



**HAL**  
open science

# Désordre Fonctionnel dans les Mécanismes Moléculaires de régulation de la Signalisation Cellulaire

Nathalie Sibille

► **To cite this version:**

Nathalie Sibille. Désordre Fonctionnel dans les Mécanismes Moléculaires de régulation de la Signalisation Cellulaire. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Montpellier, 2021. tel-03883914

**HAL Id: tel-03883914**

**<https://hal.science/tel-03883914>**

Submitted on 4 Dec 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER



ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES POUR LA SANTÉ (ED 168)

**Mémoire**

En vue de l'obtention de l'

**HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES**

Discipline : **Biologie Santé (CBS2)**

Présentée par

**Nathalie SIBILLE**

**Désordre Fonctionnel dans les Mécanismes Moléculaires de  
régulation de la Signalisation Cellulaire**

Soutenue publiquement le Mercredi 26 Mai 2021 à 14 h

Centre de Biochimie Structurale (CBS) – Université Montpellier/CNRS/INSERM

JURY

Pr. Rachel Cerdan, Professeur de l'Université de Montpellier	Présidente
Dr. Nicolas Wolff, Directeur de Recherche CNRS, Institut Pasteur, Paris	Examineur
Dr. Sonia Longhi, Directeur de Recherche CNRS, AFMB, Marseille	Rapportrice
Prof. Dr. Alexandre Bonvin, Professeur de l'Université d'Utrecht, Pays-Bas	Rapporteur
Dr. Marie-Christine Averlant-Petit, Chargée de Recherche CNRS, Nancy	Rapportrice

N°



## Table des Matières

Table des Matières .....	3
Liste des Abréviations .....	7
<b>Parcours .....</b>	<b>9</b>
1 Curriculum vitae .....	9
Obtention de contrats de recherche .....	11
Direction d'étudiants (Master ou doctorants) .....	11
Collaborations productives .....	15
Liste de publications .....	15
2 Trajectoire Scientifique .....	27
<b>Travaux Scientifiques antérieurs et jusqu'à présent .....</b>	<b>29</b>
3 Stages et Projets dans des laboratoires .....	29
3.1 Stages de Master .....	29
3.1.1 Étude de la dynamique d'une Protéine de Résistance à la Bléomycine .....	29
3.1.2 Utilisation de contraintes orientationnelles pour la détermination de structure par RMN .....	29
3.2 Stages doctoral et post-doctoral .....	31
3.2.1 Étude par RMN du domaine FMN de la Sulfite Réductase d' <i>Escherichia Coli</i> .....	31
3.2.2 Étude RMN comparative de l'impact de mutations ponctuelles sur la stabilité de la lipase de <i>Pseudomonas mendocina</i> .....	32
3.3 Projets à Pasteur et l'USTL de Lille1 : Étude par RMN de la protéine neuronale Tau .....	34
3.3.1 La phosphorylation de Tau : analyses structurales et fonctionnelles .....	35
3.3.2 L'agrégation de Tau : analyses structurales et molécules anti-agrégatives .....	36
3.3.3 L'interaction Tau-tubuline : analyses structurales et fonctionnelles .....	38
3.4 Projets au CBS de Montpellier : Les protéines intrinsèquement désordonnées .....	38
3.4.1 IDPs et Haute Pression par RMN .....	39

## Table des Matières

---

3.4.2	Régulation et réparation de l'ADN par l'interaction de p15 <sup>PAF</sup> et PCNA.....	39
3.4.3	Régulation de la transcription de gènes cibles par l'interaction du récepteur de l'acide rétinoïque avec ses co-regulateurs désordonnés.....	40
3.4.4	Régions de faible complexité dans la protéine désordonnée huntingtine .....	41
3.4.5	Robotique et désordre.....	42
3.4.6	Séparation de phase du domaine N-terminal désordonné de l'eIF4G.....	43
3.4.7	Modulation des voies de la signalisation cellulaire par l'interaction des régions C-terminales des GPCRs avec l'arrestine.....	44
	<b>Travaux Scientifiques actuels.....</b>	<b>45</b>
4	Introduction.....	45
4.1	Qu'est-ce qu'un IDP ? .....	45
4.2	Caractérisation structurale d'un complexe impliquant un IDP.....	46
4.3	Le désordre au cœur de la signalisation cellulaire.....	46
5	Modulation des voies de la signalisation cellulaire par l'interaction des régions C-terminales désordonnées des GPCRs avec l'arrestine .....	47
5.1	Introduction et Objectifs.....	47
5.1.1	Complexité de la signalisation GPCR.....	47
5.1.2	Arrestines.....	49
5.1.3	Interaction des GPCRs avec les arrestines .....	51
5.1.4	Le phospho-barcode .....	51
5.1.5	Objectifs de notre étude.....	53
5.2	Résultats et discussion.....	54
5.2.1	Systèmes modèles .....	54
5.2.2	Validation du modèle simplifié composé des peptides C-terminaux isolés.....	54
5.2.3	La boîte à outils.....	55
5.2.4	Codes-barres de phosphorylation et structuraux des GPCters.....	57
5.2.5	Codes-barres conformationnels des arrestines .....	66
5.3	Conclusions .....	73

---

6 Régulation de la transcription de gènes cibles par l'interaction du récepteur de l'acide rétinoïque alpha avec ses co-regulateurs désordonnés .....	75
6.1 Introduction .....	75
6.2 Co-represseur N-CoR .....	76
6.3 Co-activateur TIF2 .....	77
6.4 Conclusions .....	77
<b>Projet de Recherche .....</b>	<b>79</b>
7 Désordre Fonctionnel dans les Mécanismes Moléculaires de régulation de la Signalisation Cellulaire .....	79
7.1 Les régions C-terminales des GPCRs dans la voie de signalisation de l'arrestine .....	79
7.1.1 Code-barres de phosphorylation et de structuration de la région C-terminale du récepteur GHSR reconstitué dans les nanodisques .....	80
7.1.2 Codes-barres conformationnels des arrestines .....	81
7.1.3 Image globale de l'ensemble du récepteur .....	86
7.1.4 Caractérisation structurale de la région C-terminale des arrestines .....	88
7.1.5 Conclusions .....	89
7.2 Les régions flanquantes et désordonnées de co-regulateurs dans la modulation de la transcription des gènes cibles de RXR/RAR .....	90
7.3 Conclusions et perspectives à plus long terme .....	91
Références .....	93
Annexe A .....	103
Annexe B .....	105
Annexe C .....	107
Annexe D .....	109
Annexe E .....	111
Annexe F .....	113



---

## Liste des Abréviations

A	Absorbance
A <sub>a</sub>	composante axiale du tenseur d'alignement
A <sub>r</sub>	composante rhombique du tenseur d'alignement
AD	Alzheimer's disease
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
ATP	Adénosine TriPhosphate
BRP	Protéine Résistance à la Bléomycine
CD	Circular dichroism / Dichroïsme Circulaire
CDK	Cyclin-dependent kinase
CycA3	Cyclin A3
Da	Dalton : poids moléculaire (1 Da ≈ 1 g/mol), 1 acide aminé ≈ 110 Da
<sup>n</sup> D <sub>IS</sub>	Couplage dipolaire à n liaisons entre le spin I et le spin S
DO	Densité Optique
DSC	Differential scanning calorimetry
DSS	2,2-Dimethyl-2-Silapentane-d6-5-Sulfonic acid - Diméthyle Sulfoxyde (D-6)
ε	coefficient d'extinction
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FRET	Förster Resonance Energy Transfer / transfert d'énergie de fluorescence
γ <sub>I</sub>	rapport gyromagnétique du spin I
GPCR	G protein-coupled Receptor / Récepteur Couplé aux Protéines G
GRK	G protein-coupled Receptor Kinase / Kinase spécifiques aux RCPGs
GSK3β	Glycogen synthase kinase 3β
HSQC	Heteronucléar Overhauser Effect Spectroscopy
IDP	Intrinsically Disordered Protein / Protéine intrinsèquement désordonnée
INEPT	Intensive Nucleus Enhancement by Polarisation Transfer

## Liste des Abréviations

---

IPTG	IsoPropylThioGalactoside
${}^nJ_{IS}$	Couplage scalaire à n liaisons entre le spin I et le spin S
MALS	Multi-Angle Light Scattering / diffusion de lumière multi-angle
MAP	Microtubule Associated Protein / Protéine Associée aux Microtubules
MD	Molecular Dynamics / Dynamique moléculaire
MSP	Membrane Scaffold protein for nanodisc / protéine d'échaffaudage
MT	Microtubules
MTBR	Microtubule Binding Region / région de liaison aux microtubules
ND	Nanodiscs
NOE	Nuclear Overhauser Effect / Effet Overhauser Nucléaire
NR	Nuclear Receptor / Récepteur Nucléaire
PHF	Paired helical filament / filaments appariés en hélice
PKA	Protein kinase A
ppm	partie par million ( $10^{-6}$ )
PRE	Paramagnetic Relaxation Enhancement
SIR	Sulfite Reductase
$r_{IS}$	distance internucléaire entre les spins I et S
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RDC	Residual Dipolar Couplings / Couplages Dipolaires Résiduels
rpm	tours par minute
$S^2$	paramètre d'ordre généralisé de la relaxation
SAS	Small Angle Scattering / diffusion aux petits angles
SANS	Small angle neutron scattering / diffusion des neutrons X aux petits angles
SAXS	Small angle X-ray scattering / diffusion des rayons X aux petits angles
SEC	Size Exclusion Chromatography / chromatographie d'exclusion de taille
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TM	TransMembrane
ThS	Thioflavin S
TROSY	Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy

---

## Parcours

### 1 Curriculum vitae

#### **Nathalie SIBILLE**

17/07/1976

Française

[nathalie.sibille@cbs.cnrs.fr](mailto:nathalie.sibille@cbs.cnrs.fr)

+33 4 67 41 77 05

Centre de Biochimie Structurale

29 rue de Navacelles,

34090 Montpellier

<http://www.cbs.cnrs.fr/index.php/fr/accueil-equipea2>

<https://orcid.org/0000-0001-8145-6795>

#### **Chargée de Recherche CNRS Section 16 'Chimie et Vivant' (Octobre 2006)**

(Section CNU : qualifiée en 64 et 31 en 2004, 28 en 2005 et 32 en 2006)

CBS, Montpellier – CNRS UMR 5048 – Université Montpellier – INSERM U 1054

#### **Education**

**2000-2003** PhD Thesis in BioPhysics 'Physique pour l'Instrumentation' - PhD Viva: 16 December 2003 - Institut de Biologie Structurale (IBS), CEA-CNRS-UGA of Grenoble I - *Title: 'Étude par Résonance Magnétique Nucléaire du domaine FMN de la Sulfite Réductase d'Escherichia Coli'* (Supervisors: B. Bersch and B. Brutscher) - fellow: M.E.N.R.T.

**1998-2000** Master degree in Physics 'Méthodes Physiques Expérimentales et Instrumentation', University of Grenoble I (Option: Biophysics).

**1995-1998** BSc in Physics, University of Grenoble I (Option: Astrophysics)

**1994** Bachelor's degree C 'Mathematics and Physical Sciences', Albert Triboulet high school (26)

#### **Research Experience**

**2019-** Co-team leader at the CBS (Montpellier, France) - Structure and Function of Highly Flexible Protein (HFP) team - HCERES defense 11/02/2020.  
<http://www.cbs.cnrs.fr/index.php/en/home-equipea2>

- 2011-** Senior CNRS scientist (CR1) at the CBS (Montpellier, France)
- 2006-2011** Associate CNRS scientist (CR2) at the UGSF (Lille, France) - Fellow : ANR CNRS 'Biologie et Santé'
- 2005-2006** Post-doctorant in the group of NMR (G Lippens) of Institut Pasteur Lille. Selected for a postdoctoral position financed by AIRMA. *Title: 'NMR Study on the neuronal Tau protein associated with Alzheimer's disease'*
- 2004-2005** Postdoctorant in the group of NMR of the Bijvoet Center for Biomolecular (Utrecht University, The Netherlands). Financed by FOM 'Foundation for Fundamental Research on Matter'. *Title: 'Comparative NMR study on the impact of point mutations on protein stability of Pseudomonas mendocina lipase'* with N. van Nuland, R. Boelens and A. Bonvin.

### Trainings

- 2000** **Advanced Diploma Studies (M2): Methods in Experimental Physics** - UJF, Grenoble I, France  
Training period: 4 months, IBS - L.R.M.N., Grenoble, France.  
*'Use of orientational restraints for structure determination by NMR'* with JP. Simorre and M. Blackledge
- 1999** **Master (M1) Degree in Physics** - UJF, Grenoble I, France  
Training period: 3 months, IBS - L.R.M.N., Grenoble, France.  
*'Study of the dynamics of a Bleomycine resistant protein by <sup>15</sup>N relaxation'* with B. Brutscher
- 1998** **Bachelor (L3) Degree in Physics** - UJF, Grenoble I, France  
Training period: 2 months, Laboratoire de Magnétisme Louis Néel - CNRS, Grenoble, France.  
*'Rare earth magnetic system study. Monocrystals elaboration and crystallographic characterisation. Magnetic scattering of neutrons at the Institut Laue-Langevin'* with P. Morin & M. Amara

### Awards

- 2019** CNRS Award for Doctoral and Research Supervision (**PEDR**)
- 2016** Member of the Labex EPIGENMED – Montpellier. Axis Biophysics and Systems Biology. 2 Postoc and 1 PhD grant have been awarded through this program renewed in 2018
- 2005** Post-doctoral grant (**AIRMA**: Association Internationale pour la Recherche sur la Maladie d'Alzheimer)

---

**2001-2004 3 Prized Posters** on my PhD and post-doctoral projects

**2000** PhD thesis grant by the French Ministry of National Education and Research (**MENRT**), Grenoble (France)

**Grants**

**2018-2022 Coordinator** of the ANR-17-CE11-0022-01 project: 'GPCteR: Molecular mechanisms of functional disordered C-terminal regions of GPCRs and impact on arrestin signaling pathways'. (Total granted: 341 k€, 219 k€ as coordinator)

**2019-2023** Participation to MSCA-RISE: 'REFRACT: Repeat protein Function, Annotation and Classification of Topologies'. (Total granted: 2.200 k€, 200 k€ as partner)

**2014-2015** Participation to 'NeuroMed: Diagnostic and molecular comprehension of three neurodegenerative diseases: Parkinson, phenylketonuria and TTR amyloidosis' SUDOE project. (Total granted: 1.014 k€, 107 k€ as partner)

**2010-2011** Project leader for collaboration and service contract for Complix NV Technologiepark 3, B-9052, Ghent (Zwijnaarde), Belgium (Partner at 100% with 24 k€)

**2007-2010** Participation (25%) and service contract for DebioPharm S.A., Lausanne, Switzerland

**2007-2009** Participation (25%) to the ANRS: 'Structural and Functional Analysis of the NS5A Protein of Hepatitis C Virus'

**2006-2009** Participation (30%) to the ANR-05-BLAN-6320-01: Tau-Tubuline: 'Effect of phosphorylation on the Tau-tubulin interaction: structural and functional analyses'

**Students and Post-Doc mentoring**

**Since 2011** 2 Erasmus students (L3 level), 2 summer students from Princeton (L1), 3 Master's students from UM (2 M2 and 1 M1), 2 visiting PhD students for 6 and 3 months, 1 PhD student (100%), 1 technician (biochemist), 1 engineer (molecular biologist), 2 Post-Doc (100%), 4 shared Post-Docs:

2018- Supervision of Assia Mouhand, post-doctorant ANR on GPCteR project (**2 articles**)

2018- Supervision of Myriam Guillien, PhD student Labex EpiGenMed on GPCteR project (**1 article**)

- 2018 Supervision of Vincent Meynier, M1 'Sciences du Médicament', Montpellier University (5 months)  
*Title:* 'Etude par RMN de la région C-terminale désordonnées phosphomimetic du b2AR'  
*Currently:* PhD student in Carine Tisné's team in Paris University since October 2019
- 2018 Supervision of Belen Chaves (NMR part), PhD student with Jose Manuel Perez Cañadillas, CSIC, Madrid (**1 bioRxiv**, submitted to NSMB) (3 months)  
*Currently:* post-doc at University College London since October 2019
- 2018- Supervision of Carlos Elena (NMR part), post-doctorant on the Chem Repeat project (**3 articles**)
- 2017-2019 Supervision of Lucile Senicourt, post-doctorant Labex on the Nuclear Receptor project (**1 bioRxiv**, under review JMB)  
*Currently:* formation Data Scientist @ 'Hopital Fondation Rothschild', France, since September 2020
- 2017-2019 Supervision of Matija Popovic (NMR part), post-doctorant on the Chem Repeat project (**4 articles**)  
*Currently:* Protein Specialist at Centre for Genomic Regulation (CRG), Barcelona Area, Spain
- 2016-2017 Supervision of Elise Delaforge (NMR part), post-doctorant on the Chem Repeat and GPCteR project (**2 articles** and **1 chapter**)  
*Currently:* Teaching Assistant in Nîmes since November 2017
- 2015-2016 Supervision of Amandine Gontier, Master 1 and Master 2 Chimie-Biologie of Lille University  
*Title M2:* 'Caractérisation structurale de l'extrémité C-terminale du récepteur V2 par RMN'  
*Title M1:* 'Caractérisation structurale de l'extrémité C-terminale du récepteur de la Ghréline par RMN'  
*Currently:* post-doc Paris-Sorbonne University since November 2020
- 2015-2019 Co-supervision of Alejandro Estana (25%), PhD student, Toulouse University (**6 articles**)  
*Title:* 'Algorithms and computational tools for the study of intrinsically disordered proteins'  
*Currently:* IR CNRS @ LPT and IRAP labs, Toulouse, France, since December 2020

- 
- 2012-2016 Co-supervision of Tiago Cordeiro, post-doctorant on PCNA and Nuclear Receptor projects (**5 articles**)  
*Currently:* group leader in the Dynamic Structural Biology Lab, New University of Lisbon, Portugal
- 2015 Supervision of Susana Barrera-Vilarmau, PhD student with Ramon Crehuet at IQAC- CSIC, Barcelona, Spain (6 months)  
*Currently:* predoctoral researcher at IQAC/CSIC
- 2014 Supervision of Aleix Marti, Erasmus at Universitat Rovira I Virgili, Tarrago, Catalogne, Spain (4 months)  
*Title:* 'Structural Characterization of the C-terminal of B2ar by Nuclear Magnetic Resonance '  
*Currently:* PhD student at the University of Camerino, Italia (with AM Eleuteri) since 2017
- 2013 Co-supervision of Mariano Dellarole, post-doc @ CBS with Cathy Royer (**1 article in corresponding**)  
*Currently:* Research Scientist, Institut Pasteur Paris, France
- 2012 Co-supervision of Marta Barbon, L3 Erasmus at Universita degli Studi di Ferrara, Italia (4 months)  
*Title:* 'Étude par RMN du ligand AVP du récepteur V2'  
*Currently:* Research Associate Imperial College, London, UK since October 2018
- 2005-2011 (CR2, Lille):** 1 L3, 2 Master1, 1 Master2, 1 tec (biochemist), 1 IE (bioinfo) & 3 PhD theses (25%)
- 2009-2011 Participation to the supervision of Isabelle Huvent, IE, USTL, Lille, France (**2 articles**)  
*Currently:* Lecturer, USTL, Lille, France
- 2008-2010 Participation to the supervision of Fanny Bonachera, IE, USTL, Lille, France (**2 articles**)  
*Currently:* Research Engineer, Strasbourg, France
- 2008-2011 Participation to the supervision of Anthony Daccache, PhD, ED Biologie Santé, Lille, France (**1 article**)  
*Title:* 'Functional and Pathological consequences of post-translational modification of protein tau in Alzheimer's disease'  
*Currently:* Seed Fund Developer at Finovan Gestion, Houplin-Ancoisne, France

- 2006-2010 Participation to the supervision of Laziza Amniai, PhD, ED Biologie Santé, Lille, France (**3 articles**)  
*Title:* 'Functional and Pathological consequences of post-translational modification of protein tau in Alzheimer's disease'  
*Currently:* Head of R&D Reagents Department at DIAGAST, Lille, France
- 2006-2009 Participation to the supervision of Dries Verdegem, PhD, ED Biologie Santé, Lille, France (**2 articles**)  
*Title:* 'NMR assignment methods (for unstructured proteins) and on structural analysis of (Hepatitis C) viral proteins with NMR'  
*Currently:* Metabolomics Bioinformatics Researcher at VIB, Brussel, Belgium
- 2010-2011 Participation to the supervision of Cyril Charlier, L3 and M1, ED Physics, Lille, France  
*Title M1:* 'Understanding of the inactivation of the Cyclophilin A by an immunosuppressive compound using in-cell NMR'  
*Title L3:* 'Evaluation by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) of proteins in a cellular system, the *Xenopus oocyte*'  
*Currently:* Associate Researcher at CNRS, Toulouse, France
- 2008 Participation to the supervision of Geoffrey Dufour, M2, ED Biologie Santé, Lille, France (6 months)  
*Title:* 'Comparaison par résonance magnétique nucléaire de l'interaction de la Cyclophiline A avec les ligands Cyclosporine A et Debio 025'  
*Currently:* CEO, Inatech Nutrition, Saint Brieuc, France
- 2006 Participation to the supervision of Yoann Jumel, M2, ED Biologie Santé, Lille, France (6 months)  
*Title:* 'Les phosphorylations de la protéine neuronale Tau'  
*Currently:* CEO, Inatech Nutrition, Saint Brieuc, France
- 2004-2005 (Post-doctorat, Utrecht):** 1 'honor thesis' of a Bachelor student and 1 Master in chemistry
- 2005 Supervision of A.J. de Graaf, bachelor student, Utrecht University, NL (4 months)  
*Title:* 'H/D exchange studies by NMR of Lipase from *Pseudomonas mendocina*. Comparison between wild type and F180P/S205G mutant lipase, with and without specific inhibitor E600'  
*Currently:* Clinical chemist at St Jansdal Harderwijk Hospital, NL
- 2005 Supervision of E.C. Blomen, 'honor thesis' of a bachelor student @ University College Utrecht, NL (4 months)

---

*Title: 'A study of an industrial enzyme from *Pseudomonas mendocina* by NMR'*

*Currently: Independent expert in the field of renewable energy and energy transition*

**2000-2003 (PhD thesis, Grenoble): 1 master student and 1 high school student**

### Collaborations

**Since 2018** JM. Perez-Canadillas - CSIC, Madrid, Spain - LLPS project (**1 article bioRxiv**)

**Since 2017** JL. Banères - IBMM, Montpellier – Partner ANR GPCteR - (**1 article**)

**Since 2017** Lise Arleth - University of Copenhagen, Denmark - Partner ANR GPCteR

**Since 2016** J. Cortès - LAAS, Toulouse - (<https://moma.laas.fr/team/>) - Computational project (**6 article**)

**Since 2015** W. Bourguet & A le Maire - CBS, Montpellier - Nuclear receptor project (Labex EpiGenMed) (**2 articles and 1 chapter**)

**2014-2016** FJ Blanco - CSIC, Barcelona, Spain - PCNA project (**2 articles**)

**2012-2014** C. Royer and C. Roumestand - CBS, Montpellier - High Pressure project (**1 corresp article**)

**Since 2012** P. Bernadó - CBS, Montpellier - PCNA, LPPS, ChemRepeat and Computational projects - (**15 articles and 2 book chapters**)

### Publications (\*corresponding author)

Total number of Articles in Peer-Reviewed Journals: **34** (3 as corresponding author)

Book Chapters: **2** (1 as corresponding author)

Hirsch Index: **17**; i-10 index= **22**; Total Number of Citations: **1058**; Average Citations per Item: **24.8**

### In preparation

37. Mouhand A., Guillien M. et al. **Sibille N\***. Structural characterization of functional  $\beta$ -arrestin variants and Impact on the interaction with the C-terminal regions of GPCRs. *Biomolecules*.

36. Guillien M., Mouhand A et al. **Sibille N\***. Molecular mechanisms of functional phosphomimetic disordered C-terminal regions of GPCRs and impact on  $\beta$ -arrestin signaling pathways. *eLife or J Mol Biol*.

35. Guillien M., Mouhand A et al. **Sibille N\***. Structural characterization of the functional disordered C-terminal regions of GPCR by Nuclear Magnetic Resonance. *Scientific Reports*.

#### Book Chapters

- Delaforge E., Cordeiro T.N., Bernadó P., **Sibille N\***. (2018) Conformational Characterization of Intrinsically Disordered Proteins and Its Biological Significance. In: *Webb G. (eds) Modern Magnetic Resonance. Springer, Cham.* [https://doi.org/10.1007/978-3-319-28388-3\\_52](https://doi.org/10.1007/978-3-319-28388-3_52)

#### Published

34. Sénicourt L, le Maire A, Allemand F, Carvalho J.E., Guee L, Germain P, Schubert M, Bernadó P, Bourguet W, **Sibille N\*** (2020) Structural Insights into the cooperative interaction of the intrinsically disordered Co-Activator TIF2 with retinoic acid receptor heterodimer (RXR/RAR). bioRxiv: doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.28.359091> under review in *Journal of Molecular Biology*
33. Morató A, Elena-Real CA, Popovic M, Fournet A, Zhang K, Allemand F, **Sibille N**, Urbanek A, Bernadó P (2020) Robust Cell-Free Expression of Sub-Pathological and Pathological Huntingtin Exon-1 for NMR Studies. General Approaches for the Isotopic Labeling of Low-Complexity Proteins. *Biomolecules*. 10(10):1458.
32. Guillien M, le Maire A, Mouhand A, Bernado P, Bourguet W, Banères JL, **Sibille N\*** (2020) IDPs and their complexes in GPCR and nuclear receptor signaling. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 174:105-155
31. Estana A, Barozet A, Mouhand A, Vaisset M, Zanon C, Fauret P, **Sibille N**, Bernado P, Cortés J (2020) Predicting Secondary Structure Propensities in IDPs Using Simple Statistics from Three-Residue Fragments. *J Mol Biol*. 432(19):5447-5459
30. Urbanek A, Popovic M, Morato A, Estana A, Elena-Real CA, Mier P, Fournet A, Allemand F, Delbecq S, Andrade-Navarro MA, Cortés J, **Sibille N**. & Bernado P (2020) Flanking Regions Determine the Structure of the Poly-Glutamine in Huntingtin through Mechanisms Common among Glutamine-Rich Human Proteins. *Structure*. 28(7):733-746
29. Urbanek A, Popovic M, Elena-Real CA, Morato A, Estana A, Fournet A, Allemand F, Gil AM, Cativiela C, Cortés J, Jimenez AI, **Sibille N** & Bernado P (2020) Evidence of the Reduced Abundance of Proline cis Conformation in Protein Poly Proline Tracts. *J Am Chem Soc*. 142(17):7976-7986
28. Chaves-Arquero B, Martinez-Lumreras S, **Sibille N**, Camero S, Bernado P, Jimenez MA, Zorilla S, Perez-Canadillas JM (2020) Multivalent interaction between eIF4G1, Pub1 and Pab1 drive the formation of protein condensates. *Submitted to NSMB; bioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.07.234443>

27. Urbanek A, Elena-Real CA, Popovic M, Morato A, Fournet A, Allemand F, Delbecq S, **Sibille N** & Bernado P (2020) Site-Specific Isotopic Labeling (SSIL): Access to High-Resolution Structural and Dynamic Information in Low-Complexity Proteins. *Chembiochem*. 21(6):769-775
26. Cordeiro TN, **Sibille N**, Germain P, Barthe P, Boulahtouf A, Allemand F, Bailly R, Vivat V, Ebel C, Barducci A, Bourguet W, Le Maire A, Bernadó P (2019) Interplay of protein disorder in retinoic acid receptor heterodimer and its co-repressor regulates gene expression. *Structure*. 27(8):1270-1285
25. Estana A, **Sibille N**, Delaforge E, Vaisset M, Cortes J, Bernado P (2019) Realistic Ensemble Models of Intrinsically Disordered Proteins Using a Structure-Encoding Coil Database. *Structure*. 27(2):381-391
24. Estana A, Molloy K, Vaisset M, **Sibille N**, Simeon T, Bernado P, Cortes J. (2018) Hybrid parallelization of a multi-tree path search algorithm: Application to highly-flexible biomolecules. *Parallel Comput*. 77:84-10
23. Urbanek A, Morato A, Allemand F, Delaforge E, Fournet A, Popovic M, Delbecq S, **Sibille N** & Bernado P (2018) A General Strategy to Access Atomic Resolution Structural Information in Poly-Glutamine Homo-Repeats. *Angew Chem Int Ed Engl*. 57(14):3598-3601
22. Cordeiro TN, Herranz-Trillo F, Urbanek A, Estana A, Cortes J, **Sibille N** & Bernadó P (2017) Structural Characterization of Highly Flexible Proteins by Small-Angle Scattering. In: *Chaudhuri B., Muñoz I., Qian S., Urban V. (eds) Adv Exp Med Biol*, vol 1009. 107-129 Springer, Singapore
21. Cordeiro TN, Chen PC, De Biasio A, **Sibille N**, Blanco FJ, Crehuet R, Hub JS, Bernadó P (2017) Disentangling polydispersity in the PCNA-p15PAF complex, a disordered, transient and multivalent macromolecular assembly. *Nucleic Acids Res*. 45(3):1501-1515
20. Cordeiro TN, Herranz-Trillo F, Urbanek A, Estana A, Cortes J, **Sibille N** & Bernadó P (2017) Small Angle Scattering Studies of Intrinsically Disordered Proteins and their complexes. *Curr Opin Struct Biol*. 42:15-23
19. De Biasio A, Ibanez de Opakua A, Cordeiro TN, Villate M, Merino N, **Sibille N**, Lelli M, Diercks T, Bernadó P & Blanco FJ (2014). p15PAF Is an Intrinsically Disordered Protein with Nonrandom Structural Preferences at Sites of Interaction with Other Proteins. *Biophys J*. 106:865-74. [F1000](#)
18. **Sibille N\***, Delarolle M, Royer C & Roumestand C (2014). Measuring residual dipolar couplings at high hydrostatic pressure: robustness of alignment media to high pressure. *J Biomol NMR*. 40(5):955-62
17. **Sibille N** & Bernadó P (2012). Structural Characterization of Intrinsically Disordered Proteins by the Combined Use of NMR and SAXS. *Biochem Soc Trans*. 40(5):955-62

16. **Sibille N**, Bellot G, Wang J, Déméné H (2012). Low concentration of a Gd-chelate increases the signal-to-noise ratio in fast pulsing BEST experiments. *J Magn Reson.* 224C:32-7
15. **Sibille N**, Huvent I, Fauquant C, Amniai L, Verdegem D, Leroy A, Wieruszeski JM, Lippens G, Landrieu I (2012) Structural characterization by Nuclear Magnetic Resonance of a functional fragment of Tau: Impact of phosphorylation in the Pro-rich region. *Proteins.* 80(2):454-62
14. Daccache A, Lion C, **Sibille N**, Gerard M, Slomianny C, Lippens G, Cotelle C (2011) Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. *Neurochem Int.* 58(6):700-7
13. Landrieu I, Leroy A, Smet-Nocca C, Huvent I, Amniai L, Hamdane M, **Sibille N**, Buée L, Wieruszeski JM, Lippens G (2010) Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of the neuronal Tau protein: normal function and implication in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans.* 38(4):1006-11
12. Landrieu I, Hanouille X, Bonachera F, Hamel A, **Sibille N**, Yin Y, Wieruszeski J-M, Horvath D, Wei Q, Vuagniaux G, Lippens G (2010) Structural Basis for the non-immunosuppressive character of the Cyclosporin A analogue DEBIO-025. *Biochemistry.* 49(22):4679-86
11. **Sibille N**, Hanouille X, Bonachera F, Verdegem D, Landrieu I, Wieruszeski JM, Lippens G (2009) Selective backbone labelling of ILV methyl labelled proteins. *J Biomol NMR.* 43(4) :219-27
10. Hanouille X, Melchior A, Parent B, **Sibille N**, Denys A, Wieruszeski J-M, Horvath D, Allain F, Lippens G & Landrieu I (2007) Structural and functional characterisation of the interaction between Cyclophilin B and an heparin derived oligosaccharide. *J Biol Chem.* 282(47):34148-58
9. Lippens G, Sillen A, Landrieu I, Amniai L, **Sibille N**, Barbier P, Leroy A, Hanouille X and Wieruszeski JM (2007) Tau Aggregation in Alzheimer's Disease: What Role for Phosphorylation? *Prion.* 1(1) :21-25
8. **Sibille N**, Sillen A, Leroy A, Wieruszeski JM, Smet C, Mulloy B, Landrieu I, Lippens G (2006) Structural impact of heparin binding to full-length Tau as studied by NMR spectroscopy. *Biochemistry.* 45(41):12560-72
7. **Sibille N**, Favier A, Azuaga AI, Bonvin AMJJ, Boelens R, Ganshaw G, Bott R, van Nuland NAJ (2006) Comparative NMR study on the impact of point mutations on protein stability of *Pseudomonas mendocina* lipase. *Protein Science* 15(8):1915-27
6. Landrieu I, Lacosse L, Leroy A, Wieruszeski JM, Trivelli X, Sillen A, **Sibille N**, Schwalbe H, Saxena K, Langer T, Lippens G (2005) NMR analysis of a Tau phosphorylation pattern. *J Am Chem Soc.* 128(11):3575-83. [F1000](#)
5. **Sibille N**, Blackledge M, Brutscher B, Covès J, Bersch B (2005) Solution structure of the sulfite reductase flavodoxin-like domain from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 44(25):9086-95

4. **Sibille N**, Bersch B, Covès J, Blackledge M, Brutscher B (2002) Side Chain Orientation from Methyl (1)H-(1)H Residual Dipolar Couplings Measured in Highly Deuterated Proteins. *J Am Chem Soc.* 124:14616-14625.
3. **Sibille N**, Champier L, Bersch B, Brutscher B, Blackledge M, Covès J (2002) Reactivity, Secondary Structure and Molecular Topology of the *Escherichia coli* Sulfite Reductase Flavodoxin-like Domain. *Biochemistry.* 41:3770-3780.
2. **Sibille N**, Pardi A, Simorre JP, Blackledge M (2001) Refinement of local and long-range structural order in theophylline-binding RNA using (13)C-(1)H residual dipolar couplings and restrained molecular dynamics. *J Am Chem Soc.* 123:12135-46.
1. **Sibille N**, Covès J, Marion D, Brutscher B, Bersch B. (2001) <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N assignment of the flavodoxin-like domain of the *Escherichia coli* sulfite reductase. *J Biomol NMR.* 21:71-72.

#### Abstract of congress

Bernado P, Urbanek A, Popovic M, Morato A, Elena-Real C, Estana A, Allemand F, Fournet A, Jimenez A, Cativiela C, Cortès J, Delbecq S, **Sibille N** (2019) Access to atomic resolution structural information of homo-repeats by NMR: The Huntingtin case. In *Abstracts Of Papers Of The American Chemical Society*. Vol. 257.

Urbanek A, Morato A, Popovic M, Estana A, Allemand F, Elena-Real C, Fournet A, Jimenez A, Cativiela C, Delbecq S, Cortès J, **Sibille N** & Bernado P. (2019) Access to Atomic Resolution Structural Information of Homor-Repeats: The Huntingtin Case. In: *European Biophysics Journal With Biophysics Letters*. Vol 48, pp. S78. Meeting Abstract O-187

Bernado P, Cordeiro TN, Le Maire A, Barthe, P, Allemand F, Barducci A, Ebel C, Pierre G, **Sibille N** & Bourguet, W. (2017) Conformational plasticity in the regulation of nuclear receptor gene transcription. *Acta Crystallogr. Sect. A* **73**, C645.

#### PhD Thesis

Title: 'Étude par Résonance Magnétique Nucléaire du domaine FMN de la Sulfite Réductase d'*Escherichia Coli*'

PhD Viva: 16 December 2003 at the 'Institut de Biologie Structurale' (IBS) - CNRS/CEA/UJF - Grenoble I, France

PhD Thesis in 'Méthodes physiques expérimentales et instrumentation'

Fellow: awarded with a M.E.N.R.T.

Reviewers: M. Delepierre and E. Guittet; Examinators: Rolf Boolens and J. Covès; Supervisors: B. Bersch and B. Brutscher

#### PhD thesis Jury Member

2018 Jury member of Florian CELLI PhD thesis - University of Paris-Saclay

*Title: 'Analyse structurale des régions prédites comme dépliées de l'enveloppe nucléaire: exemple de l'émerine et de la lamine A'*

2017 Jury member of Laura Troussicot PhD thesis - University of Lyon

*Title: 'Nouvelle approche basée sur la dynamique moléculaire et la RMN pour l'étude et l'optimisation de nouveaux inhibiteurs de peroxyrédoxines humaines, impliquées dans les chocs ischémiques'*

### Editorial and reviewing activities

2020 Invited to join the "Biomolecules" Topic Editorial Board and to lead a Special Issue entitled 'Protein intrinsic disorder: role in signaling, regulation and membrane-less organelle formation' with Sonia Longhi & Carine van Heijenoort

Since 2011 Regular Referee for Biochemistry, Biomolecules, ChemEurJ, Scientific Rep, ...

### Software

**MoMA:** Molecular Motion Algorithm, <https://moma.laas.fr/team/>

**Realistic Ensemble Builder (REB):** Program to build ensembles of Intrinsically Disordered Proteins using a conformational database of tripeptides derived from high-resolution structures. Program described in [Estaña et al. *Structure*, **2019**, 27(2):381-391].

### Teaching experience

2019- Courses on IDPs and protein sequence motifs in the '*Analyse in silico des génomes et Perfectionnement pratique en Bio-informatique*' module for Master2 students at the 'Ecole Pratiques des Hautes Etudes, Sciences de la vie et de la terre', Montpellier University 4 h / year

2016- NMR courses on IDPs for Master2 students 'Sciences du Médicament Parcours Biologie Structurale et Conception Rationnelle de Molécules Bioactives', Montpellier University, 4 h / year

Since 2015 NMR courses in the National School RéNaFoBiS (Réseau National de Formation en Biologie Intégrative – FRISBI): 2 h of courses and one day of practical work / year, total 1 week / year

2013 2h of NMR courses on IDPs for the 'Atelier Technologique BioCampus' in Montpellier

2010-2011 Responsible of the « Restrained Molecular Dynamics » module in the Master2 Chimie-Biologie of Lille 1: 20 h of courses, exercises and practical work

2004 NMR practical courses for 3<sup>rd</sup> year students of chemistry faculty, Utrecht University: 109 h

---

2000-2003 Physics for bachelor degrees students, Grenoble: 152 h of practical courses: Physical Optics, Mechanics and electricity

### Organisation of school

2019 Organisation of the 'Algorithms in Structural Bioinformatics' (Algo SB) Winter School for Intrinsic Disorder in Proteins (non-folding, binding and condensation) - delayed 2022 <http://algosb2020.galaxy.ibpc.fr>

Since 2015 Member of the board and organisation of the 'Ecole Nationale de Biologie Structurale Intégrative' (RENaFoBis) School - <https://www.renafobis.fr>

2010 Participation to the creation of the Master Chimie-Biologie of Lille 1 with Pr. Didier Barbry

### Administrative and Collective Responsibilities

2020 Co-Scientific manager of the NMR plateforme at the CBS

2020 Co-team leader HFP - HCERES defense 02/20

2020 In charge of the supervision, annual interview and the CNRS 'Sirhus' report of Frédéric Allemand, IR CNRS in our team

2019 Invitation to join the Network of Proposers for the COST Action DP-FETCH: 'Dark Proteome: Function, Evolution and TeCHnology'

2019 Member of the Green Lab comity at the CBS, responsible of the Building and exterior part

2019 Organisation of 'La fete de la Science': participation to the guided tour of the CBS and escape game organisation on the thematic 'FBI: Investigation at the frontiers of the visible'

2018 Co-Responsible of the design of a booklet describing the main activities and the CBS organization (sended to European and French Universities)

2017 Member of the "CBS2 day" committee at the Doctoral School of Montpellier

Since 2015 Member of the scientific council at the CBS

Since 2014 Member of the COST NGP – Non Globular Proteins

Since 2013 Member of the direction council meeting at the CBS

Since 2013 Member of the GDR « RCPG-Physio-Med »

### Participation in Expert commitees

Since 2019 Member of the external comity for TGIR-RMN proposal evaluation

- 2019 Jury member for the 'Les grandes avancées en Biologie-Santé' prize – I-site Muse Montpellier
- 2018 Expertise of scientific proposals for the 'IDEX Communauté Université Grenoble Alpes'
- 2016 Jury member for a Lecturer position (COS64 MCF 1758), UGSF, Lille1
- 2012 Expert Member of the jury for an external BAP A n°71 (NMR technician) - Pasteur Institut

#### Organisations of meetings and symposia

- 2016 Members of the scientific committee of the '**1ere Journée Grand-Sud de RMN**' congress in Montpellier (France)
- 2006-2011 Responsible of the scientific animation of UGSF lab and Federative Research Institute 118, Lille
- 2009 Organization of the Thematic Day Meeting '**Biologie Structurale**'. Lille, France

#### Presentations

##### ↳ Invited Talk

1. **Sibille N.** Study of Intrinsically Disordered Protein by High Pressure NMR & SAXS. **Biologie & Haute Pression Quelles cellules haute pression dans les laboratoires et les grands instruments?** Synchrotron Soleil, France. 8/10/19
2. **Sibille N.** *Interplay of protein disorder in retinoic acid receptor heterodimer and its co-regulators in gene expression.* **Biomolécules & Nanostructures 7.** Pomlewo, Gdansk, Poland. 15-19/05/19
3. **Sibille N.** *Towards the characterization of the plasticity of a Retinoic Acid nuclear Receptor heterodimer complexes involving an IDP.* **A Day In The Life Of Intrinsically Disordered Proteins: From Computation To Experiments.** ENS Chimie, Paris, France. 26/10/2015
4. **Sibille N.** *Etude par RMN de la protéine neuronale Tau : fonction physiologique et implication dans la maladie d'Alzheimer.* **Biologie structurale et phénomènes transitoires.** Dourdan, France. **Conférence plénière**, 5/06/2009

##### ↳ Invited Seminars

- Since 2011 (CR1 CNRS, Montpellier):** Synchrotron SOLEIL – 12/2016 at Gif sur Yvette (invited by Juan Perez; SANOFI Montpellier (presentation of the team at the CBS 07/2015)
- 2005-2011 (CR2 CNRS, Lille):** 3 invited conferences in Institut Pasteur (Paris), ENSIC (Nancy) and Centre de Biochimie Structurale (Montpellier)

**2000-2003 (PhD thesis, Grenoble):** 4 invited conferences: Clark University, Worcester, U.S.A; Utrecht University, The Netherlands; Institut Pasteur de Lille, France; Université Claude Bernard, Lyon I, France

#### ↳ Last presentation of post-doctorants

1. Elena-Real CA, Urbanek A, Popovic M, Morato A, Estana A, Gil AM, Fournet A, Allemand F, Cativiela C, Jimenez A, Delbecq S, Cortes J, Sibille N, Bernado P. "Site-specific incorporation of isotopically labeled amino acids to study homorepeat proteins at high resolution". **Non-canonical amino acids: tools for biological and biophysical investigations**. Paris, France. 21-22/10/19.
2. Urbanek A, Morató A, Popovic M, Allemand F, Fournet A, Delaforge E, Gil AM, Jiménez AI, Cativiela C, Delbecq S, Sibille N & Bernadó P. A general strategy to access structural information at atomic resolution in homorepeat proteins. Communication orale by Urbanek A. **XXVIII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS)** - Dublin, Ireland. 19-24/08/18
3. Sénicourt L, Allemand F, Lemaire A, Barducci A, Germain P, Bourguet W, Bernado P, Sibille N\*. *Structural bases of the RAR/RXR heterodimer regulation by the Intrinsically Disordered co-activator*. Communication orale by Sénicourt L. **8<sup>th</sup> Meeting on Nuclear Receptor**. Lyon, France. 24-25 March 2018
4. Sénicourt L, Allemand F, Germain P, Bourguet W, Bernado P, Sibille N\*. *Structural role of the Intrinsically Disordered Protein TIF2 in Retinoic Acid Receptor Activation*. Communication orale by Sénicourt L. **Labex EpiGenMed Day**. Montpellier, 27/10/17
5. Urbanek A, Morató A, Allemand F, Fournet A, Delaforge E, Jiménez AI, Cativiela C, Delbecq S, Sibille N & Bernadó P. *A novel approach to enable the structural and dynamics characterisation of homorepeat proteins*. Communication orale by Urbanek A. **GRISBI Program of the Labex EpiGenMed and Numev Joint Meeting** - Montpellier, 05/05/18
6. Idem at **3rd NGP-NET Symposium on Non-Globular Proteins** – Kosice (Slovaquie) 28/08–01/09/2017
7. Bernado P, et al., Sibille N and Bourguet W. *Acta Cryst.* (2017). A73, C645

#### ↳ Poster presentations (International):

32. Elena-Real C, Urbanek A, Popovic M, Morató A, Estana A, Fournet A, Allemand F, Delbecq S, Cortes J, Sibille N & Bernadó P. *High-resolution NMR structural characterisation of Huntingtin's polyglutamine tract*. **21<sup>st</sup> ISMAR 15<sup>th</sup> EUROMAR** – Berlin (Germany) 25-30/08/19

31. [Sénicourt L](#), Allemand F, Lemaire A, Barducci A, Germain P, Bourguet W, Bernado P, [Sibille N\\*](#). *Structural bases of the RAR/RXR heterodimer regulation by the Intrinsically Disordered co-activator*. **11<sup>th</sup> NMR: a tool for biology** – Institut Pasteur (Paris) 28-30/01/19
  30. idem at **Intrinsically Disordered Proteins (Gordon Res. Conference)** - Les Diablerets (Switzerland) 30/06-06/07/18
  29. [Urbanek A](#), Morató A, Popovic M, Allemand F, Fournet A, Delaforge E, M Gil A, Jiménez AI, Catiuela C, Delbecq S, [Sibille N](#) & Bernadó P. *A novel approach to enable the structural and dynamics characterisation of homorepeat proteins*. **XXVIII<sup>th</sup> ICMRBS** – Dublin (Ireland) 19-24/08/18
  28. idem at **Intrinsically Disordered Proteins (Gordon Res. Conference)** - Les Diablerets (Switzerland) 30/06-06/07/18
  27. [Morató A](#), Urbanek A, Allemand F, Fournet A, Delaforge E, Delbecq S, [Sibille N](#) & Bernadó P. *An efficient cell-free strategy to produce stable huntingtin for structural studies*. **3rd NGP-NET Symposium on Non-Globular Proteins** – Kosice (Slovaquie ) 28/08–01/09/2017
  26. [Estana A](#), [Sibille N](#), Delaforge E, Vaisset M, Bernadó P, and Cortés J. *Generating realistic conformational ensembles of intrinsically disordered proteins*. **CECAM Workshops**. Paris 3-6/10/17
  25. [Barrera-Vilarmau S](#), [Sibille N](#), Bernadó P, and Crehuet R. *The subtle pressure dependence of Intrinsically Disordered Proteins*. **CECAM Workshops**. Paris 3-6/10/17
  24. idem as 24 presented at the **EBSA** – Edinburgh (UK) 16-20/07/17
  23. Cordeiro T, Le Maire A, [Sibille N\\*](#), Barthe P, Bourguet W, Germain P, Bernadó P . *Towards the characterization of the plasticity of a Retinoic Acid nuclear Receptor heterodimer complexes involving an IDP*. **1st NGP-net Symposium on Non-Globular Proteins** - Porto (Portugal) 6-9/10/15
  22. Marti A, Allemand F, Fournet A, Cordeiro T, Orcel H, Mouillac B, Bernadó P, [Sibille N\\*](#). *Structural characterization of functional disordered C-terminal regions of GPCRs by Nuclear Magnetic Resonance*. **Journée thématique Interdisciplinarité** - Montpellier (France) 27/11/14
  21. Idem as 22 presented at the **3rd Annual Meeting of the GDR3545** - Montpellier (France) 20-22/11/14
  20. [Sibille N](#), Royer R, Roumestand C. *Pressure Effect on NMR Alignment Media: A Tool for Residual Dipolar Couplings Measurement Under High Pressure*. **IMBP 2014** - Montpellier (France) 8-11/07/14
- From 2001 to 2013: 11 Posters presented by [Sibille N](#) (international): **ENC 2013** - Asilomar (USA); **ICMRBS 2012** – Lyon (France); **Alzheimer's Diseases and Parkinson's Diseases**

---

**2011** – Barcelone (Espagne); **EUROMAR 2010 and 17th ISMAR Conference**, Florence (Italie); **3rd EU-NMR Annual User Meeting 2007**, Autrans (France); **European Biophysics Congress 2007**, London (UK); **GRC 2006 : Computational Aspects-Biomolecular NMR**, Aussois (France) ; **Euromar/EENC 2005**, Veldhoven (The Netherlands) ; **17th EENC/32nd Ampere 2004**, Lille (France) ; **The 44th Experimental Nuclear Magnetic Resonance Conference 2003**, Savannah, Georgia, NM (USA) ; **Embo Pratical course : Multidimensional NMR in Structural Biology 2002**. Il Ciocco, Lucca (Italie)



## Parcours

### 2 Trajectoire Scientifique



J'ai effectué mes études de Physique à l'Université Joseph Fourier de Grenoble I et j'ai commencé à découvrir le monde de la biologie structurale et de la spectroscopie à Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) lors de mes stages au sein du laboratoire de RMN de l'Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel.

Une partie importante de ma carrière scientifique a été consacrée aux développements de nouvelles méthodes de RMN, tout d'abord mis au point lors de ma thèse à Grenoble (2000-2003). Ces développements concernaient principalement une nouvelle approche en RMN structurale, les constantes de couplages dipolaires résiduels (RDCs). Nous avons notamment montré dans un article sur mes travaux de DEA ([Sibille et al., 2001](#)) qu'il était possible d'utiliser ces contraintes par modules. Ceci permet de grandement améliorer la résolution des structures de macromolécules allongées comme les ARN ou des grosses protéines à l'échelle de la RMN, donc nécessairement deutérées pour des raisons d'ordre technique.

J'ai poursuivi ma carrière de spectroscopiste par un post-doctorat aux Pays-Bas au laboratoire de RMN du Bijvoet Center de l'Université d'Utrecht. Cette période m'a permis de consolider mes connaissances en RMN avec le Pr. Rolf Boelens, de m'initier au monde de la modélisation avec le Pr. Alexandre Bonvin et finalement d'acquérir une expérience en étude de la stabilité des protéines avec Nico van Nuland lors d'un séjour dans son nouveau laboratoire à Grenade en Espagne en 2005 ([Sibille et al., 2006a](#)).

A mon arrivée dans le laboratoire de Lille, j'ai démarré l'étude structurale de la protéine neuronale Tau dans le cadre de son implication dans la maladie d'Alzheimer. J'ai ainsi commencé à aborder le thème des protéines intrinsèquement désordonnées (IDPs) et jaugé de leur importance dans la cellule. J'ai appréhendé le sujet d'un point de vue méthodologique, en transférant mes compétences de RDCs mesurés sur des protéines structurées à des systèmes désordonnés et dynamiques (Sibille et al., 2006b). D'autre part, nous avons été parmi les premiers à montrer que la RMN était une méthode de choix pour l'identification et la quantification de sites de phosphorylation sur les IDPs (Landrieu et al., 2006) (F1000). Ainsi, la possibilité d'évaluer les changements structuraux imposés par la phosphorylation donne un atout important à la RMN comme méthode d'évaluation des modifications post-traductionnelles des protéines d'un point de vue structural (Sibille et al., 2012). Durant ces 6 années, je me suis focalisée sur l'analyse de la structuration de Tau et de ses conséquences fonctionnelles ou pathologiques selon l'épitope de phosphorylation concerné, et finalement sur la recherche de drogues anti-agrégatives de cette protéine neuronale (Daccache et al., 2011).

En Septembre 2011, j'ai intégré le Centre de Biochimie Structurale (CBS) de Montpellier. Cette mutation m'a permis de mettre en place au CBS un environnement de travail dédié à l'étude des IDPs. Ainsi, avec les compétences complémentaires de Pau Bernadó, chercheur INSERM (SAXS et modélisation), nous avons toute l'expertise, les outils et les équipements nécessaires pour faire aboutir nos sujets respectifs qui ont en commun cette même thématique d'intérêt. L'AERES avait très bien évalué la création de notre équipe "Structure et Fonction de Protéines Hautement Flexibles" ou HFP, et l'INSERM nous avait qualifié d'"Excellent" en 2013. Nous avons également intégré en 2016 le LABEX 'EpiGenMed' de Montpellier, ceci nous a permis de développer certaines de nos collaborations. La mise en place d'une nouvelle équipe, sur une thématique qui m'est chère, a été très enrichissante, tant d'un point de vue personnel que professionnel. La co-direction de notre équipe a récemment été officialisée. Nous l'avons publiquement présentée devant l'HCERES en Février 2020.

## Travaux Scientifiques antérieurs et jusqu'à présent

### 3 Stages et Projets dans des laboratoires

#### 3.1 Stages de Master

##### 3.1.1 Étude de la dynamique d'une Protéine de Résistance à la Bléomycine

Lors de mon stage de maîtrise de Physique Recherche, j'ai étudié les propriétés dynamiques par relaxation  $^{15}\text{N}$  d'une Protéine Résistance à la Bléomycine (BRP) qui est un agent anticancéreux (Figure 1). La Bléomycine (Blm) est un glycopeptide de 1,4 kDa, antibiotique naturellement excrété par des micro-organismes: les actinomycètes (*Streptomyces verticillus*). Sous sa forme active, la Bléomycine est complexée avec du fer  $\text{Fe}^{2+}$  (Blm-Fe). Ce complexe est très réactif et dégrade l'ADN. Ces actinomycètes ont développé un mécanisme de résistance contre ce composé potentiellement toxique, en synthétisant une Protéine Résistante à la Bléomycine (BRP). La nature dimérique de la BRP (14 kDa) a été confirmée par le tenseur de diffusion déterminé par les données de relaxation RMN. D'autre part, la liaison de la Blm induit également des changements de la dynamique locale (tronçon N85-G91), comme le montrent les données de relaxation  $^{15}\text{N}$  (Vanbelle et al., 2003).

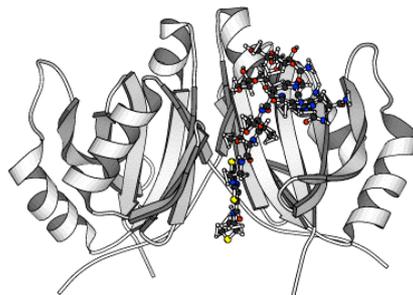


Figure 1 : Protéine homodimérique de Résistance à la Bléomycine

##### 3.1.2 Utilisation de contraintes orientationnelles pour la détermination de

### structure par RMN

Lors de mon stage de D.E.A. en Méthodes Physiques Expérimentales et Instrumentation, j'ai utilisé des couplages dipolaires résiduels (RDC) pour l'affinement de structure d'un ARN de 33 nucléotides complexé à la théophylline.

La détermination de structure par RMN repose principalement sur l'utilisation de distances inter-protons à courte portée. Ces contraintes de distances sont obtenues par l'intermédiaire de l'effet nOe (nuclear Overhauser effect), qui donne des informations d'une nature assez locale, puisqu'il diminue avec l'inverse de la distance internucléaire à la puissance six. Pour les acides nucléiques qui ont une faible densité de protons et pour lesquels les distances entre bases sont assez grandes, il est possible de mesurer que très peu de contraintes nOe. Ainsi, pour déterminer une structure tertiaire fiable, les informations à longue portée sont précieuses.

Nous nous sommes donc intéressés à ce problème à travers un ARN complexé à la théophylline (un broncho-dilatateur). Il s'agissait de trouver un aptamère d'ARN capable de la complexer sélectivement afin de pouvoir la doser dans le sang. Les structures de cet ARN constitué de 33 nucléotides (gz33) ont été résolues par RMN par des méthodes classiques (nOe) et nous pouvons constater sur la (Figure 2A) la forte dispersion entre ces structures. La structure locale est bien déterminée mais l'orientation des différentes régions de la molécule n'est pas bien définie. Ceci est dû à l'absence d'informations à longue portée. Ainsi les couplages dipolaires, qui donnent de l'information orientationnelle, ont été utilisés pour résoudre ce problème. Ces résultats ont été utilisés et publiés dans "Journal of American Chemical Society" (Sibille et al., 2001) afin de proposer une structure moyenne avec une dispersion moindre (Figure 2B) par rapport à la structure obtenue par un calcul uniquement basé sur les NOEs. Cette étude a permis de développer une méthode d'analyse de RDCs par modules (Dosset et al., 2001), car l'obtention de tenseurs d'alignement fiables est très importante pour l'affinement de structures.

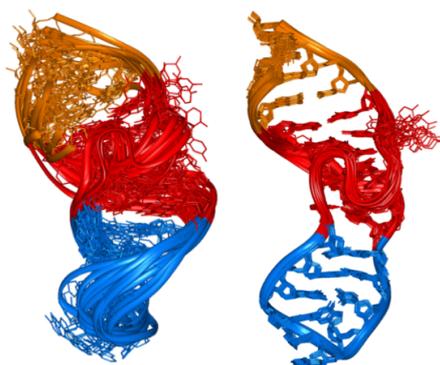


Figure 2 : Un aptamère d'ARN complexé à la théophylline avant affinement de structure avec des RDCs (à gauche, nOe) et après (à droite, RDCs)

## 3.2 Stages doctoral et post-doctoral

### 3.2.1 Étude par RMN du domaine FMN de la Sulfite Réductase d'*Escherichia Coli*

Mon Doctorat de Physique s'est centré sur l'étude par RMN du domaine FMN de la sulfite réductase d'*Escherichia coli*, un domaine impliqué dans le transfert d'électrons. Cette thèse m'a permis de développer mes compétences sur les RDCs, la structure de protéines, le développement méthodologique sur les méthyles, et les interactions protéine-protéine.

La structure cristallographique de SiR-FP60, un monomère tronqué mais actif, a été déterminée (Gruez et al., 2000). Cependant, aucune densité électronique n'a été observée pour le domaine FMN, nommé SiR-FP18 en référence à son poids moléculaire (Figure 3A). Ceci a été interprété comme une flexibilité de ce domaine afin d'optimiser le transfert d'électrons entre la composante flavoprotéique (SiR-FP) et hémoprotéique (SiR-HP). Dans le but d'obtenir des informations structurales sur ce domaine manquant et de compléter la structure cristallographique, nous avons entrepris l'étude par RMN de SiR-FP18, la version monomérique du domaine FMN de la sulfite réductase (Sibille et al., 2001). Cette étude a permis d'appréhender le mécanisme de transfert d'électrons au sein de la sulfite réductase.

Mon travail de thèse comporte deux parties majeures. Dans une première partie, nous avons identifié rapidement le repliement global de SiR-FP18 (Figure 3B) en utilisant un modèle structural et des couplages dipolaires résiduels (Champier<sup>§</sup>, Sibille<sup>§</sup> et al., 2002). Ensuite, nous avons montré comment compléter la structure du squelette polypeptidique avec la

détermination de l'orientation de quelques chaînes latérales contenant des méthyles (Figure 3C) (Sibille et al., 2002). Cette approche a été adaptée pour l'étude de protéine de grande taille à l'échelle de la RMN.

Dans une deuxième partie, nous avons déterminé la structure haute résolution de la protéine d'intérêt SiR-FP18 en se basant d'une part sur la mesure de distances proton-proton ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) via l'interprétation de l'effet nOe (effet Overhauser nucléaire). Nous avons ensuite affiné cette structure avec les couplages dipolaires résiduels (RDCs), mesurés afin d'améliorer localement la qualité de la structure. La détermination de cette structure de SiR-FP18 a permis de la replacer dans la structure cristallographique initiale de SiR-FP60 où ce domaine était manquant. Ainsi, nous avons pu proposer un modèle de la structure du complexe de SiR-FP, afin d'avancer dans la compréhension du mécanisme de transfert d'électron au sein de cette enzyme. Cette étude a été publiée dans "Biochemistry" (Sibille et al., 2005).

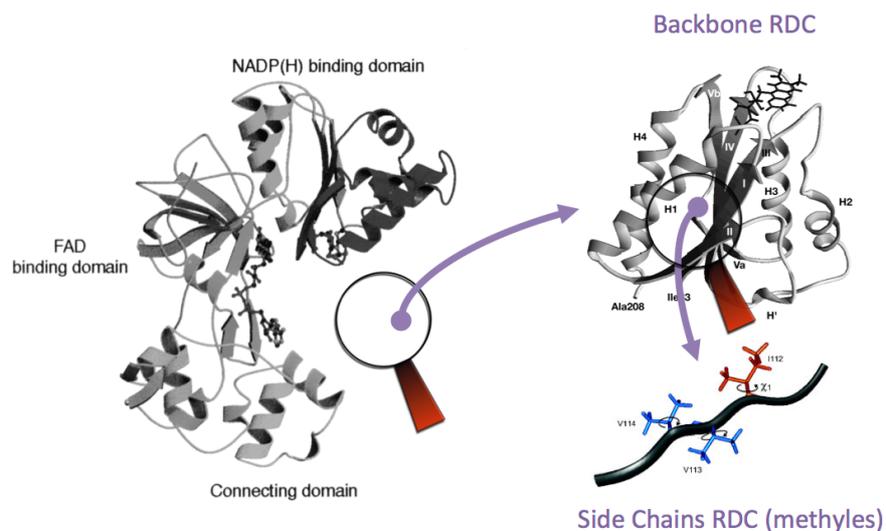


Figure 3 : A) La structure cristallographique de SiR-FP60 complétée par B) la structure RMN de SiR-FP18 affiné par C) l'orientation des chaînes latérales méthylées

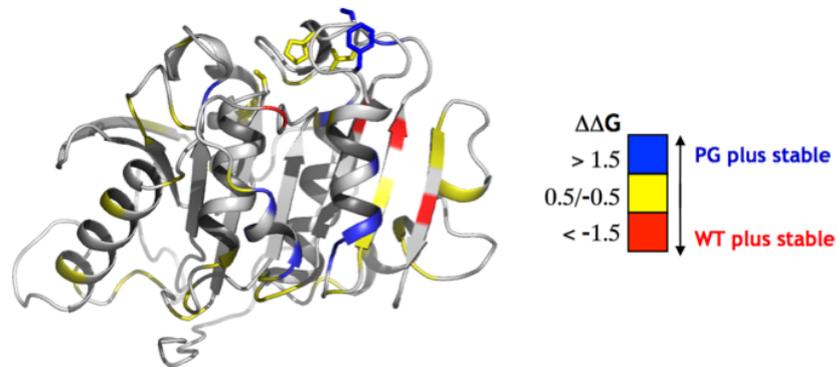
### 3.2.2 Étude RMN comparative de l'impact de mutations ponctuelles sur la stabilité de la lipase de *Pseudomonas mendocina*

Le champ d'étude de mon post-doctorat aux Pays-Bas portait sur la compréhension de l'inactivation d'une enzyme industrielle: un problème de "protein folding". Pour cela j'ai utilisé

des techniques pour étudier la stabilité des protéines, la relaxation  $^{15}\text{N}$ , l'échange proton/deutérium (H/D). J'ai également mis en place une technique d'injection rapide pour étudier l'interaction protéine-ligand par RMN en temps réel (qui a remporté un prix du meilleur poster).

Dans cette étude, nous avons comparé la dynamique et la stabilité conformationnelle de la lipase native (WT) de *Pseudomonas mendocina* et de son mutant F180P/S205G (PG) qui montre une activité et stabilité accrues. La lipase de *P. mendocina* est une enzyme qui hydrolyse les liaisons ester sur une large variété de composés (incluant les mono- et triglycérides). Cette molécule est donc une candidate intéressante pour les applications liées aux détergents. Cette enzyme de 28 kDa et de 258 résidus présente une triade catalytique (Ser126, His206 et Asp176) localisée à la surface de la molécule. Les deux lipases, WT et PG, ont été étudiées en présence d'un inhibiteur spécifique (E600) qui se lie de façon covalente et qui prévient de la dégradation. Cette dernière étant présument causée par une autolyse à travers le site catalytique exposé des lipases.

Les expériences de stabilité par fluorescence, CD et DSC ont montré et confirmé la stabilité du mutant PG face à l'agrégation et à la dénaturation. Les expériences RMN de relaxation pour l'étude de la dynamique ont montré, comme attendu, des tenseurs de diffusion dérivés très similaires pour la lipase native WT et le mutant PG. Ceci confirmait une étroite identité structurale tridimensionnelle déjà suspectée par la similarité des spectres  $^{15}\text{N}$ -HSQC du WT et du PG. D'autre part, les différences en facteurs de protection locaux entre WT et PG, dérivées des expériences d'échange H/D (Figure 4), ont montré une nette stabilisation de l'hélice  $\alpha 5$  au détriment du feuillet  $\beta$  dans le mutant PG ainsi qu'aux alentours du site catalytique et des mutations. Les simulations de dynamique moléculaire effectuées par le Dr. Alexandre Bonvin ont confirmé nos données expérimentales. Nous pouvons en déduire que la mutation de phénylalanine 180 en proline située exactement au N-terminal de l'hélice  $\alpha 5$ , à proximité de la triade catalytique, stabilise  $\alpha 5$  dans PG en engendrant des propriétés de « N-capping » plus favorable (la proline n'est pas un donneur de  $\text{H}_\text{N}$  et ne requiert donc aucun accepteur de liaison hydrogène en position  $i+3$ ). Ainsi, ce compromis accroît globalement la stabilité du double mutant PG.



**Figure 4** : Différences en facteurs de protection locaux entre WT et PG, dérivées des expériences d'échange H/D, sont données en énergies libres de Gibbs ( $\Delta\Delta G$ )

L'analyse des données de relaxation par cartographie de la densité spectrale réduite révèle une caractéristique intéressante du mutant PG : un ensemble de résidus à mouvements lents et quelques résidus à mouvements rapides sont localisés à proximité du site catalytique et des mutations. La mobilité accrue peut être profitable à l' "induced fit", ce qui pourrait expliquer que le mutant PG est plus actif que le WT. Nos données expérimentales et simulées (Sibille et al., 2006a) nous ont permis de formuler une hypothèse sur un lien rationnel entre flexibilité locale rapide et stabilité thermodynamique. Nous pouvons faire une analogie avec l'étude de Dorothy Kern (Eisenmesser et al., 2002), sur une échelle de temps différente ( $\mu\text{s}$ - $\text{ms}$ ), liant la cinétique d'une enzyme à sa dynamique moléculaire locale.

### 3.3 Projets à Pasteur et l'USTL de Lille1 : Étude par RMN de la protéine neuronale Tau

Ma recherche post-doctorale, à l'Institut Pasteur de Lille, a commencé en Septembre 2005 au sein du laboratoire de RMN de Guy Lippens. L'équipe a rejoint le 1<sup>er</sup> Janvier 2006 l'UGSF dirigée par le Dr. Jean-Claude Michalski de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL). J'ai été récompensée par un poste de Chargée de Recherche en Octobre 2006 en section 16 « Chimie et Vivant » du CNRS.

La protéine Tau a généré beaucoup d'intérêt à cause de son implication potentielle dans la pathologie de la maladie d'Alzheimer et d'autres maladies dégénératives. Tau est en effet une Protéine Associée aux Microtubules (MAP) neuronale, qui a un rôle central autant dans les processus physiologique (stabilisation du cytosquelette neuronal) que pathologique (agrégation dans la maladie d'Alzheimer) (Figure 5).

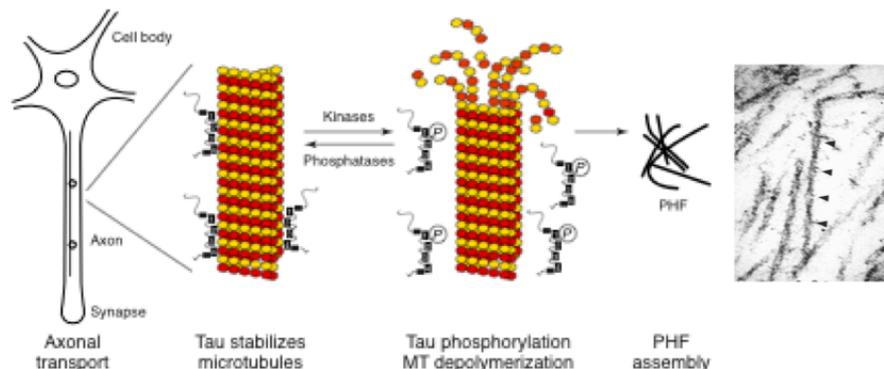


Figure 5 : Fonction de Tau dans une cellule neuronale et dégénération en fibre de Tau (PHF)

### 3.3.1 La phosphorylation de Tau : analyses structurales et fonctionnelles

En sachant que la phosphoprotéine neuronale Tau possède 40 sites de phosphorylation potentiels et qu'ils régulent son interaction avec les microtubules et son agrégation, il est fondamental de comprendre les aspects structural et fonctionnel des phospho-Tau. Nous avons donc comparé nos données de caractérisation structurale sur différentes phospho-protéines de Tau *in vitro*.

Nous avons étudié deux sortes de phosphorylation. Une de type physiologique (pSer214) impliquée dans la dynamique d'assemblage et de désassemblage des hétérodimères alpha et beta de tubuline en microtubule. Et l'autre de type pathologique (épitope AT180) qui empêche la polymérisation de la tubuline en microtubules (Landrieu et al., 2010 et Thèse Laziza Amniai). Pour ce faire Tau a été entièrement phosphorylée d'une part sur le site Ser214 par la protéine kinase A cAMP-dépendante (Landrieu et al., 2006). Ensuite, sur les résidus Thr231 et Ser235 par la kinase CDK2/CyclineA3 qui reconstitue l'épitope AT180 retrouvé dans les cerveaux Alzheimer. Les paramètres structuraux extraits par RMN sur ces deux phospho-Tau, tels que des valeurs de déplacements chimiques sensibles aux types de

structures secondaires, des couplages dipolaires résiduels (RDC) sensibles aux orientations des vecteurs  $H_N-N$  les uns par rapport aux autres et des distances à longue portée via des expériences de relaxation paramagnétique (PRE), ont montré des différences très significatives.

En effet, la perte de fonction lors de la phosphorylation par la CDK semble être causée par l'apparition très nette d'une hélicité en aval des phosphorylations qui doit empêcher le deuxième hétéro-dimère de tubuline de se lier pour former les microtubules. Il est à noter que cette hélice ne se forme pas lors de la phosphorylation par la PKA, qui elle, n'empêche pas la polymérisation des microtubules. Les travaux concernant cette étude ont été publiés dans « Proteins » (Sibille et al., 2012).

### 3.3.2 L'agrégation de Tau : analyses structurales et molécules anti-agrégatives

Afin de comprendre le mécanisme d'agrégation de Tau en 'paired helical filaments' (PHF), il faudra trouver une combinaison de kinases qui permettra d'obtenir *in vitro* une Tau hyperphosphorylée. En effet, très souvent observée sous sa forme hyperphosphorylée dans les PHF *in vivo*, Tau peut cependant former *in vitro* ces agrégats caractéristiques de la maladie d'Alzheimer en utilisant un agent agrégeant afin de mimer l'effet de l'hyperphosphorylation (Lippens et al., 2007).

Cette étude a donc été réalisée en présence de polyanions, ici l'héparine, dans des conditions pré-agrégatives afin de pouvoir sonder les facteurs qui induisent l'agrégation de Tau et conduisent donc à la dégénérescence neuronale. Nous avons ainsi pu localiser les régions impliquées dans la forme pré-agrégative sur la séquence primaire de Tau. Ces régions sont le domaine riche en lysine qui indique une tendance accrue en PPII et la région de liaison aux microtubules (MTBRs) qui indique une augmentation de structure bêta dans les répétitions R2 et R3 (Sibille et al., 2006b). Le fait que Tau ne s'agrège pas en conditions physiologiques normales suggère la présence de facteurs inhibiteurs intrinsèques à la protéine. Il a été montré que ces régions inhibitrices de l'agrégation en fibres PHF sont les extrémités N- et C-terminales positivement chargées du MTBR. L'hyperphosphorylation de Tau pourrait ainsi conduire à la neutralisation des charges et donc à une suppression de leur



fibrilisation de Tau *in vitro*. Ces trois molécules sont l'hydroxytyrosol, l'oleuropeine et l'oleuropeine aglycone. Ces résultats ont fourni une preuve expérimentale supplémentaire des bienfaits nutritionnels de l'huile d'olive aussi bien qu'une base chimique pour le développement de nouvelles drogues visant les tauopathies neurodégénératives ([Daccache et al., 2011](#) et [Thèse Anthony Daccache](#)).

### 3.3.3 L'interaction Tau-tubuline : analyses structurales et fonctionnelles

L'effet des modifications post-traductionnelles, sur la capacité de Tau à se lier aux microtubules et à engendrer leur polymérisation, est difficile à interpréter tant que nous ne disposerons pas de données structurales à résolution suffisante sur l'interaction de Tau avec les microtubules. Ainsi, un des objectifs de notre projet était de définir les bases structurales de l'interaction de Tau avec les microtubules et leur constituant essentiel : la tubuline. Dans cette optique, nous avons montré qu'il était possible de déterminer rapidement l'attribution des chaînes latérales des isoleucines, leucine et valine contenant des méthyles reprotoqués. Ce développement méthodologique est adapté à l'étude de protéines de grande taille à l'échelle de la RMN ([Sibille et al., 2009](#)). En vue de l'étude de protéines et complexes de grande taille comme Tau-Tubuline, il serait intéressant d'ajouter à ces données des mesures de distances NOE entre méthyles pour obtenir des informations de translation. Ces données pourraient être complétées par des couplages dipolaires résiduels (RDC) qui sont uniquement sensibles à l'orientation.

Différentes expériences RMN ont été menées afin d'élucider la surface d'interaction de Tau avec l'hétérodimère  $\alpha\beta$  de tubuline (T2) stabilisé par une protéine de la famille de la stathmine (RB3 ou R : 17 kDa, T2R : 200 kDa). Cette étude, en collaboration avec Benoit Gigan et Marcel Knossow (I2BC, Gif-sur-Yvette), montre la synergie entre deux régions de Tau dans l'interaction (le MTBR et la région flanquante riche en proline) ([Fauquant et al., 2011](#)).

## 3.4 Projets au CBS de Montpellier : Les protéines intrinsèquement désordonnées

Ces dernières années, l'axe principal de ma recherche est la combinaison de paramètres RMN structuraux avec du SAXS afin de mieux caractériser les IDPs d'intérêt et leurs complexes

(voir [Cordeiro et al., 2017](#); [Cordeiro et al., 2017b](#); [Delaforge et al., 2018](#); [Sibille and Bernadó, 2012](#) et [Annexes](#)).

### 3.4.1 IDPs et Haute Pression par RMN

Collaboration 2011-2014: Christian Roumestand (CBS, Montpellier) et Cathy Royer (RPI, USA) ([1 article en correspondant](#))

La caractérisation de l'état déplié est un prérequis pour comprendre la stabilité et le repliement des protéines. Pour caractériser pleinement les protéines dans différents états excités, l'utilisation de contraintes structurales, telles les RDCs, mesurées à haute pression serait la méthode la plus appropriée. Pour ce faire, la première étape a été de trouver des milieux orientants qui supportent la haute pression. Ce travail est détaillé dans l'[Annexe D](#), et a été publié en correspondante dans « *J Biomol NMR* » ([Sibille\\* et al., 2006a](#)).

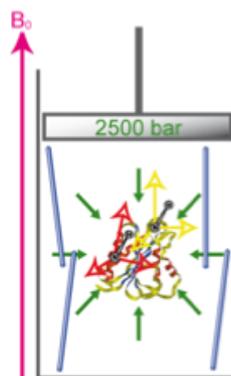


Figure 7 : Milieux orientants résistants à une pression de 2500 bars

Lors de son passage de 6 mois au CBS, Susana Barrera Vilarmou, étudiante en thèse de Ramon Crehuet, a analysé des données RMN de PRE sous haute pression afin de suivre comment la compaction des IDPs évolue avec la pression. Ces données sont en train d'être complétées par une étude de SAXS sous pression que l'on met au point sur la ligne Swing de Soleil en collaboration avec Aurélien Thureau.

### 3.4.2 Régulation et réparation de l'ADN par l'interaction de p15<sup>PAF</sup> et PCNA

Collaboration 2014-2016 : FJ Blanco - CSIC, Barcelona, Spain - Projet PCNA ([2 articles](#))

Nous avons mis en place plusieurs collaborations. Une des premières portait sur l'étude de l'interaction de la protéine désordonnée p15<sup>PAF</sup> avec l'antigène nucléaire de

prolifération cellulaire (PCNA) (Cordeiro et al., 2017a; De Biasio et al., 2014). Cette interaction est impliquée dans la régulation de la réplication et la réparation de l'ADN.

La PCNA est une pince coulissante à ADN qui joue un rôle dans plusieurs processus métaboliques de l'ADN, notamment la réplication et la réparation de l'ADN, le remodelage de la chromatine et l'épigénétique. Le trimère de PCNA agit comme une plateforme où les enzymes et les protéines régulatrices se lient pour effectuer des actions spécifiques sur l'ADN. Les partenaires de la PCNA partagent un site d'interaction commun à sa surface suggérant un échange contrôlé d'interacteurs régi par des affinités et des concentrations locales. À l'aide du SAXS, de la RMN et d'analyse de données développée dans le groupe, nous avons participé à l'élucidation de la structure de ce complexe et des règles régissant l'échange de partenaires pour mieux comprendre les bases structurales des différentes étapes impliquées dans la processivité de la PCNA.

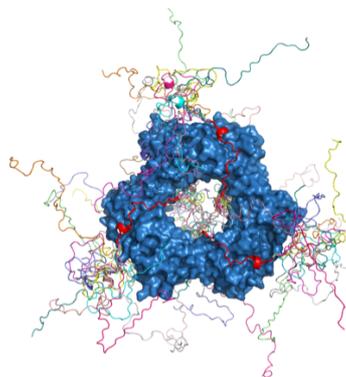


Figure 8 : Interaction de p15<sup>PAF</sup> avec le trimère de PCNA

### 3.4.3 Régulation de la transcription de gènes cibles par l'interaction du récepteur de l'acide rétinoïque avec ses co-régulateurs désordonnés

Collaboration depuis 2015 : W. Bourguet & A le Maire - CBS, Montpellier - Projet Récepteur Nucléaire (Labex EpiGenMed) (2 articles et 1 chapitre)

Depuis 2015, nous avons également établi une collaboration étroite avec l'équipe de William Bourguet au CBS concernant la caractérisation du complexe RXR/RAR avec un co-répresseur partiellement déstructuré (N-CoR) (travail de Tiago Cordeiro, post-doc CNRS que j'ai co-encadré) et récemment avec un co-activateur également partiellement déstructuré

(TIF2) (travail de Lucile Sénicourt, post-doc labex EpiGenMed que j'ai encadrée). La combinaison de la RMN, de la cristallographie, du SAXS et de la modélisation a été déterminante pour caractériser ces complexes et avancer dans la compréhension de la régulation des gènes liés à ce récepteur nucléaire (Cordeiro et al., 2019; Senicourt et al., 2020). Je reviendrai sur ce travail au [Chapitre 6](#) de ce mémoire.

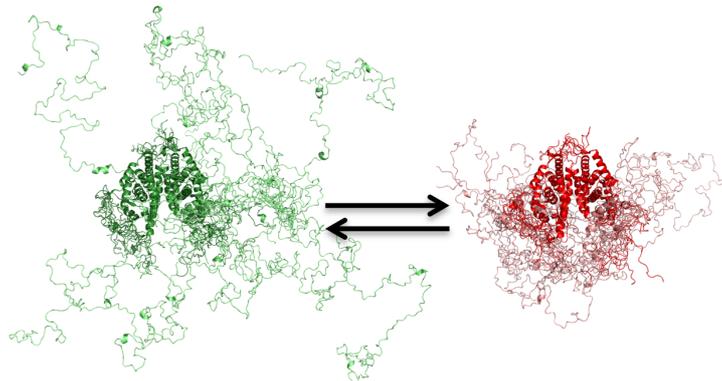


Figure 9 : Équilibre entre N-CoR simplement et doublement lié sur RXR/RAR

#### 3.4.4 Régions de faible complexité dans la protéine désordonnée huntingtine

Collaboration: P. Bernadó (ERC ChemRepeat depuis 2015) ([5 articles](#) et [1 revue](#))

Je suis impliquée dans le projet ERC Chem Repeat de mon coéquipier sur lequel je supervise la partie RMN.

Certaines pathologies - c'est notamment le cas de la maladie de Huntington - sont causées par des protéines présentant un nombre anormalement élevé de répétitions d'un même acide aminé. La structure protéique adoptée au niveau de ces répétitions est désordonnée et non accessible aux outils d'analyse actuels. Ainsi ce projet avait pour but de mettre au point une nouvelle méthodologie permettant de s'affranchir de cette limite en combinant la « non-sense suppression » et l'expression de la protéine en « cell free » afin de marquer de manière spécifique une seule glutamine de la protéine (Morató et al., 2020; Urbanek et al., 2020a, 2020b, 2019, 2018).

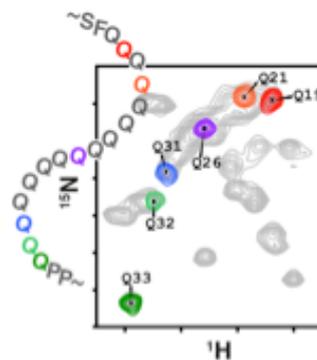


Figure 10 : Stratégie de marquage pour les régions de faible complexité

### 3.4.5 Robotique et désordre

Collaboration depuis 2016 : J. Cortès - LAAS, Toulouse - (<https://moma.laas.fr/team/>) - Outils de calcul pour la modélisation et l'analyse des données (6 article)

Nous avons développé une étroite collaboration avec Juan Cortès du LAAS de Toulouse dans le développement de nouveaux outils pour la modélisation structurale de systèmes flexibles (Estaña et al., 2020, 2019, 2018). La participation à l'encadrement de son thésard, Alejandro Estaña, a pu apporter ma vision de structuraliste auprès de roboticiens et informaticiens. Juan Cortès qui organise l'école d'hiver Algo SB (Algorithms in Structural Bioinformatics m'a invité pour l'organisation de la 7<sup>ème</sup> édition "Intrinsic Disorder in Proteins - From Non-Folding to Fuzzy Recognition to Phase Separation". Cette école qui devait avoir lieu du 22 au 27 Novembre 2020 sera reportée à Novembre 2022 pour des raisons liées à la crise sanitaire de la Covid-19.

La modélisation structurale des IDPs est extrêmement difficile car leurs caractéristiques sont codées par le biais de conformation au niveau résiduel. Afin de résoudre ces défis, nous avons développé une base de données de tripeptides à partir de structures haute résolution en collaboration avec Juan Cortés qui permet de construire des modèles d'ensemble IDP réalistes pour ces protéines (Estaña et al., 2018). Les ensembles résultants sont en accord avec de nombreuses données expérimentales RMN et SAXS. L'amélioration des performances de cette approche repose sur l'inclusion des propriétés chimiques et structurales des résidus voisins. La base de données tripeptidiques est extrêmement riche et peut également être

utilisée pour déchiffrer la voie de repliement de petits éléments structuraux de protéines (Estaña et al., 2019) et la prédiction d'éléments partiellement structurés chez les IDPs à partir de leurs séquences (Estaña et al., 2020).

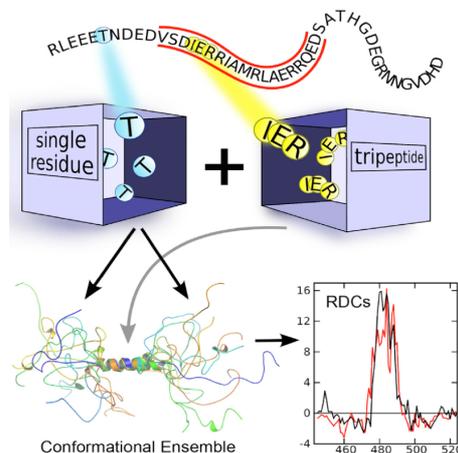


Figure 11 : Stratégie générale pour construire des modèles d'IDP à l'aide de la base de données tripeptide

### 3.4.6 Séparation de phase du domaine N-terminal désordonné de l'eIF4G

Collaboration depuis 2018 : JM. Perez-Canadillas - CSIC, Madrid, Spain - Projet LLPS (1 article bioRxiv, soumission NSMB)

Cette collaboration a consisté à l'analyse conformationnelle du domaine N-terminal désordonné du facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4G (eIF4G) qui interagit avec la protéine de liaison aux polyadénylates (Pab1). Cette protéine a des propriétés de séparation de phase qui ont été élucidées dans cette étude.

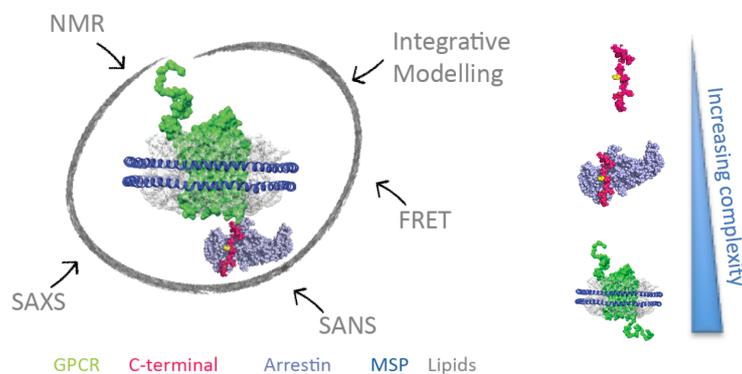
Nous avons accueilli Belen Chaves, pendant 3 mois en 2018, l'étudiante en thèse de JM. Perez-Canadillas. Je l'ai formée à la mesure de RDCs et de PRE sur son système. Son article a été envoyé à NSMB et est disponible dans bioRxiv.

doi: <https://doi.org/10.1101/2020.08.07.234443>

### 3.4.7 Modulation des voies de la signalisation cellulaire par l'interaction des régions C-terminales des GPCRs avec l'arrestine

Collaboration depuis 2017 : JL. Banères - IBMM, Montpellier - Projet GPCteR (ANR coordination) (1 article publié et 3 en préparation)

Mon parcours m'a conduit à élaborer un projet qui rassemble tous les domaines que j'avais explorés jusqu'ici afin d'étudier les parties C-terminales phosphorylables et déstructurées des Récepteurs Couplés aux Protéines G (GPCRs). Les GPCRs sont impliqués dans de nombreuses maladies, ils sont également la cible d'un médicament sur deux sur le marché pharmaceutique. D'où le challenge de mieux comprendre le fonctionnement de ces régions C-terminales afin d'ouvrir une voie à un nouveau genre de thérapie impliquant des inhibiteurs d'interaction protéine-protéine (PPII) dont un des partenaires est désordonné. La mise en place de ce projet dans son entièreté a conduit à un financement ANR en 2018 que je coordonne. Je reviendrai sur ce travail au [Chapitre 5 et 7](#) de ce mémoire.



**Figure 12** : Stratégie « diviser et conquérir » en augmentant au fur et à mesure la complexité du système GPCR:arrestine

## Travaux Scientifiques actuels

### 4 Introduction

#### 4.1 Qu'est-ce qu'un IDP ?

Les fonctions exécutées par les IDPs sont complémentaires à celles exécutées par leurs homologues globulaires, démontrant que les propriétés biophysiques des protéines désordonnées dictent leurs mécanismes fonctionnels. La plasticité conformationnelle, la grande accessibilité aux solvants, les modifications post-traductionnelles et la structuration transitoire sont des caractéristiques inhérentes aux IDPs qui sont idéales pour moduler la reconnaissance des partenaires dans les processus de signalisation. En conséquence, la caractérisation structurale des IDPs dans leur état libre et en complexe avec les partenaires biologiques concernés est cruciale pour révéler la base moléculaire de la signalisation et de la régulation cellulaire. La reconnaissance des partenaires des IDPs est normalement effectuée à travers de courts motifs linéaires (SLiM) qui sont intégrés dans des régions désordonnées souvent mal conservées. Une caractéristique cruciale des IDPs réside dans le coût entropique associé aux transitions d'un ordre à l'autre observées dans les SLiM lors de la reconnaissance du partenaire. Ce coût entropique implique très souvent des affinités faibles à modérées. Cette particularité en combinaison avec la grande spécificité des interactions fait des IDPs des agents très bien adaptés aux processus de signalisation (Tompá et al., 2015) tels que les mécanismes GPCR que nous aborderons dans les projets 'GPCteR' et 'Nuclear Receptor'. Cela explique également la capacité de nombreuses IDPs à présenter des interactions un-à-plusieurs et plusieurs-à-un, ou de promiscuité, expliquant l'enrichissement du désordre dans les centres d'interaction.

## 4.2 Caractérisation structurale d'un complexe impliquant un IDP

La stratégie principale pour caractériser structurellement un complexe impliquant un partenaire désordonné est détaillée dans les [Annexe C](#) et [Annexe E](#) de ce mémoire. D'un point de vue conceptuel, il est possible d'isoler une région désordonnée afin d'étudier son interaction avec ses partenaires. D'un point de vue méthodologique, nous exploitons la complémentarité de différentes méthodes de biologie structurale telles que la RMN, le SAXS/SANS et la modélisation, complétée par des approches cellulaires.

## 4.3 Le désordre au cœur de la signalisation cellulaire

L'[Annexe A](#) de ce mémoire détaille comment le désordre module la signalisation cellulaire dans deux systèmes qui seront développés dans ce manuscrit. Dans le premier système abordé dans les [Chapitres 5 et 7](#), nous verrons qu'en raison de leur flexibilité, très peu de données structurales sont disponibles pour les régions C-terminales des GPCRs, bien qu'elles soient des régions fonctionnellement cruciales de cette classe majeure de récepteurs. Il existe notamment de multiples aspects de l'interaction entre les GPCRs et les arrestines qui restent mal compris, y compris les caractéristiques conformationnelles des régions C-terminales phosphorylées et la nature du complexe GPCR:arrestine hautement dynamique (« fuzzy » ([Tompa and Fuxreiter, 2007](#))). Nous allons évaluer les caractéristiques structurales des régions C-terminales des GPCRs, à savoir comment elles sont perturbées lors de la phosphorylation et comment cela influe sur la conformation de l'arrestine, afin de comprendre comment la sélection de la voie de signalisation GPCR est contrôlée. Nous espérons qu'à la fin de cette étude nous serons capables de fournir une boîte à outils adaptée à l'étude des autres récepteurs. En outre, l'identification précise des surfaces d'interaction entre les GPCRs et les arrestines pourrait être au cœur de la découverte de nouveaux agents thérapeutiques ciblant les voies de signalisation des différentes arrestines. Le deuxième système abordé au [Chapitre 6](#) concerne les co-régulateurs de Récepteurs Nucléaires qui sont de très grandes protéines désordonnées impliquées dans la régulation de la transcription de gènes cibles. Notre objectif à moyen terme sera de comprendre la spécificité d'interaction de ces co-régulateurs envers leur récepteur nucléaire.

## Travaux Scientifiques actuels

# 5 Modulation des voies de la signalisation cellulaire par l'interaction des régions C-terminales désordonnées des GPCRs avec l'arrestine

**Personnes impliquées:** Myriam Guillien (Doctorante Labex EpiGenMed et ANR), Assia Mouhand (Post-Doctorante ANR), Aurélie Fournet (Technicienne INSERM, biochimie), Frédéric Allemand (Ingénieur de Recherche CNRS, biologie moléculaire), Aurélien Thureau (Ingénieur de la ligne Swing à SOLEIL, SAXS)

**Principaux collaborateurs:** Jean-Louis Banères (IBMM, Montpellier - Partenaire 2 ANR, expert en GPCR), Lise Arleth (U. Copenhagen - Partenaire 3, experte en SAS des protéines membranaires), Alessandro Barducci et Matteo Paloni (CBS, Montpellier - Partenaire 1 ANR, experts en Modélisation)

**Grant:** Coordonnatrice de l'ANR GPCteR (2018-2022)

## 5.1 Introduction et Objectifs

### 5.1.1 Complexité de la signalisation GPCR

Le génome humain code pour environ 950 récepteurs couplés aux protéines G (RCPG ou GPCR). Ces récepteurs sont des acteurs majeurs dans la plupart des processus de communication cellulaire, et en tant que tels sont associés à de nombreuses conditions

pathologiques. Par conséquent, on estime que plus de la moitié des cibles médicamenteuses cellulaires actuelles sont des GPCRs ([Lagerstrom and Schioth, 2008](#)). Cependant, jusqu'à présent, l'utilisation potentielle de composés ciblant les GPCRs dans des applications cliniques a été largement inexploitée, en raison d'une compréhension incomplète de la façon dont le mécanisme complexe de ces récepteurs est contrôlé.

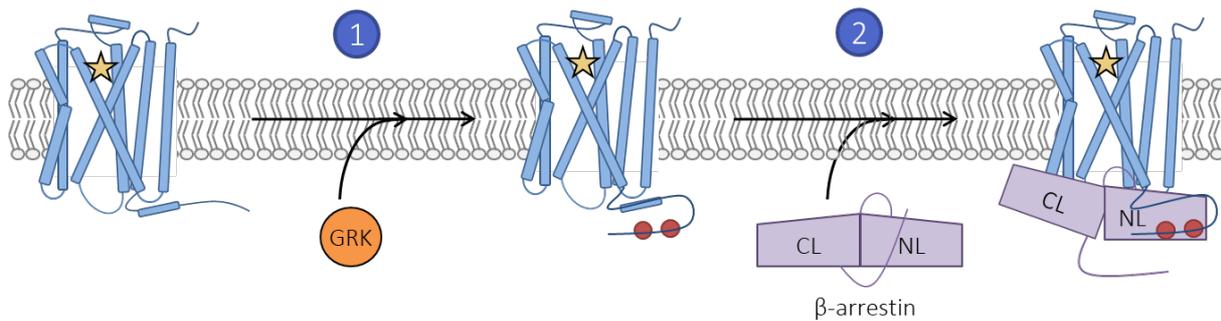


Figure 13 : La voie arrestine dans la signalisation des GPCRs

En effet, contrairement à ce qui a été décrit pendant de nombreuses années, la signalisation GPCR n'est pas limitée à une seule voie, mais il a été démontré que ces récepteurs interagissent avec une multitude de protéines en plus des protéines G canoniques ([Luttrell and Kenakin, 2011](#)). Parmi ces protéines, on trouve les arrestines (Arr), les kinases des récepteurs de la protéine G (GRK) ([Figure 13](#)) et les protéines d'échafaudage (AP2, GASP...). La plupart de ces interactions sont de véritables événements de signalisation qui se produisent indépendamment des protéines G et sont responsables d'effets biologiques majeurs associés aux GPCRs. En fait, la signalisation associée aux GPCRs peut être grossièrement discriminée par deux voies principales, les signaux dépendant de la protéine G et ceux dépendant de l'arrestine. Au cours des dernières décennies, des efforts importants ont été faits pour comprendre les propriétés moléculaires et les mécanismes de régulation qui contrôlent les deux voies. La voie de signalisation couplée aux protéines G a été activement explorée au cours des dix dernières années, avec l'élucidation de la structure du complexe récepteur B2 adrénergique:protéine Gs (B2AR:Gs) comme l'une des premières réalisations ([Rasmussen et al., 2011](#)). En revanche, les bases moléculaires détaillées qui sous-tendent les interactions GPCR:arrestine sont encore mal comprises.

Au-delà de l'intérêt académique, la compréhension des bases structurales de cette dernière interaction peut avoir des applications pharmaceutiques importantes. En effet, associé à la multiplicité du couplage des GPCRs à diverses protéines de signalisation, se trouve le paradigme des ligands dits biaisés. Ce concept stipule qu'en raison du couplage indépendant des GPCRs à des voies distinctes, un médicament donné peut posséder des efficacités intrinsèques différentes. En effet, il peut agir soit comme un agoniste partiel, un antagoniste ou un agoniste inverse pour le même récepteur lorsque l'on considère les différentes cascades de signalisation. Un composé biaisé pourrait ainsi avoir des applications thérapeutiques majeures, car il devrait diriger la réponse biologique associée à un récepteur d'une manière unique et bien définie (Whalen et al., 2011). D'autre part, une fois que les bases structurales de l'interaction GPCR:arrestine sous ses différentes conformations seront élucidées, elles permettront notamment de guider la conception de mimes peptidiques pouvant interférer avec chacune des cascades de signalisation.

### 5.1.2 Arrestines

Les arrestines sont des protéines omniprésentes qui régulent un vaste éventail de fonctions cellulaires (Oakley et al., 2012). Jusqu'à présent, quatre isoformes d'arrestines ont été identifiées. L'arrestine1 et 4 sont associées au système visuel, tandis que l'arrestine2 et 3 (respectivement  $\beta$ -arrestine1 et 2) sont exprimées de manière ubiquitaire et contrôlent les voies de signalisation indépendantes de la protéine G pour de nombreux GPCRs (voir Annexe A).

Les arrestines présentent une conservation structurale élevée et partagent des caractéristiques critiques liées à leur activité biologique. Plusieurs structures cristallines d'arrestines ont éclairé leur organisation générale (Granzin et al., 1998; Hirsch et al., 1999; Kim et al., 2013). Cette dernière est constituée de domaines N- et C-terminaux en feuillets  $\beta$ . Le domaine N contient une série de résidus polaires («noyau polaire») enfouis qui sont stabilisés par une queue C-terminale désordonnée qui verrouille les arrestines dans un état inactif (Figure 14). Une série d'études structurales avec des GPCRs et des arrestines non visuelles a fourni des informations sur la façon dont les deux protéines pourraient interagir

(Borshchevskiy and Buldt, 2013; Shukla et al., 2013). En utilisant un complexe B2AR humain fonctionnel purifié:arrestine2 et une combinaison de techniques (microscopie électronique à particule unique et de spectrométrie de masse à échange d'hydrogène-deutérium), Lefkowitz et ses collègues (Shukla et al., 2014) ont fourni un modèle où l'arrestine interagit avec le B2AR de manière bimodale à travers deux étapes d'interactions. La première étape à travers la région C-terminale phosphorylée et la deuxième à travers le domaine transmembranaire du récepteur (Cahill et al., 2017). La structure cristalline de l'arrestine2 en complexe avec la région C-terminale du récepteur de la vasopressine V2 phosphorylée a également fourni des informations sur les changements conformationnels possibles déclenchés lors de l'activation de l'arrestine (Shukla et al., 2013), y compris la rotation relative des domaines N- et C-terminaux de l'arrestine2. Enfin, une étude structurale récente d'une protéine de fusion rhodopsine:arrestine1 constitutivement active a révélé une interaction via le noyau transmembranaire du récepteur (Kang et al., 2015).

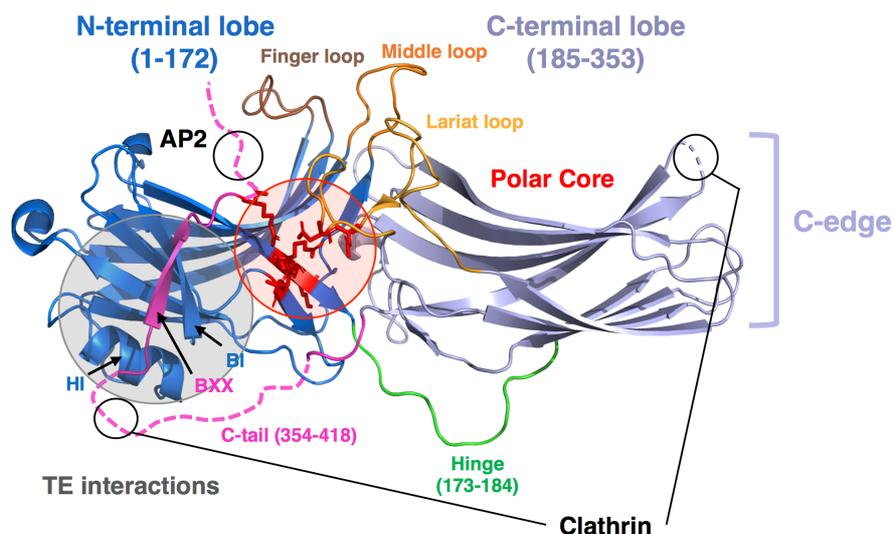


Figure 14 : Structure de l'arrestine2 sous sa forme inactive (code PDB : 1G4M).

Cependant, toutes ces structures cristallographiques ne fournissent qu'une image statique, probablement la plus stable dans les conditions de cristallisation, d'un complexe autrement dynamique. Par conséquent, les caractéristiques structurales et dynamiques de l'interaction GPCR:arrestine doivent encore être délimitées.

### 5.1.3 Interaction des GPCRs avec les arrestines

La vision de base de la signalisation GPCR indique que la liaison d'un agoniste stabilise une conformation active des sept hélices transmembranaires (7TM) du récepteur (voir Figure 2 de l'article en Annexe A (Guillien et al., 2020)). Cette dernière devient donc compétente pour interagir avec la protéine G afin de déclencher la signalisation dépendante de cette voie. Lors de l'activation, le récepteur est phosphorylé par les kinases spécifiques aux GPCRs (GRK) sur plusieurs sites de sa région C-terminale, ce qui facilite à son tour la liaison des arrestines.

L'interaction avec les arrestines a deux destins fonctionnels:

- i. L'arrêt de la signalisation de la protéine G en empêchant le couplage de la protéine G et, ce faisant, conduit à la désensibilisation des récepteurs
- ii. L'échafaudage d'un large éventail de kinases et d'autres molécules de signalisation conduisant à la génération d'un signal indépendant de la protéine G

On distingue deux classes de GPCR qui incluent ceux qui interagissent de manière transitoire avec les arrestines (classe A) et ceux qui interagissent étroitement avec cette protéine de signalisation (classe B). Plus précisément, les GPCRs de classe A se lient faiblement aux arrestines, se dissocient lors de l'internalisation puis se recyclent vers la membrane. Les GPCRs de classe B se lient étroitement et restent liés à l'arrestine même après l'internalisation.

D'autre part, des analyses récentes ont montré que l'interaction bimodale de l'arrestine, celle impliquant les régions C-terminales phosphorylées puis celle avec les domaines transmembranaires du récepteur, ont des résultats fonctionnels distincts. En effet, le premier semble être capable de favoriser l'internalisation et la signalisation des récepteurs mais pas la désensibilisation, tandis que le second est responsable de la désensibilisation de la signalisation dépendante de la protéine G.

### 5.1.4 Le phospho-barcode

Comme indiqué ci-dessus, l'interaction entre les GPCRs et les arrestines concerne d'abord la région C-terminale du récepteur. Cette interaction dépend de la phosphorylation de cette région par les GRKs. L'accumulation de preuves au cours de la dernière décennie a donné naissance au modèle 'phospho-barcode' qui émet l'hypothèse que les sites de

phosphorylation spécifiques au ligand dirigent les conséquences fonctionnelles du récepteur (Figure 15). Dans ce modèle, les multiples conformations du récepteur dépendantes du ligand seraient phosphorylées de manière différentielle par les différentes GRK. En effet, plusieurs sous-types de GRK ont été identifiés, à savoir les GRK2, 3, 5 et 6, qui sont exprimés de manière ubiquitaire, et déterminent les patterns de phosphorylation pour les GPCRs non visuels.

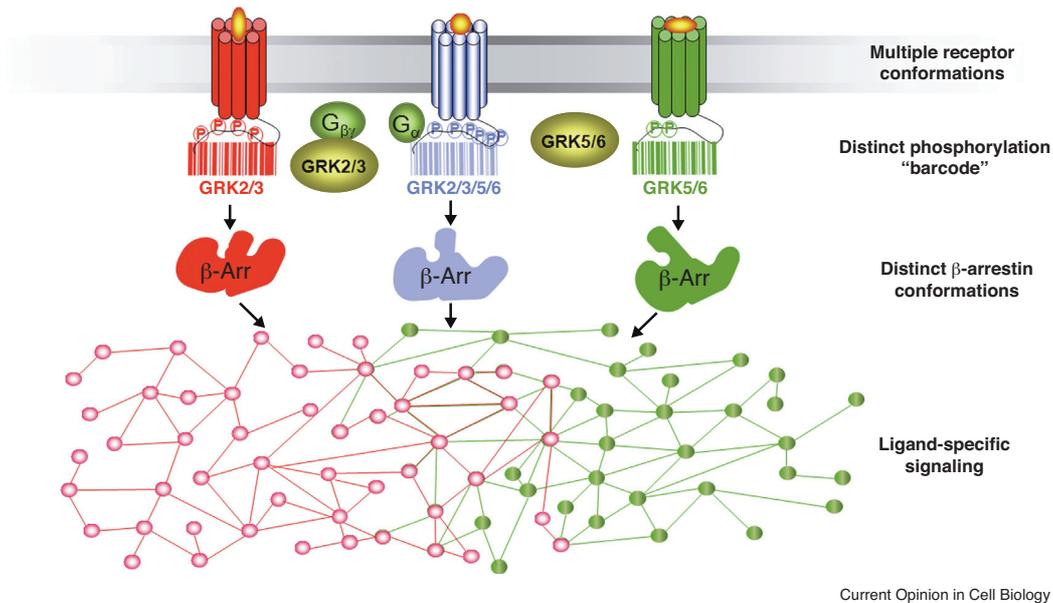


Figure 15 : Représentation schématique du modèle phospho-barcode (Figure extraite de Wisler et al., 2014)

Ces différents patterns de phosphorylation (et de structuration) des régions C-terminales déclencheraient des conformations distinctes de l'arrestine recrutée qui, à leur tour, recrutent spécifiquement différentes molécules effectrices en aval. En d'autres termes, la phosphorylation de sites distincts sur ces régions du GPCR constitue un code-barres qui dicte le résultat de la signalisation en aval du récepteur. L'hypothèse du code-barres est soutenue par plusieurs études pour différents GPCRs. Ceux-ci incluent le B2AR (Nobles et al., 2011), le récepteur M3-muscarinique (Willets et al., 2001), le CCR7 (Zidar et al., 2009), et plus tard, le GPR120 (Prihandoko et al., 2016) et le récepteur de la ghréline (Bouzo-Lorenzo et al., 2016).

Néanmoins, compte tenu de l'homologie de séquence relativement faible des régions C-terminales des GPCRs, il est encore difficile de comprendre comment les phospho-barcodes déclenchent sélectivement différentes fonctions dépendantes de l'arrestine.

### 5.1.5 Objectifs de notre étude

Une observation particulièrement fascinante est que les régions C-terminales des GPCRs fonctionnent comme des régions intrinsèquement désordonnées (IDRs), et en tant que telles, nous devrions nous attendre à ce que les caractéristiques mentionnées dans l'introduction ([Chapitre 4](#)) soient présentes dans les processus de signalisation dépendant de l'arrestine. Ces propriétés spécifiques seront révélées tout au long du projet.

Dans ce contexte, nous proposons de fournir des informations mécanistiques sur la signalisation médiée par l'arrestine grâce à une analyse structurale détaillée de l'interaction entre les récepteurs GPCRs et les arrestines. Nous utiliserons une combinaison de techniques biophysiques telles que la RMN, la diffusion des rayons X (SAXS) ou des neutrons (SANS) aux petits angles (SAS) et des outils de calcul appliqués à des systèmes modèles de complexité croissante. Ceux-ci iront des peptides isolés (régions C-terminales des GPCRs) aux complexes de signalisation purifiés et reconstitués dans des systèmes imitant la membrane (nanodisques).

Les objectifs du présent projet seront atteints en trois étapes:

- i. Caractériser les conséquences structurales des motifs de phosphorylation sur les régions C-terminales des GPCRs
- ii. Caractériser les bases structurales de l'interaction entre les régions C-terminales des GPCRs phosphorylées et les arrestines
- iii. Caractériser les conséquences structurales de la région C-terminale dans le récepteur en entier, en l'absence et en présence de protéines de signalisation pour obtenir une image intégrative de ce système complexe.

## 5.2 Résultats et discussion

### 5.2.1 Systèmes modèles

Nous menons notre étude avec trois modèles de récepteurs représentant les deux familles de GPCR par rapport à leurs interactions avec l'arrestine, c'est-à-dire le récepteur de la vasopressine (V2R) (classe B), et les récepteurs beta2 adrénergique (B2AR) et ghréline (GHSR1a) (classe A). B2AR a été sélectionné car il représente le récepteur le mieux décrit à ce jour, également en terme de sites de phosphorylation (Nobles et al., 2011).

En plus d'être des modèles pour chacune des deux classes d'interaction, ces récepteurs sont des cibles pharmacologiques majeures. B2AR est impliqué dans les pathologies cardiovasculaires, l'asthme et divers cancers. V2R est une cible pour le traitement de maladies génétiques rares telles que le diabète insipide néphrogénique congénital (Jean-Alphonse et al., 2009). Le récepteur GHSR est une cible pharmacologique de premier plan avec des applications dans l'obésité, le diabète, la toxicomanie et l'alcoolisme (M'Kadmi et al., 2015). En effet, ce dernier contrôle la sécrétion d'hormone de croissance induite par la ghréline, la prise alimentaire et les comportements de recherche de récompense. Il pourrait ainsi être inversement ciblé lors des traitements de chimiothérapie pour aider les patients à la prise alimentaire.

### 5.2.2 Validation du modèle simplifié composé des peptides C-terminaux isolés

Les résultats préliminaires que nous avons obtenus nous avaient démontré la faisabilité de ce projet. En effet, nous avons montré par des expériences d'anisotropie de fluorescence (Figure 16) que :

- i. les peptides isolés représentant toutes les classes de régions C-terminales interagissent avec l'arrestine2
- ii. les peptides C-terminaux de B2AR et GHSR présentent une affinité réduite pour l'arrestine2 par rapport à V2R, en accord avec les observations biologiques faites sur les différentes classes de récepteurs.

Ces données valident la pertinence biologique de notre modèle réduit et structuralement simplifié.

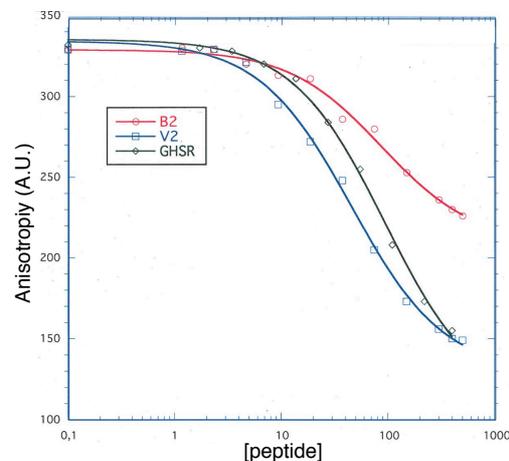


Figure 16 : Anisotropie de fluorescence des C-terminaux de B2AR et V2R sur le mutant R169E phospho-indépendant de l'arrestine2

### 5.2.3 La boîte à outils

#### Peptides C-terminaux

Nous avons produit et purifié les peptides des régions C-terminales de chacun des récepteurs modèles, c'est-à-dire V2R, B2AR et GHSR. Ces peptides ont été conçus pour commencer après l'hélice cytoplasmique 8, qui est attachée à la membrane, et les cystéines palmitoylées. Cela garantit la solubilité des peptides en solution aqueuse. Les séquences primaires des trois régions C-terminales sont présentées dans le [Tableau 1](#).

Récepteur	Nombre de résidus	Numérotation dans la Séquence Primaire	pI Théorique
<b>B<sub>2</sub>AR (sp P07550 )</b>	72	342-413	4.71
LRRSSLKAYNGY <sup>S355</sup> <sup>S356</sup> NGNT <sup>T360</sup> GEQ <sup>S364</sup> GYHVEQEKENKLLCEDLPGTEDFVGHQGTVP <sup>S396</sup> DNIDS <sup>S401</sup> QGRNCS <sup>S407</sup> TNDS <sup>S411</sup> LL Sites phosphorylés numérotés selon (Nobles et al., 2011)			
<b>V2R (sp P30518 )</b>	29	343-371	6.16
ARGRT <sup>S347</sup> PP <sup>S350</sup> LGPQDE <sup>S357</sup> <u>CT</u> <sup>T359</sup> <sup>T360</sup> AS <sup>S362</sup> <sup>S363</sup> <sup>S364</sup> LAKDTSS Sites phosphorylés numérotés selon (Kelly N Nobles et al., 2007)			
<b>GSHR (sp Q92847 )</b>	28	339-366	6.26
GFEPFSQRKLS <sup>S349</sup> <sup>T350</sup> LKDESSRAWTES <sup>S362</sup> <sup>S363</sup> INT <sup>T366</sup> Sites phosphorylés numérotés selon (Bouzo-Lorenzo et al., 2016)			

Tableau 1 : Les séquences primaires des trois GPCRs étudiés. Le code couleur représente: (i) les sites potentiels de phosphorylation par GRK, GRK2, GRK6; (ii) La propension alpha hélicoïdale prédite par AGADIR (<http://agadir.org.es/>) est surlignée en italique. (iii) Le symbole C indique un site potentiel de palmitoylation (déterminé par le site Web CCS-Palm sur GPS sur Expasy)

Les peptides C-terminaux ont été exprimés dans *E. coli* sous forme de protéine de fusion avec la Glutathion S-Transférase (GST) et purifiés avec un rendement élevé (100-200 mg pour la protéine de fusion et environ 4 mg par litre de culture après clivage et élimination de la GST). Ce haut niveau d'expression a facilité la production dans un milieu minimum pour le marquage isotopique nécessaire aux études RMN multidimensionnelles. Cela nous a permis d'obtenir suffisamment de matériel pour mettre en place le protocole de phosphorylation et réaliser toutes les autres expériences prévues.

### **Arrestines et protéines de signalisation**

Nous avons amélioré les étapes d'expression dans *E. coli* et purification de l'arrestine2 de type sauvage et phospho-indépendante (R169E) afin de les avoir en quantité suffisante pour leur analyse structurale.

De plus, nous avons mis en place au laboratoire la production des kinases à GPCR (GRK2 et GRK6) avec un système d'expression baculovirus Bac-to-Bac en cellules d'insectes *sf9*, avec les précieux conseils de Thomas Robert (CBS). Les autres protéines de la machinerie de signalisation des GPCRs viennent du laboratoire de Jean-Louis Banères (IBMM).

### **Récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)**

Jean-Louis Banères (IBMM) maîtrise la production de GPCRs purifiés, basée sur l'expression des récepteurs dans les corps d'inclusion d'*E. Coli* et le repliement ultérieur en présence de nanodisques lipidiques. Ce protocole de production comprend une étape de purification par chromatographie d'affinité du ligand. Cette étape garantit que le récepteur obtenu dans de telles conditions est pleinement fonctionnel en ce qui concerne la liaison du ligand et l'interaction avec les protéines de signalisation (protéines G, arrestines). Ce protocole de surexpression dans *E. coli* est totalement compatible avec les stratégies de marquage isotopique pour la RMN et le SANS (Casiraghi et al., 2016; Catoire et al., 2010). Contrairement aux procédures habituelles impliquant l'assemblage de récepteurs purifiés dans des détergents, les nanodisques fournissent une plate-forme lipidique pour une interaction optimale avec les arrestines. En effet, il a été montré que les boucles à l'extrémité du domaine C-terminal (C-edge) de l'arrestine fonctionnent comme un ancrage à la membrane (Figure 14), et que l'engagement de cet ancrage à la membrane pourrait être impliqué dans la formation

et/ou la stabilisation du pré-complexe GPCR:arrestine (Lally et al., 2017). Enfin, deux mutants ponctuels de GHSR qui présentent différents modèles d'interaction avec les arrestines sont disponibles. Le mutant L149G, qui a une affinité plus forte pour l'arrestine par rapport à la Gq, et le mutant ponctuel P148A, qui empêche l'interaction avec l'arrestine sans impacter le recrutement de la G (Evron et al., 2014).

### **Ligands**

Toute une série de ligands GHSR comprenant des agonistes complets, des agonistes biaisés pour Gq et arrestine et des antagonistes neutres a été synthétisée et caractérisée par notre collaborateur à l'IBMM (M'Kadmi et al., 2015). Ces ligands déclenchent de manière différentielle le recrutement de la protéine G et/ou de l'arrestine.

### **Tests fonctionnels**

Un test fonctionnel avec des protéines purifiées qui permet d'évaluer les propriétés fonctionnelles de l'arrestine a été développé par notre collaborateur (Damian et al., 2012). Ce test est basé sur le marquage fluorescent (bimane) de l'arrestine et le suivi ultérieur de son recrutement vers le récepteur à travers les changements d'émission du fluorophore. En outre, des tests fonctionnels dans des systèmes cellulaires avec un capteur BRET est également disponible pour le recrutement de l'arrestine (M'Kadmi et al., 2015). Ce test sera utilisé pour valider dans les cellules les observations *in vitro* réalisées tout au long de notre projet.

#### **5.2.4 Codes-barres de phosphorylation et structuraux des GPCters**

Cette partie du travail est destinée à fournir une description de l'impact structural des phospho-codes dans le contexte de l'hypothèse des codes-barres en utilisant notre système modèle le plus simple : des peptides C-terminaux purifiés, des arrestines et des GRK recombinants. Dans cette intention, les différents sous-types de GRK, à savoir GRK2 (internalisation), GRK6 (activation ERK) et la combinaison des deux (désensibilisation), seront utilisés pour phosphoryler différemment les peptides C-terminaux des récepteurs (Zhou et al., 2001). Les modifications post-traductionnelles et les préférences conformationnelles induites seront quantifiées et suivies au niveau résiduel par RMN, comme montré par exemple

sur la protéine Tau ([Landrieu et al., 2006](#); [Sibille et al., 2012](#)). La comparaison de la teneur en structures secondaires, dans les états phosphorylés et non phosphorylés de ces peptides C-terminaux, donnera les premiers indices sur le lien entre le changement structural local et la fonction des régions C-terminales des GPCRs.

### 5.2.4.1 Détermination du phospho-code des régions C-terminales des GPCRs

Nous avons commencé à évaluer le phospho-barcode pour les peptides C-terminaux des trois modèles de récepteurs. B2AR est utilisé comme récepteur de référence pour reproduire le motif de phosphorylation avec les différentes kinases, son code de phosphorylation ayant été totalement élucidé ([Nobles et al., 2011](#)). En revanche, pour V2R et GHSR, le motif de phosphorylation déclenché par chaque kinase n'est pas complètement déchiffré. Pour GHSR, il a été montré que deux régions de la partie C-terminale sont différentiellement phosphorylées ([Bouzo-Lorenzo et al., 2016](#)). L'un comprend les Ser362, Ser363 et Thr366 et est principalement responsable de la liaison de l'arrestine, de l'internalisation du récepteur et de l'activation ERK. Le second qui comprend les Thr350 et Ser349 joue un rôle plus subtil de stabilisation du complexe récepteur:arrestine. Cependant, jusqu'à présent, il n'a pas été déterminé quelle GRK est responsable de la phosphorylation de chacune de ces deux régions. Par conséquent, il sera d'un grand intérêt d'établir lequel de ces motifs correspond à la phosphorylation par GRK2 et/ou GRK6. Pour la région C-terminale de V2R, aucune information détaillée sur le phospho-barcode n'est actuellement disponible.

La plus grosse difficulté dans cette étude a été la phosphorylation *in vitro* des peptides C-terminaux isolés de leur environnement d'origine qui est le récepteur en entier lié à la membrane. Ainsi, les quantités de peptides phosphorylés obtenues étaient entravées soit par la quantité des kinases recombinantes purifiées obtenues soit par une activité catalytique réduite dans ce système modèle simplifié. Les kinases commerciales (GRK2 et 6), chères et en faible quantité (1 mg, tests avec 2,15 mL de kinases à 6  $\mu$ M (0,49 mg/mL), ratio maximum de 1 kinase : 5 peptides), ne nous permettaient absolument pas d'obtenir un ratio adéquat à cette étude sachant qu'il y a entre 4 et 8 sites de phosphorylation attendus par région C-terminale. Ensuite, les tests effectués avec les kinases (GRK2 et 5) fournies par Martin J. Lohse

(Université de Würzburg, Allemagne) : 1 mg, tests avec 400  $\mu$ L de kinases à 30  $\mu$ M (2,4 mg/mL), ratio maximum de 2 kinases : 1 peptide, nous ont conforté dans l'idée de mettre en place un système d'expression en cellule d'insecte afin de pouvoir produire nos propres kinases dans des quantités nécessaires. Le système de production en cellule *sf9* nous a permis d'obtenir cette année de la GRK2 en grande quantité (3 mg/L de culture, tests avec 600  $\mu$ L à 123  $\mu$ M (10 mg/mL), ratio maximum de 10 kinases : 1 peptide). À présent, nous sommes en train de transfecter de nouvelles cellules *sf9* avec un Bacmide qui contient le gène de la GRK6. Pour cela, nous avons fait une transposition du gène GRK6 que l'on a cloné dans un vecteur pFastBAC dans un Bacmide (BAC to Bac). Ensuite, nous nous sommes basés sur les protocoles de phosphorylation *in vitro* qui ont été décrits dans la littérature pour des GRK purifiées (Bayburt et al., 2011; Chen et al., 2013; Zhou et al., 2001). Le protocole a été adapté et validé sur notre récepteur de référence, B2AR. Pour déterminer les meilleures conditions de phosphorylation, plusieurs échantillons de peptide/kinase d'intérêt ont été préparés, et la réaction arrêtée à des moments différents en chauffant le mélange à 75 °C, ou en utilisant de l'EDTA ou du TFA. Les peptides C-terminaux des trois récepteurs ont été testés et phosphorylés avec les GRK2 purifiées.

Nous avons ensuite utilisé la RMN pour évaluer de manière quantitative le niveau d'incorporation de phosphate pour chaque site du peptide C-terminal par les GRK recombinantes. En effet, le spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC d'un peptide phosphorylé montre une nouvelle résonance à bas champ appartenant au résidu sous sa forme phosphorylée et la disparition du signal du résidu sous sa forme non phosphorylée (Figure 17). L'intensité relative des deux pics fournit le taux de phosphorylation. L'attribution sans ambiguïté des résonances déblindées par la présence d'un phosphate est généralement effectuée en suivant la disparition des signaux de la forme non phosphorylée de ces résidus sur un spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC. Cependant, si le motif de phosphorylation est trop complexe de part le nombre de sites phosphorylés au même moment, comme pour B2AR, l'attribution peut se faire avec des expériences de RMN 3D. D'autre part, le spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC du peptide peut également être enregistré au cours du temps de la réaction de la kinase afin d'extraire l'ordre séquentiel et la cinétique de phosphorylation de chaque résidu. Cela a déjà été démontré dans différentes

études avec des kinases plus universelles comme la PKA sur la protéine Tau (Landrieu et al., 2006) ou la CDK2 et GSK3beta sur PTEN (Cordier et al., 2012).

Les premiers résultats montrent que les peptides B2AR et GHSR1a ont été phosphorylés par GRK2 alors que V2R ne montre aucun signe de phosphorylation par cette kinase. Pour B2 : S346 et/ou S356, S345 et/ou S364, et S355 (3 ou 4 phosphorylations potentielles). Pour GHSR : S355, S356, S362 et S364 (3 à 4 phosphorylations potentielles). Pour V2 : pas de phosphorylation apparente. Ces sites correspondent pour l'instant partiellement à ceux déterminés dans la littérature.

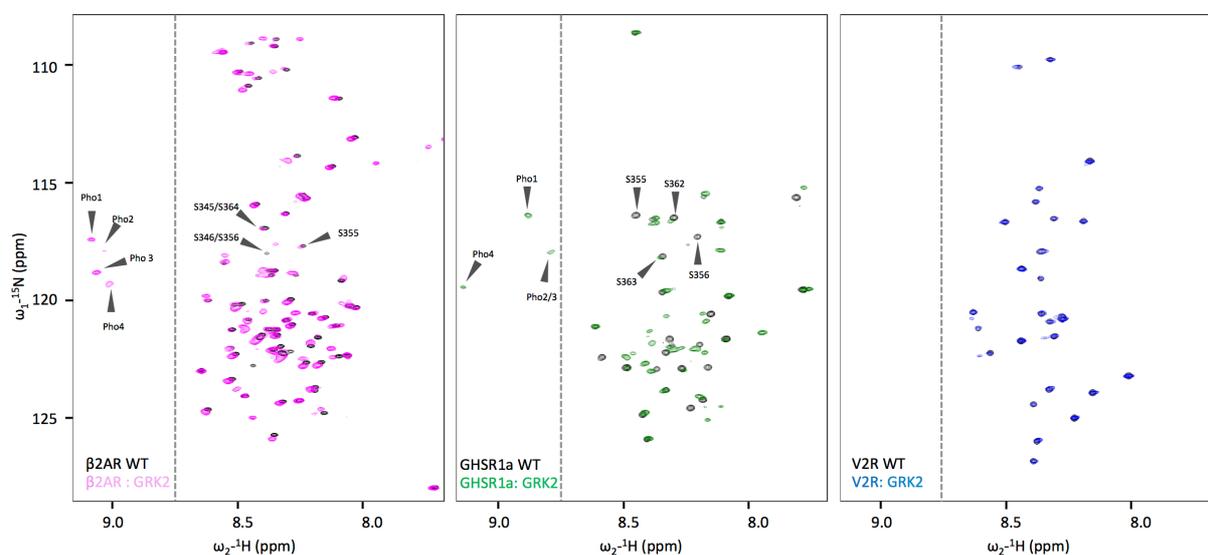
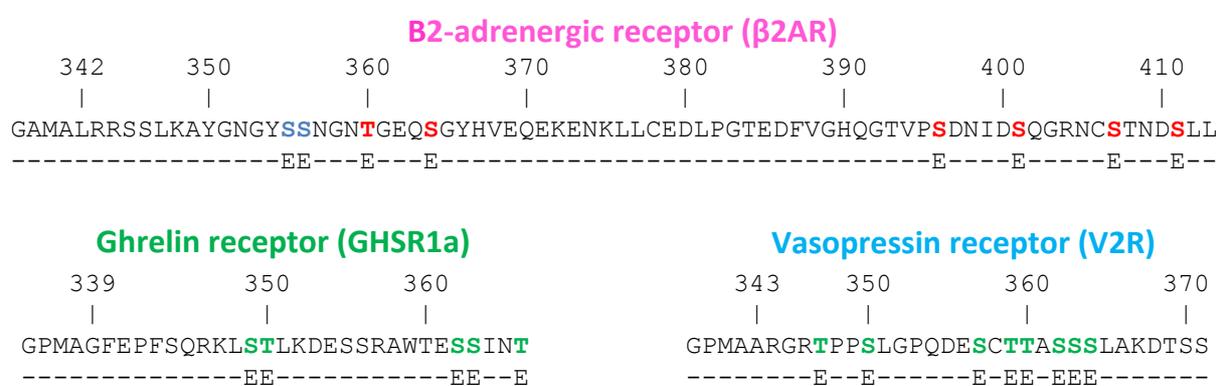


Figure 17 : Superposition des spectres  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC des peptides B2AR, GHSR1a et V2R non phosphorylés (en noir) et phosphorylés (en couleur) par la GRK2

L'analyse complète par RMN permettra d'identifier le phospho-code (quels résidus) et la cinétique de phosphorylation (à quelle vitesse et dans quel ordre). Nous validerons les phosphorylations de B2AR pour lequel le code-barres *in vivo* est connu. Nous attribuerons les phosphorylations de GHSR à une kinase puisque les sites de phosphorylation ont été identifiés mais non attribués. Nous évaluerons le phospho-code de V2R car ce dernier est essentiellement inconnu. Nous espérons ainsi avancer dans la compréhension de la fine régulation de l'orchestration des phosphorylations sur ces voies de signalisation.

### 5.2.4.2 Détermination du code structural des régions C-terminales des GPCRs

En attendant d'avoir une phosphorylation suffisamment complète et efficace des peptides C-terminaux avec les GRKs, nous avons exprimé des peptides C-terminaux où les sites phosphorylés connus ont été remplacés par des acides glutamiques (Figure 18) (Pearlman et al., 2011). L'impact de ces peptides C-terminaux phospho-mimétiques sur le recrutement de l'arrestine a été testé par RMN (voir section interaction ci-après). Nous nommerons à partir d'ici les peptides C-terminaux WT et phospho-mimétiques de B2AR, GHSR1a et V2R respectivement b2wt, b2m26, ghwt, ghm26, v2wt et v2m26, m26 signifiant que l'on remplace par des glutamates tous les sites phosphorylés par la GRK2 et la GRK6.



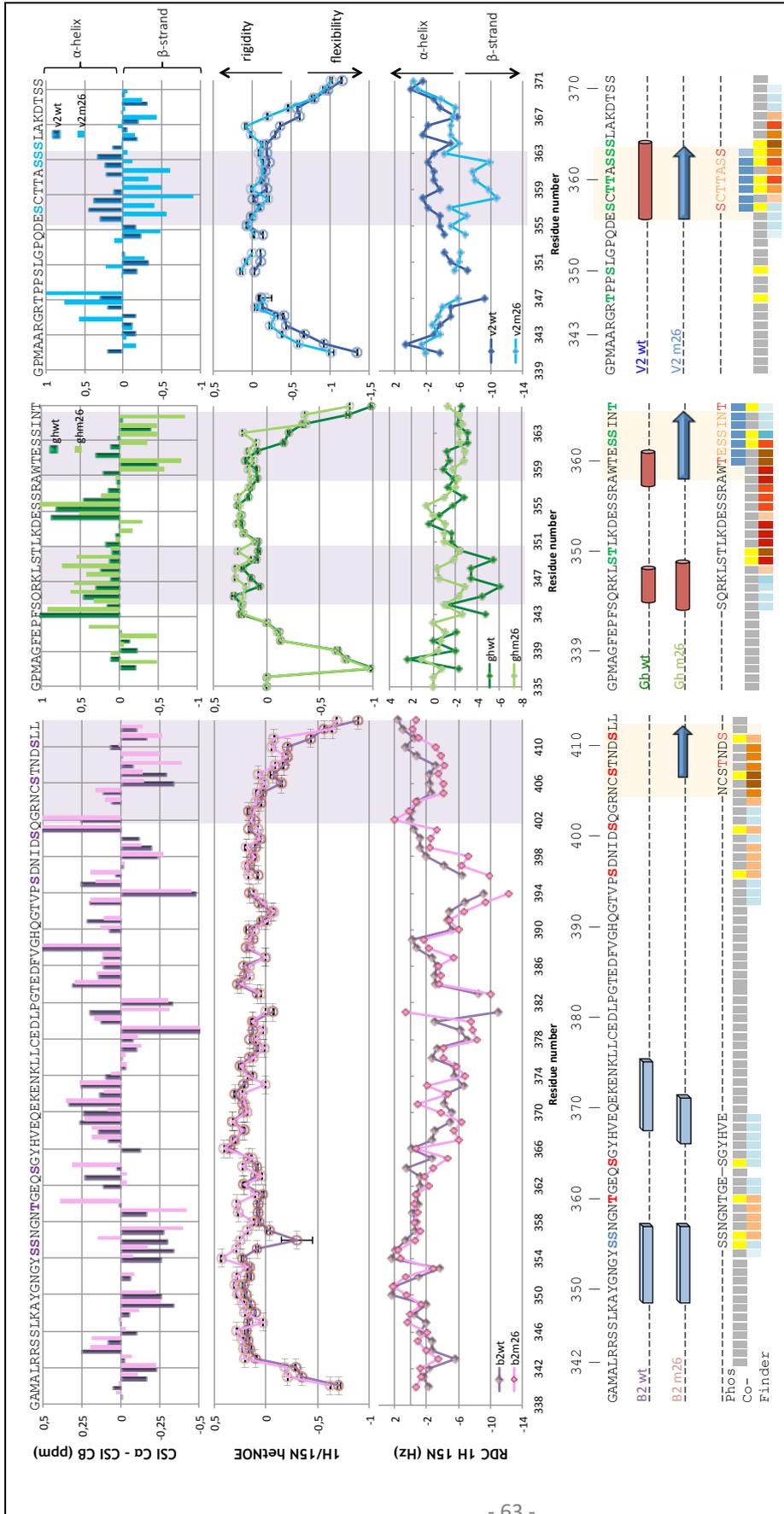
**Figure 18** : Séquences des peptides C-terminaux où les sites phosphorylés connus ont été remplacés par des acides glutamiques. Site phosphorylé par GRK2, GRK6 ou une GRK non spécifiée selon (Bouzo-Lorenzo et al., 2016; Kelly N Nobles et al., 2007; Nobles et al., 2011) pour GHSR1a, B2AR et V2R respectivement

La caractérisation structurale des peptides C-terminaux des formes non phosphorylées et phospho-mimétiques dans un premier temps (Figure 19, manuscrit Guillien et al. en préparation) permet une comparaison directe des ensembles conformationnels dérivés des paramètres RMN. La première étape de toutes les études RMN est l'attribution de résonances  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$  afin de lier chaque pic du spectre  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC à un acide aminé de la séquence primaire. L'attribution RMN est semi-automatisée pour fonctionner plus efficacement pour les IDPs caractérisées par une dispersion spectrale réduite en protons amide (environ 1 ppm) (Jung and Zweckstetter, 2004; Narayanan et al., 2010). Les spectres ont été enregistrés sur des spectromètres RMN à haut champ (700 et 800 MHz). Cette étape nous a permis d'obtenir

l'empreinte RMN de chaque région C-terminale qui sera utilisée pour toutes les études ultérieures. Ensuite, plusieurs paramètres structuraux RMN ont été collectés et analysés afin d'établir le contenu en éléments transitoires en hélices  $\alpha$ ,  $\beta$  étendus ou hélice PolyProline II (PPII). Concrètement, les déplacements chimiques, via l'indice de déplacement chimique (CSI) et les couplages dipolaires résiduels (RDCs) sont des sondes extrêmement sensibles au biais conformationnel au niveau résiduel dans des chaînes désordonnées (pour une revue [Annexes C et E](#)). Ces données structurales ont été complétées par des données de dynamique extraites avec des paramètres de relaxation  $^{15}\text{N}$  (vitesses de relaxation longitudinale (R1), transversale (R2) et croisée ( $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$  NOE)).

Cette caractérisation a permis de révéler l'apparition, la disparition ou le renforcement d'éléments de structures secondaires résiduels qui sont impliqués dans l'interaction avec le partenaire arrestine de signalisation (voir ci-après). En effet, le consensus des paramètres RMN de B2AR montre qu'un brin  $\beta$  s'est formé à la fin du peptide phospho-mimétique (b2m26). Pour GHSR, les changements structuraux entre WT et m26 montrent une augmentation de l'hélicité et la transformation d'une région hélicoïdale qui s'est étendue en brin  $\beta$ , respectivement au centre et à la fin du peptide phospho-mimétique (ghm26). Pour V2R, les changements structuraux entre WT et m26 sont les plus prononcés avec la transformation d'une région hélicoïdale qui s'est étendue en brin  $\beta$  également en partie C-terminale du peptide phospho-mimétique (v2m26). Il est intéressant de noter ici que V2R est le récepteur qui fait partie de la classe B, i.e. qui interagit le plus fortement avec l'arrestine. Ce clair changement de structuration pourrait donc être lié à la fonction. D'autre part, ces régions se trouvent aux endroits où l'on trouve les codes de phosphorylation putatifs (pX(X)pXXp/E/D) des GPCRs pour le recrutement des arrestines ([Zhou et al., 2017](#)).

En résumé, nous observons une transition entre une région hélicale ou désordonnée en brin  $\beta$  du côté C-terminal de ces peptides dans leur forme phospho-mimétique ([Figure 19](#)). Cette transition pourrait être liée à la fonctionnalité du GPCR concernant son interaction avec son partenaire physiologique arrestine. Nous vérifierons que les phosphorylations *in vitro* induisent les mêmes transitions structurales.



**Figure 19** : Caractérisation structurale des peptides C-terminaux. En haut sont représentées les CSI par rapport au random coil de Tamiola et Mulder, les vitesses de relaxation croisée NOE hétéronucléaires et les RDC  $^1D_{NH}$ . En haut, sont représentés la numérotation des séquences et le consensus des structures secondaires déterminées par *b2wt*, *b2m26*, *ghwt*, *ghm26*, *v2wt* et *v2m26*, m26 signifiant que les sites phosphorylés par GRK2 et GRK6 ont été mutés par des glutamate. Sites de phosphorylation **GRK2**, **GRK6** et **GRK** d'après (Nobles et al., 2011), (Bouzo-Lorenzo et al., 2016) et Nobles et al., 2007 respectivement pour B2R, V2R et GHSR. PhosCoFinder: code de phosphorylation putatif (pX(X)pXXp/E/D) avec p=résidu phospho et p/E/D=un résidu phospho peut être un résidu chargé (en bleu code putatif complètement retrouvé, en rouge code putatif partiellement retrouvé). Les couleurs plus foncées indiquent la force de conservation du code.

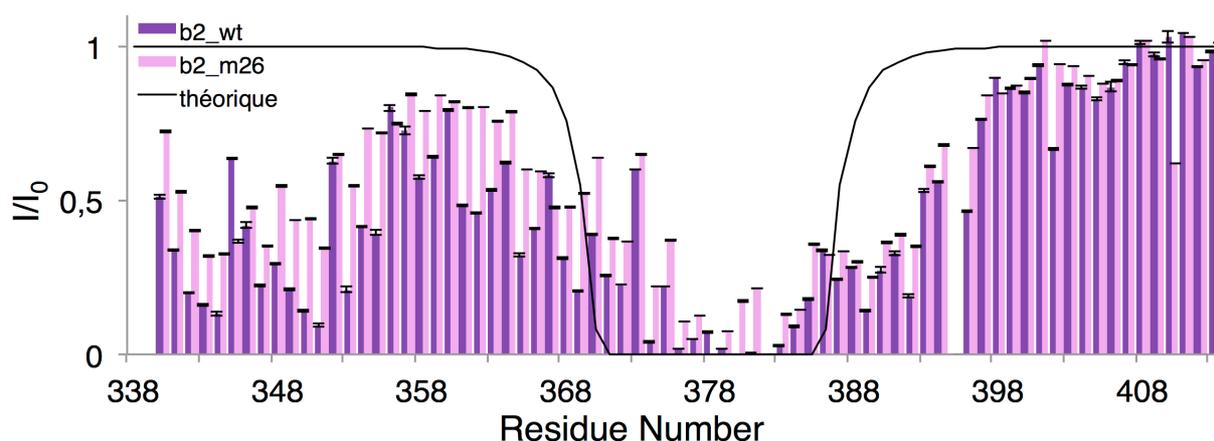


Figure 20 : Ratio PRE des peptides C-terminaux de B2AR et phosphomimétique B2m26

Ces informations locales de structuration et de dynamique ont été complétées par des informations structurales à longue distance telles que des interactions intramoléculaires transitoires à longue portée qui peuvent être présentes dans les IDPs. Ces informations sont extraites par des expériences d'augmentation de la relaxation paramagnétique (PRE). Pour cela, nous utilisons une sonde avec un radical nitroxy stable telle que le PROXYL (attachée de manière covalente à une cystéine choisie) qui réduit l'intensité du signal des résidus qui lui sont spatialement proches (Gillespie and Shortle, 1997). De telles expériences, nous ont permis de mettre en évidence une interaction transitoire entre l'extrémité N-terminale et la région médiane du peptide C-terminal du B2AR (Figure 20). Cette interaction pourrait être perturbée par l'un des patterns de phosphorylation et ainsi déclencher l'interaction avec son partenaire physiologique. Or, le profil des PREs sur le peptide phospho-mimétique b2m26 ne montre qu'une réduction de l'effet à longue portée et non pas une complète disparition de cette interaction entre l'extrémité N-terminale et la région médiane de ce peptide. Donc nous pouvons pour l'instant potentiellement écarter cette hypothèse en attendant de comparer ces résultats avec une forme phosphorylée par des kinases.

En plus des paramètres à résolution atomique mesurés par RMN, des paramètres à résolution moléculaire ont été acquis sur chaque peptide en utilisant le SAXS (Tableau 2). Le SAXS confirme la présence d'éléments de structures secondaires dans ces différents peptides car le rayon de gyration ( $R_g$ ) extrait correspond à un ensemble plus étendu qu'un ensemble complètement 'random coil' (Figure 21). En effet, les structures secondaires qui rigidifient

certaines régions de la protéine empêchent des repliements qui rendent les ensembles plus compacts. En effet, on voit par exemple sur le peptide v2wt que la distribution de  $R_g$  extraite de l'ensemble 'random coil' est plus petite que la distribution de  $R_g$  extraite du sous-ensemble calculé avec EOM (Bernado et al., 2007). En effet, cet algorithme permet d'extraire un sous-ensemble en accord avec les données de SAXS enregistrée sur la protéine.

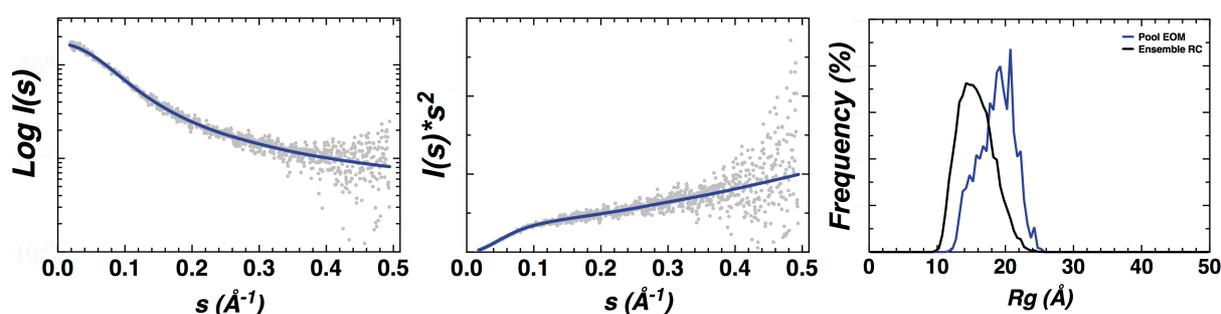


Figure 21 : Représentation Guinier, Kratky et distribution des  $R_g$  de l'ensemble 'random coil' (noir) et distribution des  $R_g$  du sous-ensemble EOM (bleu) pour le V2wt

B2wt	B2m26	Ghwt	Ghm26	V2wt	V2m26
$27.1 \pm 0.04$	$26.0 \pm 0.07$	$16.11 \pm 0.08$	$16.84 \pm 0.04$	$16.96 \pm 0.1$	$17.12 \pm 0.04$
$27.18 \pm 0.04$	$26.09 \pm 0.07$	$16.21 \pm 0.08$	$16.92 \pm 0.04$	$16.98 \pm 0.1$	$17.20 \pm 0.04$
$24.36 \pm 0.01$	$24.36 \pm 0.01$	$15.51 \pm 0.01$	$15.51 \pm 0.01$	$15.76 \pm 0.01$	$15.76 \pm 0.01$

Tableau 2 : 1<sup>ère</sup> ligne :  $R_{g_{exp}}$  (Å) de Guinier ; 2<sup>ème</sup> ligne :  $R_{g_{exp}}$  (Å) de  $P(r)$  ; 3<sup>ème</sup> ligne : Flory (Å) paramétré pour un IDP :  $R_{g_{RC}} = 2.54 * N^{0.522}$  avec N le nombre de résidus

Tous les paramètres RMN et SAXS sont combinés pour générer une description d'ensemble de la conformation des peptides C-terminaux en solution à l'aide de l'algorithme Flexible-Meccano (Ozenne et al., 2012) et d'autres programmes internes (voir exemple Annexe C et E). Ces ensembles sont en cours d'optimisation.

La comparaison des données RMN et de l'ensemble résultant des conformations calculées pour les peptides C-terminaux non phosphos et phospho-mimétiques a mis en évidence des changements de conformation clés et fonctionnels induits par les mimes de phosphorylation. De plus, la confirmation de la transition de la structuration hélicoïdale ou désordonnée en brin  $\beta$  entre les formes non phosphorylées et phosphorylées donnera des indices sur les caractéristiques cruciales des régions C-terminales des GPCRs nécessaires au recrutement de l'arrestine; et donc pour la transduction du signal.

## 5.2.5 Codes-barres conformationnels des arrestines

Après avoir caractérisé le partenaire désordonné libre en solution, la caractérisation de structurale et thermodynamique l'interaction entre ces peptides C-terminaux et les arrestines passe par différentes étapes. Nous avons tout d'abord suivi par RMN l'interaction des peptides C-terminaux isolés en ajoutant de l'arrestine WT purifiée en concentration croissante. Le SAXS et la cristallographie aux rayons X suivront pour compléter ces données du côté du partenaire structuré de 47 kDa, qui est l'arrestine. Cette étude donnera des indices sur la façon dont les différents phospho-codes et la classe de récepteurs (classe A ou B, en ce qui concerne l'interaction arrestine) modulent l'interaction des régions C-terminales avec les arrestines, et quelles sont les conséquences pour la conformation de l'arrestine.

### 5.2.5.1 Interaction des peptides C-terminaux des GPCRs avec les arrestines: cinétique et thermodynamique du complexe

Les premiers tests d'interaction ont été réalisés sur les peptides C-terminaux WT avec le mutant arrestine R169E dit « phospho indépendant », largement utilisé par les biologistes car il permet de s'affranchir de l'état de phosphorylation du GPCR pour que l'interaction puisse avoir lieu. Comme cela a été montré précédemment dans les résultats préliminaires, la constante de dissociation,  $K_d$ , a été caractérisée par anisotropie de fluorescence afin de déterminer les paramètres thermodynamiques de l'interaction en solution (spectromètre de fluorescence à lecteur de microplaques Tecan Safire II) (Figure 16). Comme nous étions limités par la concentration du mutant R169E, nous avons dû plutôt titrer le peptide et marquer l'arrestine R169E au fluorophore MBB (MonoBromoBimane) sur le résidu L68C de la « finger loop » (Figure 23). Ainsi, nous avons suivi la décroissance d'anisotropie due à la libération de la « finger loop » lorsque le peptide interagit. Nous avons obtenu des  $K_d$  de l'ordre de 45  $\mu$ M pour l'interaction des peptides V2wt et le double pour B2wt et Ghwt avec l'arrestine R169E. Ces valeurs suivent la règle des classes A et B des GPCRs avec une plus grande affinité pour le V2R de la classe B. Ensuite, la thermophorèse à micro-échelle (MST) pour extraire le  $K_d$  en solution a été testée sur la plateforme Techniques Biophysiques de l'AFMB à Marseille (un projet FRISBI avait été déposé à cet effet). Les résultats n'étant pas concluants, nous en avons

déduit que nous avons sûrement surestimé les Kd en effectuant ces mesures d'anisotropie inversée. Nous avons donc décidé de nous focaliser sur l'arrestine WT qui permet d'obtenir de plus grandes quantités de protéines et de manière plus stable dans le temps afin de pouvoir réaliser des mesures d'anisotropie dans l'ordre usuel. Pour cela, nous avons marqué les peptides (3 à 9 kDa) au dérivé succinimidyl ester de l'Alexa488, qui se conjugue au groupement amine du premier résidu du peptide. Afin de suivre l'évolution de l'anisotropie en interaction avec l'arrestine WT (47 kDa), cette dernière est ajoutée en quantité croissante tout en gardant la quantité de sonde stable tout au long de la titration. Les résultats sont en cours d'analyse.

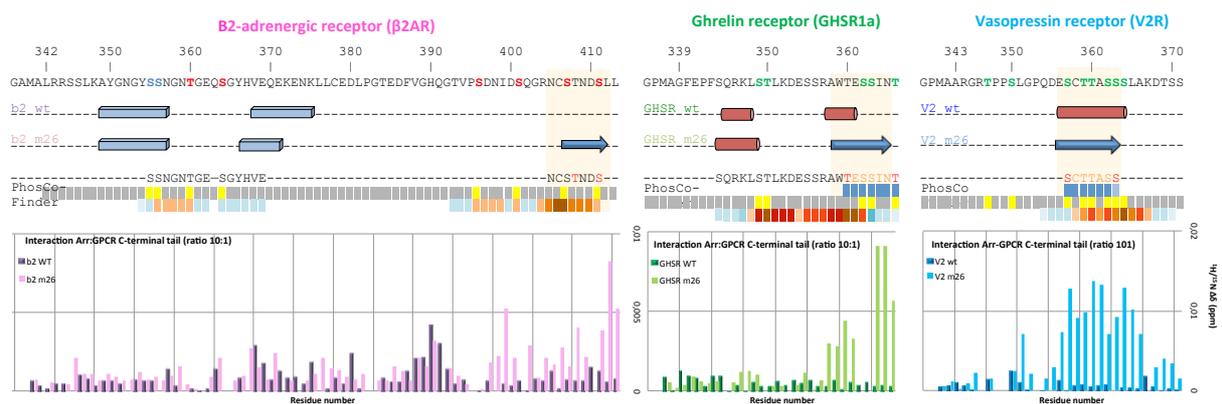
D'autre part, nous savions que la faible affinité des complexes étudiés pourrait rendre cette caractérisation thermodynamique difficile car la saturation du complexe pourrait ne pas être possible. Cependant, l'Interférométrie Bio-Layer (BLI) sera envisagée afin de déterminer les paramètres cinétiques de l'interaction, cette technique ne nécessite pas une saturation du complexe pour déterminer les paramètres de vitesse d'association ( $k_{on}$ ) et de dissociation ( $k_{of}$ ).

#### 5.2.5.2 Interaction des peptides C-terminaux des GPCRs avec les arrestines: régions impliquées dans le complexe

En attendant d'évaluer quantitativement les propriétés thermodynamiques et cinétiques des différentes interactions arrestine:peptide pour chacun des peptides modèles de phosphorylation, nous avons suivi cette interaction par RMN.

Il est très intéressant de voir que les peptides non phospho-mimétiques n'interagissent pas avec leur partenaire alors que les phospho-mimétiques sont perturbés par la présence de l'arrestine (Figure 22). D'autre part, les régions impliquées dans l'interaction correspondent à celles présentant une transition structurale entre hélicité ou désordre en brin  $\beta$  (régions C-terminales de ces trois peptides modèles, Figure 19).

Ces expériences confirment que de la force d'interaction est faible puisqu'il faut un ratio de 1:10 peptide:arrestine afin de commencer à voir des perturbations de déplacements chimiques sans baisse significative des intensités pour un complexe de 50 kDa.



**Figure 22** : Interaction des peptides C-terminaux avec l'arrestine WT avec un ratio de 1 :10. En bas sont représentées les perturbations de déplacements chimiques du peptide marqué  $^{15}\text{N}$  en présence du partenaire arrestine non marqué  $^{15}\text{N}$ . En haut, sont représentés la numérotation des séquences et le consensus des structures secondaires déterminées par RMN ( $\beta$ -stand,  $\alpha$ -helix, PPII) des peptides C-terminaux de **b2wt**, **b2m26**, **ghwt**, **ghm26**, **v2wt** et **v2m26** ; m26 signifiant que les sites phosphorylés par GRK2 et GRK6 ont été mutés par des glutamates. Sites de phosphorylation **GRK2**, **GRK6** et **GRK** d'après (Nobles et al., 2011), (Bouzo-Lorenzo et al., 2016) et (Kelly N Nobles et al., 2007) respectivement pour B2R, V2R et GHSR. PhosCoFinder: code de phosphorylation putatif (p(X)pXXp/E/D) avec p=résidu phospho et p/E/D=un résidu phospho peut être un résidu chargé (en bleu code putatif complètement retrouvé, en rouge code putatif partiellement retrouvé). Les couleurs plus foncées indiquent la force de conservation du code

En conclusion, cette étude montre la relation structure/fonction des régions C-terminales des GPCRs où les régions qui subissent une transition structurale (correspondant aux zones des sites potentiellement phosphorylés), permettent l'interaction avec le partenaire physiologique arrestine.

### 5.2.5.3 Interaction basale des régions C-terminales des GPCRs avec les arrestines

Il est connu que les GPCRs ont une interaction basale avec les arrestines même dans leur état non phosphorylé. Dans le cas de ce complexe peptide non-phospho:arrestine WT de supposée très faible affinité où les perturbations de déplacement chimique n'ont pas pu être détectées (Figure 22), des expériences de PRE peuvent être menées afin de cartographier les parties du peptide qui sont transitoirement impliquées dans une interaction. Pour cela une sonde PROXYL a été greffée sur le mutant L68C de la « finger loop » de l'arrestine WT (Figure 23). Ne voyant aucune perturbation de la sonde sur le peptide, même pour le peptide phospho-mimétique qui lui interagit (Figure 22), nous nous sommes rendu compte que le site d'interaction en partie C-terminale du peptide était certainement hors de la zone active du

nitroxyle qui est d'environ 20 à 25 Å. En effet, ce mutant L68C est adapté pour l'interaction avec le récepteur en entier mais pas pour celle avec les régions C-terminales isolées. Nous sommes en train de produire un nouveau mutant Y47C de l'arrestine WT pour pallier ce problème (Figure 23). Ces expériences permettront, d'une part, de valider les interactions précédemment découvertes sur les phospho-mimétiques, et d'autre part, de sonder dans quelle proportion l'interaction basale joue un rôle dans l'interaction GPCR:arrestine.

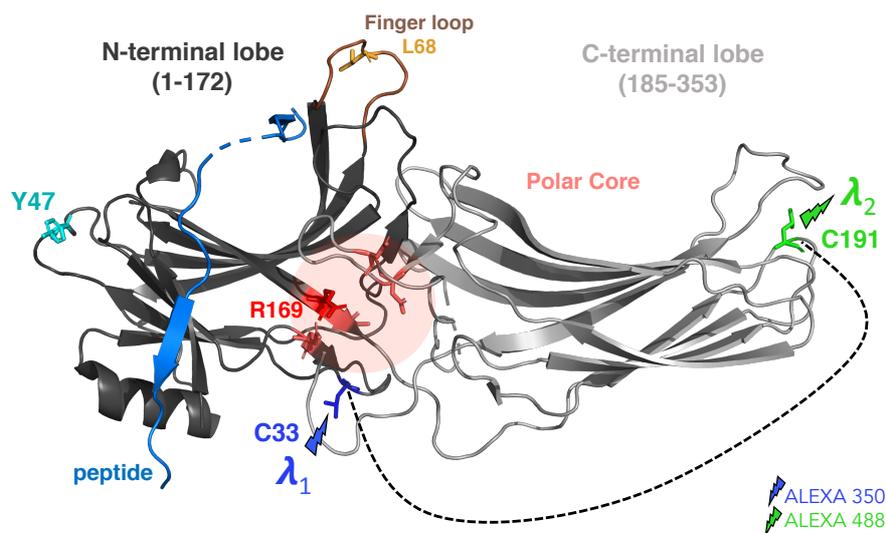


Figure 23 : Structure de l'arrestine2 en interaction avec le peptide V2pp (code PDB : 4JQI)

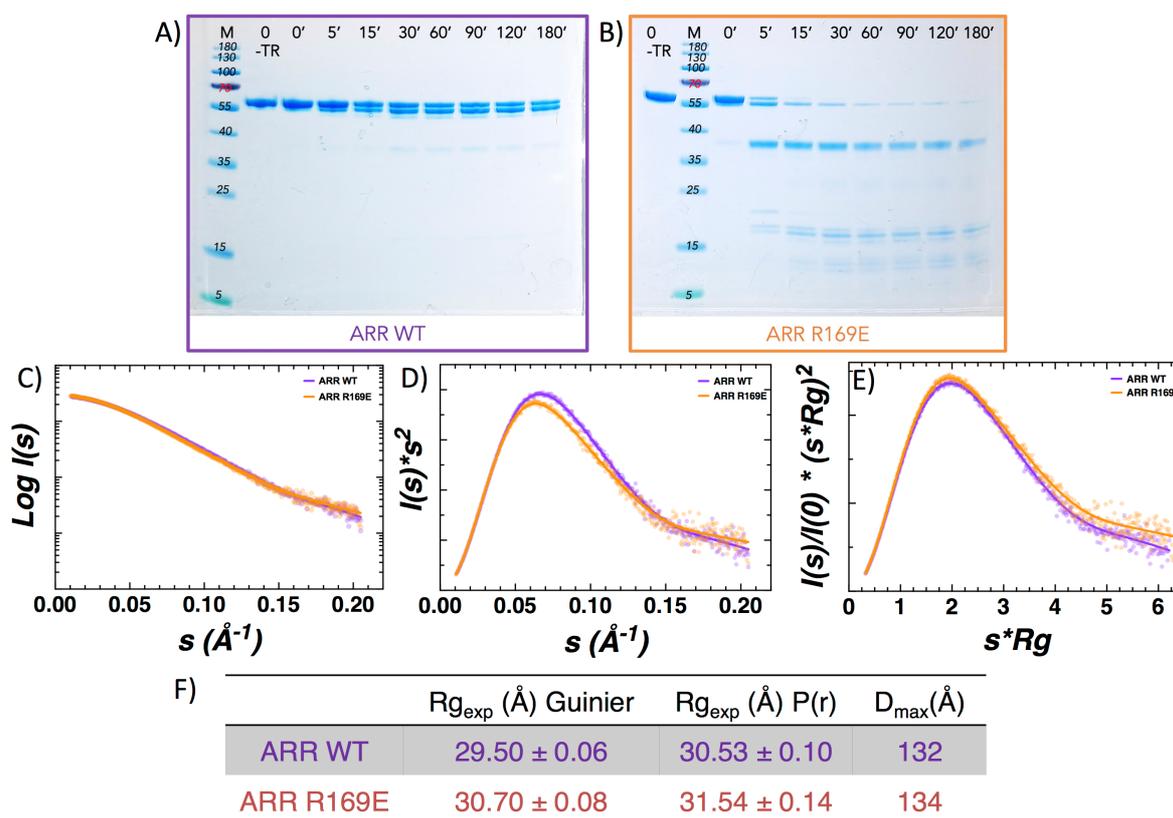
#### 5.2.5.4 Caractérisation structurale des complexes par RMN et cristallographie aux rayons X: détails atomiques des réarrangements des régions C-terminale sous forme liée

La RMN a permis de déterminer la zone d'interaction de la région C-terminale avec l'arrestine. La zone d'interaction délimitée sera synthétisée chimiquement avec des résidus phosphorylés ou des glutamates selon l'avancement du projet concernant les phospho-codes. Nous avons prévu de réaliser des essais de cristallogenèse avec des mélanges d'arrestine et de peptides synthétiques dans le but de déterminer la structure des différents complexes. Des études précédentes ont montré qu'afin d'obtenir la structure cristallographique de l'arrestine en complexe avec le peptide synthétique phosphorylé de la région C-terminale de V2R, le peptide avait dû être « cross-linké » à l'arrestine (Shukla et al., 2013). D'autre part, le code de phosphorylation choisi ne correspond à aucun code réel, toutes les sérines et thréonines sont

sous forme phosphorylée. Si nécessaire, cette approche de « cross-linking » sera également utilisée dans notre cas.

### 5.2.5.5 Caractérisation structurale des complexes par analyse SAXS: réarrangement global de l'arrestine

Des expériences SAXS sur l'arrestine WT et R169E libres ont été réalisées. Le mutant phospho-indépendant R169E mime une conformation dite « active », i.e. la même qu'en interaction avec la région C-terminale du GPCRs. La liaison de la région C-terminale du GPCR déplace la queue C-terminale de l'arrestine qui libère la surface d'interaction. On s'attend donc à un déplacement d'équilibre de l'ensemble des conformations entre l'arrestine WT et R169E depuis une forme fermée et inactive (WT) à une forme ouverte et active (R169E).



**Figure 24** : Coupure à la trypsine (A-B) et SEC-SAXS (C-F) de l'arrestine **WT** et **R169E**. (A-B) Digestion enzymatique à la trypsine de l'arrestine2 WT (A) ou R169E (B) (0.5 mg/mL, ratio 1:500, 37°C, temps d'incubation : 0, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 min) ; (C) Courbes SAXS de l'arrestine2 WT et R169E (5 mg/mL) (SWING, SOLEIL), (D) Kratky et (E) Kratky plots normalisés, (F) rayons de gyrations  $R(g)$  et distances maximales ( $D_{max}$ )

La digestion trypsique limitée de l'arrestine2 WT et R169E ([Figure 24A-B](#)) confirme une conformation et une dynamique plus ouverte du mutant qui mime une forme de l'arrestine en interaction ([Mayer et al., 2019](#); [Nobles et al., 2007](#); [Xiao et al., 2004](#); [Zhao and Xiao, 2019](#)). En effet, l'arrestine2 R169E est rapidement clivée par la trypsine (clivage après les résidus lysine et arginine). Ceci indique que les sites de clivage sont plus exposés pour l'arrestine2 R169E, cela serait en concordance avec une caractéristique de forme « ouverte » pour ce mutant.

Cependant, les courbes SAXS de l'arrestine WT et du mutant phospho-indépendant R169E ne montrent qu'un très faible réarrangement structural global. Le déplacement d'équilibre entre forme ouverte et fermée n'est ainsi peut-être pas assez significatif pour être détecté par SAXS. Il s'agit éventuellement que d'un changement de dynamique plus subtil.

Il est donc fortement probable que l'étude des complexes par SAXS ne sera donc pas suffisante et qu'il faudra la compléter par des informations de FRET avec des sondes judicieusement placées (voir Projet en [Chapitre 7.1](#)).

Nous avons tout de même enregistré des données SAXS sur les complexes. La faible affinité de cette interaction nous a conduit à faire des expériences SEC-SAXS en condition saturante. En effet, nous avons saturé les colonnes en peptides (tampon contenant le peptide) avant de faire passer l'arrestine ([Montgomery, 2016](#); [Yong et al., 1993](#)). Comme attendu, les changements structuraux ne sont pas assez conséquents pour être détectables par SAXS. Le SAXS étant sensible à la masse, l'ajout d'un peptide de petite taille n'a pas suffi à pallier le manque de réarrangement structural. Cependant, cette expérience nous a montré une déplétion dans le profil UV qui confirme une interaction entre l'arrestine2 et les peptides ([Figure 25](#)).

En effet, le profil UV de l'arrestine injectée seule (courbe violette en [Figure 25B](#)) montre un pic au même volume d'élution que l'arrestine seule dans un tampon sans peptide ([Figure 25A](#)) et un pic négatif au même volume d'élution que le peptide Ghm26 seul (2<sup>ème</sup> pic en vert, [Figure 25A](#)), montrant la déplétion du peptide du tampon pour se complexer à l'arrestine. En revanche, l'injection du complexe (courbe verte, [Figure 25B](#)) ne montre pas de pic négatif indiquant que la totalité de l'arrestine est déjà saturée en peptides. La même expérience a été

réalisée pour le complexe GhWt:arrestine (Figure 25C et D). Cette expérience montre qu'il faut deux fois plus de peptide non phospho-mimétique pour saturer l'arrestine. En effet, l'injection du complexe au même ratio que Ghm26:arrestine, montre une déplétion du peptide du tampon. Le ratio utilisé ne suffit pas pour saturer l'arrestine en GhWt (Figure 25D), contrairement au complexe Ghm26 :arrestine (Figure 25B).

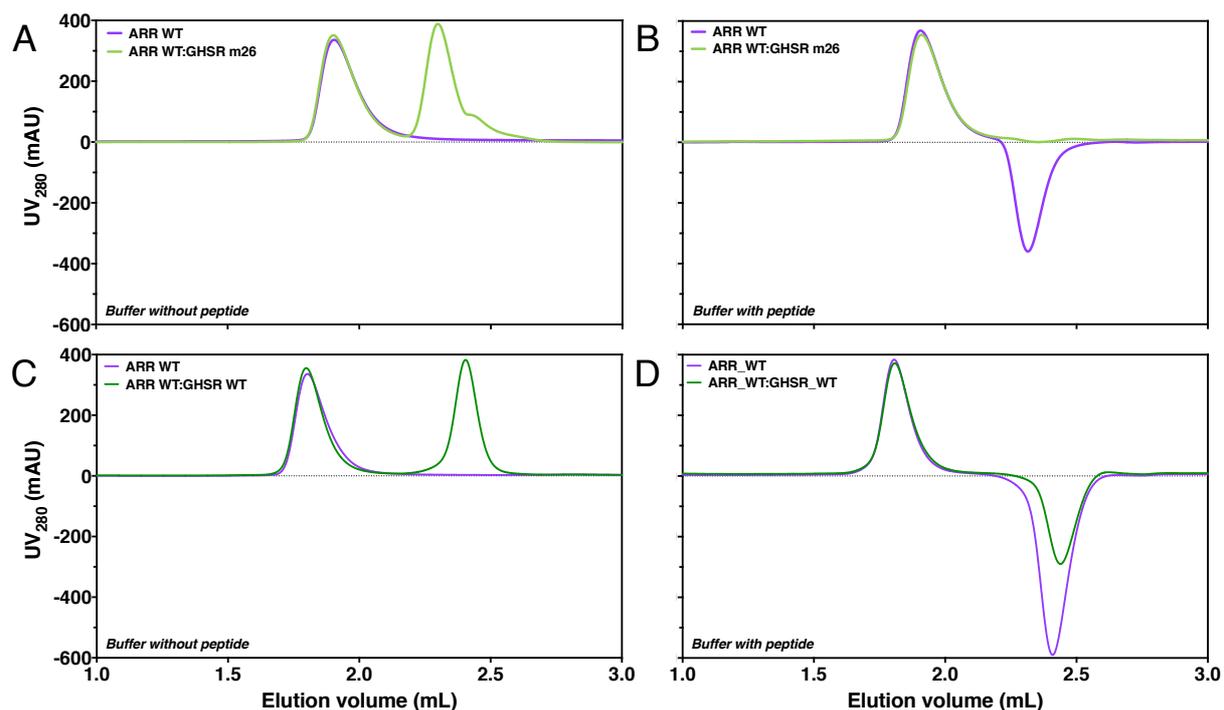


Figure 25 : Profils UV des interactions peptide WT:arrestine (A et B) et peptide phospho-mimétique:arrestine (C et D) sans (A et C) et avec (B et D) saturation d'une colonne d'exclusion stérique (Hiload 5/15, Superdex 200, Increase, GE Healthcare®) par le peptide qui est dans le tampon à 180  $\mu$ M

Ceci montre la nécessité de la présence de charges pour une interaction plus forte avec l'arrestine, mais d'un autre côté nous mettons en évidence l'existence d'une interaction basale avec le peptide WT.

## 5.3 Conclusions

Nous avons mis en place au laboratoire l'expression des kinases GRK en baculovirus et sommes en train d'identifier les codes de phosphorylation des régions C-terminales des GPCRs pour les différents types de GRK.

Nous avons caractérisé structurellement les régions C-terminales de trois GPCRs modèles dans leur état non phosphorylé et phospho-mimétique.

Les régions de transition structurale correspondent aux sites de phosphorylation potentiels et aux zones impliquées dans l'interaction avec le partenaire physiologique arrestine.

Nous avons également réalisé des expériences de titrage qui indiquent que les peptides C-terminaux des GPCRs n'interagissent pas avec les mélanges lipidiques ou les nanodisques vides, ce qui sera important pour la RMN du GPCR en entier. Des préparations de GHSR entier ont été utilisées pour visualiser la région C-terminale du GHSR par RMN, après marquage isotopique ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ ) (Catoire et al., 2010).

Les données SAXS enregistrées pour l'arrestine2 WT et R169 ne montrent pas de réarrangement structural spectaculaire. Cependant, la digestion trypsique montrant des différences non négligeables, l'analyse structurale des arrestines sera complétée par des données de FRET.

Les premières données de SAXS obtenues pour le GHSR entier, reconstitué dans des nanodisques (Banères et al., 2011; Logez et al., 2016) et purifié sous sa forme fonctionnelle (Damian et al., 2012) est en cours d'analyse par Lise Arleth (Université de Copenhague), pionnière et une référence mondiale dans l'étude des protéines membranaires par SAS.

Pour la suite du projet décrit au Chapitre 7, une fois que l'on aura démontré *in vivo* que les peptides C-terminaux phospho-mimétiques ne modifient pas significativement le dialogue récepteur:arrestine, nous envisagerons de conserver cette option dans la suite de l'étude, et ce pour des raisons techniques et de coût. Enfin, si nécessaire, il sera possible de synthétiser chimiquement les peptides C-terminaux avec des phospho-résidus (plateforme Synbio de Montpellier).



## Travaux Scientifiques actuels

# 6 Régulation de la transcription de gènes cibles par l'interaction du récepteur de l'acide rétinoïque alpha avec ses co-régulateurs désordonnés

**Personnes impliquées:** N. Sibille, P. Bernadó, F. Allemand, A. Fournet, T. Cordeiro, L. Sénicourt, A. Sagar

**Principaux collaborateurs:** A. le Maire, P. Germain, W. Bourguet, (experts en Récepteurs Nucléaires et cristallographie), A. Barducci (expert en modélisation moléculaire) (CBS, Montpellier)

**Bourse:** Labex EpiGenMed

### 6.1 Introduction

Les récepteurs nucléaires (NR) sont des facteurs de transcription ayant un rôle direct dans la régulation de l'expression des gènes de réponse hormonale. La liaison de l'agoniste aux NR déclenche la transcription à travers une cascade d'événements qui est initiée par l'échange du complexe de répression par celui d'activation. L'assemblage des deux grands complexes est médié par des protéines co-régulatrices intrinsèquement désordonnées qui, simultanément, interagissent avec les NR. Les co-régulateurs sont appelés co-activateurs ou

co-répresseurs lorsqu'ils interviennent respectivement dans les complexes d'activation ou de répression. Nous avons disséqué les bases structurales de l'interaction entre les deux familles de co-régulateurs avec l'hétérodimère du récepteur de l'acide rétinoïque (RAR / RXR). En effet, nous avons étudié l'interaction de N-CoR (co-répresseur) et de TIF2 (co-activateur) intrinsèquement désordonnés avec l'hétérodimère RXR/RAR, qui forment des complexes hautement dynamiques et plastiques.

## 6.2 Co-represseur N-CoR

Nous sommes parvenus aux conclusions suivantes pour le corépresseur N-CoR (Cordeiro et al., 2019) et Annexe F :

i. Les ligands agonistes induisent un repliement en C-terminal du RAR et du RXR en hélice (H12) dans le domaine de liaison du ligand (LBD) du NR. Ceci se produit indépendamment de la présence de protéines co-régulatrices.

ii. Nous avons ensuite démontré par RMN que le domaine d'interaction au NR (NRID) de N-CoR est intrinsèquement désordonné. Il englobe trois régions hautement conservées, partiellement structurées et liées à la reconnaissance de l'hétérodimère RXR/RAR.

iii. Le complexe N-CoR avec RXR/RAR expérimente un équilibre entre une forme simplement et doublement liée de N-CoR à l'hétérodimère. Les populations relatives de ces deux formes complexées peuvent être modulées par des agonistes et antagonistes.

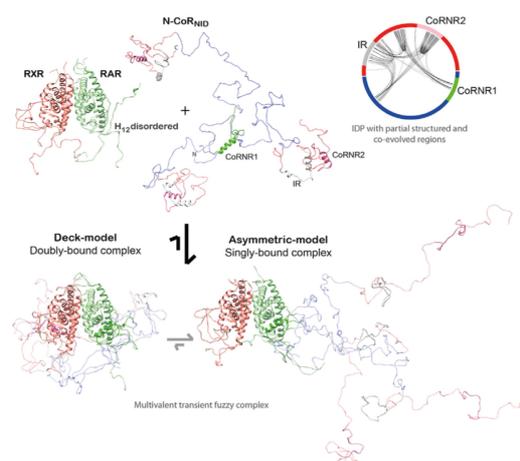


Figure 26 : Interaction et équilibre entre N-CoR simplement et doublement lié sur RXR/RAR

## 6.3 Co-activateur TIF2

Les principaux résultats issus de l'étude du co-activateur TIF2 sont en cours de publication en auteur correspondant (Senicourt et al., 2020) et sont plus longuement détaillés dans l'Annexe B de ce mémoire.

i. Nous avons démontré par RMN que la région de liaison au NR (NRID) de TIF2 est intrinsèquement désordonnée, mais qu'elle englobe trois régions hautement conservées qui sont partiellement structurées.

ii. En plus des trois sites d'interaction NR bien connus, nous avons souligné par RMN l'importance d'une région flanquante au deuxième site de liaison (NR-box2) pour le renforcement de l'interaction avec RXR/RAR.

iii. Initialement identifiée et délimitée par RMN, cette région flanquante plus la NR-box2 a été co-cristallisée avec succès avec le récepteur nucléaire (NR), affichant un nouveau motif hélice-tour-hélice. Ce motif pourrait être impliqué dans la spécificité de reconnaissance des co-activateurs.

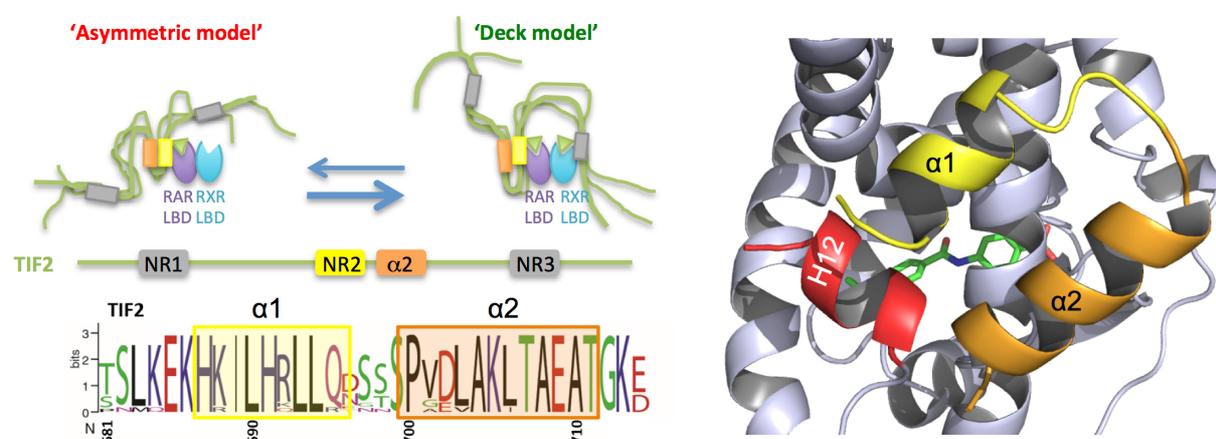


Figure 27 : Modèle d'interaction de TIF2 avec le domaine LDB de RXR/RAR. La NR-box2 et sa région flanquante sont hautement conservées et forme un motif hélice-tour-hélice nouvellement découvert sur la structure cristallographique de RAR avec ce peptide identifié par RMN

## 6.4 Conclusions

## Chapitre 6

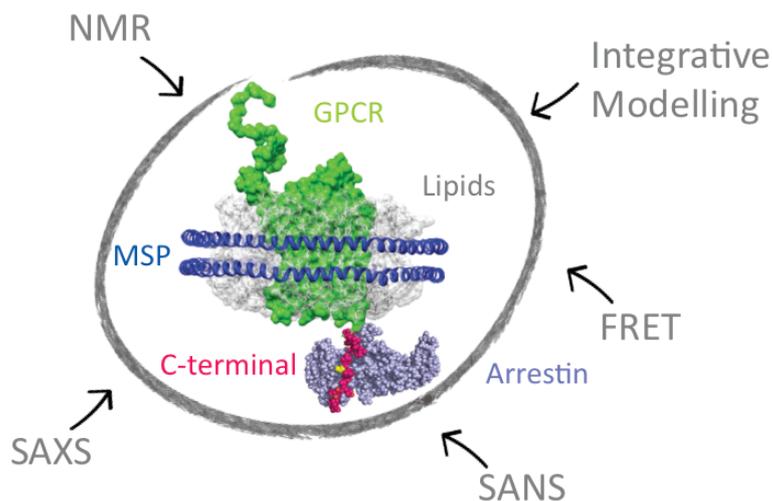
---

Ces résultats fournissent des indices structuraux et fonctionnels impliqués dans la régulation de la transcription génique et suggèrent des voies mécanistes jouant un rôle dans la transition de l'état basal (inactif) à l'état transcriptionnellement actif.

## Projet de Recherche

## 7 Désordre Fonctionnel dans les Mécanismes Moléculaires de régulation de la Signalisation Cellulaire

### 7.1 Les régions C-terminales des GPCRs dans la voie de signalisation de l'arrestine



Comme vu précédemment, notre objectif principal est de déchiffrer les exigences structurales et dynamiques de l'interaction des GPCRs avec les arrestines, ainsi que le déroulement de la signalisation indépendante de la protéine G. Nos études fourniront également des informations essentielles pour guider la conception rationnelle des mimétiques peptidiques qui pourraient interférer avec les différentes surfaces d'interaction

de ces complexes. Ils pourront être utilisés comme médicaments sélectifs ou outils pharmacologiques n'affectant qu'un seul type d'interaction récepteur:arrestine, afin de moduler des cascades de signalisation spécifiques, et donc avoir un impact individuel sur chacun des effets biologiques contrôlés par les GPCRs.

Les tâches suivantes seront finalisées et effectuées:

i. Décryptage de la phosphorylation et des codes-barres structuraux des régions C-terminales des GPCRs. Cette tâche fournira une description claire de l'impact structural des phospho-codes et les reliera à des voies de signalisation spécifiques: la désensibilisation, l'activation ERK ou l'internalisation. La comparaison de la teneur en structures secondaires dans les formes phosphorylées et non phosphorylées donnera les premiers indices du lien entre les changements structuraux locaux et la fonction dans les régions C-terminales des GPCRs.

ii. Codes à barres conformationnels de l'arrestine. La caractérisation de l'interaction avec les arrestines aux niveaux structural et thermodynamique donnera des indices sur la façon dont les divers phospho-codes modulent l'interaction des régions C-terminales avec les arrestines, et s'ils induisent des changements conformationnels distincts dans les arrestines. Les expériences de RMN et SAXS se feront en parallèle des analyses basées sur le FRET qui fourniront une image détaillée des changements conformationnels de l'arrestine.

iii. Image globale de l'ensemble du récepteur. Cela nous permettra d'évaluer dans quelle mesure le «noyau» 7TM du récepteur et l'environnement lipidique modulent la conformation de la région C-terminale et, par la suite, l'interaction avec l'arrestine. Les réarrangements locaux et globaux de l'ensemble du récepteur dans son nanodisque seront évalués par SAXS / SANS en collaboration avec Lise Arleth (Université de Copenhague), experte en SAS des protéines membranaires.

### 7.1.1 Code-barres de phosphorylation et de structuration de la régions C-terminale du récepteur GHSR reconstitué dans les nanodisques

Nous sommes en train de dessiner une nouvelle construction du récepteur à la ghréline (GHSR) afin de pouvoir à la fois couper la région C-terminale et éventuellement pouvoir

effectuer de nouveau une ligation de la région clivée au récepteur. Pour cela, nous avons le choix entre ajouter simplement un site de clivage à la 3c juste avant la région C-terminale ou alors mettre un site de reconnaissance à la sortase.

Le but est de vérifier que le code de phosphorylation trouvé sur les peptides C-terminaux isolés est le même que celui des régions C-terminales dans le contexte du récepteur en entier. Pour cela, nous phosphorylerons le GHSR avec les kinases produites au laboratoire, puis nous cliverons la partie C-terminale afin d'analyser par RMN les sites de phosphorylation.

Nous étudierons également le récepteur GHSR en entier par RMN. Le récepteur dans les nanodisques est un objet supérieur à 150 kDa, on s'attend à ce que les résidus intégrés dans la région centrale du GHSR perdent complètement leur intensité RMN en raison du caractère «à l'état solide» de ce dernier. En revanche, la région C-terminale flexible doit toujours être visible en raison de sa flexibilité. Dans de telles conditions, nous ne devrions avoir accès qu'aux résonances de la région C-terminale du GHSR entier, si elle n'interagit pas avec le cœur 7TM du GPCR ou avec les nanodisques environnants. Nous devrions donc retrouver l'empreinte RMN des peptides C-terminaux isolés attribués précédemment. En accord avec cette hypothèse, nous avons observé qu'aucun des peptides C-terminaux n'interagissait avec les mélanges lipidiques POPC:POPG ou avec les nanodisques vides de composition lipidique similaire. Pour surmonter le problème des signaux provenant d'une autre partie flexible du GHSR, il sera possible de supprimer dans un premier temps le N-terminal du GHSR.

Cette étude nous permettra de suivre les conséquences structurales de la région C-terminale du GHSR dans le contexte de récepteur entier lors de l'ajout de ligands (agoniste, antagoniste ou agoniste inverse et/ou biaisé (M'Kadmi et al., 2015)) liant la région 7TM et/ou N-terminale.

## 7.1.2 Codes-barres conformationnels des arrestines

### 7.1.2.1 Caractérisation structurale des complexes par analyse RMN: réarrangement local de l'arrestine

Cette partie du projet permettra d'avoir une vision du pendant arrestine lors de son interaction avec les peptides C-terminaux. Dans la partie résultats de ce mémoire, nous avons

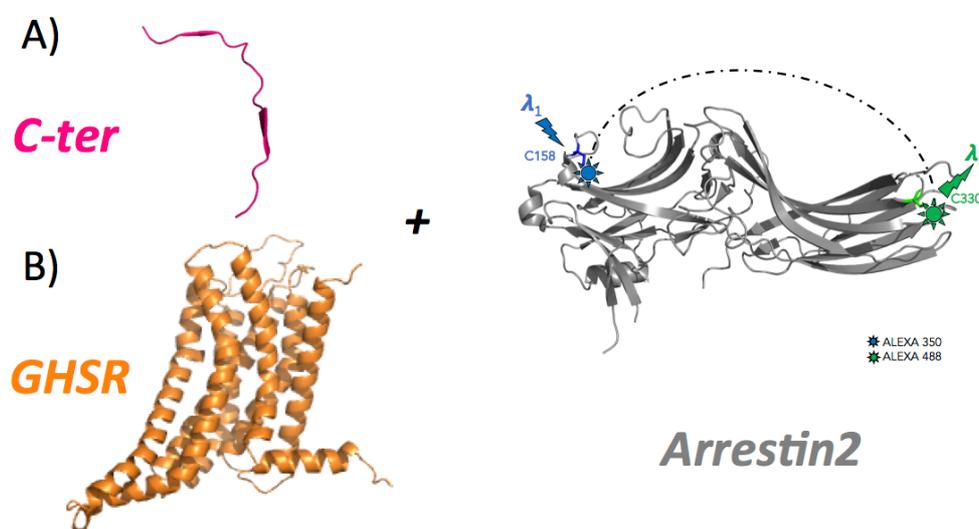
regardé ce système du côté des peptides. L'avantage de cette étude, bien que plus délicate, est que l'on pourra plus aisément saturer le système en peptides et faire une titration de l'interaction par RMN. L'interaction sera caractérisée par l'ajout progressif des peptides C-terminaux des GPCRs non marqués à l'arrestine marquée  $^{15}\text{N}/^2\text{H}$ , puis en suivant les perturbations de déplacement chimique de l'arrestine. La zone d'interaction sera localisée et les changements structuraux mis en évidence par des paramètres RMN nécessaires pour caractériser la conformation de l'arrestine dans le complexe (déplacements chimiques, RDC, PRE). Si des phénomènes d'échange chimique se produisent pendant le processus de liaison, les résonances des résidus en interaction pourraient être élargies au-delà de la détection. Cependant, pour suivre de tels échanges, nous pouvons utiliser des expériences de dispersion de relaxation (Bouvignies et al., 2011) ou CEST (Vallurupalli et al., 2012) qui donnent accès à des états invisibles résultant d'un échange lent ou intermédiaire sur l'échelle de temps de la RMN.

Un exemple intéressant d'étude d'interaction par RMN d'un complexe IDP / protéine phosphorylée a été illustré il y a quelques années dans Nature par Peter Wright, en utilisant un titrage et des données de dispersion de relaxation  $^{15}\text{N}$  (Sugase et al., 2007). Dans notre cas, il est probable que la force d'interaction entre la région C-terminale du GPCR et de l'arrestine soit d'un ordre de grandeur similaire (Vaynberg and Qin, 2006), c'est-à-dire des complexes de faible à moyenne affinité, permettant ainsi à la conformation liée de l'arrestine (en échange rapide par rapport à l'échelle de temps RMN) d'être caractérisée par RMN. Dans ce cas, les investigations RMN révéleront les détails atomiques des réarrangements de l'arrestine sous sa forme liée aux régions C-terminales. La taille du complexe (~ 50 kDa) nécessitera une arrestine perdeutérée afin de diminuer la relaxation transverse qui pourraient gêner l'acquisition du signal, ceci combiné à un spectromètre à champ magnétique très élevé, comme disponible au laboratoire (700 et 800 MHz). La deutération n'est pas un problème ici car l'arrestine est exprimée dans *E. coli*. D'autre part le marquage  $^{15}\text{N}/^2\text{H}$  de l'arrestine a déjà été décrit (Zhuang et al., 2013).

Pour compléter ces données de structuration locale et l'interprétation des résultats RMN, des expériences de réarrangement global de l'arrestine sont décrites dans le paragraphe suivant.

#### 7.1.2.2 Caractérisation structurale des complexes par analyse FRET: réarrangement global de l'arrestine

L'aperçu du réarrangement global de l'arrestine lors de la complexation avec les différents peptides C-terminaux sera cartographié à l'aide de la technique de transfert d'énergie de fluorescence par résonance de type Förster (FRET).



**Figure 28** : Expériences de FRET avec ou sans (1) les peptides C-terminaux ou (2) le récepteur GHSR

Le FRET fournira des indications sur les réarrangements conformationnels subtils de l'arrestine lors de la liaison aux peptides C-terminaux phosphorylés (Figure 28). Pour cela, nous avons des doubles mutants comme le I158C/S330C sans aucune autre cystéine (JL Banères a récupéré des mutants de l'Université de Vanderbilt). Nous utiliserons, un fluorophore donneur (Alexa350) et un fluorophore accepteur (Alexa488), afin d'extraire des distances entre ces sondes à l'aide du FRET. Fait important, la valeur  $R_0$  (rayon de Förster qui représente la distance entre le donneur et l'accepteur pour une efficacité de transfert de 50%) qui est de 50 Å pour la paire de fluorophore choisie, est bien adaptée aux caractéristiques géométriques de l'arrestine. Le dérivé de maléimide des Alexa sera utilisé pour conjuguer le fluorophore aux

deux groupes thiols de l'arrestine (L158C et S330C). Nous aurons donc statistiquement un marquage à 50 % donneur / donneur et accepteur / accepteur et un marquage à 50 % efficace pour le transfert donneur / accepteur.

Les premiers tests effectués avec ce couple n'ont pas donné de différence de distances de FRET entre l'arrestine libre et l'arrestine complexée au récepteur GHSR. En effet, la différence d'efficacité de FRET calculée sur les trajectoires MD n'est pas assez conséquente pour être mesurable (Figure 29A). Pour cela, Matteo Paloni (CBS) a calculé les trajectoires MD de l'arrestine WT sous forme inactive (fermée et non complexée, PDB 1G4M) et de l'arrestine sous forme active (ouverte et complexée, PDB 4JQI) et il a pu en extraire les efficacités de FRET sur différents couples (Figure 29B). Ce travail nous a permis d'identifier au moins deux couples qui pourraient être intéressants en terme de différence de distance de FRET entre l'état actif (complexé) et inactif (non complexé).

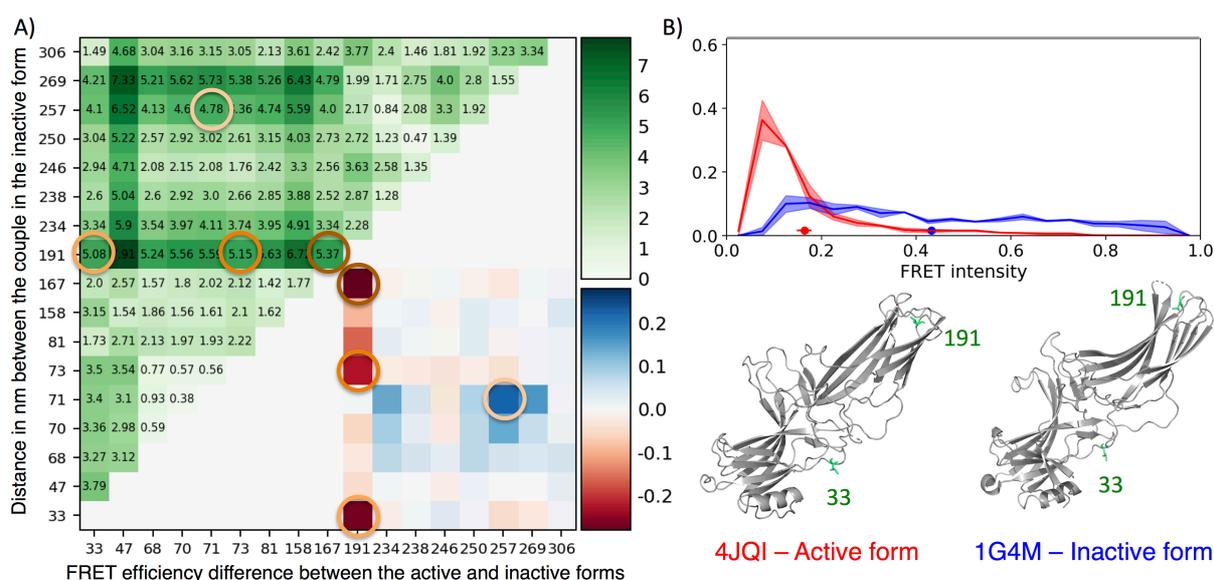


Figure 29 : A) Calcul de l'efficacité de transfert de FRET sur les ensembles des arrestines sous forme active (code PDB : 4JQI) et inactive (code PDB : 1G4M) provenant d'une trajectoire MD ; B) Exemple de calcul d'intensité de FRET de la forme active et inactive pour le couple L33C/L191C

Nous utiliserons aussi la technologie de transfert de luminescence (LRET) pour étudier les changements conformationnels de l'arrestine lors de la liaison aux peptides C-terminaux phosphorylés. Dans ce cas, le donneur (un luminophore) et l'accepteur (fluorophore) seront respectivement un lanthanide « cagé » et une fluorescéine, comme cela a déjà été fait avec le

récepteur de la ghréline (Damian et al., 2015). L'avantage du LRET est que la durée de vie de fluorescence est plus longue, ce qui permet de faire des mesures en temps résolu avec un appareillage plus simple, et donc avoir accès à des populations avec des mesures de distance entre fluorophores plus précises. La valeur  $R_0$  (45 Å) de cette paire de fluorescence est aussi bien adaptée aux caractéristiques géométriques de l'arrestine que le couple précédent. À cet effet, les sondes seront introduites dans l'arrestine en utilisant une combinaison d'une unique cystéine réactive et d'un acide aminé non naturel (azidoF pour un couplage ultérieur du fluorophore en utilisant la chimie-click). Cette chimie de marquage orthogonale offre un moyen très polyvalent pour introduire des sondes à différentes positions.

Les expériences de FRET et LRET décrites précédemment donnent accès à une mesure globale moyennée sur la contribution de toutes les espèces en solution. En ce sens, le smFRET est plus informatif car, au contraire, il donne accès à une mesure qui permet de visualiser chacune des espèces « individuellement », avec leurs caractéristiques intrinsèques. Nous envisagerons donc également des mesures de smFRET, technique disponible au laboratoire dans l'équipe d'Emmanuel Margeat.

Les sondes seront insérées à différentes positions pour obtenir une image globale des réarrangements conformationnels de l'arrestine. Ces positions correspondront à des sites d'arrestine qui ne devraient pas être impliqués dans les interactions avec des récepteurs ou des partenaires physiologiques importants; ils ont été récemment décrits et utilisés pour des mesures BRET *in vivo* (Lee et al., 2016). Dans tous les cas, nous allons d'abord tester si les mutations compromettent le recrutement de l'arrestine en mesurant le recrutement induit par un agoniste *in vitro* et dans des dosages cellulaires (voir la section Boîte à outils). Les signaux LRET/FRET/smFRET seront mesurés pour les différentes sondes en l'absence et en présence des peptides C-terminaux phosphorylés d'une part (Figure 28A) et avec le récepteur en entier d'autre part (Figure 28B). Les distances seront extraites de la courbe de diminution de l'intensité de fluorescence du donneur transférée à l'accepteur. Cela permettra une cartographie globale des changements conformationnels de l'arrestine lors de la liaison aux différents peptides.

En outre, la comparaison des changements de conformation induits par les peptides C-terminaux de classe A et de classe B devrait aider à déterminer si les différents types d'interaction sont associés à des états structuraux de conformation distincts des arrestines.

### 7.1.3 Image globale de l'ensemble du récepteur

#### 7.1.3.1 Caractérisation structurale du GHSR

Une combinaison de rayons X aux petits angles et de diffusion de neutrons (SAXS / SANS) sera utilisée pour étudier la configuration globale du GHSR entier reconstitué dans des nanodisques (ND). Ici, on utilisera le potentiel de la variation de contraste par SANS afin d'extraire individuellement les caractéristiques de chaque élément qui constitue notre système d'étude. Dans ces expériences, une protéine GHSR protonée sera reconstituée dans un nanodisque deutéré ( $^2\text{H}$ -ND). Lise Arleth (Université de Copenhague) a optimisé le niveau de deutération des phospholipides et de la protéine d'échafaudage membranaire (MSP) pour rendre les nanodisques « invisibles » dans les expériences SANS réalisées dans un tampon deutéré à 100 % (Maric et al., 2014). Dans ces conditions expérimentales, les données de SANS fourniront des informations à basse résolution sur la structure 3D du GHSR qui restera le seul composant protoné. Les expériences de SANS seront complétées par des mesures de SAXS afin de mesurer des informations à basse résolution sur le système complet (ND et GHSR) en solution. L'ensemble des données SAXS / SANS sera analysé à l'aide d'outils analytiques hybrides originaux développés par Lise Arleth, combinant une description atomistique de la protéine membranaire et une description géométrique du nanodisque (Skar-Gislinge et al., 2015). Le tout sera combiné avec une approche de modélisation d'ensemble qui inclut des régions partiellement flexibles (Bernado et al., 2007). La disponibilité de modèles d'homologie fiables pour le GHSR facilitera la stratégie de modélisation des données SAXS / SANS.

Les premières caractérisations par SEC-MALS effectuées sur le GHSR reconstitué dans les nanodisques ont montré que les MSPs non circularisables utilisées comme ceinture autour du récepteur et des lipides n'étaient pas les plus adaptées pour des expériences de SAS. En effet, ces expériences demandent de concentrer le récepteur jusqu'à quelques mg/mL. Le

suivi de tailles par SEC-MALS (Tableau 3) montrent que l'objet donne des paramètres de moins en moins cohérents au fur et à mesure de la concentration du récepteur.

	Theoretical		Experimental NDs MSP1D1 Empty			Experimental NDs MSP1D1 Loaded	
	NDs empty	NDs loaded	0.7 (mg/ml)	2.5 (mg/ml)	5 (mg/ml)	0.7 (mg/ml)	3 (mg/ml)
MW totale (Kda)	151	168	170	192	198	244	366
MW proteins (kda)	44	87	52	64	65	42	214
MW lipids (Kda)	107	81	118	128	133	203	152

Tableau 3 : Masses théoriques et extraites de l'analyse de SEC-MALS pour les nanodisques vides (bleu) ou chargés avec GHSR (vert)

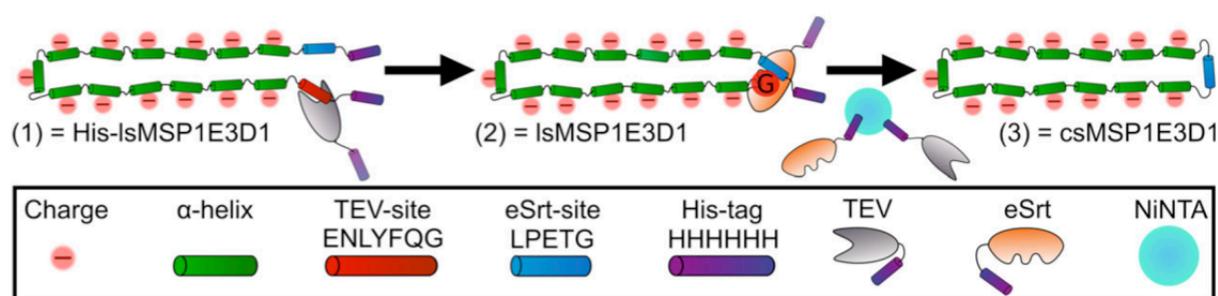


Figure 30 : Image issue de (Johansen et al., 2019). (1) Schématisation d'une MSP1E3D1 dites 'étendue' par rapport à la MSP1D1 dû à la répétition de 3 hélices. Une étiquette Histidine est placée en N-terminal d'un site de coupure à la TEV (= IsMSP1E3D1). (2) Un site de clivage à la sortase est placée en C-terminal et (3) suite au clivage, la MSP est dite circularisée (= csMSP1E3D1)

Ceci nous a conforté dans l'idée d'utiliser des MSPs circularisables (Figure 30, gènes envoyés par Lise Arleth). En effet, les premières courbes de SAXS sur le GHSR reconstitué dans des ND circularisables sont encourageantes et en cours d'analyse.

#### 7.1.3.2 Caractérisation structurale du complexe GHSR:arrestine

L'originalité de l'approche précédente sera de nouveau utilisée pour caractériser le complexe GHSR:arrestine. En supposant que le domaine 7TM du GHSR ne subisse pas de changement structural majeur lors de la reconnaissance de l'arrestine, l'analyse des données

SAXS du complexe sondera directement la position de l'arrestine dans le contexte du GHSR reconstitué dans les ND.

Si nécessaire, une deutération spécifique sur l'un ou l'autre des partenaires en interaction sera tentée afin de localiser plus précisément l'arrestine liée en utilisant les expériences de variation de contraste par SANS décrite précédemment.

### 7.1.3.3 Conclusions

Cette étude nous fournira un modèle structural pour le GHSR entier et son complexe avec arrestine. L'utilisation de nanodisques, qui imite l'environnement biologique, garantit en partie la pertinence du modèle résultant. En mettant en place ces expériences, nous pourrons ensuite sonder structurellement les phénomènes d'association / dissociation de l'arrestine lors de l'ajout de ligand diverse (agoniste, antagoniste, agoniste inverse, agoniste biaisé, etc ...). Ceci permettrait d'étudier les bases structurales des ligands pharmacologiques développés à l'IBMM pour le GHSR.

En parallèle, nous testerons des grilles de microscopie électronique pour avoir des images de cryoEM sur la plateforme disponible au laboratoire.

### 7.1.4 Caractérisation structurale de la région C-terminale des arrestines

Comme nous l'avons vu précédemment, l'arrestine possède une extrémité C-terminale qui se détache du cœur polaire de son domaine N-terminal ([Figure 14](#) et voir [Annexe A](#) pour plus de détails sur le système). Cette extrémité se comporte donc comme une IDR avec des régions importantes pour l'interaction avec certains effecteurs de la signalisation GPCR ([Gurevich et al., 2018](#)). Le but de cette partie du projet est donc de mettre en lumière ces régions et ces interactions.

#### 7.1.4.1 Caractérisation structurale par analyse RMN: réarrangement local de la région C-terminale de l'arrestine

La caractérisation structurale de cette extrémité C-terminale de l'arrestine se fera de la même façon que celle décrite dans les résultats des régions C-terminale des GPCRs ([Chapitre 5.2](#) et pour une revue voir [Annexe C](#) et [E](#)).

#### 7.1.4.2 Caractérisation structurale des complexes arrestine:effecteurs

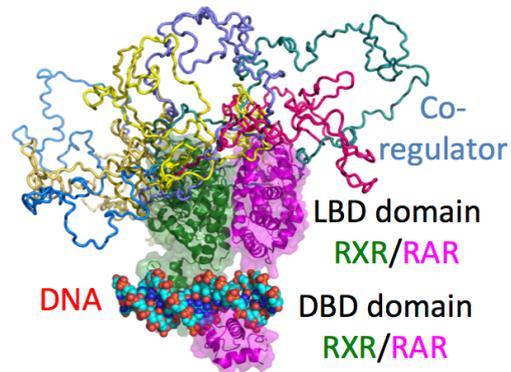
La liaison de l'arrestine sur les RCPG favorise leur entrée dans la voie d'endocytose via les puits recouverts de clathrine. En effet, l'arrestine interagit avec la sous-unité  $\beta$  d'AP-2 et cette protéine adaptatrice établit un pont moléculaire entre le complexe récepteur- $\beta$ -arrestine et la principale protéine du manteau de la vésicule d'endocytose, la clathrine. Une fois le compartiment endosomique atteint, le devenir des récepteurs internalisés est variable. Le plus souvent, les récepteurs sont déphosphorylés et recyclés vers la membrane plasmique, où ils peuvent à nouveau être stimulés. Du fait de spécificités de structure propres, certains récepteurs ne recyclent pas et sont dirigés vers le compartiment lysosomal pour y être dégradés. Les mécanismes moléculaires qui dirigent les récepteurs vers les lysosomes semblent multiples, incluant une forte affinité pour les arrestines, l'ubiquitinylation de la région cytoplasmique, ou l'association avec des protéines de tri, comme la GASP (G protein-coupled receptor associated sorting protein).

L'élucidation de ces complexes passera par les différentes étapes déjà décrites dans ce mémoire pour l'interaction avec la région C-terminale des GPCR avec l'arrestine (pour une revue voir [Annexe A](#) et [C](#)).

#### 7.1.5 Conclusions

Il est très intrigant de voir que les régions C-terminales des GPCRs, à l'intérieur même d'une seule classe, possèdent des homologies de séquence aussi faibles alors qu'elles reconnaissent toutes le même partenaire arrestine. Nous espérons que nos révélations structurales arriveront à nous faire avancer dans la compréhension des mécanismes sous-jacents au déclenchement sélectif des différentes fonctions dépendantes de l'arrestine via des phospho-barcodes certainement extraordinairement bien orchestrés.

## 7.2 Les régions flanquantes et désordonnées de co-régulateurs dans la modulation de la transcription des gènes cibles de RXR/RAR



Comme vu au [Chapitre 6](#), nous collaborons avec William Bourguet et Albane le Maire sur leur sujet biologique. Nous complétons leur expertise en cristallographie des récepteurs nucléaires (NR) avec des aspects de désordres qui interviennent dans les co-régulateurs de ces systèmes de modulation de la transcription de gènes spécifiques au NR étudié.

Pour compléter nos résultats obtenus jusque là, nous visons à décrypter l'origine de la sélectivité entre les différents NR. En effet, les régions flanquantes ont déjà été désignées comme responsables de la sélectivité et spécificité des co-régulateurs envers leur NR. Cependant, aucune preuve structurale n'avait été mise en évidence avant notre étude ( et [Annexe B](#)). Ainsi, nous aimerions continuer notre étude pour décrypter le rôle des régions flanquantes des différentes familles de co-activateurs dans la sélectivité des NR.

D'autre part, nous visons aussi à approfondir la description structurale de l'interaction par RMN de TIF2 et des mutants de TIF2 avec RXR/RAR, en utilisant des expériences de PRE afin de discriminer l'orchestration des NR-boxes sur le complexe. Cette orchestration n'a toujours pas été clairement élucidée. Ensuite, comme nous l'avons fait pour N-CoR ([Annexe F](#)), nous utiliserons les application du SAXS et de la modélisation atomistique pour discriminer les formes potentielles du complexe entre TIF2 et RXR/RAR.

Et finalement, nous visons l'étude des complexes des co-régulateurs avec RXR/RAR en entier, i.e. avec le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et le domaine de liaison au ligand (LBD) du NR, et ce, en interaction avec l'ADN.

### 7.3 Conclusions et perspectives à plus long terme

Les projets GPCteR et NR visent à déchiffrer les mécanismes moléculaires sous-jacents à, respectivement, la voie de signalisation arrestine des GPCRs et la régulation de la transcription de gènes cibles.

Au final, nous espérons que les projets GPCteR et NR offriront toutes les pièces pour reconstruire le puzzle 3D de l'interactome d'un GPCR et d'un NR et à l'avenir, que ces informations seront essentielles pour comprendre et moduler rationnellement la transduction du signal cellulaire d'une part et la transcription de gènes cibles d'autre part.

Ces missions ambitieuses seront accomplies par une approche intégrative et multidisciplinaire qui réunit l'expertise de plusieurs équipes complémentaires. En plus de nos expertises, nous souhaitons nous former et utiliser la plate-forme de cryo-microscopie électronique qui se développe au laboratoire pour commencer à dépister les meilleures conditions pour nos échantillons afin de pouvoir obtenir des structures 3D de nos complexes.

Les complexes comprenant des régions désordonnées montrent souvent de courts motifs de reconnaissance encadrés par un environnement flexible et de séquence variable qui peut conduire à une malléabilité structurale et fonctionnelle.

Les bénéfices de la flexibilité structurale, de l'adaptabilité et de l'évolutionabilité procurés par les protéines désordonnées est visible à tous les niveaux de la régulation de la transcription des gènes et/ou de la modulation de la signalisation cellulaire en général.

Les IDPs et IDRs évoluent généralement plus rapidement que leurs homologues structurés. Cependant ce n'est pas toujours le cas mais ceci reste encore mal compris ([Brown et al., 2002](#); [Lee et al., 2015](#)). En explorant les questions soulevées dans ce mémoire, nous espérons que nous serons en mesure de mieux comprendre l'évolution moléculaire des protéines/régions intrinsèquement désordonnées que l'on a explorées. Cependant, il faudra faire des efforts en ce sens car les bases structurales ne pourront pas tout expliquer. Des études de phylogénie et d'évolution seront essentielles, mais également des études de co-évolution entre partenaires.



---

## Références

- Banères J-L, Popot J-L, Mouillac B. 2011. New advances in production and functional folding of G-protein-coupled receptors. *Trends Biotechnol* **29**:314–322. doi:10.1016/j.tibtech.2011.03.002
- Bayburt TH, Vishnivetskiy SA, McLean MA, Morizumi T, Huang C-C, Tesmer JGG, Ernst OP, Sligar SG, Gurevich V V. 2011. Monomeric rhodopsin is sufficient for normal rhodopsin kinase (GRK1) phosphorylation and arrestin-1 binding. *J Biol Chem* **286**:1420–1428. doi:10.1074/jbc.M110.151043
- Bernado P, Mylonas E, Petoukhov M V, Blackledge M, Svergun DI. 2007. Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering. *J Am Chem Soc* **129**:5656–5664. doi:10.1021/ja069124n
- Borshchevskiy V, Buldt G. 2013. Structural biology: Active arrestin proteins crystallized. *Nature* **497**:45–46.
- Bouvignies G, Vallurupalli P, Hansen DF, Correia BE, Lange O, Bah A, Vernon RM, Dahlquist FW, Baker D, Kay LE. 2011. Solution structure of a minor and transiently formed state of a T4 lysozyme mutant. *Nature* **477**:111–4. doi:10.1038/nature10349
- Bouzo-Lorenzo M, Santo-Zas I, Lodeiro M, Nogueiras R, Casanueva FF, Castro M, Pazos Y, Tobin AB, Butcher AJ, Camina JP. 2016. Distinct phosphorylation sites on the ghrelin receptor, GHSR1a, establish a code that determines the functions of ss-arrestins. *Sci Rep* **6**:22495. doi:10.1038/srep22495
- Brown CJ, Takayama S, Campen AM, Vise P, Marshall TW, Oldfield CJ, Williams CJ, Keith Dunker A. 2002. Evolutionary Rate Heterogeneity in Proteins with Long Disordered Regions. *J Mol Evol* **55**:104–110. doi:10.1007/s00239-001-2309-6
- Cahill TJ 3rd, Thomsen ARB, Tarrasch JT, Plouffe B, Nguyen AH, Yang F, Huang L-Y, Kahsai AW, Bassoni DL, Gavino BJ, Lamerdin JE, Triest S, Shukla AK, Berger B, Little J 4th, Antar A, Blanc A, Qu C-X, Chen X, Kawakami K, Inoue A, Aoki J, Steyaert J, Sun J-P, Bouvier M, Skiniotis G, Lefkowitz RJ. 2017. Distinct conformations of GPCR-beta-arrestin complexes mediate desensitization, signaling, and endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**:2562–2567. doi:10.1073/pnas.1701529114
- Casiraghi M, Damian M, Lescop E, Point E, Moncoq K, Morellet N, Levy D, Marie J, Guittet E, Baneres J-

## Références

---

- L, Catoire LJ. 2016. Functional Modulation of a G Protein-Coupled Receptor Conformational Landscape in a Lipid Bilayer. *J Am Chem Soc* **138**:11170–11175. doi:10.1021/jacs.6b04432
- Catoire LJ, Damian M, Giusti F, Martin A, van Heijenoort C, Popot J-L, Guittet E, Baneres J-L. 2010. Structure of a GPCR ligand in its receptor-bound state: leukotriene B4 adopts a highly constrained conformation when associated to human BLT2. *J Am Chem Soc* **132**:9049–9057. doi:10.1021/ja101868c
- Champier L, Sibille N, Bersch B, Brutscher B, Blackledge M, Covès J. 2002. Reactivity, secondary structure, and molecular topology of the Escherichia coli sulfite reductase flavodoxin-like domain. *Biochemistry* **41**:3770–3780.
- Chen Y-J, Oldfield S, Butcher AJ, Tobin AB, Saxena K, Gurevich V V, Benovic JL, Henderson G, Kelly E. 2013. Identification of phosphorylation sites in the COOH-terminal tail of the mu-opioid receptor. *J Neurochem* **124**:189–199. doi:10.1111/jnc.12071
- Cordeiro Tiago N., Chen P, De Biasio A, Sibille N, Blanco FJ, Hub JS, Crehuet R, Bernadó P. 2017a. Disentangling polydispersity in the PCNA–p15PAF complex, a disordered, transient and multivalent macromolecular assembly. *Nucleic Acids Res* **45**:1501–1515. doi:10.1093/nar/gkw1183
- Cordeiro Tiago N., Herranz-Trillo F, Urbanek A, Estaña A, Cortés J, Sibille N, Bernadó P. 2017b. Structural characterization of highly flexible proteins by small-angle scattering *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC. pp. 107–129. doi:10.1007/978-981-10-6038-0\_7
- Cordeiro Tiago N, Herranz-Trillo F, Urbanek A, Estaña A, Cortés J, Sibille N, Bernadó P. 2017. Small-angle scattering studies of intrinsically disordered proteins and their complexes. *Curr Opin Struct Biol* **42**:15–23. doi:10.1016/j.sbi.2016.10.011
- Cordeiro TN, Sibille N, Germain P, Barthe P, Boulahtouf A, Allemand F, Bailly R, Vivat V, Ebel C, Barducci A, Bourguet W, le Maire A, Bernadó P. 2019. Interplay of Protein Disorder in Retinoic Acid Receptor Heterodimer and Its Corepressor Regulates Gene Expression. *Structure* **27**:1270-1285.e6. doi:10.1016/j.str.2019.05.001
- Cordier F, Chaffotte A, Terrien E, Prehaud C, Theillet F-X, Delepierre M, Lafon M, Buc H, Wolff N. 2012. Ordered phosphorylation events in two independent cascades of the PTEN C-tail revealed by NMR. *J Am Chem Soc* **134**:20533–20543. doi:10.1021/ja310214g
- Daccache A, Lion C, Sibille N, Gerard M, Slomianny C, Lippens G, Cotelle P. 2011. Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. *Neurochem Int* **58**:700–707.
- Damian M, Marie J, Leyris J-P, Fehrentz J-A, Verdie P, Martinez J, Baneres J-L, Mary S. 2012. High

- constitutive activity is an intrinsic feature of ghrelin receptor protein: a study with a functional monomeric GHS-R1a receptor reconstituted in lipid discs. *J Biol Chem* **287**:3630–3641. doi:10.1074/jbc.M111.288324
- Damian M, Mary S, Maingot M, M’Kadmi C, Gagne D, Leyris J-P, Denoyelle S, Gaibelet G, Gavara L, Garcia de Souza Costa M, Perahia D, Trinquet E, Mouillac B, Galandrin S, Gales C, Fehrentz J-A, Floquet N, Martinez J, Marie J, Baneres J-L. 2015. Ghrelin receptor conformational dynamics regulate the transition from a preassembled to an active receptor:Gq complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**:1601–1606. doi:10.1073/pnas.1414618112
- De Biasio A, Ibáñez De Opakua A, Cordeiro TN, Villate M, Merino N, Sibille N, Lelli M, Diercks T, Bernadó P, Blanco FJ. 2014. P15PAF Is an intrinsically disordered protein with nonrandom structural preferences at sites of interaction with other proteins. *Biophys J* **106**:865–874. doi:10.1016/j.bpj.2013.12.046
- Delaforge E, Cordeiro TN, Bernadó P, Sibille N. 2018. Conformational characterization of intrinsically disordered proteins and its biological significance Modern Magnetic Resonance. Springer International Publishing. pp. 381–399. doi:10.1007/978-3-319-28388-3\_52
- Dosset P, Hus JC, Marion D, Blackledge M. 2001. A novel interactive tool for rigid-body modeling of multi-domain macromolecules using residual dipolar couplings. *J Biomol NMR* **20**:223–31.
- Eisenmesser EZ, Bosco DA, Akke M, Kern D. 2002. Enzyme Dynamics During Catalysis. *Science (80- )* **295**:1520 LP – 1523. doi:10.1126/science.1066176
- Estaña A, Barozet A, Mouhand A, Vaisset M, Zanon C, Fauret P, Sibille N, Bernadó P, Cortés J. 2020. Predicting secondary structure propensities in IDPs using simple statistics from three-residue fragments. *J Mol Biol*. doi:10.1016/j.jmb.2020.07.026
- Estaña A, Molloy K, Vaisset M, Sibille N, Siméon T, Bernadó P, Cortés J. 2018. Hybrid parallelization of a multi-tree path search algorithm: Application to highly-flexible biomolecules. *Parallel Comput* **77**:84–100.
- Estaña A, Sibille N, Delaforge E, Vaisset M, Cortés J, Bernadó P. 2019. Realistic Ensemble Models of Intrinsically Disordered Proteins Using a Structure-Encoding Coil Database. *Structure* **27**:381-391.e2. doi:10.1016/j.str.2018.10.016
- Evron T, Peterson SM, Urs NM, Bai Y, Rochelle LK, Caron MG, Barak LS. 2014. G Protein and beta-arrestin signaling bias at the ghrelin receptor. *J Biol Chem* **289**:33442–33455. doi:10.1074/jbc.M114.581397
- Fauquant C, Redeker V, Landrieu I, Wieruszeski J-M, Verdegem D, Laprévotte O, Lippens G, Gigant B,

## Références

---

- Knossow M. 2011. Systematic identification of tubulin-interacting fragments of the microtubule-associated protein Tau leads to a highly efficient promoter of microtubule assembly. *J Biol Chem* **286**:33358–33368. doi:10.1074/jbc.M111.223545
- Gillespie JR, Shortle D. 1997. Characterization of long-range structure in the denatured state of staphylococcal nuclease. I. Paramagnetic relaxation enhancement by nitroxide spin labels. *J Mol Biol* **268**:158–69. doi:10.1006/jmbi.1997.0954
- Granzin J, Wilden U, Choe HW, Labahn J, Krafft B, Buldt G. 1998. X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments. *Nature* **391**:918–921. doi:10.1038/36147
- Gruetz a, Pignol D, Zeghouf M, Covès J, Fontecave M, Ferrer JL, Fontecilla-Camps JC. 2000. Four crystal structures of the 60 kDa flavoprotein monomer of the sulfite reductase indicate a disordered flavodoxin-like module. *J Mol Biol* **299**:199–212. doi:10.1006/jmbi.2000.3748
- Guillien M, le Maire A, Mouhand A, Bernadó P, Bourguet W, Banères J-L, Sibille N. 2020. IDPs and their complexes in GPCR and nuclear receptor signaling. *Prog Mol Biol Transl Sci* **174**:105–155. doi:10.1016/bs.pmbts.2020.05.001
- Gurevich V V., Gurevich E V., Uversky VN. 2018. Arrestins: structural disorder creates rich functionality. *Protein Cell* **9**:986–1003. doi:10.1007/s13238-017-0501-8
- Hirsch JA, Schubert C, Gurevich V V, Sigler PB. 1999. The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell* **97**:257–269.
- Jean-Alphonse F, Perkowska S, Frantz M-C, Durroux T, Méjean C, Morin D, Loison S, Bonnet D, Hibert M, Mouillac B, Mendre C. 2009. Biased agonist pharmacochaperones of the AVP V2 receptor may treat congenital nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* **20**:2190–203. doi:10.1681/ASN.2008121289
- Johansen NT, Tidemand FG, Nguyen TTTN, Rand KD, Pedersen MC, Arleth L. 2019. Circularized and solubility-enhanced MSPs facilitate simple and high-yield production of stable nanodiscs for studies of membrane proteins in solution. *FEBS J* **286**:1734–1751. doi:10.1111/febs.14766
- Jung Y-S, Zweckstetter M. 2004. Mars -- robust automatic backbone assignment of proteins. *J Biomol NMR* **30**:11–23. doi:10.1023/B:JNMR.0000042954.99056.ad
- Kang Y, Zhou XE, Gao X, He Y, Liu W, Ishchenko A, Barty A, White TA, Yefanov O, Han GW, Xu Q, de Waal PW, Ke J, Tan MHE, Zhang C, Moeller A, West GM, Pascal BD, Van Eps N, Caro LN, Vishnivetskiy SA, Lee RJ, Suino-Powell KM, Gu X, Pal K, Ma J, Zhi X, Boutet S, Williams GJ, Messerschmidt M, Gati C, Zatsepin NA, Wang D, James D, Basu S, Roy-Chowdhury S, Conrad CE, Coe J, Liu H, Lisova S, Kupitz C, Grotjohann I, Fromme R, Jiang Y, Tan M, Yang H, Li J, Wang M,

- Zheng Z, Li D, Howe N, Zhao Y, Standfuss J, Diederichs K, Dong Y, Potter CS, Carragher B, Caffrey M, Jiang H, Chapman HN, Spence JCH, Fromme P, Weierstall U, Ernst OP, Katritch V, Gurevich V V., Griffin PR, Hubbell WL, Stevens RC, Cherezov V, Melcher K, Xu HE. 2015. Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature* **523**:561–567. doi:10.1038/nature14656
- Kim YJ, Hofmann KP, Ernst OP, Scheerer P, Choe H-W, Sommer ME. 2013. Crystal structure of pre-activated arrestin p44. *Nature* **497**:142–146.
- Lagerstrom MC, Schiöth HB. 2008. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **7**:339–357. doi:10.1038/nrd2518
- Lally CCM, Bauer B, Selent J, Sommer ME. 2017. C-edge loops of arrestin function as a membrane anchor. *Nat Commun* **8**:14258. doi:10.1038/ncomms14258
- Landrieu I, Lacosse L, Leroy A, Wieruszeski J-M, Trivelli X, Sillen A, Sibille N, Schwalbe H, Saxena K, Langer T, Lippens G. 2006. NMR analysis of a Tau phosphorylation pattern. *J Am Chem Soc* **128**:3575–3583.
- Landrieu I, Leroy A, Smet-Nocca C, Huvent I, Amniai L, Hamdane M, Sibille N, Buée L, Wieruszeski J-M, Lippens G. 2010. NMR spectroscopy of the neuronal tau protein: normal function and implication in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* **38**:1006–1011.
- Lee M-H, Appleton KM, Strungs EG, Kwon JY, Morinelli TA, Peterson YK, Laporte SA, Luttrell LM. 2016. The conformational signature of beta-arrestin2 predicts its trafficking and signalling functions. *Nature* **531**:665–668. doi:10.1038/nature17154
- Lee R Van Der, Buljan M, Lang B, Weatheritt RJ, Daughdrill GW, Dunker AK, Fuxreiter M, Gough J, Gsponer J, Jones DT, Kim PM, Kriwacki RW, Old CJ, Pappu R V, Tompa P, Uversky VN, Wright PE, Babu MM. 2015. Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins.
- Lippens G, Sillen A, Landrieu I, Amniai L, Sibille N, Barbier P, Leroy A, Hanouille X, Wieruszeski J. 2007. Tau Aggregation in Alzheimer's Disease What Role for Phosphorylation? *Prion* **1**:21–25. doi:10.4161/pri.1.1.4055
- Logez C, Damian M, Legros C, Dupre C, Guery M, Mary S, Wagner R, M'Kadmi C, Nosjean O, Fould B, Marie J, Fehrentz J-A, Martinez J, Ferry G, Boutin JA, Baneres J-L. 2016. Detergent-free Isolation of Functional G Protein-Coupled Receptors into Nanometric Lipid Particles. *Biochemistry* **55**:38–48. doi:10.1021/acs.biochem.5b01040
- Luttrell LM, Kenakin TP. 2011. Refining efficacy: allosterism and bias in G protein-coupled receptor signaling. *Methods Mol Biol* **756**:3–35. doi:10.1007/978-1-61779-160-4\_1

## Références

---

- M'Kadmi C, Leyris J-P, Onfroy L, Gales C, Sauliere A, Gagne D, Damian M, Mary S, Maingot M, Denoyelle S, Verdie P, Fehrentz J-A, Martinez J, Baneres J-L, Marie J. 2015. Agonism, Antagonism, and Inverse Agonism Bias at the Ghrelin Receptor Signaling. *J Biol Chem* **290**:27021–27039. doi:10.1074/jbc.M115.659250
- Maric S, Skar-Gislinge N, Midtgaard S, Thygesen MB, Schiller J, Frielinghaus H, Moulin M, Haertlein M, Forsyth VT, Pomorski TG, Arleth L. 2014. Stealth carriers for low-resolution structure determination of membrane proteins in solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **70**:317–328. doi:10.1107/S1399004713027466
- Mayer D, Damberger FF, Samarasimhareddy M, Feldmueller M, Vuckovic Z, Flock T, Bauer B, Mutt E, Zosel F, Allain FHT, Standfuss J, Schertler GFX, Deupi X, Sommer ME, Hurevich M, Friedler A, Veprintsev DB. 2019. Distinct G protein-coupled receptor phosphorylation motifs modulate arrestin affinity and activation and global conformation. *Nat Commun* **10**:1–14. doi:10.1038/s41467-019-09204-y
- Montgomery CR. 2016. Protein-protein interactions (PPIs): Types, methods for detection and analysis. *Protein-Protein Interact Types, Methods Detect Anal* **59**:1–165.
- Morató A, Elena-Real CA, Popovic M, Fournet A, Zhang K, Allemand F, Sibille N, Urbanek A, Bernadó P. 2020. Robust Cell-Free Expression of Sub-Pathological and Pathological Huntingtin Exon-1 for NMR Studies. General Approaches for the Isotopic Labeling of Low-Complexity Proteins. *Biomolecules* **10**. doi:10.3390/biom10101458
- Narayanan RL, Durr UHN, Bibow S, Biernat J, Mandelkow E, Zweckstetter M. 2010. Automatic assignment of the intrinsically disordered protein Tau with 441-residues. *J Am Chem Soc* **132**:11906–11907. doi:10.1021/ja105657f
- Nobles Kelly N, Guan Z, Xiao K, Oas TG, Lefkowitz RJ. 2007. The active conformation of beta-arrestin1: direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins1 and -2. *J Biol Chem* **282**:21370–21381. doi:10.1074/jbc.M611483200
- Nobles Kelly N., Guan Z, Xiao K, Oas TG, Lefkowitz RJ. 2007. The active conformation of  $\beta$ -arrestin1: Direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of  $\beta$ -arrestins1 and -2. *J Biol Chem* **282**:21370–21381. doi:10.1074/jbc.M611483200
- Nobles KN, Xiao K, Ahn S, Shukla AK, Lam CM, Rajagopal S, Strachan RT, Huang T-Y, Bressler EA, Hara MR, Shenoy SK, Gygi SP, Lefkowitz RJ. 2011. Distinct phosphorylation sites on the beta(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of beta-arrestin. *Sci*

- Signal* **4**:ra51. doi:10.1126/scisignal.2001707
- Oakley RH, Revollo J, Cidlowski JA. 2012. Glucocorticoids regulate arrestin gene expression and redirect the signaling profile of G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:17591–17596. doi:10.1073/pnas.1209411109
- Ozenne V, Bauer F, Salmon L, Huang J-R, Jensen MR, Segard S, Bernado P, Charavay C, Blackledge M. 2012. Flexible-meccano: a tool for the generation of explicit ensemble descriptions of intrinsically disordered proteins and their associated experimental observables. *Bioinformatics* **28**:1463–1470. doi:10.1093/bioinformatics/bts172
- Pearlman SM, Serber Z, Ferrell JE. 2011. A Mechanism for the Evolution of Phosphorylation Sites. *Cell* **147**:934–946. doi:10.1016/j.cell.2011.08.052
- Prihandoko R, Alvarez-Curto E, Hudson BD, Butcher AJ, Ulven T, Miller AM, Tobin AB, Milligan G. 2016. Distinct Phosphorylation Clusters Determine the Signaling Outcome of Free Fatty Acid Receptor 4/G Protein-Coupled Receptor 120. *Mol Pharmacol* **89**:505–520. doi:10.1124/mol.115.101949
- Rasmussen SGF, DeVree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, Thian FS, Chae PS, Pardon E, Calinski D, Mathiesen JM, Shah STA, Lyons JA, Caffrey M, Gellman SH, Steyaert J, Skiniotis G, Weis WI, Sunahara RK, Kobilka BK. 2011. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**:549–555. doi:10.1038/nature10361
- Senicourt L, Maire A le, Allemand F, Carvalho JE, Guee L, Germain P, Schubert M, Bernado P, Bourguet W, Sibille N. 2020. Structural insights into the cooperative interaction of the intrinsically disordered co-activator TIF2 with retinoic acid receptor heterodimer (RXR/RAR). *bioRxiv* 2020.10.28.359091. doi:10.1101/2020.10.28.359091
- Shukla AK, Manglik A, Kruse AC, Xiao K, Reis RI, Tseng W-C, Staus DP, Hilger D, Uysal S, Huang L-Y, Paduch M, Tripathi-Shukla P, Koide A, Koide S, Weis WI, Kossiakoff AA, Kobilka BK, Lefkowitz RJ. 2013. Structure of active beta-arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature* **497**:137–141. doi:10.1038/nature12120
- Shukla AK, Westfield GH, Xiao K, Reis RI, Huang L-Y, Tripathi-Shukla P, Qian J, Li S, Blanc A, Oleskie AN, Dosey AM, Su M, Liang C-R, Gu L-L, Shan J-M, Chen X, Hanna R, Choi M, Yao XJ, Klink BU, Kahsai AW, Sidhu SS, Koide S, Penczek PA, Kossiakoff AA, Jr VLW, Kobilka BK, Skiniotis G, Lefkowitz RJ. 2014. Visualization of arrestin recruitment by a G Protein-Coupled Receptor. *Nature* **512**:218–222. doi:10.1038/nature13430
- Sibille N, Bernadó P. 2012. Structural characterization of intrinsically disordered proteins by the combined use of NMR and SAXS. *Biochem Soc Trans* **40**:955–62. doi:10.1042/BST20120149

## Références

---

- Sibille N, Bersch B, Covès J, Blackledge M, Brutscher B. 2002. Side chain orientation from methyl  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  residual dipolar couplings measured in highly deuterated proteins. *J Am Chem Soc* **124**:14616–25.
- Sibille N, Blackledge M, Brutscher B, Covès J, Bersch B. 2005. Solution Structure of the Sulfite Reductase Flavodoxin-like Domain from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **44**:9086–9095. doi:10.1021/bi050437p
- Sibille Nathalie, Cov J, Marion D, Brutscher B, Bersch B. 2001. Letter to the Editor :  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  assignment of the flavodoxin-like domain of the *Escherichia coli* sulfite reductase. *J Biomol NMR* **21**:71–72.
- Sibille N, Favier A, Azuaga AI, Ganshaw G, Bott R, Bonvin AMJJ, Boelens R, Van Nuland NAJ. 2006a. Comparative NMR study on the impact of point mutations on protein stability of *Pseudomonas mendocina* lipase. *Protein Sci* **15**:1915–1927.
- Sibille N, Hanouille X, Bonachera F, Verdegem D, Landrieu I, Wieruszkeski J-M, Lippens G. 2009. Selective backbone labelling of ILV methyl labelled proteins. *J Biomol NMR* **43**:219–227.
- Sibille N, Huvent I, Fauquant C, Verdegem D, Amniai L, Leroy A, Wieruszkeski J-M, Lippens G, Landrieu I. 2012. Structural characterization by nuclear magnetic resonance of the impact of phosphorylation in the proline-rich region of the disordered Tau protein. *Proteins* **80**:454–462. doi:10.1002/prot.23210
- Sibille N, Pardi a, Simorre JP, Blackledge M. 2001. Refinement of local and long-range structural order in theophylline-binding RNA using  $(^{13}\text{C})$ - $(^1\text{H})$  residual dipolar couplings and restrained molecular dynamics. *J Am Chem Soc* **123**:12135–46.
- Sibille N, Sillen A, Leroy A, Wieruszkeski J-M, Mulloy B, Landrieu I, Lippens G. 2006b. Structural impact of heparin binding to full-length Tau as studied by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **45**:12560–72. doi:10.1021/bi060964o
- Skar-Gislinge N, Kynde SAR, Denisov IG, Ye X, Lenov I, Sligar SG, Arleth L. 2015. Small-angle scattering determination of the shape and localization of human cytochrome P450 embedded in a phospholipid nanodisc environment. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **71**:2412–2421. doi:10.1107/S1399004715018702
- Sugase K, Dyson HJ, Wright PE. 2007. Mechanism of coupled folding and binding of an intrinsically disordered protein. *Nature* **447**:1021–1025. doi:10.1038/nature05858
- Tompa P, Fuxreiter M. 2007. Fuzzy complexes : polymorphism and structural disorder in protein – protein interactions. *Trends Biochem Sci* **33**:2–8. doi:10.1016/j.tibs.2007.10.003

- Tompa P, Schad E, Tantos A, Kalmar L. 2015. Intrinsically disordered proteins : emerging interaction specialists. *Curr Opin Struct Biol* **35**:49–59.
- Urbanek A, Elena-Real CA, Popovic M, Morató A, Fournet A, Allemand F, Delbecq S, Sibille N, Bernadó P. 2019. Site-Specific Isotopic Labeling (SSIL): Access to High-Resolution Structural and Dynamic Information in Low-Complexity Proteins. *ChemBioChem*. doi:10.1002/cbic.201900583
- Urbanek A, Morató A, Allemand F, Delaforge E, Fournet A, Popovic M, Delbecq S, Sibille N, Bernadó P. 2018. A General Strategy to Access Structural Information at Atomic Resolution in Polyglutamine Homorepeats. *Angew Chemie - Int Ed*. doi:10.1002/anie.201711530
- Urbanek A, Popovic M, Elena-Real CA, Morató A, Estaña A, Fournet A, Allemand F, Gil AM, Cativiela C, Cortés J, Jiménez AI, Sibille N, Bernadó P. 2020a. Evidence of the Reduced Abundance of Proline cis Conformation in Protein Poly Proline Tracts. *J Am Chem Soc* **142**:7976–7986. doi:10.1021/jacs.0c02263
- Urbanek A, Popovic M, Morató A, Estaña A, Elena-Real CA, Mier P, Fournet A, Allemand F, Delbecq S, Andrade-Navarro MA, Cortés J, Sibille N, Bernadó P. 2020b. Flanking Regions Determine the Structure of the Poly-Glutamine in Huntingtin through Mechanisms Common among Glutamine-Rich Human Proteins. *Structure* **28**:733-746.e5. doi:10.1016/j.str.2020.04.008
- Vallurupalli P, Bouvignies G, Kay LE. 2012. Studying “invisible” excited protein states in slow exchange with a major state conformation. *J Am Chem Soc* **134**:8148–8161. doi:10.1021/ja3001419
- Vanbelle C, Brutscher B, Blackledge M, Muhle-Goll C, Řmý MH, Masson JM, Marion D. 2003. NMR study of the interaction between Zn(II) ligated bleomycin and *Streptoalloteichus hindustanus* Bleomycin resistance protein. *Biochemistry* **42**:651–663. doi:10.1021/bi0267341
- Vaynberg J, Qin J. 2006. Weak protein-protein interactions as probed by NMR spectroscopy. *Trends Biotechnol* **24**:22–7. doi:10.1016/j.tibtech.2005.09.006
- Whalen EJ, Rajagopal S, Lefkowitz RJ. 2011. Therapeutic potential of beta-arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends Mol Med* **17**:126–139. doi:10.1016/j.molmed.2010.11.004
- Willets JM, Challiss RA, Kelly E, Nahorski SR. 2001. G protein-coupled receptor kinases 3 and 6 use different pathways to desensitize the endogenous M3 muscarinic acetylcholine receptor in human SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol* **60**:321–330.
- Wisler JW, Xiao K, Thomsen ARB, Lefkowitz RJ. 2014. Recent developments in biased agonism. *Curr Opin Cell Biol* **27**:18–24. doi:10.1016/j.ceb.2013.10.008
- Xiao K, Shenoy SK, Nobles K, Lefkowitz RJ. 2004. Activation-dependent conformational changes in {beta}-arrestin 2. *J Biol Chem* **279**:55744–55753. doi:10.1074/jbc.M409785200

## Références

---

- Yong H, Thomas GA, Peticolas WL. 1993. Metabolite-Modulated Complex Formation between  $\alpha$ -Glycerophosphate Dehydrogenase and Lactate Dehydrogenase. *Biochemistry* **32**:11124–11131. doi:10.1021/bi00092a023
- Zhao Y, Xiao K. 2019. A Mass Spectrometry-Based Structural Assay for Activation-Dependent Conformational Changes in  $\beta$ -Arrestins In: Scott M, Laporte S, editors. Beta-Arrestins: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. New York, NY: Humana Press. p. 293.
- Zhou H, Yan F, Tai HH. 2001. Phosphorylation and desensitization of the human thromboxane receptor-alpha by G protein-coupled receptor kinases. *J Pharmacol Exp Ther* **298**:1243–1251.
- Zhou XE, He Y, de Waal PW, Gao X, Kang Y, Van Eps N, Yin Y, Pal K, Goswami D, White TA, Barty A, Latorraca NR, Chapman HN, Hubbell WL, Dror RO, Stevens RC, Cherezov V, Gurevich V V., Griffin PR, Ernst OP, Melcher K, Xu HE. 2017. Identification of Phosphorylation Codes for Arrestin Recruitment by G Protein-Coupled Receptors. *Cell* **170**:457-469.e13. doi:10.1016/j.cell.2017.07.002
- Zhuang T, Chen Q, Cho MK, Vishnivetskiy SA, Iverson TM, Gurevich V V., Sanders CR. 2013. Involvement of distinct arrestin-1 elements in binding to different functional forms of rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:942–947. doi:10.1073/pnas.1215176110
- Zidar DA, Violin JD, Whalen EJ, Lefkowitz RJ. 2009. Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:9649–9654. doi:10.1073/pnas.0904361106

## Annexe A

Guillien M, le Maire A, Mouhand A, Bernado P, Bourguet W, Banères JL, **Sibille N\***

(2020)

IDPs and their complexes in GPCR and nuclear receptor signaling.

*Prog Mol Biol Transl Sci.*

174:105-155

<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.05.001>

HAL : <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03749862>



## Annexe B

Sénicourt L, le Maire A, Allemand F, Guee L, Carvalho J.E., Germain P, Schubert M, Bernadó  
P, Bourguet W, **Sibille N\***.

(2021)

Structural Insights into the Interaction of the Intrinsically Disordered Co-activator TIF2 with  
Retinoic AAcid Receptor Heterodimer (RXR/RAR).

*J Mol Biol*

433(9):166899

<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166899>

HAL: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03047222v2/document>

bioRxiv: <https://doi.org/10.1101/2020.10.28.359091>



## Annexe C

Delaforge E, Cordeiro TN, Bernadó P, **Sibille N\***

(2018)

Conformational Characterization of Intrinsically Disordered Proteins and Its Biological Significance.

*Webb G. (eds) Modern Magnetic Resonance. Springer, Cham.*

HAL: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02348118>



## Annexe D

**Sibille N\***, Delarolle M, Royer C & Roumestand C.

(2014)

Measuring residual dipolar couplings at high hydrostatic pressure: robustness of alignment media to high pressure.

*J Biomol NMR.*

40(5):955-62

HAL : <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02347973v1>



## Annexe E

**Sibille N** & Bernadó P

(2012)

Structural Characterization of Intrinsically Disordered Proteins by the Combined Use of NMR  
and SAXS.

*Biochem Soc Trans.*

40(5):955-62

HAL : <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02347934v1>



## Annexe F

Cordeiro TN, **Sibille N**, Germain P, Barthe P, Boulahtouf A, Allemand F, Bailly R, Vivat V, Ebel C, Barducci A, Bourguet W, Le Maire A, Bernadó P

(2019)

Interplay of protein disorder in retinoic acid receptor heterodimer and its co-repressor regulates gene expression.

*Structure*

27(8):1270-1285

HAL: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03078485v1>

