

---

## CEG Chap 3 : Les récepteurs nucléaires

---

Florence DEMAY

### Sommaire

CEG Chap 3 : Les récepteurs nucléaires.....	1
I-Introduction.....	2
A) Rôle physiologique des RN .....	2
B) La super-famille des RN.....	2
C) La structure des R nucléaires.....	3
II-Mode d'action des RN.....	4
A) Les RN de type I : les R aux stéroïdes.....	4
B) Les RN de type II : les R partenaires de RXR.....	5
C) Les RN de type III : Les R orphelins.....	5
III-La liaison du ligand.....	5
A) Structure des ligands .....	5
B) Structure du domaine E (LBD).....	5
Étude de différents phyto-oestrogènes.....	6
IV-La liaison à l'ADN.....	7
A) La structure du domaine C (DBD).....	7
La boîte P (P box, boîte proximale) sur le premier doigt de zinc partie N-ter.....	7
La boîte D (D box ; boîte distale ou de dimérisation) .....	8
B) Rôle des boîtes P et D du DBD.....	8
V-Les ER.....	8
A) Orientation et espacement des demi-sites.....	8
VI-Activation transcriptionnelle.....	9
Technique d'immuno-précipitation sur les complexes chromatiniens (chiP).....	10

## I- Introduction

### A) Rôle physiologique des RN

Les RN sont des FT qui ont la particularité d'être activés par des ligands. Les ligands sont tjs des molécules hydrophobes qui vont traverser la mb pour se lier spécifiquement un R qui leur correspond.

Parmi ces R on trouve des hormones (stéroïdes : oestrogènes, T3), hormones thyroïdiennes (permet la différenciation cellulaire au cours du dvt) des vitamines (vitA ou acide rétinoïque permet la différenciation cellulaire ; vitamine D qui maintient le taux de calcium), les leucotriènes (coagulation), prostaglandine, acide biliaire.

Ne pas confondre les R nucléaires et les R mb qui eux sont activés par l'interaction avec un lipide incapable de traverser la mb.

Le dvt des techniques de bioch a permis de caractériser ds les années 60 une protéine capable de lier l'oestradiol et de le retenir ds la cellule. Cette protéine a été appelée R.

Ds les années 80, compétition entre labo américain et labo français pour cloner ce R. Des AC ont été créés ce qui a permis de cloner le R nucléaire. C'est le labo américain qui a cloné pour la première fois le R en connaissant la séquence complète du R. En connaissant ADNc, on a pu caractériser des molécules qui possédaient des domaines conservés qu'on a appelé R nucléaires.

A la fin des années 90, on a pu cloner toute une famille de R dont les ligands n'étaient pas connus : R orphelins.

Dans les années 80 on a identifi<sup>2</sup> que l'ADN pouvait se fixer sur les R. Les ER n'étaient pas connus à cette époque. Fin des années 90, on a identifié les co-facteurs.

Les R nucléaires sont les R les plus étudiés ds le monde. Ils sont impliqués ds de très nbreux processus biologiques.

Exp : métabolisme ac biliaire, biosynth de l'hème et du cholestérol.

On retrouve aussi des R nucléaires impliqués ds bcp de processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation...

Ces R nucléaires présentent aussi des intérêts pharmacologique : en jouant sur l'affinité des ligands on peut moduler l'activité des R. On peut synth des molécules qui vont mimer l'effet des ligands naturels : agoniste si active le R, antagoniste si inactive le R.

Actuellement 10% des médicaments sur le marché jouent sur les R nucléaires.

Exp : pilule : proche des oestradiol qui vont se fixer sur R à l'oestrogène.

### B) La super-famille des RN

Une 60aine de R a été identifiée depuis le séquençage du génome. Tous les modes d'action de ces R ne sont pas connus.

Au niv des R à œstrogène, on trouve deux R (alpha et beta) exprimés ds le même type cellulaire mais les proportions varient selon le type cellulaire. Ces R sont activés par le même ligands mais comme ils sont différents, ils auront des gènes cibles différents ce qui va permettre de moduler

l'action de l'oestradiol.

Ds le cas de cancer du sein, l'oestradiol favorise la prolifération cellulaire. On utilise donc une molécule pour bloquer ces R à l'oestradiol pour empêcher la prolifération cellulaire.

Les R nucléaires ne sont présents que chez les métazoaires. Molécules apparues il y a 700 millions d'années. Au départ, il aurait eu un gène ancestral qui se serait d'abord dupliqué puis qui aurait divergé : le nbr de R nucléaires augmente au cours de l'Evolution.

Au début, la molécule ancestrale n'avait pas de ligand qui serait apparu bien plus tard.

Chez les vertébrés on a identifié une 60aine de RN (R nucléaire). Chez les mammifères, on a identifié 20 RN orphelin càd qu'ils n'ont pas de ligands ou que leur ligand n'a pas encore été identifié.

### C) La structure des R nucléaires

Tous ces RN ont des structures similaires même s'ils peuvent fixer des ligands très différents.

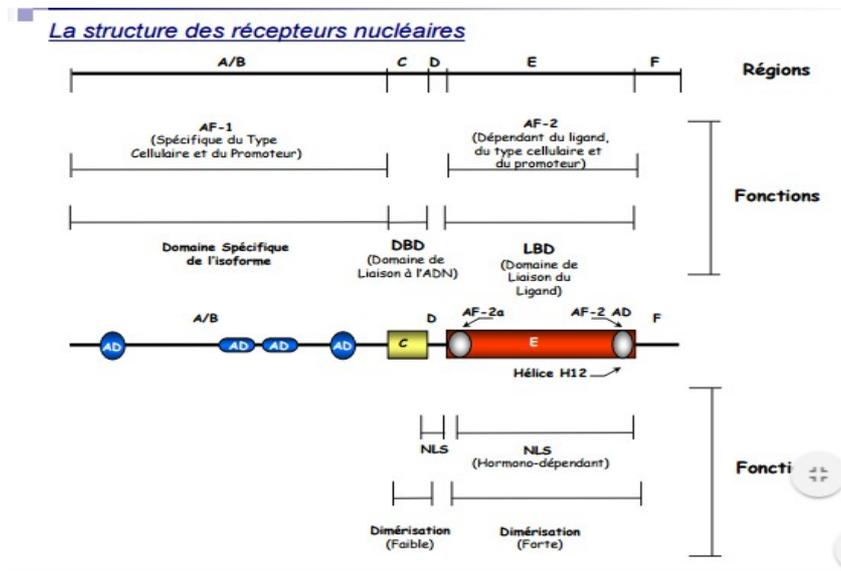
Parmi ces ligands on peut trouver des hormones, des senseurs nutritionnels etc

Ds la plupart des cas, dès la synth des R, le ligand sera associé au R pr que le R puisse avoir la bonne conformation.

Les RN présentent des isoformes : deux gènes diff qui vont coder pr deux gènes diff. Peuvent aussi résulter d'épissage différentiel : R à l'ac rétinioïque. Dans le génome des mammifères, 3 gènes qui codent pour les RN de l'acide rétinioïque (alpha, beta et gamma). Les épissages des ARNpré-m vont permettre la synth de 8 isoformes du R RAR de l'acide rétinioïque

Comme les R sont diff, ils peuvent capter des co-facteurs qui sont diff et qui auront donc des activités différentes.

On a pu distinguer 5 à 6 domaines nommés de A à F. Ces domaines peuvent fonctionner de manière indépendante les uns des autres. Les RN sont donc des FT à structure modulaire.



Le premier **domaine** nommé **A/B** est **très variable** et c'est au niv de ce domaine qu'on retrouvera les épissages alternatifs. On y retrouve la fonction **AF-1** qui a une **fonction activatrice de trans-activation**. Cette dernière permet le recrutement de co-facteurs transcriptionnels activateurs.

Cette fonction AF-1 est svt modulé par des modifications post-traductionnelles notamment des phosphorylations.

Vient ensuite le **domaine C** dont la structure est conservée chez tous les RN. C'est ce domaine qui va permettre la **fixation du R sur l'ADN (DBD ; DNA Binding Domain)**. Il est également impliqué ds la dimérisation des RN.

Le **domaine D** est une région charnière entre les domaine C et E (zone flexible). Permet des changements de position entre les domaines C et E.

Le **domaine E** est le domaine de **liaison du ligand (LBD)**. Possède une fonction **AF-2** qui est également une fonction de trans-activation. Va pouvoir recruter lui aussi des co-facteurs nécessaire à la transcription du gène. Cette fonction ne sera active quand lorsque le ligand sera fixer sur le R. Impliqué ds la dimérisation du R.

On retrouve aussi deux petites séquences : **NLS** (Signa de Localisation Nucléaire) au niveau des domaines C et E.

Ce signal de transfert nucléaire est une succession de 5 à 6 acides aminés basiques riches en arginines et lysines. Bien que ce signal soit consécutivement actif, le transport nucléaire du récepteur est dépendant de l'énergie.

Le **domaine F** est très conservé et a une fonction de **dimérisation**.

## II- Mode d'action des RN

### A) Les RN de type I : les R aux stéroïdes

Chez les R de cette famille, les domaines C et D sont les mêmes pour tous. Les domaines A/B sont différents d'un R à l'autre ainsi que le domaine E (même si les variation sont bcp moins importantes). Seuls les R aux oestrogènes possède un domaine F.

Ce sont des **homodimères**. Ils reconnaissent des séquences de 6 nt qui sont des palindromes imparfaits. La séquence AGAACA très conservée est d'abord reconnue par GR, MR, AR, PR et l'autre séquence du palindrome moins conservée, lie l'autre R de l'homodimère. La séquence AGGTCA est reconnue par ER et l'autre partenaire se lie à l'autre séquence du palindrome moins conservée.

**En abs de ligands** : Les R se trouvent sous la forme de monomère.

Ils sont localisés de manière variable e fonction du type de R stéroïdien : ds le cytosol (GR, MR, PR, AR) ou ds le noyau (ER) et ils sont liés à une protéine Hsp.

Cas du R aux oestrogènes, le R est majoritairement ds le noyau.

**Prot chaperons** : interviennent pour la mise en place de la bonne conformation du R, comme HSP 90 et HSP70.

Même si le R est inactif mais les prot chaperons le place ds une conformation favorable pour accepter le ligand.

**En présence de ligand** : Le ligand en se fixant sur le R ce qui va entraîner un changement de

conformation du R. Les R vont alors se dissocier de Hsp et se dimériser. Ils vont alors pouvoir se lier à leur ER (enhancer ou promoteur : séquence palindromique) de l'ADN. Ce phénomène est couplé au recrutement de co-activateurs (co-régulateurs) qui permettent la stimulation de la transcription des gènes. Les co-activateurs ne se lient pas à l'ADN mais permettent l'ouverture de la chromatine et le recrutement des FT associés au complexe de l'ARN PII.

## B) Les RN de type II : les R partenaires de RXR

Ce sont des **hétérodimères**. Ils reconnaissent une séquence de 6 nt AGGTCA qui est répétée (Direct Repeat – DR) et séparées par un nombre variable de nt, allant de 1 à 6. On parle alors de DR1, DR2 etc selon le nombre de nt entre chaque séquence. Chaque hétérodimère est une combinaison de TR, VDR, RAR avec RXR.

**En abs de ligand** : les R sont liés à leurs ER de l'ADN (contrairement aux R de classe 1) et ils sont associés avec des co-répresseurs (co-régulateurs) pour prévenir la transcription du gène. Les co-répresseurs ne se lient pas à l'ADN et ne réduisent pas la transcription basale mais réduisent l'initiation de la transcription.

**En présence de ligand** : interaction avec les co-répresseurs cesse et les R recrutent des co-activateurs.

RXR est un R activé par la fixation de l'acide rétinoïque (RAR) en conformation 9-cis.

Se fixe tjs sur la partie 5' de l'ER

Chaque demi-site de ER sera reconnu par un monomère.

## C) Les RN de type III : Les R orphelins

Ils peuvent se fixer à l'ADN sous forme de dimères (homo ou hétéro) ou de monomère.

Ils peuvent être intrinsèquement actifs mais svt leur activité sera modulée par des modifications post-traductionnelles. Elles seront induites par la fixation de ligand sur la mbp.

## III- La liaison du ligand

### A) Structure des ligands

Malgré des similitudes ds la structure des RN, la fixation des ligands est très spécifique des RN en conditions physiologiques. Si on augmente la concentration d'un ligand, on peut forcer sa fixation sur un R qui n'est pas le sien.

### B) Structure du domaine E (LBD)

Commun à tous les R.

Riche en AA hydrophobes qui vont former une cavité hydrophobe ds laquelle le ligand va pouvoir se fixer.

Les parois de la cavité hydrophobe sont formées de 12 hélices alpha.

En abs de ligand, la cavité est ouverte. Qd ligand se fixe et pénètre ds la cavité hyd, on obs un basculement de l'hélice 12 qui vient se repositionner comme un couvercle. On obs aussi un

changement de courbures des hélice alpha 3, 4 et 5.

La fonction AF-2 est localisée en partie sur l'hélice 12. Cette fonction de trans-activation est impliquée ds le recrutement de co-facteurs. Sont repliement va donc permettre des interactions prot-prot et va permettre le recrutement de co-facteurs.

La taille de la cavité va être adaptée à la taille du ligand. Pour activer le R, le ligand devra établir certaines liaisons spécifiques avec certains AA des hélices de la cavité hydrophobes . Ces liaisons sont de faibles énergie pour que le ligand puisse ressortir ensuite.

On est capable de fabriquer des ligands synthétiques agonistes et antagonistes qui bloquent les R

### **Exp : DES ou diéthylstiboestrol**

Utilisé pour traiter des femmes qui faisaient svt des fausses-couches mais interdit ds les années 70 car malformation de l'appareil génital des filles qui naissaient suite à ce traitement. Ce ligand se fixait au R de l'oestradiol.

### **Exp : Bisphenol A**

Molécule capable de se fixer sur le R des à l'oestradiol. C'était un perturbateur endocrinien car il mimait les effets de l'œstrogène au moment où il n'était pas censé agir.

On a mesuré chez des poissons le taux d'ARN codant pour la vitelagénine qui est synthétisé qd fixation de ligands sur le R des œstrogènes. On a testé diff produits. On obs que certains insecticides, fongicides, détergents de plastiques avaient cet effet.

On s'est aperçu que dans les rivières, certains de ces produits induisait un effet de réversion des sexes des poissons qui devenaient tous des femelles.

## **Étude de différents phyto-oestrogènes**

Resvératol, apigénine

### **1er cas : utilisation des gènes rapporteurs qui codent pour la luciférase**

Mycotoxine produite par céréales mal conservées. Pour obs les effets, on utilise un gène rapporteur luciférase avec en amont un ER spécifique du R des oestrogènes. On transfecte cela ds cellules qui expriment normalement le R aux oestrogènes.

Ensuite on teste un phyto-oestrogène comme la mycotoxine à diff concentrations sur ces cellules.

Le contrôle positif est l'oestradiol : la luciférase apparaît à  $10^{-11}$ M.

Pb : les autres R induisent aussi la luciférase mais avec moins d'affinité.

On ne sait pas si la molécule qui se fixe au R induit ou inhibe la transcription.

Pour savoir cela, on passe au deuxième cas.

### **2e cas : processus cellulaire**

On utilise ces molécules sur des cellules qui dérivent d'une lignée cancéreuse et leur prolifération dépend de l'œstradiol (si abs d'œstradiol ds le milieu plus de prolifération, qui reprend avec ajout d'œstradiol).

On mesure l'effet de la zéaralénone à plusieurs concentrations en considérant que l'œstradiol à un effet normal (base 100). A concentration de  $10^{-9}$  la zéaralénone va mimer l'effet de l'œstradiol (effet agoniste). Si on met de l'œstradiol avec de la zéaralénone, on obs un effet avec l'œstradiol seul. Qd on ne met que de l'apigénine, pas d'effet.

Si on associe apigénine et œstradiol, on obs que l'apigénine a un effet antagoniste sur a prolifération de cellule oestrogéno-dépendante.

### 3e cas : analyses transcriptomiques

On a traité la cellule œstradiol, zea et api puis on récupère l'ARN après 24h.

On a pu identifier 4 types de gènes : activés ou réprimés par l'apigénine et gènes activés ou réprimés par zearalénone.

Pb : apigénine peut peut-être également affecter d'autres voies de signalisation ds la cellule.

## IV- La liaison à l'ADN

Pour former un dimère, il y a deux zones d'interaction : une premier au niv du domaine de liaison à l'ADN et un 2 e au niv du domaine E/liaison de l'hormone.

Chaque monomère reconnaît la moitié de l'ER. En fonction du dimère formé, la nature de l'ER reconnu va dépendre du monomère.

En fonction de la nature de l'ER, on va parler de palindrome, de répétition directe ou de palindrome inversé.

### A) La structure du domaine C (DBD)

Ce domaine, qui confère la possibilité aux NRs de reconnaître leurs séquences spécifiques cibles sur l'ADN, présente une homologie de séquence dans la superfamille.

Ce domaine (DBD ; DNA Binding Domain) est caractérisé par la présence de **deux doigts de zinc de type C2C2**. Chaque doigt de zinc est lié à quatre CYS. Si on mute une des CYS, le doigt de zinc se casse et on obs une perte de liaison à l'ADN.

Le premier doigt de zinc N-ter assure la liaison à l'ADN : il porte l'hélice alpha de reconnaissance.

Le DBD possède une taille de 66 à 70 acides aminés. Il est composé de deux hélices alpha et sa séquence protéique est riche en acides aminés basiques.

On peut à l'intérieur du DBD définir quatre sous domaines (on en traite seulement deux) :

#### **La boîte P (P box, boîte proximale) sur le premier doigt de zinc partie N-ter**

Il porte l'hélice alpha de reconnaissance. Si on la mute, il y a perte de liaison à l'ADN.

**Elle est impliquée ds la fixation à l'ADN** grâce à son interaction directe avec l'ADN au niveau de

l'ER.

### **La boîte D (D box ; boîte distale ou de dimérisation)**

Ce sous-domaine, situé dans le second doigt de zinc, définit l'écartement entre les deux demi-sites de l'élément de réponse sur l'ADN. Si mutation, perte dimérisation.

**Elle est impliquée dans la dimérisation des R.**

Chaque monomère reconnaît ER avec le premier doigt et les deux autres doigts forment une courbure qui permet l'interaction R-R et donc qui permet la dimérisation du R.

## **B) Rôle des boîtes P et D du DBD**

**La boîte P est impliquée ds la liaison à l'ADN.**

**La boîte D est impliquée ds la dimérisation du R.**

On ne retrouve que deux type P-Box diff :

Un premier motif qu'on retrouve chez R hormones stéroïdiennes sauf celui de l'œstrogène et un domaine du P-Box présent chez tous les autres RN.

Ce qui va assurer la spécificité de la fixation va être l'orientation des motifs l'un par rapport à l'autre ainsi que par le nbr de nt qui séparent ces deux demi-sites.

Un contact physique assuré par la D-box doit avoir lieu entre les deux monomères.

## **V- Les ER**

### **A) Orientation et espacement des demi-sites**

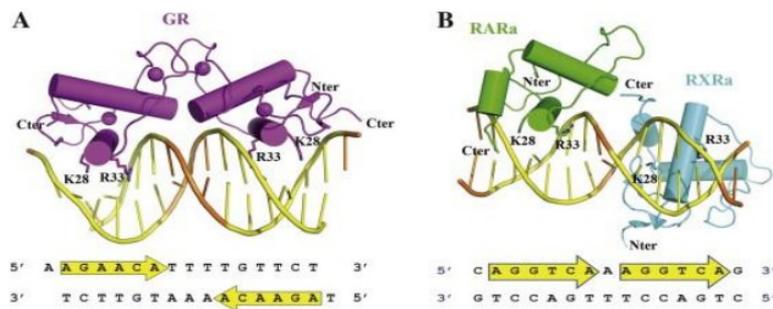
Un même R peut reconnaître deux types de motifs.

C'est le cas des RAR qui forment un hétérodimère avec RXR : il peut reconnaître des répétitions directes séparées de 1 à 5 nt mais l'affinité du ligand ne sera pas la même.

La conformation du dimère sera différente car l'agencement de la D-box sera diff. De ce fait l'interaction avec le co-facteur sera diff.

L'identité des éléments de réponse peut être déterminée par :

- la séquence des demi-sites
- le nombre de paires de bases qui séparent les demi-sites
- l'orientation relative des motifs.



B) Répétition directe séparée par un seul nt.

Qd 5nt : fixation co-répresseur et relargage du co-répresseur quand le ligand se fixe : le gène sera transcrit. Si les co-facteurs répresseurs ne sont pas relargués, il n'y aura pas recrutement de co-facteurs activateurs.

Qd 1 nt : fixation co-répresseur mais fixation ligand n'est pas possible : transcription réprimée

Cas particulier des récepteurs orphelins se fixant sous forme de monomère

Dans le cas des R orphelin, il y aura fixation d'un monomère ?

## VI- Activation transcriptionnelle

La fixation de FT sur l'ER de l'ADN va induire le recrutement de co-facteurs qui vont permettre l'ouverture de la chromatine.

La fixation du ligand entraîne un changement de conformation du domaine E et un basculement de l'hélice 12 : dimérisation du R

Une molécule agoniste va pouvoir occuper la même place ds la cavité hydrophobe que le ligand. Ceci va permettre le bon basculement de l'hélice 12.

Une molécule antagoniste se fixe aussi ds la cavité hydrophobe et empêche la fixation du ligand naturel et ne permet pas le basculement correct de l'hélice 12. Or, cette hélice 12 est impliquée ds le recrutement de co-facteurs nécessaires à la régulation de la transcription.

On a pu identifier des motifs présents au niv des co-facteurs répresseurs et des co-facteurs activateurs de la transcription.

## Régulation de la transcription

Pour moduler l'activité du R on peut agir sur interactions prot-prot : on met de petits peptides ds la cellule qui peuvent se fixer sur le dimère. Cela va empêcher la fixation du co-facteur normalement recruté par le dimère qd il est activé.

Il peut être intéressant de fixer des co-facteurs au lieu de ligand :

-Si on met antagoniste de l'oestradiol pr empêcher div cellules mammaires mais on va toucher tous les R de tous les types cellulaires.

Si on met un peptide qui entre en compétition avec co-facteurs recrutés que ds les cellules mammaires.

Limite : réussir à faire entrer le peptide ds la cellule.

Les RN bien qu'activés par la liaison du ligand, sont également des FT intégrateurs de signaux. Leur activation dépend des modifications post-traductionnelles. Celles-ci peuvent affecter les liaisons s à l'ADN (domaine C), les domaine de trans-activation (modulation du recrutement des co-facteurs nécessaires).

### **Technique d'immuno-précipitation sur les complexes chromatiniens (chiP)**

On fixe au formaldéhyde qui va permettre la fixation des protéines présentes sur la chromatine.

Le facteur de trans-activation est-il associé à la chromatine.

On utilise des AC anti-F1 puis purification. On fait ensuite une PCR car on s'intéresse à deux gènes. Les amorces cibles les promoteurs des gènes A et B.

On obtient un duplicat dc F1 était fixé sur gène A et B.

Même fonctionnement : AC spé de F1

Puis seconde immunoprécipitation co-facteur 3.

On a désormais ds tubes des complexes F1/F2.

On fait la même PCR qu'avant.

-gène A : on a une amplification

-gène B : pas d'amplification

Seul le promoteur A recrute en même tps TF1 et co-facteur .

On est obligé de dire que la PCR n'a pas fonctionné sur le gène B donc on doit obligatoirement faire des contrôles :

-Utilisation de AC non-relevant : anti IgG

-Contrôles de la PCR sur input

input : qd on fait la manip, au stade où on a juste fragmenté la chromatine, on n'a pas encore mis d'AC anti -F1 donc on prend une fraction de chromatine et on fait tjs une PCR contrôle sur cette portion. Permet de standardiser la manipulation si on a plusieurs manipulations.