Biochimie cours n° 15 du 28/11/2007

Professeur : Hugues De Thé

Le 28/11/07 à 10h30

Ronéotypeurs : Alexandre Sellam et Clémentine Jacques

Mode d'action des hormones stéroïdes

Plan du cours

- I- Introduction
- II- Deux grandes familles de récepteurs
 - 1. Les récepteurs transmembranaires
 - 2. Les récepteurs nucléaires
- III- Généralités sur les hormones à mode d'action intracellulaire
 - 1. Capacité à ce que la synthèse des hormones stéroïdes soit regroupée dans un petit nombre de tissus, appelés tissus endocrines
 - 2. La notion du rétrocontrôle
 - 3. Le rôle des facteurs extérieurs
 - a) 1^{er} exemple : dans le cas des hormones thyroïdiennes
 - b) 2^e exemple : la Vitamine A
 - c) 3^e exemple : la Vitamine D3
- IV- Une grande caractéristique des hormones : agir à des concentrations extrêmement faibles
- V- Notion d'hormone libre et d'hormone totale
- VI- Comment a-t-on abordé l'étude de ces hormones ?
- VII- Travaux de clonage
- VIII- Clonage d'expression
 - 1. Principe du clonage d'expression
 - 2. Limites du clonage d'expression
- IX- Clonage d'hybridation
- X- Versant fonctionnel : analyse des gènes cibles
- XI- Réponse à l'hormone
- XII- Structure récepteur nucléaire
- XIII- Domaines cristallisés : ADN (doigt de zinc)
- XIV- Le ligand
- XV- Expérience : démontrer le caractère modulaire et l'indépendance des différents modèles.
- XVI- Diversité des éléments de réponse.

I-Introduction

Généralités sur les hormones :

Une hormone est une molécule de signalisation, qui au départ, pouvait être synthétisée par un tissu spécialisé et agir à distance.

Exemple : l'insuline synthétisée dans les îlots β du pancréas, régule la glycémie.

Cette notion a évolué jusqu'à englober des régulations locales dans lesquelles chaque tissu va fabriquer sa propre hormone, donc il va y avoir synthèse locale d'un médiateur dans lequel un tissu va fabriquer cette molécule de signalisation qui va lui permettre de s'adapter à des conditions extérieures.

→ Situation paracrine : lorsque ce sont 2 cellules voisines

→ Situation autocrine : même type cellulaire

intégrée ensuite, dans le cadre de régulation hormonale parce que ces mécanismes moléculaires étaient absolument identiques au niveau de la signalisation dans les cellules cancéreuses

Ces hormones peuvent de nature extrêmement diverse : ici on va s'intéresser aux hormones qui agissent par l'intermédiaire de **récepteurs nucléaires**.

II- Deux grandes familles de récepteurs

1. Les récepteurs transmembranaires

Cette première famille de récepteurs va aller reconnaître l'hormone dans le domaine extracellulaire. Ce sont, en général, des hormones qui n'ont pas la capacité de traverser la membrane du fait de **leur taille**, par exemple : les hormones peptidiques (comme l'insuline). La liaison de cette hormone (c'est pareil que pour les récepteurs de facteurs de croissance) va entraîner un certain nombre de signalisations en aval intracellulaire, par exemple des phosphorylations.

2. Les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires vont lier des hormones à mode d'action intracellulaire.

Ces hormones vont être des composés de plus petite taille et vont avoir la capacité de **diffuser à travers la membrane plasmique**. Ce sont donc en général des composés **hydrophobes** qui vont se retrouver aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur de la cellule.

A l'intérieur de la cellule, ces hormones vont fixer des protéines spécifiques (=récepteurs). Ces protéines spécifiques vont induire l'effet biologique qui passe le plus souvent par la **régulation de la transcription**.

Donc le complexe hormone-récepteur se fixe sur l'ADN et active la transcription.

III-Généralités sur les hormones à mode d'action intracellulaire

1. **Capacité à ce que leurs synthèses soient regroupées dans un petit nombre de tissus, appelés tissus endocrines.**

Ainsi les corticosurrénales vont produire plusieurs types d'hormones stéroïdes : le cortisol, les androgènes, les minéralocorticoïdes ...

Les ovaires vont faire des œstrogènes et de la progestérone.

La thyroïde va produire des hormones thyroïdiennes : la calcitonine, la parathormone...

Point important : Un certain nombre d'hormones ont des structures voisines et dérivent les unes des autres. Il va y avoir de très nombreux phénomènes **d'interconversion**. Cette possibilité d'interconversion entre les hormones, ayant des effets extrêmement différents, va être à l'origine d'un certain nombre de dérèglements en pathologie.

2. La notion du rétrocontrôle

Les hormones sont des molécules de signalisation. Elles sont donc là soit pour maintenir un état d'équilibre (par exemple pour les hormones thyroïdiennes, un équilibre du **métabolisme de base**) soit pour répondre à des situations d'agressions (**ce sont des réponses adaptatives**).

Ces réponses adaptatives sont la conséquence de la modification des conditions extérieures, exemple : conditions de stress. Les hormones auront donc pour rôle d'assurer l'adaptation à ces situations de stress.

Il y a donc des contrôles extrêmement stringents de la production de ces hormones avec un phénomène de **rétrocontrôle**.

Un exemple dans le cas de la thyroïde :

La thyroïde va fabriquer d'abord une **hormone peptidique T4** (qui est tétra iodé). En périphérie, cette hormone va être convertie dans la **forme active T3** (partiellement désiodée). T3 va ensuite agir sur l'ensemble **hypothalamo-hypophysaire** qui va répondre en sécrétant une hormone peptidique : **TSH** (*Thyroid Stimulating Hormone*). TSH va jouer le rôle de facteur de croissance et va faire grossir la thyroïde.

⇒ On a donc toute une série de boucles de rétrocontrôles qui va assurer l'équilibre de ces systèmes d'information. Qui dit « boucle » dit « possibilité de dérégulation ».

3. Le rôle des facteurs extérieurs

Le rôle d'adaptation au milieu extérieur se manifeste, entre autres, par le fait que beaucoup de ces hormones vont dériver d'éléments extérieurs nécessaires à la vie, en particulier, de **vitamines**.

Ces vitamines se comportent comme des précurseurs des hormones.

a) 1^{er} exemple : dans le cas des hormones thyroïdiennes

La présence d'iode qui vient du milieu extérieur est absolument nécessaire à la synthèse des hormones thyroïdiennes.

Si on n'a pas d'iode on a une **hypothyroïdie carencielle** cela se manifeste par un goitre. En effet, l'absence d'hormones thyroïdiennes induit une production importante de TSH qui agit comme facteur de croissance sur la thyroïde (=> grosse thyroïde => goitre).

Autrefois chez les populations loin de la mer, qui se nourrissaient avec du sel de mine (sel non iodé), on observait un goitre.

Il existe aussi dans l'alimentation des substances goitrigènes qui empêchent la synthèse d'hormones thyroïdiennes.

L'hypothyroïdie est associée à une maladie : le myxœdème qui se manifeste par une hypothermie, une prise de poids...

Outre le rôle sur le métabolisme basal, les hormones thyroïdiennes ont ainsi le rôle essentiel d'établir **des connexions entre les neurones**.

Donc un embryon ou un fœtus qui ne reçoit pas assez d'hormones thyroïdiennes de sa mère va développer un retard mental. Ces enfants sont appelés « crétins des Alpes ».

b) 2^e exemple : la Vitamine A

La vitamine A provient de **dérivés végétaux** (ex : le β carotène qui est produit dans les carottes). Elle sert à voir la nuit, puisque le rétinol (=Vitamine A) est à l'origine du rétinol qui est le pigment visuel des bâtonnets.

L'autre fonction beaucoup plus importante de la vitamine A c'est d'être le **précurseur de l'acide rétinoïque**. L'acide rétinoïque joue un rôle fondamental dans le développement embryonnaire et dans le maintien de la trophicité des épithéliums.

Remarque : Dans la définition de l'hormonologie il faut aussi inclure des molécules d'information dont la synthèse est locale.

Le meilleur exemple de ces synthèses locales ce sont les dérivés de l'acide rétinoïque. **En effet, chaque cellule fabrique son propre acide rétinoïque.**

c) 3^e exemple : la Vitamine D3

La vitamine D3 provient aussi de l'alimentation.

Dans les éléments extérieurs, il faut aussi faire intervenir des facteurs comme **l'irradiation solaire**. Par exemple, dans la synthèse de la vitamine D, il faut avoir la vitamine (qui provient de l'alimentation) et aussi avoir l'exposition au soleil (pour permettre les réactions d'isomérisation).

IV- Une grande caractéristique des hormones : agir à des concentrations extrêmement faibles

Une grande découverte dans les années 1920 a été celle de composés capables d'agir à des concentrations extrêmement faibles.

Typiquement les concentrations plasmatiques actives d'hormones vont être de l'ordre de **10^{-9} molaire**.

Comment vont être synthétisées ces hormones ?

Elles vont être synthétisées dans les tissus spécialisés ensuite transportées dans le plasma. Et dans le plasma ces hormones vont être liées à des transporteurs qui sont des protéines spécialisées. En effet, les hormones qui traversent les membranes sont essentiellement hydrophobes et ne peuvent être bien solubles dans le plasma d'où la nécessité de transporteurs.

Cela permet de conduire à la notion d'hormone libre et d'hormone totale.

V- Notion d'hormone libre et d'hormone totale

Dans le plasma on va avoir une **toute petite fraction de l'hormone qui va est sous forme libre**. L'hormone sous forme libre est la seule à pouvoir diffuser pour traverser la membrane plasmique et rentrer dans les cellules. Cette forme libre peut représenter de 1‰ à 1% de la forme totale ; le reste étant lié à des protéines de transport.

Lorsqu'on va essayer de doser l'hormone dans le plasma, si on ne fait pas attention on va doser la forme totale (c.-à-d. essentiellement liée à des protéines de transport), **alors que la forme importante est la forme libre (=forme biologiquement active)**.

Pour les hormones thyroïdiennes, il peut exister des variations physiologiques extrêmement importantes du transporteur. Ainsi la protéine de liaison pour les hormones thyroïdiennes (TBG : Thyroid Binding Globulin) **varie beaucoup pendant la grossesse**. Chez la femme enceinte (ayant beaucoup plus de protéines de transport), pour maintenir une concentration constante de la forme libre, la concentration totale va augmenter fortement. Pratiquement toutes les hormones agissant par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires ont une protéine de transport spécifique.

Remarque : les hormones vont être dégradées essentiellement par **le foie et le rein**. Donc les maladies avancées du foie ou des reins vont donner lieu à des troubles hormonaux secondaires du fait de l'excès ou de l'absence de dégradation.

VI-Comment a-t-on abordé l'étude de ces hormones ?

Pour cela, quelques rappels sur les techniques d'association ligand-protéine :

On marque les hormones radioactivement et on les met en présence d'extrait tissulaire. On va déterminer par des techniques de précipitation différentielle l'hormone qui est accrochée par les protéines et l'hormone qui n'est pas accrochée par les protéines.

On a une représentation linéaire. Cela veut dire qu'il n'y a pas de liaison spécifique et que l'hormone accroche n'importe quelle protéine.

On a une fixation extrêmement rapide au départ et ensuite une fixation lente. Cela traduit la somme de 2 choses : une fixation saturable plus une fixation non spécifique.

On a la fixation saturable en soustrayant les deux courbes. Grâce à la courbe de fixation, saturable on va pouvoir déduire 2 valeurs : une valeur qui est la **capacité maximale à lier** et une autre qui traduit **l'affinité** (=équivalent du Km chez les enzymes) de protéines présentes dans la préparation pour l'hormone.

Cette représentation va permettre de trouver le nombre de sites et l'affinité.

Grâce à cette technique, en utilisant des hormones radioactives on a pu mettre en évidence dans les tissus cibles de ces hormones l'existence de protéines capables de lier avec une très forte affinité les hormones. **Ces protéines ce sont les récepteurs de l'hormone agissant avec une très forte affinité.**

Ce que l'on vient de voir était un modèle simplifié.

C'est plus compliqué pour les stéroïdes où il y a des phénomènes d'interconversion. Donc même si on part d'hormones pures on va en obtenir des tas donc on va détecter plusieurs récepteurs à la fois.

Et puis après 20 ans de travail, les chercheurs se sont aperçus que ce qu'ils avaient identifiés ce n'était pas le récepteur hormonal mais un transporteur à travers la membrane plasmique. Ou alors qu'il s'agissait d'une enzyme d'isomérisation ou de dégradation...

VII-Travaux de clonage

On prend un tissu riche en récepteur. Beaucoup de travaux sur les récepteurs de l'œstrogène ont été menés sur des utérus de poulets. En prenant de l'utérus de poulet on va obtenir une préparation qui est extrêmement riche en hormones.

On va utiliser de l'hormone radioactive et puis par des techniques classiques de séparation (=chromatographie,...) des protéines, on va essayer de purifier notre protéine.

A la fin de notre cuisine, on obtient une protéine pure qui fixe très bien les œstrogènes, **c'est donc le récepteur aux œstrogènes.**

Ensuite on va faire des anticorps contre cette protéine. Par exemple, on a purifié un récepteur aux œstrogènes chez le poulet et on va l'injecter à des souris. Comme le récepteur des œstrogènes chez le poulet n'est pas absolument identique à celui de la souris. La souris va se mettre à faire des anticorps. Au bout d'une bonne année de travail, on va avoir enfin **l'hybridome** c'est-à-dire **une cellule immortalisée qui produit autant d'anticorps qu'on le souhaite.**

VIII-Clonage d'expression

1. Principe du clonage d'expression

On part d'une population d'ARN.

On part initialement d'un tissu où il y a beaucoup de récepteurs aux œstrogènes par exemple l'utérus de poulet. On a donc de l'ARN de l'utérus de poulet. Etant donné que les hormones agissent à très faible concentration, les récepteurs eux aussi agissent à très faible concentration. **Les récepteurs ne vont représenter qu'un ARN sur 1 million. Il va falloir un moyen de les trouver.**

Pour cela on fait appel aux techniques de génie génétique (de Pierre Tiollais).

Avec la *reverse transcriptase* on va transformer l'ARN en ADNc. L'ADNc mime l'ARN. L'ADN est double brin donc beaucoup plus solide.

A la base l'ARN est extrêmement fragile et par la reverse transcription on le transforme en quelque chose de beaucoup plus solide. Ensuite on cherche à amplifier l'ADNc et à le collectionner.

On va insérer la population de cDNA (il n'y en que 1 sur un million qui nous intéresse) dans un morceau de virus qu'on appelle le **bactériophage λ** . C'est un virus qui a la bonne idée d'être grand (50Kb) et d'avoir un grand morceau qui ne sert à rien (C, D). Dans le morceau qui ne sert à rien on introduit le cDNA. On a créé un **virus recombinant** qui :

- contient le bras droit et le bras gauche du phage λ .
- est compétent pour la réplication.
- a au milieu un morceau de cDNA.

(Remarque [cf 1^{er} cours de Hugues De Thé]: c'est exactement ce que faisaient les rétrovirus de poulets. En effet, les rétrovirus donnent des leucémies parce qu'ils ont capturé à un moment donné un oncogène).

Là on va chercher à introduire dans les phages λ toute la collection des ARN de la cellule c'est ce que l'on appelle une **bibliothèque génomique**. Avec la bibliothèque génomique on va immortaliser la population d'ARNm et on va pouvoir les propager.

Se pose maintenant le problème de sélection.

Pour résoudre le problème de sélection, on va ajouter sur l'un des côtés du phage un **promoteur bactérien**. Ce promoteur bactérien va permettre, lorsque la bactérie est infectée par ce virus, de faire exprimer l'ARNm humain.

On prend des grandes boîtes de Pétri dans lesquelles on va étaler un mélange de bactéries et ces bactériophages. On obtient un tapis de bactéries. Sur ce tapis, chaque fois qu'une bactérie a été infectée par un virus on aura un trou. Un trou c'est une **plage de lyse**. Cette plage de lyse traduit la propagation d'un virus ; chaque virus contenant un ARNm.

Résumé : On est parti d'une collection d'ARNm que l'on a transformé en une collection de trous. Chacun de ces trous est bourré de virus. Chaque virus contient des cDNA et surtout chaque virus exprime une protéine humaine.

On recouvre la boîte de Pétri d'un espèce de papier très absorbant qui colle les protéines. On fait donc une **réplique papier** et chaque fois qu'on a un trou on a les protéines de virus et surtout un petit peu de protéines humaines. Avec cette protéine humaine, on va faire réagir un anticorps c'est ce que l'on appelle le **clonage par expression**.

2. Limites du clonage d'expression

En terme de fréquence pour détecter le récepteur, c'est de l'ordre de 10^{-7} voire $3 \cdot 10^{-8}$. En effet il faut que l'ARN soit dans le bon sens. De plus en général, la **reverse transcriptase ne va pas jusqu'au bout de l'ARN**. On rétrotranscrit en commençant par l'extrémité 3' et il faut aller le plus loin possible. Il faut donc que l'anticorps ne soit pas trop N-terminale sur la protéine, parce que si l'anticorps est N-terminale sur la protéine il faut que la reverse transcriptase aille jusqu'au bout. Or la RT se fatigue souvent en cours de route, il est donc préférable de choisir un **anticorps plutôt C-terminale**.

Pour stabiliser la protéine on fait **des protéines de fusion**. On retrouve le problème de la congruence des triplets de codon : il faut être en phase (1 coup sur 3). Donc en pratique pour un trouver un bout de cDNA qui code pour une protéine qui reconnaît l'anticorps c'est de l'ordre **d'une chance sur 100 millions**.

Il faut aussi que l'anticorps soit absolument spécifique, parce qu'en général les monoclonaux reconnaissent entre 1 et 5 protéines différentes.

Disons que tout va bien et que l'on a réussi à avoir un morceau de cDNA ce morceau ne va pas être complet. Donc on va passer du clonage par expression au **clonage par hybridation**.

IX-Clonage d'hybridation

Cela consiste à prendre comme sonde un bout d'ADN radioactif. On va donc chercher les trous qui **s'hybrident avec le bout d'ADN radioactif**. En isolant tous ces morceaux par des études de chevauchement (historiquement par des enzymes de restriction, maintenant par séquençage direct) on va pouvoir reconstruire **l'intégralité de l'ARNm**.

Conclusion : Ces travaux ont duré une bonne vingtaine d'années entre l'obtention d'hormones, d'anticorps, le clonage par expression et le clonage par hybridation.

X- Versant fonctionnel : analyse des gènes cibles

Première propriété des hormones : **réguler la transcription**.

Etude réalisée historiquement, à partir d'une hormone du développement de la mouche (ecdysone) qui va permettre la différenciation embryonnaire chez la mouche. Cette hormone était capable d'activer la transcription de certains gènes en quelques minutes. En fait, on s'est aperçu que les chromosomes présentaient des boursouflures qui correspondaient à l'ouverture de la chromatine pour permettre la transcription (transcription massive d'un petit nombre de gènes par processus d'ouverture des chromosomes et synthèse d'ARN messager).

Premier effet : activation de la transcription d'un petit nombre de gènes que l'on a appelé les gènes cibles primaires

→ Bouffée de transcription primaire.

Les gènes activés par la bouffée de transcription primaire sont eux même des facteurs de transcription

→ Bouffée de transcription secondaire

Beaucoup de ces gènes sont également des facteurs de transcription

→ Bouffée de transcription tertiaire.

Comment peut on distinguer la transcription primaire de la transcription secondaire ?

La primaire ne nécessite pas de synthèse protéique, c'est-à-dire que l'on peut l'observer même si on inhibe la synthèse protéique. Si on bloque celle-ci on limite au 1^{er} gène et au premier pic de synthèse des ARN messagers.

Ceci a permis de déterminer très vite des gènes cibles primaires :

- oestrogènes : ovalbumine (protéine du blanc d'oeuf dont l'expression va augmenter de 100 fois dans l'utérus de poulet)
- glucocorticoïdes : TAT (thyrosine amino transférase)

Comment les identifier ?

Le **récepteur** est probablement un **activateur transcriptionnel**, il va se fixer sur le promoteur de ces gènes. Par des techniques analogues, quand on a un gène on va coder son promoteur qui à l'époque était par 1000 à 5000 paires de bases en amont du site de transcription.

Il existe un certain nombre de site de fixation pour des protéines obligatoires dans ce promoteur : par exemple le TATA Box.

Il existe des sites de régulation qui permettent l'activation tissu spécifique de certains gènes. (Récepteurs stéroïdes font parti de ceux-la)

Difficulté : ces séquences qu'on appelle souvent « augmenteur » (ou « v-answer » ??) contrairement aux autres qui sont collées au site d'initiation de la transcription peuvent être à côté ou très loin à l'intérieur du gène.

Il faut prendre le promoteur proximal que l'on va coller dans un plasmide et on va lui faire synthétiser un gène facile à mesurer (historiquement : enzyme) comme celui du gène de méduse qui a une fluorescence verte spontanée : **GFP** (green fluorescent protein)

Ensuite on prend le plasmide que l'on transfère dans une culture cellulaire, on rajoute l'hormone. On a augmenté fortement l'expression de l'ARN messager donc on voit une fluorescence. Donc dans ce bout d'ADN, il y a quelque chose qui contrôle la réponse à l'hormone.

XI- Réponse à l'hormone

Faire une cartographie de délétion : consiste à saucissonner, enlever les petits morceaux de promoteur jusqu'à perdre la réponse à l'hormone. (Attention à ne pas enlever les éléments compétitifs mais uniquement les éléments constitutifs)

On va coller entre les 2 (promoteur et GFP) un petit bout d'un promoteur viral qui fonctionne tout seul et effectuer des morceaux.

Résultats :

+ : tjs inductible par l'hormone

- : plus inductible

Pour une hormone donnée, on trouve toujours la même séquence.

La sensibilité à une hormone est liée à la présence d'une séquence d'ADN petite (entre 10 et 15 pdb), toujours la même pour une même hormone.

- oestrogènes : **AGGTCA TGACCT** séquence **palyndromique**

- glucocorticoïde : **AGAACA TGTTCT** avec une symétrie interne

Protéine qui reconnaît ces séquences : **homodimère.**

Pour les oestrogènes : **ERE** (élément de réponse à l'oestrogène)

Seulement 2 nucléotides changent entre l'élément de réponse aux oestrogènes et celui aux glucocorticoïdes.

Cela suggère que les protéines qui reconnaissent appartiennent à une même famille.

Éléments de réponse sont NECESSAIRES, SUFFISANTS, CANONIQUES et PARTAGES (similarité entre hormones différentes).

Suffisant car si on prend un promoteur d'un gène quelconque qui n'est pas régulé par l'hormone et qu'on lui colle un ERE au milieu de son promoteur (par le génie génétique) ce gène qui est complètement indifférent à l'hormone va devenir hypersensible.

Éléments de réponse extrêmement conservés, toujours les mêmes.

Élément canonique : il y a l'élément parfait que l'on ne retrouve pas toujours et des éléments partiellement dégénérés dans lesquels au lieu d'avoir 12 nucléotides canoniques on n'en aura que 10 (ce qui entraîne une activité plus faible).

Elément partagé : similarité entre hormones différentes.

Cela laisse prévoir l'existence d'un code génétique dans lequel la présence de ces éléments de réponse allait permettre de prédire une réponse à une hormone particulière.

Il y a aussi une *Plasticité de régulation* : si remaniement au niveau du promoteur, on peut facilement changé la régulation du gène. (Transformer un gène insensible à une hormone en un gène hypersensible). Important pour certains éléments mobiles, structures de type rétrovirale qui vont bouger dans des génômes de mammifères, il va y avoir perte de transcription - intégration. Ces éléments mobiles (famille des rétrovirus) vont contenir dans leur promoteur un certains nombres de séquences de régulation aux hormones => un des mécanismes par lesquels certains gènes ont pu acquérir une sensibilité à certaines hormones. C'est aussi un mécanisme oncogénique (pouvoir générer un clone dans lequel on va inactiver le gène).

XII- Structure récepteur nucléaire :

A(/B) : variable de taille, *domaine activation transcription*. Il va contenir des sites pour des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation ou la modification par des protéines de la famille des ubiquitines.

C : *site de reconnaissance ADN*. Il reconnaît et interagit avec l'élément de réponse des gènes cibles. La reconnaissance se fait par 2 doigts de zinc :

- le premier reconnaît l'ADN
- le second effectue la dimérisation.

Les deux doigts de zinc :

4 motifs de cystéine qui vont entrer en liaison de coordination avec l'atome de zinc.

Liaison de coordination entre atome de zinc va bloquer les positions des 4 cystéines dans l'espace, ce qui va enlever la respiration naturelle et verrouiller ce domaine. Permet d'imposer des contraintes stériques précises pour assurer la reconnaissance à l'ADN.

D : zone charnière avec NLS (signal localisation nucléaire) : étiquette qui indique à la protéine qu'elle doit être envoyée vers le noyau

E : domaine complexe. Structure en sandwich d'hélices α (empilées les unes sur les autres). Il assure :

- dimérisation
- reconnaissance de l'hormone
- fonction activation transcriptionnelle hormone dépendante. (piège à polymérase en maintenant une forte concentration locale d'ARN polymérase) → AF2

AF2 : 2^{ème} fonction activation commune à tous les récepteurs nucléaire. On l'appelle également H12 pour 12^{ème} hélice. Implication en terme de compétition.

(AF1 : 1^{ère} fonction d'activation sur domaine A)

Un des premiers modèles (récepteur nucléaire) où on a pu montrer que chacun des 3 domaines fonctionnent pour lui-même :

- domaine de dimérisation
- domaine de reconnaissance à l'ADN
- domaine de régulation

ils sont complètement séparables

XIII- Domaines cristallisés : ADN (doigt de zinc)

Voir schéma 1 du prof page suivante

Cela représente un cocrystal entre l'élément de réponse et le domaine C du récepteur nucléaire.

Dimère : 2 domaines C interagissent avec l'élément de réponse avec une symétrie en miroir entre les 2 sites de liaison à l'ADN qui correspondent à la symétrie en miroir de la séquence de l'élément de réponse.

La reconnaissance séquence spécifique de l'ADN par le récepteur nucléaire se fait grâce à 2 hélices α :

- une qui est parallèle au contact de l'ADN (représentée en haut et qui se pose sur l'ADN)
- une 2^{ème} qui est de face, légèrement tordue et qui va se glisser à l'intérieur du grand sillon. C'est celle-ci qui va assurer la reconnaissance séquence spécifique (un domaine C de récepteur aux oestrogènes ne se fixe pas sur un élément de réponse aux glucocorticoïdes)

→ on va pouvoir déterminer les points de contact.

Les doigts de zinc vont verrouiller 2 choses critiques :

- **fixer l'espacement** entre 2 hélices α par la boucle du doigt de zinc : la boucle devient rigide => aucune possibilité de glissement sur les côtés. → Régule l'espacement.
- **Verrouiller l'axe** avec lequel l'hélice α entre dans le grand sillon, verrouiller la reconnaissance séquence spécifique de l'ADN.
→ Régule l'interaction avec les bases.

XIV- Le ligand

Voir schéma 2 du prof page suivante

Représentation de la structure du domaine E : sandwich -hélice α .

Fonction : assurer l'homodimérisation et créer de poches où va se faire la reconnaissance de l'hormone.

H12 est mobile donc non représenté.

Activation transcriptionnelle (AF2) correspond à la mobilité de H12 réglée par le ligand de manière allostérique. Quand le ligand vient se fixer, cela change la conformation de ce « ressort » et il va pouvoir fonctionner comme un scotch.

XV- Expérience : démontrer le caractère modulaire et l'indépendance des différents domaines.

On prend des cellules (boîte de pétri) et on va y transférer (comme vu ci-dessus) un gène rapporteur : GFP (gène de méduse). On a des promoteurs qui contiennent soit un ERE ou GRE (un plasmide avec ERE et l'autre avec GRE).

On va avoir un plasmide : **vecteur d'expression** qui est capable de faire s'exprimer le récepteur aux oestrogènes et un autre qui est capable de faire s'exprimer le récepteur aux glucocorticoïdes.

On transfère ces différents plasmides dans les cellules et on va traiter avec les différentes hormones.

Pour activer la transcription, pour augmenter la quantité de protéine, il faut avoir à la fois le plasmide avec les ERE et le récepteur aux oestrogènes et les oestrogènes (on ne peut pas remplacer par les glucocorticoïdes des oestrogènes en mettant ERE et récepteurs d'oestrogènes) et inversement avec les glucocorticoïdes.

→ Il faut 3 niveaux de spécificités obligatoires :

- élément de réponse
- récepteur
- l'hormone

Substitution de domaine :

On a 3 domaines séparés, on va essayer de faire de l'échange de domaine. On a les vecteurs d'expression, on sait où commence chacun des domaines. On va remplacer le domaine C dans chacun des récepteurs.

Le plasmide qui contient l'élément de réponse aux oestrogènes plus le récepteur aux oestrogènes → activation de la transcription uniquement avec les oestrogènes.

(Si on transfère le récepteur aux glucocorticoïdes, traité avec des oestrogènes ou glucocorticoïdes (peu importe) ??)

La séquence sera entièrement aux récepteurs aux glucocorticoïdes sauf qu'il y aura des lésions de l'ADN (rec oestrogènes) → capable activer transcription sur ERE avec des glucocorticoïdes seulement.

La transcription sera activée en présence de l'élément de réponse aux glucocorticoïdes, du récepteur aux glucocorticoïdes et de glucocorticoïdes mais pas d'oestrogènes.

Si on lui met ce récepteur hybride, il va se mettre à activer la transcription à travers les éléments de réponse aux glucocorticoïdes uniquement en présence d'oestrogènes.

Interprétation :

Fonctionnement modulaire, ce qui compte c'est l'appariement entre l'élément de réponse (HRE : hormone reponse element) et le domaine cible.

Après le domaine d'activation de la transcription qui fonctionne pour lui-même, il n'y a pas de relation entre les 2 domaines de la protéine.

Cela explique les bases de l'évolution : par des recombinaisons de séquences codantes dans lesquelles (par l'intermédiaire de translocation chromosomique) on fait apparaître de nouvelles séquences et de nouveaux points de fusion (qui auront pour conséquences de créer de nouvelles fonctions dans lesquelles on va juxtaposer plusieurs fonctions).

C'est une image en miroir de ce qui se passe dans les leucémies. Il va y avoir une translocation chromosomique active dans laquelle va fusionner un domaine de répression : un activateur transcriptionnel essentiel.

Cela va bloquer la différenciation qui conduit à un cancer.

Dans l'évolution le même mécanisme peut être à l'origine du gain de fonction très favorable. Les premiers récepteurs nucléaires seraient un facteur de transcription classique avec un domaine de fixation à l'ADN et un domaine de régulation modulé par phosphorylation ou par ubiquitination.

Ensuite la structure en sandwich est arrivée : c'était peut être une enzyme, un transporteur capable de fixer les corps gras.

La translocation a fait apparaître un gain de fonction puisque maintenant du fait de la translocation (de manière analogue à ce qu'on a vu pour les leucémies) on a la capacité de réguler la transcription en fonction de cette hormone (corps gras, molécule liposoluble) → gain de fonction qui permet de réguler la fonction en fonction de l'extérieur.

Cet ensemble initialement formulé à partir d'une translocation a été dupliqué des centaines de fois (évoluer pour son compte pour reconnaître des dizaines d'hormones différentes) → génère les systèmes fondamentaux pour développement embryonnaire pour la réponse adaptative (hormones stéroïdes).

(Les récepteurs à hormones stéroïdes à différenciation sexuelles sont les premiers à avoir été découverts mais ce sont sûrement les derniers à être apparus dans l'évolution).

En fusionnant 2 domaines qui au départ n'ont rien à voir, on peut avoir un gain de fonction qui est extrêmement puissant et important avec la capacité de réguler la transcription en fonction d'agents extérieurs.

XVI- Diversité des éléments de réponse :

(détermination de la spécificité oestrogènes et glucocorticoïdes)

Voir schéma 3 du prof page suivante.

Domaines très conservés dans leur structure.

Le domaine C a entre 70 et 75% d'identité en acides aminés → domaine très conservé, presque toujours la même forme

Certains nombres de points de contact sont essentiels.

Dans les deux doigts de zinc, il y a des fonctions de :

- régulation liaison ADN
- dimérisation

Régulation de la liaison à l'ADN : pour changer le spectre de reconnaissance de domaine de liaison à l'ADN, on a simplement muté 2 résidus d'acides aminés.

Gly et Ser (glucocorticoïdes) → Glu et Gly (oestrogènes)

Par le cristal, on a pu déterminer que ces 2 résidus (AGAACA ou AGCTCA) reconnaissent les 2 positions différentes.

Structure très complexe de forme complètement conservée et 2 points chauds qui vont reconnaître les 2 résidus spécifiques d'un élément de réponse ; le reste de la protéine va reconnaître l'élément de réponse étendu donc le AG et le CA derrière.

Aussi bien au sein de la partie protéique que de la partie acides nucléiques, on va avoir des éléments qui font la reconnaissance générale de la structure et au sein de cette reconnaissance générale, 2 positions particulières qui vont faire la spécificité qui sont le AA ou GT sur élément de réponse qui vont correspondre au Gly-Ser ou Glu-Gly.