mon collègue David Cotnoir-White en collaboration avec le personnel de la plateforme de l'IRIC. Nous avons obtenu un Z-Factor de 0.7, ce qui signifie que l'essai est très robuste. Le Z-Factor est un type

de mesure qui nous permet de déterminer si notre méthode est assez fiable pour pouvoir faire du HTS (Zhang, Chung et al. 1999). Donc, les essais en PCA-BRET développés au cours de mes travaux de doctorat pourront servir au criblage de nouveaux composés agissant sur les complexes de NR Nur77/RXR et Nurr1/RXR, notamment.

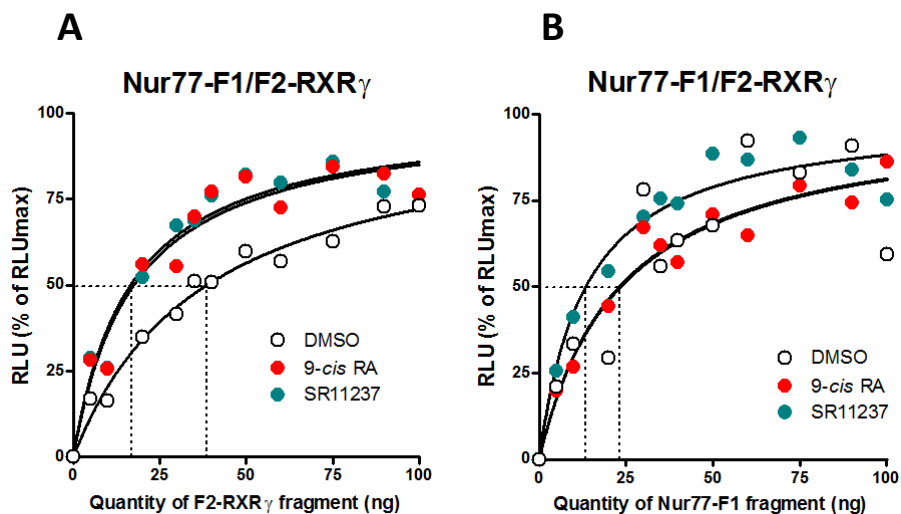


Figure 27: Courbes de titrations des fragments Nur77-F1 et F2-RXR γ .

Les cellules HEK293-T ont été co-transfectées avec une quantité constante de Nur77-F1 (35 ng) et une quantité croissante de F2-RXR γ (0 à 100 ng) (A) ou une quantité constante de F2-RXR γ (35 ng) et une quantité croissante de Nur77-F1 (0 à 100 ng) (B) en présence de véhicule (DMSO), le SR11237 (1 μ M) ou RA 9-cis (1 μ M) pendant 20 min. Les données représentent une expérience représentative de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. Les valeurs sont exprimées en pourcentage (%) d'unités lumineuses relatives (RLU) obtenues à 485 nm avec à 100% la valeur maximale obtenue pour chaque drogue. Les courbes ont été tracées en utilisant une analyse de régression non linéaire.

La validation de cette technique nous permet d'envisager que cette technologie, couplée avec d'autres méthodes de BRET, pourra nous permettre de développer de nouveaux outils encore plus puissants et révélateurs sur l'activité de ligand vis-à-vis d'un complexe spécifique de récepteurs nucléaires. En effet, l'utilisation de nouvelles RLuc récemment développées (Loening, Fenn et al. 2006, Kocan, See et al. 2008, Hall, Unch et al. 2012), mais aussi avec l'ajout d'autres protéines fluorescentes tel que la mTFP1 qui auraient la capacité de grandement potentialiser le signal BRET, pourrait nous permettre d'optimiser notre système de PCA-BRET. De plus, la combinaison du PCA-BRET et du BRET *in vivo*, pourrait être un outil plus direct et précis pour nous informer de la régulation via des ligands de la formation de complexes de NRs avec un co-activateur. Actuellement, le signal de BRET détecté *in vivo* provient des cellules immortalisées (exprimant le donneur et l'accepteur) injectées dans des souris ou de cultures primaires de tissus d'animaux transgéniques (De, Ray et al. 2009, Audet, Lagace et al. 2010, Dragulescu-Andrasi, Chan et al. 2011). La deuxième méthode semble plus adéquate, car en excluant la présence des cellules immortalisées, on s'assure de rester dans un contexte physiologique. De plus, cette méthode nous permet de comparer différents tissus, ce qui nous permettrait de nous assurer en plus de la sélectivité de l'effet de notre ligand sur un complexe de NRs, de vérifier son implication spécifique dans un tissu cible. Ce procédé se révélerait crucial, sachant la colocalisation unique de Nur77 et RXR γ dans certaines régions du cerveau (Levesque and Rouillard 2007). Toutefois, la génération de ce modèle de souris transgénique pourrait s'avérer longue et coûteuse à caractériser. Une autre alternative de BRET *in vivo*, qui pourrait s'avérer plus facile d'accès, serait de générer une construction virale exprimant nos gènes d'intérêts sous le contrôle d'un promoteur spécifique que l'on pourrait injecter dans notre tissu cible. Par exemple, on pourrait utiliser le promoteur de

l'enképhaline, qui est exprimé spécifiquement dans les neurones qui expriment le récepteur D2 dans le striatum, une structure du cerveau qui est impliqué dans le contrôle des mouvements (Ethier, Beaudry et al. 2004, Ethier, Kagechika et al. 2004, St-Hilaire, Bourhis et al. 2006). Le laboratoire du Dr Lévesque a en effet démontré que l'expression de Nur77 dans cette sous-population cellulaire du striatum est associée à la modulation des mouvements involontaires anormaux (appelés dyskinésie tardive) suite à une prise répétée d'un agent antipsychotique. Cela nous permettrait de valider l'effet protecteur potentiel de ligand sélectif Nur77/RXR γ suite à l'induction de la dyskinésie tardive par les antipsychotiques.

Nur77, un « vrai » récepteur orphelin ?

Comme il a été mentionné précédemment, Nur77 est connu pour être un récepteur nucléaire «orphelin» et la plupart des études sur son activité monomérique et homodimérique suggèrent que son activité est constitutive (Castro, Arvidsson et al. 1999, Wansa, Harris et al. 2002, Maxwell and Muscat 2006). Cependant, plusieurs études récentes ont montré que des ligands tels que la cytosporone B, la 6-mercaptopurine et certains composés de la famille des DIM-C pourraient moduler l'activité de Nur77 (Wansa and Muscat 2005, Cho, Yoon et al. 2007, Zhan, Du et al. 2008).

Néanmoins, l'activité de ces drogues reste un sujet de controverse. Les études utilisant ces composés ont été seulement reproduites par les groupes qui les ont découverts. Il ne semble pas avoir eu de validation externe des effets produits par ces composés pour le moment. De plus, certains composés comme la cytosporone B ont également pour effet d'induire

l'expression de Nur77, ce qui vient compliquer l'interprétation de leur activité agoniste sur ce NR (Zhan, Du et al. 2008). Nous avons testé 3 de ces ligands en BRET (Nur77-Rluc) et en essai rapporteur et nous n'avons pas détecté d'activité agoniste pour ces composés (**Figure 28**). De plus, nos résultats montrent que Nur77 ne participe pas (partenaire silencieux) à l'activité ligand-induite du complexe Nur77/RXR (Giner et al, sous presse).

Plusieurs raisons pourraient expliquer ces observations concernant ces ligands Nurs. Par exemple, ces études se sont déroulées dans des lignées cellulaires bien particulières telles que les RKO, les SW480, les SW620 (cellules de cancer du côlon humain), ou encore les BGC-823 (cellules de cancer de l'intestin humain), les H1299 (cellules de cancer du poumon humain), les HL-7702 (cellules de foie humain) et les HepG2 (cellules d'hépatome humain) (Wansa and Muscat 2005, Cho, Yoon et al. 2007, Zhan, Du et al. 2008), ce qui pourrait expliquer la différence avec les observations obtenues dans d'autres modèles et notamment nos expériences qui se déroulent dans les HEK293-T. Il paraît donc nécessaire de reproduire nos essais BRET dans les lignées cellulaires citées précédemment et dans les PC12 afin d'avoir une meilleure idée des mécanismes de ces composés et notamment au niveau des neurones. Aussi, dans notre exemple avec le BRET, nous utilisons des motifs de co-activation synthétique, soit les motifs L2N2 et AF1-ID qui reconnaissent respectivement la portion AF-2 et AF-1 des NRs. Il se pourrait que la présence d'un co-activateur entier soit nécessaire pour mesurer l'activité de ces ligands. De plus, il est possible que d'autres partenaires protéiques rentrent en jeu afin d'assurer l'activité de ces ligands. Toutefois, il semble relativement clair que Nur77 serait régulé par des PMTs, où via l'activité des réxinoïdes par l'interaction avec son partenaire d'hétérodimérisation RXR.

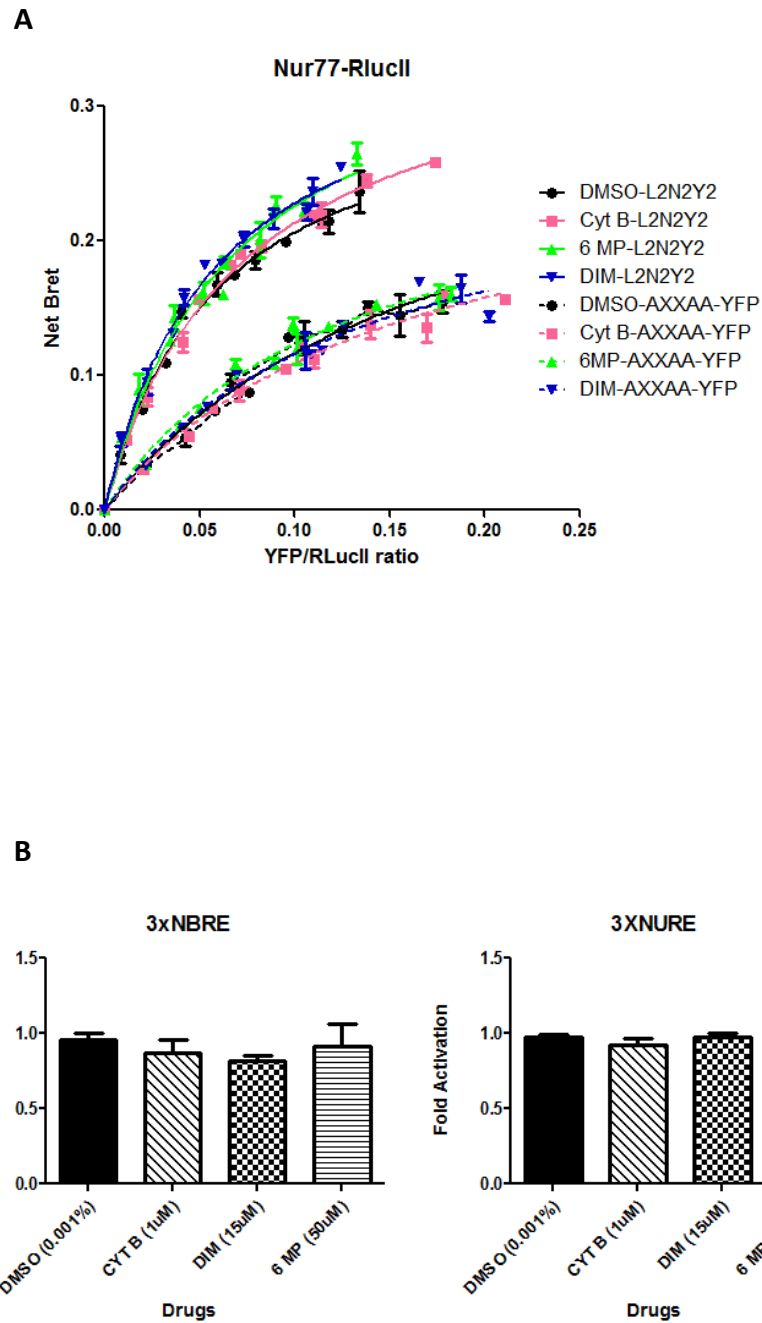


Figure 28: Effets des ligands Nurs en BRET et en essai rapporteur.

(A) Courbe de titration du signal BRET pour le recrutement du motif CoA-YFP (L2N2Y2) natif ou muté (AXXAA) par Nur77-RLucII en présence de 1 μ M de cytosporone (Cyt B), DIM-C-pPhOCH₃ (DIM) ou 6-Mercaptopurine (6-MP) pendant 20 min. Les cellules HEK293 ont été transfectées avec une quantité fixe de Nur77-RLucII (10 ng par puits) avec des quantités croissantes du CoA L2N2Y2 (contenant le motif LXXLL) ou du CoA muté AXXAA-YFP (jusqu'à 100 ng par puits) dans une plaque 96 puits. Les données correspondent à un exemple représentatif de trois expériences indépendantes réalisées en quadruplicata. Les courbes ont été tracées en utilisant une régression non linéaire (courbe de saturation à un site).

(B) Essai rapporteur sur les gènes rapporteurs 3XNBRE et 3XNurRE en présence de Nur77 et des ligands Nurs. La concentration de drogues utilisées pour chacune des drogues correspond à leur EC₅₀ respectif, qui a été caractérisé préalablement dans la littérature, soit 1 μ M pour la CYT B, 15 μ M pour la DIM et 50 μ M pour la 6-MP (Wansa and Muscat 2005, Zhan, Du et al. 2008, Yoon, Lee et al. 2011). Les valeurs représentent la moyenne des ratios Firefly/RLU \pm SEM (n = 3) pour lesquels on a ensuite normalisé avec les valeurs du DMSO (0.001%).

La SUMOylation affecte l'activité fonctionnelle de Nur77

Afin de mieux comprendre, la régulation de l'activité de Nur77, nous avons voulu évaluer le rôle de certaines modifications post-traductionnelles (PTMs). Nous avons dans un premier temps généré des mutants sur plusieurs résidus, qui sont reconnus pour être phosphorylés et avoir un effet sur la fonction de Nur77. Nous avons donc muté les Sérines 351, 341 et 164, ainsi que la Thréonine 88 en Alanine (Hirata, Kiuchi et al. 1993, Pekarsky, Hallas et al. 2001,

Maira, Martens et al. 2003, Han, Cao et al. 2006, Wang, Rud et al. 2009, Thompson, Burger et al. 2010) (Yao, He et al. 2012). Les Sérines 351 et 341 sont situées dans le DBD de Nur77. La phosphorylation sur le résidu 351 par AKT est connue pour diminuer l'activité transcriptionnelle de Nur77 ainsi que de bloquer son export nucléaire (Pekarsky, Hallas et al. , Han, Cao et al. 2006). Paradoxalement, ce même résidu est impliqué dans l'export de Nur77 à la mitochondrie pour induire l'apoptose lorsqu'il est phosphorylé par PKC ou RSK1/2 (Wang, Rud et al. 2009, Thompson, Burger et al. 2010). Aussi, il a été montré que la phosphorylation des Sérines 351 et 341 par la PKA augmente la liaison à l'ADN de l'homodimère Nur77/Nur77 et diminue la liaison de la forme monomérique (Hirata, Kiuchi et al. 1993, Maira, Martens et al. 2003). La Sérine 164 et la Thréonine 88 sont quant à eux situées dans la portion AF-1 de Nur77. Il a été montré que la phosphorylation par la DNA-PK de la Sérine 164 induisait la réparation à l'ADN, alors que la phosphorylation de la Thréonine 88 par CHEK2 augmente la capacité de Nur77 à se lier à ses éléments de réponses (Yao, He et al. 2012)

Les courbes de titration en essais BRET, nous ont permis d'observer qu'il n'y avait pas de différences sur la faculté de recruter le motif de co-activation L2N2GFP2 entre les différents mutants et le Nur77 sauvage (résultats non publiés). De plus, nous avons essayé d'induire les voies de signalisation ERK/MAP kinase, PI3K/Akt et PKC avec l'ajout de facteur de croissance tel que l'EGF, PDGF et VEGF mais là aussi nous n'avons pas observé d'effets sur ses mutants comparativement au Nur77 sauvage que ce soit en essai BRET ou encore en essai rapporteur. Il existe plusieurs possibilités pouvant expliquer ces résultats. Par exemple, il a été montré que pour la sérine 351 (Ser351) lorsque muté ne semble pas avoir d'effet, mais

lorsqu'on ajoute une forme constitutive de MEKK1 celui-ci est délocalisé dans le cytoplasme alors que cela n'est pas le cas avec la forme constitutive de AKT (Han, Cao et al. 2006). Il semblerait donc que la mutation du résidu seul ne soit pas suffisante pour observer un effet et qu'il est nécessaire de surexprimer des kinases être en mesure de voir l'effet. Il serait toutefois intéressant de vérifier le rôle de la phosphorylation de Nur77 en générant des mutants phosphomimétiques, en remplaçant les sérines et thréonines mentionnées plus tôt par l'acide glutamique, bien que cette modification ne reproduise pas complètement l'effet de la phosphorylation. Il est aussi important de mettre en perspective que l'on ne mesure pas la même chose avec l'essai BRET en présence du motif de co-activation. Nos résultats nous indiquent que les mutants garde leur potentiel à recruter le co-activateur, alors que les autres études sur ces mêmes mutants montre un rôle dans la localisation cellulaire (noyau ou cytoplasme) ou encore dans leurs facultés à lié l'ADN sur des éléments NBRE ou NurRE. Concernant la localisation cellulaire, il est vrai que notre essai BRET mesure seulement l'interaction avec le co-activateur et ne nous permet pas de confirmer une possible délocalisation. Il est probable qu'une proportion de Nur77 reste dans le noyau pour interagir avec le co-activateur alors que le reste serait présent dans le cytoplasme. Il serait donc important de vérifier par FRET ou microscopie si dans nos conditions expérimentales il y a une délocalisation des mutants non phosphorylable de Nur77 du noyau au cytoplasme. Quant à la faculté de Nur77 a se lier à ses éléments de réponse, nous n'avons également pas observé de différence en essai rapporteur entre la forme sauvage et les mutants sur les sérines 351, 341 et 164 et la thréonine 88 mutants. Il paraît donc essentiel de répéter ces expériences de BRET et d'essai rapporteurs dans les mêmes conditions où ces mutants ont été caractérisé (lignées

cellulaires, traitements) afin de mieux comprendre le rôle de la phosphorylation dans la régulation de la fonction de Nur77.

Il a été démontré récemment que la SUMOylation pouvait jouer un rôle dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de Nur1 (Galleguillos, Vecchiola et al. 2004, Arredondo, Orellana et al. 2013). Nous avons donc testé cette possibilité. Ces résultats sont présentés dans l'article 2 de la présente thèse. Ces résultats suggèrent que la SUMOylation joue un rôle important dans la régulation de l'activité de Nur77. En effet, nous avons montré par BRET que Nur77 (Nur77-RlucII) recrute préférentiellement la SUMO2 (YFP-SUMO2) sur le site lysine 577 (K577) situé dans l'hélice H11 du LBD et que la SUMOylation sur ce résidu est important pour le recrutement du co-activateur par la forme monomérique de Nur77. De façon intéressante, nous avons observé que le recrutement de la SUMO2 sur K577 ne semble pas affecter l'activité homodimérique de Nur77. Pour l'hétérodimère Nur77/RXR γ , nos résultats suggèrent que la SUMOylation de la lysine 577 de Nur77 va produire un changement de conformation qui peut affecter l'activité de certains ligands pour le recrutement d'un co-activateur par le complexe Nur77/RXR γ . Ainsi, la SUMOylation pourrait moduler l'activité de certains ligands dans le contexte du complexe Nur77/RXR γ . Des essais rapporteurs sont en cours pour vérifier si la SUMOylation affecterait aussi l'activité transcriptionnelle de Nur77 sur des éléments de réponse NBRE, NurRE et DR-5. Il est aussi intéressant de noter que la SUMOylation de la lysine 577 de Nur1 induit une perte de l'activité transcriptionnelle à partir d'un gène rapporteur contenant trois éléments NBRE et que PIAS γ potentialiserait cette répression (Galleguillos, Vecchiola et al. 2004). Hors, avec Nur77, nous n'observons pas d'effet de PIAS γ sur le recrutement de co-activateur et cela ne devrait donc pas altérer la

transcription. Cela suggérerait donc que PIAS γ régulerait l'activité transcriptionnelle de Nurrl mais pas de Nur77, même si cette hypothèse doit être validée préalablement par essais rapporteurs encore une fois. Quant à la Lysine 102 de Nur77, le site consensus de SUMOylation ψ KX(E/D) est conservé à 85% alors que son site homologue sur Nurrl est lui préservé à 94%. Cette différence pourrait expliquer pourquoi, on n'observe pas d'effet de la SUMOylation sur la Lysine 102 de Nur77 comparativement à la Lysine 91 de Nurrl.

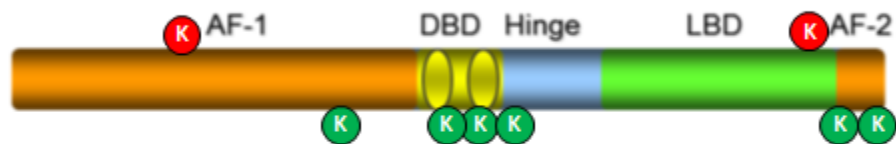


Figure 29: Sites de SUMOylation de Nur77

Les cercles rouges correspondent aux sites de SUMOylation étudiés dans le cadre de l'article « Role of Nur77 SUMOylation » p105. Le site en AF-1 correspond à la lysine 102 (K102) et la lysine 577 (K577). Les cercles verts équivalent à certains sites potentiels identifiés par l'analyse via SUMOplot dans la Figure 20 tels que les lysines 208,354, 381, 397, 588 et 590.

Il a été aussi montré que la SUMOylation était liée avec la régulation de l'expression de Nur77 dans les neurones (Shalizi, Gaudilliere et al. 2006). En effet, la forme phosphorylée et SUMOylée de MEF2A, un important facteur de transcription localisé dans le promoteur proximal de Nur77, va réprimer la transcription de Nur77, ce qui va avoir pour effet d'induire la formation de nouvelles synapses (Shalizi, Gaudilliere et al. 2006). La SUMOylation pourrait ainsi affecter directement et indirectement l'activité de Nur77 dans une voie de signalisation intracellulaire responsable de la plasticité synaptique.

Applications physiologiques et en développement du médicament

Nous avons aussi pu déterminer au cours de cette thèse un rôle de l'antagoniste UVI3003 sur le complexe Nur77/RXR γ . Cependant, celui-ci n'est pas sélectif, car il présente le même profil pharmacologique avec le complexe RXR γ /RXR γ et Nurr1/RXR. Il paraît toutefois envisageable qu'il soit possible, tout comme pour l'activité agoniste du SR11237, de générer une activité antagoniste sélective pour le complexe Nur77/RXR ou pour Nur77 seul (**Figure 14**). L'intérêt de développer une telle molécule pourrait se révéler intéressant pour le traitement de certains cancers. En effet, il a été démontré que lorsque Nur77 est localisé au noyau, il favorise la survie cellulaire (Wingate and Arthur 2006). Cette activité est favorisée par son interaction avec les RXRs (Lévesque and Rouillard 2009). Par contre, lorsque Nur77 est délocalisé du noyau vers le cytoplasme et plus spécifiquement la mitochondrie, pour interagir avec Bcl-2, cela va enclencher un processus apoptotique (**Figure 30**) (Lévesque and Rouillard 2009). Cette translocation a été observée dans de nombreuses lignées cellulaires

cancéreuses (Zhang 2007). Ce phénomène, jumelé à de nombreuses études rapportant un lien entre l'expression et/ou l'activité de Nur77 et la progression et/ou un pronostic cancéreux défavorable (Wingate and Arthur 2006, Zhang 2007, Beard, Tenga et al. 2015), suggère un rôle central de ce facteur de transcription dans de nombreux types de cancers. Ainsi, développer une drogue qui empêcherait l'interaction Nur77/RXR ou encore le recrutement des co-activateurs à ce complexe de NRs pourrait favoriser la mort de certaines cellules cancéreuses.

La sélectivité du SR11237 pour le complexe Nur77/RXR γ , fait de ce ligand un candidat intéressant pour développer de nouvelles molécules pour traiter les dyskinésies tardives à partir de son « squelette ». En effet, malgré sa sélectivité, le dimère Nur77/RXR γ en présence de SR11237 a montré une efficacité maximale de liaison au motif de co-activation de 38% par rapport au 9cis-RA. Il pourrait donc s'avérer intéressant de modifier cette molécule afin d'augmenter son activité. Toutefois, il faudra être vigilant afin de s'assurer que l'augmentation de l'efficacité d'un dérivé du SR11237 n'entraîne pas des effets adverses graves, notamment via des effets « hors cibles ». Il sera aussi nécessaire d'évaluer son profil BCS (Biopharmaceutics Classification System), car cette molécule doit être suffisamment liposoluble pour qu'elle puisse passer la barrière hématoencéphalique, afin qu'elle agisse sur les structures cibles reliées aux dyskinésies tardives.

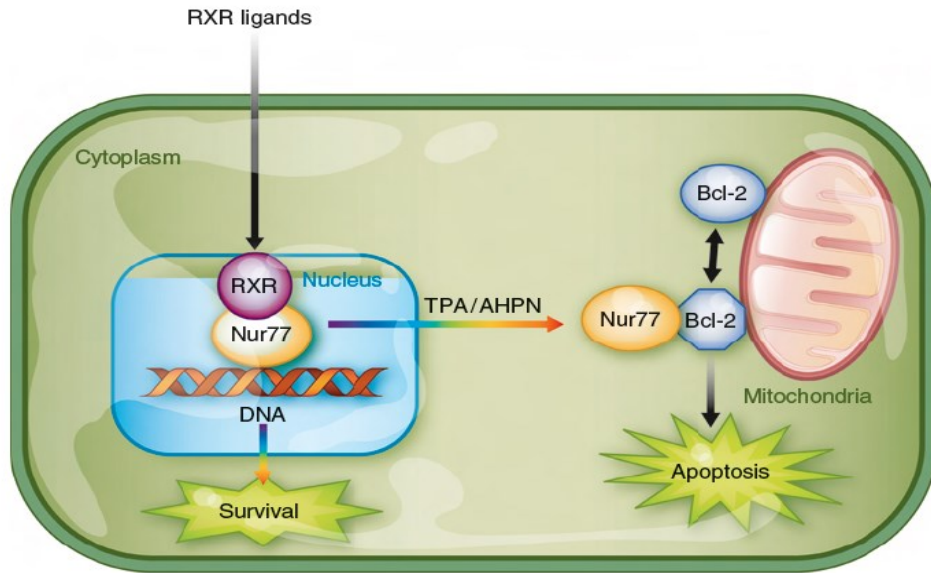


Figure 30: Le rôle de Nur77 dans l'apoptose.

Dans le noyau, Nur77 va promouvoir la survie cellulaire, notamment grâce à son interaction avec RXR. Lors du traitement avec du TPA ou AHPN/CD437 Nur77 va être délocalisé à la mitochondrie pour interagir avec Bcl-2. Cette interaction va en fait déstabiliser Bcl-2 et transformer son activité initialement anti-apoptotique en une activité pro-apoptotique. (tirée de (Lévesque and Rouillard 2009))

Annexe 1

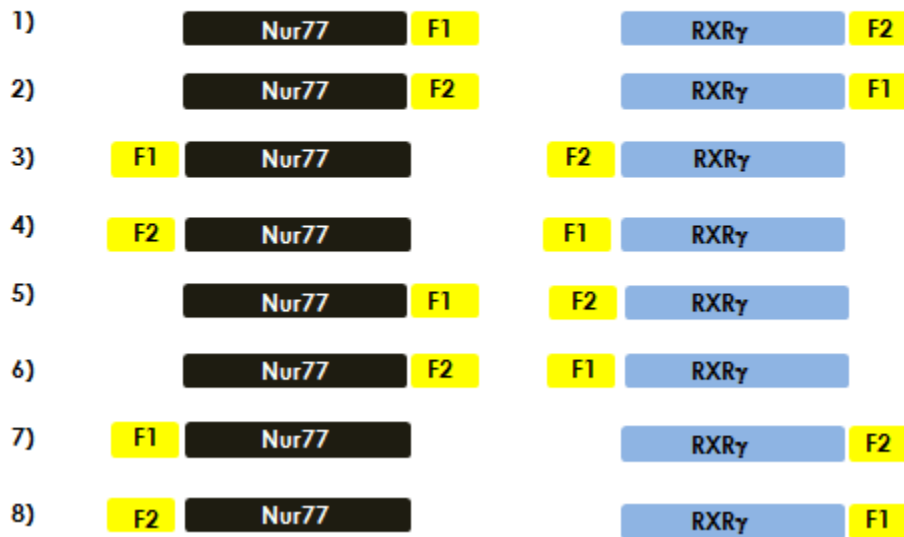


Figure S5: Optimisation du PCA-BRET

Schéma des différentes combinaisons effectuées (1 à 8) afin de déterminer la meilleure orientation entre les sous-unités de la RLucII F1 et F2 pour la complémentation entre Nur77 et RXR γ . Les résultats de l'expression de la luminescence de ces différentes combinaisons sont présentés dans la Figure 12A.

Bibliographie

A, I. J., N. S. Tan, L. Gelman, S. Kersten, J. Seydoux, J. Xu, D. Metzger, L. Canaple, P. Chambon, W. Wahli and B. Desvergne (2004). "In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers." EMBO J **23**(10): 2083-2091.

Aarnisalo, P., C. H. Kim, J. W. Lee and T. Perlmann (2002). "Defining requirements for heterodimerization between the retinoid X receptor and the orphan nuclear receptor Nurr1." J Biol Chem **277**(38): 35118-35123.

Abdel-Hafiz, H., G. S. Takimoto, L. Tung and K. B. Horwitz (2002). "The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression." J Biol Chem **277**(37): 33950-33956.

Allenby, G., M. T. Bocquel, M. Saunders, S. Kazmer, J. Speck, M. Rosenberger, A. Lovey, P. Kastner, J. F. Grippo and P. Chambon (1993). "Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: interactions with endogenous retinoic acids." Proceedings of the National Academy of Sciences **90**(1): 30-34.

Alvarez-Castelao, B., F. Losada, P. Ahicart and J. G. Castano (2013). "The N-terminal region of Nurr1 (a.a 1-31) is essential for its efficient degradation by the ubiquitin proteasome pathway." PLoS One **8**(2): e55999.

Anbalagan, M., B. Huderson, L. Murphy and B. G. Rowan (2012). "Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease." Nucl Recept Signal **10**: e001.

Aranda, A. and A. Pascual (2001). Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression.

Armando, S., J. Quoyer, V. Lukashova, A. Maiga, Y. Percherancier, N. Heveker, J. P. Pin, L. Prezeau and M. Bouvier (2014). "The chemokine CXCR4 and CXCR2 receptors form homo- and

heterooligomers that can engage their signaling G-protein effectors and betaarrestin." FASEB J **28**(10): 4509-4523.

Arredondo, C., M. Orellana, A. Vecchiola, L. A. Pereira, L. Galdames and M. E. Andres (2013). "PIASgamma enhanced SUMO-2 modification of Nurr1 activation-function-1 domain limits Nurr1 transcriptional synergy." PLoS One **8**(1): e55035.

Audet, M., M. Lagace, D. W. Silversides and M. Bouvier (2010). "Protein-protein interactions monitored in cells from transgenic mice using bioluminescence resonance energy transfer." FASEB J **24**(8): 2829-2838.

Ayaydin, F. and M. Dasso (2004). "Distinct in vivo dynamics of vertebrate SUMO paralogues." Mol Biol Cell **15**(12): 5208-5218.

Ayoub, M. A. and K. D. Pflieger (2010). "Recent advances in bioluminescence resonance energy transfer technologies to study GPCR heteromerization." Curr Opin Pharmacol **10**(1): 44-52.

Bacart, J., C. Corbel, R. Jockers, S. Bach and C. Couturier (2008). "The BRET technology and its application to screening assays." Biotechnol J **3**(3): 311-324.

Bain, D. L., A. F. Heneghan, K. D. Connaghan-Jones and M. T. Miura (2007). "Nuclear receptor structure: implications for function." Annu Rev Physiol **69**: 201-220.

Baker, K. D., L. M. Shewchuk, T. Kozlova, M. Makishima, A. Hassell, B. Wisely, J. A. Caravella, M. H. Lambert, J. L. Reinking, H. Krause, C. S. Thummel, T. M. Willson and D. J. Mangelsdorf (2003). "The Drosophila orphan nuclear receptor DHR38 mediates an atypical ecdysteroid signaling pathway." Cell **113**(6): 731-742.

Beard, J. A., A. Tenga and T. Chen (2015). "The interplay of NR4A receptors and the oncogene-tumor suppressor networks in cancer." Cell Signal **27**(2): 257-266.

Beaudry, G., M. C. Langlois, I. Weppe, C. Rouillard and D. Levesque (2000). "Contrasting patterns and cellular specificity of transcriptional regulation of the nuclear receptor nerve growth factor-inducible B by haloperidol and clozapine in the rat forebrain." J Neurochem **75**(4): 1694-1702.

Benoit, G., M. Malewicz and T. Perlmann (2004). "Digging deep into the pockets of orphan nuclear receptors: insights from structural studies." Trends Cell Biol **14**(7): 369-376.

Boehm, M. F., M. R. McClurg, C. Pathirana, D. Mangelsdorf, S. K. White, J. Hebert, D. Winn, M. E. Goldman and R. A. Heyman (1994). "Synthesis of high specific activity [3H]-9-cis-retinoic acid and its application for identifying retinoids with unusual binding properties." J. Med. Chem. **37**(3): 408-414.

Boehm, M. F., L. Zhang, B. A. Badea, S. K. White, D. E. Mais, E. Berger, C. M. Suto, M. E. Goldman and R. A. Heyman (1994). "Synthesis and structure-activity relationships of novel retinoid X receptor-selective retinoids." J. Med. Chem. **37**(18): 2930-2941.

Boehm, M. F., L. Zhang, L. Zhi, M. R. McClurg, E. Berger, M. Wagoner, D. E. Mais, C. M. Suto, J. A. Davies, R. A. Heyman and A. M. Nadzan (1995). "Design and synthesis of potent retinoid X receptor selective ligands that induce apoptosis in leukemia cells." J. Med. Chem. **38**(16): 3146-3155.

Bohren, K. M., V. Nadkarni, J. H. Song, K. H. Gabbay and D. Owerbach (2004). "A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus." J Biol Chem **279**(26): 27233-27238.

Bookout, A. L., Y. Jeong, M. Downes, R. T. Yu, R. M. Evans and D. J. Mangelsdorf (2006). "Anatomical Profiling of Nuclear Receptor Expression Reveals a Hierarchical Transcriptional Network." Cell **126**(4): 789-799.

Bourhis, E., J. Maheux, B. Paquet, H. Kagechika, K. Shudo, P. P. Rompre, C. Rouillard and D. Levesque (2009). "The transcription factors Nur77 and retinoid X receptors participate in amphetamine-induced locomotor activities." Psychopharmacology (Berl) **202**(4): 635-648.

Boute, N., R. Jockers and T. Issad (2002). "The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET." Trends Pharmacol Sci **23**(8): 351-354.

Burris, T. P., L. A. Solt, Y. Wang, C. Crumbley, S. Banerjee, K. Griffett, T. Lundasen, T. Hughes and D. J. Kojetin (2013). "Nuclear Receptors and Their Selective Pharmacologic Modulators." Pharmacological Reviews **65**(2): 710-778.

Calabresi, P., M. Di Filippo, V. Ghiglieri, N. Tambasco and B. Picconi (2010). "Levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease: filling the bench-to-bedside gap." Lancet Neurol **9**(11): 1106-1117.

Campos-Melo, D., D. Galleguillos, N. Sánchez, K. Gysling and M. E. Andrés (2013). "NUR TRANSCRIPTION FACTORS IN STRESS AND ADDICTION." Frontiers in Molecular Neuroscience **6**.

Cao, X., W. Liu, F. Lin, H. Li, S. K. Kolluri, B. Lin, Y. H. Han, M. I. Dawson and X. K. Zhang (2004). "Retinoid X receptor regulates Nur77/TR3-dependent apoptosis [corrected] by modulating its nuclear export and mitochondrial targeting." Mol Cell Biol **24**(22): 9705-9725.

Carriba, P., G. Navarro, F. Ciruela, S. Ferre, V. Casado, L. Agnati, A. Cortes, J. Mallol, K. Fuxe, E. I. Canela, C. Lluís and R. Franco (2008). "Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET." Nat Methods **5**(8): 727-733.

Castillo, S. O., J. S. Baffi, M. Palkovits, D. S. Goldstein, I. J. Kopin, J. Witta, M. A. Magnuson and V. M. Nikodem (1998). "Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the Nurr1 gene." Mol Cell Neurosci **11**(1-2): 36-46.

Castro, D. S., M. Arvidsson, M. Bondesson Bolin and T. Perlmann (1999). "Activity of the Nurr1 carboxyl-terminal domain depends on cell type and integrity of the activation function 2." J Biol Chem **274**(52): 37483-37490.

Chambon, P. (1996). "A decade of molecular biology of retinoic acid receptors." The FASEB Journal **10**(9): 940-954.

Chao, L. C., Z. Zhang, L. Pei, T. Saito, P. Tontonoz and P. F. Pilch (2007). "Nur77 coordinately regulates expression of genes linked to glucose metabolism in skeletal muscle." Mol. Endocrinol. **21**(9): 2152-2163.

Cheng, L. E., F. K. Chan, D. Cado and A. Winoto (1997). "Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis." EMBO J **16**(8): 1865-1875.

Cho, S. D., K. Yoon, S. Chintharlapalli, M. Abdelrahim, P. Lei, S. Hamilton, S. Khan, S. K. Ramaiah and S. Safe (2007). "Nur77 agonists induce proapoptotic genes and responses in colon cancer cells through nuclear receptor-dependent and nuclear receptor-independent pathways." Cancer Res **67**(2): 674-683.

Choi, S. J., S. S. Chung, E. J. Rho, H. W. Lee, M. H. Lee, H. S. Choi, J. H. Seol, S. H. Baek, O. S. Bang and C. H. Chung (2006). "Negative modulation of RXRalpha transcriptional activity by small ubiquitin-related modifier (SUMO) modification and its reversal by SUMO-specific protease SUSP1." J Biol Chem **281**(41): 30669-30677.

Claessens, F., G. Verrijdt, E. Schoenmakers, A. Haelens, B. Peeters, G. Verhoeven and W. Rombauts (2001). "Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation." J Steroid Biochem Mol Biol **76**(1-5): 23-30.

Crawford, P. A., Y. Sadovsky, K. Woodson, S. L. Lee and J. Milbrandt (1995). "Adrenocortical function and regulation of the steroid 21-hydroxylase gene in NGFI-B-deficient mice." Mol Cell Biol **15**(8): 4331-4316.

Damm, K., R. A. Heyman, K. Umesono and R. M. Evans (1993). "Functional inhibition of retinoic acid response by dominant negative retinoic acid receptor mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(7): 2989-2993.

Dawson, M. I. and Z. Xia (2012). "The retinoid X receptors and their ligands." Biochim Biophys Acta **1821**(1): 21-56.

De, A., P. Ray, A. M. Loening and S. S. Gambhir (2009). "BRET3: a red-shifted bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based integrated platform for imaging protein-protein interactions from single live cells and living animals." FASEB J **23**(8): 2702-2709.

de Lera, A. R., W. Bourguet, L. Altucci and H. Gronemeyer (2007). "Design of selective nuclear receptor modulators: RAR and RXR as a case study." Nat. Rev. Drug Discov. **6**(10): 811-820.

DeYoung, R. A., J. C. Baker, D. Cado and A. Winoto (2003). "The orphan steroid receptor Nur77 family member Nor-1 is essential for early mouse embryogenesis." J Biol Chem **278**(47): 47104-47109.

Dragulescu-Andrasi, A., C. T. Chan, A. De, T. F. Massoud and S. S. Gambhir (2011). "Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging of protein-protein interactions within deep tissues of living subjects." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(29): 12060-12065.

Dubois, C., B. Hengerer and H. Mattes (2006). "Identification of a potent agonist of the orphan nuclear receptor Nurr1." ChemMedChem **1**(9): 955-958.

Duong, V. and C. Rochette-Egly (2011). "The molecular physiology of nuclear retinoic acid receptors. From health to disease." Biochim Biophys Acta **1812**(8): 1023-1031.

Duplessis, T. T., K. L. Koterba and B. G. Rowan (2009). "Detection of ERalpha-SRC-1 interactions using bioluminescent resonance energy transfer." Methods Mol. Biol. **590**: 253-263.

Egea, P. F., A. Mitschler and D. Moras (2002). "Molecular recognition of agonist ligands by RXRs." Mol Endocrinol **16**(5): 987-997.

Ethier, I., G. Beaudry, M. St-Hilaire, J. Milbrandt, C. Rouillard and D. Levesque (2004). "The transcription factor NGFI-B (Nur77) and retinoids play a critical role in acute neuroleptic-induced extrapyramidal effect and striatal neuropeptide gene expression." Neuropsychopharmacology **29**(2): 335-346.

Ethier, I., H. Kagechika, K. Shudo, C. Rouillard and D. Levesque (2004). "Docosahexaenoic acid reduces haloperidol-induced dyskinesias in mice: involvement of Nur77 and retinoid receptors." Biol Psychiatry **56**(7): 522-526.

Evans, R. M. and D. J. Mangelsdorf (2014). "Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang." Cell **157**(1): 255-266.

Farmer, L. J., K. S. Marron, S. S. Canan Koch, C. K. Hwang, E. A. Kallel, L. Zhi, A. M. Nadzan, D. W. Robertson and Y. L. Bennani (2006). "Aza-retinoids as novel retinoid X receptor-specific agonists." Bioorg. Med. Chem. Lett. **16**(9): 2352-2356.

Fernandes, I., Y. Bastien, T. Wai, K. Nygard, R. Lin, O. Cormier, H. S. Lee, F. Eng, N. R. Bertos, N. Pelletier, S. Mader, V. K. Han, X. J. Yang and J. H. White (2003). "Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms." Mol Cell **11**(1): 139-150.

Flaig, R., H. Greschik, C. Peluso-Iltis and D. Moras (2005). "Structural basis for the cell-specific activities of the NGFI-B and the Nurr1 ligand-binding domain." J Biol Chem **280**(19): 19250-19258.

Forman, B. M., K. Umesono, J. Chen and R. M. Evans (1995). "Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors." Cell **81**(4): 541-550.

Galleguillos, D., A. Vecchiola, J. A. Fuentealba, V. Ojeda, K. Alvarez, A. Gomez and M. E. Andres (2004). "PIASgamma represses the transcriptional activation induced by the nuclear receptor Nurr1." J Biol Chem **279**(3): 2005-2011.

Gareau, J. R. and C. D. Lima (2010). "The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(12): 861-871.

Garside, H., A. Stevens, S. Farrow, C. Normand, B. Houle, A. Berry, B. Maschera and D. Ray (2004). "Glucocorticoid ligands specify different interactions with NF-kappaB by allosteric effects on the glucocorticoid receptor DNA binding domain." J Biol Chem **279**(48): 50050-50059.

Geiss-Friedlander, R. and F. Melchior (2007). "Concepts in sumoylation: a decade on." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(12): 947-956.

Germain, P., P. Chambon, G. Eichele, R. M. Evans, M. A. Lazar, M. Leid, A. R. De Lera, R. Lotan, D. J. Mangelsdorf and H. Gronemeyer (2006). "International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors." Pharmacol Rev **58**(4): 760-772.

Germain, P., S. Kammerer, E. Perez, C. Peluso-Iltis, D. Tortolani, F. C. Zusi, J. Starrett, P. Lapointe, J. P. Daris, A. Marinier, A. R. de Lera, N. Rochel and H. Gronemeyer (2004). "Rational design of RAR-selective ligands revealed by RARbeta crystal structure." EMBO Rep **5**(9): 877-882.

Germain, P., B. Staels, C. Dacquet, M. Spedding and V. Laudet (2006). "Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors." Pharmacological Reviews **58**(4): 685-704.

Giguere, V. (1999). "Orphan nuclear receptors: from gene to function." Endocr Rev **20**(5): 689-725.

Gilbert, F., M. Morissette, M. St-Hilaire, B. Paquet, C. Rouillard, T. Di Paolo and D. Levesque (2006). "Nur77 gene knockout alters dopamine neuron biochemical activity and dopamine turnover." Biol Psychiatry **60**(6): 538-547.

Giner, X., D. Cotnoir-White, S. Mader and D. Lévesque (2015). "Selective ligand activity at Nur/retinoid X receptor complexes revealed by dimer-specific bioluminescence resonance energy transfer-based sensors." FASEB J(in press).

Goldstein, J. T., A. Dobrzyn, M. Clagett-Dame, J. W. Pike and H. F. DeLuca (2003). "Isolation and characterization of unsaturated fatty acids as natural ligands for the retinoid-X receptor." Arch. Biochem. Biophys. **420**(1): 185-193.

Gronemeyer, H., J.-A. Gustafsson and V. Laudet (2004). "Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily." Nat Rev Drug Discov **3**(11): 950-964.

Guo, D., M. Li, Y. Zhang, P. Yang, S. Eckenrode, D. Hopkins, W. Zheng, S. Purohit, R. H. Podolsky, A. Muir, J. Wang, Z. Dong, T. Brusko, M. Atkinson, P. Pozzilli, A. Zeidler, L. J. Raffel, C. O. Jacob, Y. Park, M. Serrano-Rios, M. T. Larrad, Z. Zhang, H. J. Garchon, J. F. Bach, J. I. Rotter, J. X. She and C. Y. Wang (2004). "A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes." Nat Genet **36**(8): 837-841.

Gurevich, I., A. M. Flores and B. J. Aneskievich (2007). "Corepressors of agonist-bound nuclear receptors." Toxicol Appl Pharmacol **223**(3): 288-298.

Hager, G. L., C. S. Lim, C. Elbi and C. T. Baumann (2000). "Trafficking of nuclear receptors in living cells." J Steroid Biochem Mol Biol **74**(5): 249-254.

Hall, M. P., J. Unch, B. F. Binkowski, M. P. Valley, B. L. Butler, M. G. Wood, P. Otto, K. Zimmerman, G. Vidugiris, T. Machleidt, M. B. Robers, H. A. Benink, C. T. Eggers, M. R. Slater, P. L. Meisenheimer, D. H. Klaubert, F. Fan, L. P. Encell and K. V. Wood (2012). "Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate." ACS Chem Biol **7**(11): 1848-1857.

Han, Y. H., X. Cao, B. Lin, F. Lin, S. K. Kolluri, J. Stebbins, J. C. Reed, M. I. Dawson and X. k. Zhang (2006). "Regulation of Nur77 nuclear export by c-Jun N-terminal kinase and Akt." Oncogene **25**(21): 2974-2986.

Hay, R. T. (2005). "SUMO: a history of modification." Mol Cell **18**(1): 1-12.

Heery, D. M., E. Kalkhoven, S. Hoare and M. G. Parker (1997). "A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors." Nature **387**(6634): 733-736.

Helsen, C. and F. Claessens (2014). "Looking at nuclear receptors from a new angle." Mol Cell Endocrinol **382**(1): 97-106.

Helsen, C., S. Kerkhofs, L. Clinckemalie, L. Spans, M. Laurent, S. Boonen, D. Vanderschueren and F. Claessens (2012). "Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding." Mol Cell Endocrinol **348**(2): 411-417.

Hermanson, E., B. Joseph, D. Castro, E. Lindqvist, P. Aarnisalo, A. Wallen, G. Benoit, B. Hengerer, L. Olson and T. Perlmann (2003). "Nurr1 regulates dopamine synthesis and storage in MN9D dopamine cells." Exp Cell Res **288**(2): 324-334.

Heyman, R. A., D. J. Mangelsdorf, J. A. Dyck, R. B. Stein, G. Eichele, R. M. Evans and C. Thaller (1992). "9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor." Cell **68**(2): 397-406.

Hilmi, K., N. Hussein, R. Mendoza-Sanchez, M. El-Ezzy, H. Ismail, C. Durette, M. Bail, M. J. Rozendaal, M. Bouvier, P. Thibault, J. L. Gleason and S. Mader (2012). "Role of SUMOylation in full antiestrogenicity." Mol Cell Biol **32**(19): 3823-3837.

Hirata, Y., K. Kiuchi, H. Chen, J. Milbrandt and G. Guroff (1993). "The phosphorylation and DNA binding of the DNA-binding domain of the orphan nuclear receptor NGFI-B." Journal of Biological Chemistry **268**(33): 24808-24812.

Hong, C. Y., J. H. Park, R. S. Ahn, S. Y. Im, H. S. Choi, J. Soh, S. H. Mellon and K. Lee (2004). "Molecular mechanism of suppression of testicular steroidogenesis by proinflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha." Mol Cell Biol **24**(7): 2593-2604.

Hunter, T. (2007). "The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond." Molecular Cell **28**(5): 730-738.

Ikeda, F. and I. Dikic (2008). Atypical ubiquitin chains: new molecular signals.

Imai, Y., M. Y. Youn, K. Inoue, I. Takada, A. Kouzmenko and S. Kato (2013). "Nuclear receptors in bone physiology and diseases." Physiol Rev **93**(2): 481-523.

- Johnson, L. N. (2009). "The regulation of protein phosphorylation." Biochem Soc Trans **37**(Pt 4): 627-641.
- Johnson, L. N. and R. J. Lewis (2001). "Structural basis for control by phosphorylation." Chem Rev **101**(8): 2209-2242.
- Kadkhodaei, B., T. Ito, E. Joodmardi, B. Mattsson, C. Rouillard, M. Carta, S. Muramatsu, C. Sumi-Ichinose, T. Nomura, D. Metzger, P. Chambon, E. Lindqvist, N. G. Larsson, L. Olson, A. Bjorklund, H. Ichinose and T. Perlmann (2009). "Nurr1 is required for maintenance of maturing and adult midbrain dopamine neurons." J. Neurosci. **29**(50): 15923-15932.
- Kastner, P., M. Mark, M. Leid, A. Gansmuller, W. Chin, J. M. Grondona, D. Decimo, W. Krezel, A. Dierich and P. Chambon (1996). "Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice." Genes Dev **10**(1): 80-92.
- Kastner, P., N. Messaddeq, M. Mark, O. Wendling, J. M. Grondona, S. Ward, N. Ghyselinck and P. Chambon (1997). "Vitamin A deficiency and mutations of RXRalpha, RXRbeta and RARalpha lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes." Development **124**(23): 4749-4758.
- Katagiri, Y., K. Takeda, Z. X. Yu, V. J. Ferrans, K. Ozato and G. Guroff (2000). "Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B." Nat Cell Biol **2**(7): 435-440.
- Klaholz, B. P., J. P. Renaud, A. Mitschler, C. Zusi, P. Chambon, H. Gronemeyer and D. Moras (1998). "Conformational adaptation of agonists to the human nuclear receptor RAR gamma." Nat Struct Biol **5**(3): 199-202.

Kocan, M., H. B. See, R. M. Seeber, K. A. Eidne and K. D. Pflieger (2008). "Demonstration of improvements to the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technology for the monitoring of G protein-coupled receptors in live cells." J Biomol Screen **13**(9): 888-898.

Koterba, K. L. and B. G. Rowan (2006). "Measuring ligand-dependent and ligand-independent interactions between nuclear receptors and associated proteins using Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET2)." Nuclear receptor signaling **4**.

Kovalovsky, D., D. Refojo, A. C. Liberman, D. Hochbaum, M. P. Pereda, O. A. Coso, G. K. Stalla, F. Holsboer and E. Arzt (2002). "Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways." Mol Endocrinol **16**(7): 1638-1651.

Krezel, W., V. Dupe, M. Mark, A. Dierich, P. Kastner and P. Chambon (1996). "RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXR alpha +/-RXR beta -/-RXR gamma -/- mutant mice are viable." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(17): 9010-9014.

Krezel, W., N. Ghyselinck, T. A. Samad, V. Dupe, P. Kastner, E. Borrelli and P. Chambon (1998). "Impaired locomotion and dopamine signaling in retinoid receptor mutant mice." Science **279**(5352): 863-867.

Kurakula, K., D. S. Koenis, C. M. van Tiel and C. J. de Vries (2014). "NR4A nuclear receptors are orphans but not lonesome." Biochim Biophys Acta **1843**(11): 2543-2555.

Lammi, J., T. Perlmann and P. Aarnisalo (2008). "Corepressor interaction differentiates the permissive and non-permissive retinoid X receptor heterodimers." Arch Biochem Biophys **472**(2): 105-114.

Laudet, V. (1997). "Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor." J Mol Endocrinol **19**(3): 207-226.

- Laudet, V., C. Hanni, J. Coll, F. Catzeflis and D. Stehelin (1992). "Evolution of the nuclear receptor gene superfamily." EMBO J **11**(3): 1003-1013.
- Le Drean, Y., N. Mincheneau, P. Le Goff and D. Michel (2002). "Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation." Endocrinology **143**(9): 3482-3489.
- Lee, S. L., R. L. Wesselschmidt, G. P. Linette, O. Kanagawa, J. H. Russell and J. Milbrandt (1995). "Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (Nur77)." Science **269**(5223): 532-535.
- Lefebvre, P., Y. Benomar and B. Staels (2010). "Retinoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions." Trends Endocrinol Metab **21**(11): 676-683.
- Leibowitz, M. D., R. J. Ardecky, M. F. Boehm, C. L. Broderick, M. A. Carfagna, D. L. Crombie, J. D'Arrigo, G. J. Etgen, M. M. Faul, T. A. Grese, H. Havel, N. I. Hein, R. A. Heyman, D. Jolley, K. Klausning, S. Liu, D. E. Mais, C. M. Mapes, K. B. Marschke, P. Y. Michellys, C. Montrose-Rafizadeh, K. M. Ogilvie, B. Pascual, D. Rungta, J. S. Tyhonas, M. S. Urcan, M. Wardlow, N. Yumibe and A. Reifel-Miller (2006). "Biological characterization of a heterodimer-selective retinoid X receptor modulator: potential benefits for the treatment of type 2 diabetes." Endocrinology **147**(2): 1044-1053.
- Leo, C. and J. D. Chen (2000). "The SRC family of nuclear receptor coactivators." Gene **245**(1): 1-11.
- Levesque, D. and C. Rouillard (2007). "Nur77 and retinoid X receptors: crucial factors in dopamine-related neuroadaptation." Trends Neurosci **30**(1): 22-30.

Lévesque, D. and C. Rouillard (2009). Role of Members of the Nur (NR4A) Transcription Factors in Dopamine-Related Neurodegenerative and Neuropsychiatric Disorders. The Handbook of Neuropsychiatric Biomarkers, Endophenotypes and Genes. M. Ritsner, Springer Netherlands: 195-210.

Li, M., K. Xue, J. Ling, F. Y. Diao, Y. G. Cui and J. Y. Liu (2010). "The orphan nuclear receptor NR4A1 regulates transcription of key steroidogenic enzymes in ovarian theca cells." Mol Cell Endocrinol **319**(1-2): 39-46.

Lippert, W. P., C. Burschka, K. Gotz, M. Kaupp, D. Ivanova, C. Gaudon, Y. Sato, P. Antony, N. Rochel, D. Moras, H. Gronemeyer and R. Tacke (2009). "Silicon analogues of the RXR-selective retinoid agonist SR11237 (BMS649): chemistry and biology." ChemMedChem **4**(7): 1143-1152.

Llopis, J., S. Westin, M. Ricote, Z. Wang, C. Y. Cho, R. Kurokawa, T. M. Mullen, D. W. Rose, M. G. Rosenfeld, R. Y. Tsien and C. K. Glass (2000). "Ligand-dependent interactions of coactivators steroid receptor coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor binding protein with nuclear hormone receptors can be imaged in live cells and are required for transcription." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**(8): 4363-4368.

Loening, A. M., T. D. Fenn, A. M. Wu and S. S. Gambhir (2006). "Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output." Protein Eng Des Sel **19**(9): 391-400.

Lupien, M., M. Jeyakumar, E. Hebert, K. Hilmi, D. Cotnoir-White, C. Loch, A. Auger, G. Dayan, G. A. Pinard, J. M. Wurtz, D. Moras, J. Katzenellenbogen and S. Mader (2007). "Raloxifene and ICI182,780 increase estrogen receptor-alpha association with a nuclear

compartment via overlapping sets of hydrophobic amino acids in activation function 2 helix 12." Mol. Endocrinol. **21**(4): 797-816.

Maheux, J., I. Ethier, C. Rouillard and D. Levesque (2005). "Induction patterns of transcription factors of the nur family (nurr1, nur77, and nor-1) by typical and atypical antipsychotics in the mouse brain: implication for their mechanism of action." J Pharmacol Exp Ther **313**(1): 460-473.

Mahmoudi, S., P. Samadi, F. Gilbert, B. Ouattara, M. Morissette, L. Gregoire, C. Rouillard, T. Di Paolo and D. Levesque (2009). "Nur77 mRNA levels and L-Dopa-induced dyskinesias in MPTP monkeys treated with docosahexaenoic acid." Neurobiol Dis **36**(1): 213-222.

Maira, M., C. Martens, E. Batsche, Y. Gauthier and J. Drouin (2003). "Dimer-specific potentiation of NGFI-B (Nur77) transcriptional activity by the protein kinase A pathway and AF-1-dependent coactivator recruitment." Mol Cell Biol **23**(3): 763-776.

Maira, M., C. Martens, A. Philips and J. Drouin (1999). "Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation." Mol Cell Biol **19**(11): 7549-7557.

Mangelsdorf, D. J. and R. M. Evans (1995). "The RXR heterodimers and orphan receptors." Cell **83**(6): 841-850.

Mark, M., N. B. Ghyselinck and P. Chambon (2006). "Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis." Annu Rev Pharmacol Toxicol **46**: 451-480.

Martel, C., S. Dugre-Brisson, K. Boulay, B. Breton, G. Lapointe, S. Armando, V. Trepanier, T. Duchaine, M. Bouvier and L. Desgroseillers (2010). "Multimerization of Stauf1 in live cells." RNA **16**(3): 585-597.

Martens, C., S. Bilodeau, M. Maira, Y. Gauthier and J. Drouin (2005). "Protein-protein interactions and transcriptional antagonism between the subfamily of NGFI-B/Nur77 orphan nuclear receptors and glucocorticoid receptor." Mol Endocrinol **19**(4): 885-897.

Martin, L. J. and J. J. Tremblay (2005). "The human 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta5-Delta4 isomerase type 2 promoter is a novel target for the immediate early orphan nuclear receptor Nur77 in steroidogenic cells." Endocrinology **146**(2): 861-869.

Martin, L. J. and J. J. Tremblay (2008). "Glucocorticoids antagonize cAMP-induced Star transcription in Leydig cells through the orphan nuclear receptor NR4A1." J Mol Endocrinol **41**(3): 165-175.

Martinez-Gonzalez, J. and L. Badimon (2005). "The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells." Cardiovasc Res **65**(3): 609-618.

Mata de Urquiza, A., S. Liu, M. Sjöberg, R. H. Zetterström, W. Griffiths, J. Sjövall and T. Perlmann (2000). "Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain." Science **290**(5499): 2140-2144.

Maxwell, M. A. and G. E. Muscat (2006). "The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles." Nucl Recept Signal **4**: e002.

Maxwell, M. A. and G. E. O. Muscat (2005). "The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles." Nucl. Recept. Signal. **4**: e002 Epub.

McFarland, K., T. A. Spalding, D. Hubbard, J. N. Ma, R. Olsson and E. S. Burstein (2013). "Low dose bexarotene treatment rescues dopamine neurons and restores behavioral function in models of Parkinson's disease." ACS Chem Neurosci **4**(11): 1430-1438.

McKenna, N. J. and B. W. O'Malley (2002). "Minireview: nuclear receptor coactivators--an update." Endocrinology **143**(7): 2461-2465.

Mercier, J.-F., A. Salahpour, S. Angers, A. Breit and M. Bouvier (2002). "Quantitative Assessment of β 1- and β 2-Adrenergic Receptor Homo- and Heterodimerization by Bioluminescence Resonance Energy Transfer." Journal of Biological Chemistry **277**(47): 44925-44931.

Michelini, E., M. Mirasoli, M. Karp, M. Virta and A. Roda (2004). "Development of a bioluminescence resonance energy-transfer assay for estrogen-like compound in vivo monitoring." Anal Chem **76**(23): 7069-7076.

Michellys, P. Y., J. D'Arrigo, T. A. Grese, D. S. Karanewsky, M. D. Leibowitz, D. A. Mais, C. M. Mapes, A. Reifel-Miller, D. Rungta and M. F. Boehm (2004). "Design, synthesis and structure-activity relationship of novel RXR-selective modulators." Bioorg. Med. Chem. Lett. **14**(6): 1593-1598.

Michnick, S. W., P. H. Ear, E. N. Manderson, I. Remy and E. Stefan (2007). "Universal strategies in research and drug discovery based on protein-fragment complementation assays." Nat. Rev. Drug Discov. **6**(7): 569-582.

Morishita, K., N. Yakushiji, F. Ohsawa, K. Takamatsu, N. Matsuura, M. Makishima, M. Kawahata, K. Yamaguchi, A. Tai, K. Sasaki and H. Kakuta (2009). "Replacing alkyl sulfonamide with aromatic sulfonamide in sulfonamide-type RXR agonists favors switch towards antagonist activity." Bioorg. Med. Chem. Lett. **19**(3): 1001-1003.

Morita, K., K. Kawana, M. Sodeyama, L. Shimomura, H. Kagechika and M. Makishima (2005). "Selective allosteric ligand activation of the retinoid X receptor heterodimers of NGFI-B and Nurr1." Biochem. Pharmacol. **71**(1-2): 98-107.

Mukherjee, S. and S. Mani (2010). "Orphan nuclear receptors as targets for drug development." Pharm Res **27**(8): 1439-1468.

Mulero, M., J. Perroy, C. Federici, G. Cabello and V. Ollendorff (2013). "Analysis of RXR/THR and RXR/PPARG2 heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." PLoS One **8**(12): e84569.

Mullican, S. E., S. Zhang, M. Konopleva, V. Ruvolo, M. Andreeff, J. Milbrandt and O. M. Conneely (2007). "Abrogation of nuclear receptors Nr4a3 and Nr4a1 leads to development of acute myeloid leukemia." Nat Med **13**(6): 730-735.

Murphy, E. P., A. McEvoy, O. M. Conneely, B. Bresnihan and O. FitzGerald (2001). "Involvement of the nuclear orphan receptor NURR1 in the regulation of corticotropin-releasing hormone expression and actions in human inflammatory arthritis." Arthritis Rheum **44**(4): 782-793.

Nagy, L. and J. W. R. Schwabe (2004). "Mechanism of the nuclear receptor molecular switch." Trends in Biochemical Sciences **29**(6): 317-324.

Nahoum, V., E. Perez, P. Germain, F. Rodriguez-Barrios, F. Manzo, S. Kammerer, G. Lemaire, O. Hirsch, C. A. Royer, H. Gronemeyer, A. R. de Lera and W. Bourguet (2007). "Modulators of the structural dynamics of the retinoid X receptor to reveal receptor function." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104**(44): 17323-17328.

Nishida, T. and H. Yasuda (2002). "PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription." J Biol Chem **277**(44): 41311-41317.

Novak, G., A. Gallo, C. C. Zai, H. Y. Meltzer, J. A. Lieberman, S. G. Potkin, A. N. Voineskos, G. Remington, J. L. Kennedy, D. Levesque and B. Le Foll (2010). "Association of the orphan nuclear receptor NR4A1 with tardive dyskinesia." Psychiatr Genet **20**(1): 39-43.

Oita, R. C., D. J. Mazzatti, F. L. Lim, J. R. Powell and B. J. Merry (2009). "Whole-genome microarray analysis identifies up-regulation of Nr4a nuclear receptors in muscle and liver from diet-restricted rats." Mech Ageing Dev **130**(4): 240-247.

Pascual, G., A. L. Fong, S. Ogawa, A. Gamliel, A. C. Li, V. Perissi, D. W. Rose, T. M. Willson, M. G. Rosenfeld and C. K. Glass (2005). "A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma." Nature **437**(7059): 759-763.

Paulmurugan, R. and S. S. Gambhir (2003). "Monitoring protein-protein interactions using split synthetic renilla luciferase protein-fragment-assisted complementation." Anal. Chem. **75**(7): 1584-1589.

Pearen, M. A. and G. E. Muscat (2010). "Minireview: Nuclear hormone receptor 4A signaling: implications for metabolic disease." Mol Endocrinol **24**(10): 1891-1903.

Pearen, M. A., S. A. Myers, S. Raichur, J. G. Ryall, G. S. Lynch and G. E. Muscat (2008). "The orphan nuclear receptor, NOR-1, a target of beta-adrenergic signaling, regulates gene expression that controls oxidative metabolism in skeletal muscle." Endocrinology **149**(6): 2853-2865.

Pei, L. M., H. Waki, B. Vaitheesvaran, D. C. Wilpitz, I. J. Kurland and P. Tontonoz (2006). "NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism." Nat. Med. **12**(9): 1048-1055.

Pekarsky, Y., C. Hallas, A. Palamarchuk, A. Koval, F. Bullrich, Y. Hirata, R. Bichi, J. Letofsky and C. M. Croce (2001). "Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(7): 3690-3694.

Pérez, E., W. Bourguet, H. Gronemeyer and A. R. de Lera (2012). "Modulation of RXR function through ligand design." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids **1821**(1): 57-69.

Perlmann, T. and L. Jansson (1995). "A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1." Genes Dev **9**(7): 769-782.

Perroy, J., S. Pontier, P. G. Charest, M. Aubry and M. Bouvier (2004). "Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET." Nat Meth **1**(3): 203-208.

Pfleger, K. D. and K. A. Eidne (2006). "Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." Nat Methods **3**(3): 165-174.

Philips, A., S. Lesage, R. Gingras, M. H. Maira, Y. Gauthier, P. Hugo and J. Drouin (1997). "Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells." Mol Cell Biol **17**(10): 5946-5951.

Ponnio, T., Q. Burton, F. A. Pereira, D. K. Wu and O. M. Conneely (2002). "The nuclear receptor Nor-1 is essential for proliferation of the semicircular canals of the mouse inner ear." Mol Cell Biol **22**(3): 935-945.

Poukka, H., U. Karvonen, O. A. Jänne and J. J. Palvimo (2000). "Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1)." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(26): 14145-14150.

Rebois, R. V., M. Robitaille, D. Petrin, P. Zylbergold, P. Trieu and T. E. Hebert (2008). "Combining protein complementation assays with resonance energy transfer to detect multipartner protein complexes in living cells." Methods **45**(3): 214-218.

Robert, N. M., L. J. Martin and J. J. Tremblay (2006). "The orphan nuclear receptor NR4A1 regulates insulin-like 3 gene transcription in Leydig cells." Biol Reprod **74**(2): 322-330.

Rochette-Egly, C. (2003). "Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation." Cell Signal **15**(4): 355-366.

Rochette-Egly, C. (2005). "Dynamic combinatorial networks in nuclear receptor-mediated transcription." J Biol Chem **280**(38): 32565-32568.

Sacchetti, P., T. R. Mitchell, J. G. Granneman and M. J. Bannon (2001). "Nurr1 enhances transcription of the human dopamine transporter gene through a novel mechanism." J Neurochem **76**(5): 1565-1572.

Safe, S., U. H. Jin, E. Hedrick, A. Reeder and S. O. Lee (2014). "Minireview: role of orphan nuclear receptors in cancer and potential as drug targets." Mol. Endocrinol. **28**(2): 157-172.

Safe, S., K. Kim, X. Li and S.-O. Lee "NR4A orphan receptors and cancer."

Saga, Y., M. Kobayashi, H. Ohta, N. Murai, N. Nakai, M. Oshima and M. M. Taketo (1999). "Impaired extrapyramidal function caused by the targeted disruption of retinoid X receptor RXRgamma1 isoform." Genes Cells **4**(4): 219-228.

Saijo, K., B. Winner, C. T. Carson, J. G. Collier, L. Boyer, M. G. Rosenfeld, F. H. Gage and C. K. Glass (2009). "A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death." Cell **137**(1): 47-59.

Sakaki, J., K. Konishi, M. Kishida, H. Gunji, T. Kanazawa, H. Uchiyama, H. Fukaya, H. Mitani and M. Kimura (2007). "Synthesis and structure-activity relationship of RXR

antagonists based on the diazepinylbenzoic acid structure." Bioorg. Med. Chem. Lett. **17**(17): 4808-4811.

Sakurada, K., M. Ohshima-Sakurada, T. D. Palmer and F. H. Gage (1999). "Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain." Development **126**(18): 4017-4026.

Samadi, P., L. Gregoire, C. Rouillard, P. J. Bedard, T. Di Paolo and D. Levesque (2006). "Docosahexaenoic acid reduces levodopa-induced dyskinesias in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine monkeys." Ann Neurol **59**(2): 282-288.

Saucedo-Cardenas, O. and O. M. Conneely (1996). "Comparative distribution of NURR1 and NUR77 nuclear receptors in the mouse central nervous system." J Mol Neurosci **7**(1): 51-63.

Saucedo-Cardenas, O., J. D. Quintana-Hau, W. D. Le, M. P. Smidt, J. J. Cox, F. De Mayo, J. P. Burbach and O. M. Conneely (1998). "Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 4013-4018.

Savkur, R. S. and T. P. Burris (2004). "The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif." J Pept Res **63**(3): 207-212.

Sentis, S., M. Le Romancer, C. Bianchin, M. C. Rostan and L. Corbo (2005). "Sumoylation of the estrogen receptor alpha hinge region regulates its transcriptional activity." Mol Endocrinol **19**(11): 2671-2684.

Shalizi, A., B. Gaudilliere, Z. Yuan, J. Stegmuller, T. Shirogane, Q. Ge, Y. Tan, B. Schulman, J. W. Harper and A. Bonni (2006). "A calcium-regulated MEF2 sumoylation switch controls postsynaptic differentiation." Science **311**(5763): 1012-1017.

Shiio, Y. and R. N. Eisenman (2003). "Histone sumoylation is associated with transcriptional repression." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13225-13230.

Sladek, F. M. (2003). "Nuclear receptors as drug targets: New developments in coregulators, orphan receptors and major therapeutic areas." Expert Opinion on Therapeutic Targets **7**(5): 679-684.

Sohn, Y. C., E. Kwak, Y. Na, J. W. Lee and S. K. Lee (2001). "Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors and activating signal cointegrator-2 as transcriptional coregulators of the orphan nuclear receptor Nur77." J Biol Chem **276**(47): 43734-43739.

Sonoda, J., L. Pei and R. M. Evans (2008). "Nuclear receptors: Decoding metabolic disease." FEBS Letters **582**(1): 2-9.

St-Hilaire, M., E. Bourhis, D. Levesque and C. Rouillard (2006). "Impaired behavioural and molecular adaptations to dopamine denervation and repeated L-DOPA treatment in Nur77-knockout mice." Eur J Neurosci **24**(3): 795-805.

Stefan, E., S. Aquin, N. Berger, C. R. Landry, B. Nyfeler, M. Bouvier and S. W. Michnick (2007). "Quantification of dynamic protein complexes using Renilla luciferase fragment complementation applied to protein kinase A activities in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(43): 16916-16921.

Stocco, C. O., L. F. Lau and G. Gibori (2002). "A calcium/calmodulin-dependent activation of ERK1/2 mediates JunD phosphorylation and induction of nur77 and 20alpha-hsd genes by prostaglandin F2alpha in ovarian cells." J Biol Chem **277**(5): 3293-3302.

Takamatsu, K., A. Takano, N. Yakushiji, K. Morishita, N. Matsuura, M. Makishima, H. I. Ali, E. Akaho, A. Tai, K. Sasaki and H. Kakuta (2008). "Reduction of lipophilicity at the lipophilic

domain of RXR agonists enables production of subtype preference: RXRalpha-preferential agonist possessing a sulfonamide moiety." ChemMedChem **3**(3): 454-460.

Tate, B. F., G. Allenby, J. R. Perez, A. A. Levin and J. F. Grippo (1996). "A systematic analysis of the AF-2 domain of human retinoic acid receptor alpha reveals amino acids critical for transcriptional activation and conformational integrity." FASEB J **10**(13): 1524-1531.

Thompson, J., M. L. Burger, H. Whang and A. Winoto (2010). "Protein kinase C regulates mitochondrial targeting of Nur77 and its family member Nor-1 in thymocytes undergoing apoptosis." European Journal of Immunology **40**(7): 2041-2049.

Thompson, J. and A. Winoto (2008). "During negative selection, Nur77 family proteins translocate to mitochondria where they associate with Bcl-2 and expose its proapoptotic BH3 domain." J Exp Med **205**(5): 1029-1036.

Tian, S., H. Poukka, J. J. Palvimo and O. A. Janne (2002). "Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor." Biochem J **367**(Pt 3): 907-911.

Umemiya, H., H. Fukasawa, M. Ebisawa, L. Eyrolles, E. Kawachi, G. Eisenmann, H. Gronemeyer, Y. Hashimoto, K. Shudo and H. Kagechika (1997). "Regulation of retinoidal actions by diazepinylbenzoic acids. Retinoid synergists which activate the RXR-RAR heterodimers." J. Med. Chem. **40**(26): 4222-4234.

Uppenberg, J., C. Svensson, M. Jaki, G. Bertilsson, L. Jendeberg and A. Berkenstam (1998). "Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPARgamma." J Biol Chem **273**(47): 31108-31112.

van Tiel, C. M., K. Kurakula, D. S. Koenis, E. van der Wal and C. J. de Vries (2012). "Dual function of Pin1 in NR4A nuclear receptor activation: enhanced activity of NR4As and increased Nur77 protein stability." Biochim Biophys Acta **1823**(10): 1894-1904.

Veum, V. L., S. N. Dankel, J. Gjerde, H. J. Nielsen, M. H. Solsvik, C. Haugen, B. J. Christensen, T. Hoang, D. J. Fadnes, C. Busch, V. Vage, J. V. Sagen and G. Mellgren (2012). "The nuclear receptors NUR77, NURR1 and NOR1 in obesity and during fat loss." Int J Obes (Lond) **36**(9): 1195-1202.

Wagner, C. E., P. W. Jurutka, P. A. Marshall, T. L. Groy, A. van der Vaart, J. W. Ziller, J. K. Furmick, M. E. Graeber, E. Matro, B. V. Miguel, I. T. Tran, J. Kwon, J. N. Tedeschi, S. Moosavi, A. Danishyar, J. S. Philp, R. O. Khamees, J. N. Jackson, D. K. Grupe, S. L. Badshah and J. W. Hart (2009). "Modeling, synthesis and biological evaluation of potential retinoid X receptor (RXR) selective agonists: novel analogues of 4-[1-(3,5,5,8,8-pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydro-2-naphthyl)ethynyl]benzoic acid (bexarotene)." J. Med. Chem. **52**(19): 5950-5966.

Wallen-Mackenzie, A., A. M. de Urquiza, S. Petersson, F. J. Rodriguez, S. Friling, J. Wagner, P. Ordentlich, J. Lengqvist, R. A. Heyman, E. Arenas and T. Perlmann (2003). "Nurr1-RXR heterodimers mediate RXR ligand-induced signaling in neuronal cells." Genes & Development **17**(24): 3036-3047.

Wallen-Mackenzie, A., A. Mata de Urquiza, S. Petersson, F. J. Rodriguez, S. Friling, J. Wagner, P. Ordentlich, J. Lengqvist, R. A. Heyman, E. Arenas and T. Perlmann (2003). "Nurr1-RXR heterodimers mediate RXR ligand-induced signaling in neuronal cells." Genes Dev **17**(24): 3036-3047.

Wan, Y., K. K. Coxe, V. G. Thackray, P. R. Housley and S. K. Nordeen (2001). "Separable features of the ligand-binding domain determine the differential subcellular localization and ligand-binding specificity of glucocorticoid receptor and progesterone receptor." Mol Endocrinol **15**(1): 17-31.

- Wang, A., J. Rud, C. M. Olson, J. Anguita and B. A. Osborne (2009). "Phosphorylation of Nur77 by the MEK-ERK-RSK Cascade Induces Mitochondrial Translocation and Apoptosis in T Cells." The Journal of Immunology **183**(5): 3268-3277.
- Wang, Z., G. Benoit, J. Liu, S. Prasad, P. Aarnisalo, X. Liu, H. Xu, N. P. Walker and T. Perlmann (2003). "Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors." Nature **423**(6939): 555-560.
- Wansa, K. D., J. M. Harris and G. E. Muscat (2002). "The activation function-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity, and coactivator recruitment." J Biol Chem **277**(36): 33001-33011.
- Wansa, K. D., J. M. Harris, G. Yan, P. Ordentlich and G. E. Muscat (2003). "The AF-1 domain of the orphan nuclear receptor NOR-1 mediates trans-activation, coactivator recruitment, and activation by the purine anti-metabolite 6-mercaptopurine." J Biol Chem **278**(27): 24776-24790.
- Wansa, K. D. and G. E. Muscat (2005). "TRAP220 is modulated by the antineoplastic agent 6-Mercaptopurine, and mediates the activation of the NR4A subgroup of nuclear receptors." J Mol Endocrinol **34**(3): 835-848.
- White, J. H., I. Fernandes, S. Mader and X. J. Yang (2004). "Corepressor recruitment by agonist-bound nuclear receptors." Vitam Horm **68**: 123-143.
- Wilson, A. J., D. Arango, J. M. Mariadason, B. G. Heerdt and L. H. Augenlicht (2003). "TR3/Nur77 in colon cancer cell apoptosis." Cancer Res **63**(17): 5401-5407.
- Wilson, T. E., T. J. Fahrner, M. Johnston and J. Milbrandt (1991). "Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast." Science **252**(5010): 1296-1300.

Wilson, T. E., A. R. Mouw, C. A. Weaver, J. Milbrandt and K. L. Parker (1993). "The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase." Mol Cell Biol **13**(2): 861-868.

Wingate, A. D. and J. S. Arthur (2006). "Post-translational control of Nur77." Biochem Soc Trans **34**(Pt 6): 1107-1109.

Xiao, Q., S. O. Castillo and V. M. Nikodem (1996). "Distribution of messenger RNAs for the orphan nuclear receptors Nurr1 and Nur77 (NGFI-B) in adult rat brain using in situ hybridization." Neuroscience **75**(1): 221-230.

Xu, C., M. Peter, N. Bouquier, V. Ollendorff, I. Villamil, J. Liu, L. Fagni and J. Perroy (2013). "REV, A BRET-Based Sensor of ERK Activity." Frontiers in Endocrinology **4**: 95.

Xu, Y., D. W. Piston and C. H. Johnson (1999). "A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(1): 151-156.

Yamada, S. and H. Kakuta (2014). "Retinoid X receptor ligands: a patent review (2007 - 2013)." Expert Opin Ther Pat **24**(4): 443-452.

Yao, L.-m., J.-p. He, H.-z. Chen, Y. Wang, W.-j. Wang, R. Wu, C.-d. Yu and Q. Wu (2012). "Orphan receptor TR3 participates in cisplatin-induced apoptosis via Chk2 phosphorylation to repress intestinal tumorigenesis." Carcinogenesis **33**(2): 301-311.

Yasmin, R., P. Kannan-Thulasiraman, H. Kagechika, M. I. Dawson and N. Noy (2010). "Inhibition of Mammary Carcinoma Cell Growth by RXR is Mediated by the Receptor's Oligomeric Switch." Journal of Molecular Biology **397**(5): 1121-1131.

Ye, Y. and M. Rape (2009). "Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(11): 755-764.

Yoon, K., S. O. Lee, S. D. Cho, K. Kim, S. Khan and S. Safe (2011). "Activation of nuclear TR3 (NR4A1) by a diindolylmethane analog induces apoptosis and proapoptotic genes in pancreatic cancer cells and tumors." Carcinogenesis **32**(6): 836-842.

Zetterstrom, R. H., L. Solomin, L. Jansson, B. J. Hoffer, L. Olson and T. Perlmann (1997). "Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice." Science **276**(5310): 248-250.

Zetterstrom, R. H., L. Solomin, T. Mitsiadis, L. Olson and T. Perlmann (1996). "Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1." Mol Endocrinol **10**(12): 1656-1666.

Zetterström, R. H., R. Williams, T. Perlmann and L. Olson (1996). "Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system." Molecular Brain Research **41**(1-2): 111-120.

Zhan, Y., X. Du, H. Chen, J. Liu, B. Zhao, D. Huang, G. Li, Q. Xu, M. Zhang, B. C. Weimer, D. Chen, Z. Cheng, L. Zhang, Q. Li, S. Li, Z. Zheng, S. Song, Y. Huang, Z. Ye, W. Su, S. C. Lin, Y. Shen and Q. Wu (2008). "Cytosporone B is an agonist for nuclear orphan receptor Nur77." Nat Chem Biol **4**(9): 548-556.

Zhang, J. H., T. D. Chung and K. R. Oldenburg (1999). "A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays." J Biomol Screen **4**(2): 67-73.

Zhang, X. K. (2007). "Targeting Nur77 translocation." Expert Opin Ther Targets **11**(1): 69-79.

Zhao, J. (2007). "Sumoylation regulates diverse biological processes." Cell Mol Life Sci **64**(23): 3017-3033.

Zhao, Y. and D. Bruemmer (2009). "NR4A Orphan Nuclear Receptors in Cardiovascular Biology." Drug Discov. Today Dis. Mech. **6**(1-4): e43-e48.

Zwart, W., R. de Leeuw, M. Rondaij, J. Neefjes, M. A. Mancini and R. Michalides (2010). "The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen." Journal of Cell Science **123**(8): 1253-1261.