Journal de la Société de Biologie, 193 (4), 355-360 (1999)

Les hormones corticostéroïdes : mécanismes impliqués dans la reconnaissance de l'aldostérone par le récepteur aux minéralocorticoïdes

par Chantal Hellal-Levy, Jérôme Fagart*, Anny Souque & Marie-Edith Rafestin-Oblin

INSERM U478, Faculté de Médecine Xavier Bichat, 16, rue Henri Huchard, 75018 Paris, France.
** IGBMC, BP 163, 67404 Illkirsch, Cedex, France.*
Pour correspondance : oblin@bichat.inserm.fr

Reçu le 2 juillet 1999

RÉSUMÉ

L'aldostérone et le cortisol, principales hormones minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes chez l'Homme, ont des structures très proches. Les deux hormones se lient au récepteur aux minéralocorticoïdes (RM) avec la même affinité, néanmoins le RM est activé préférentiellement par l'aldostérone, ce qui suggère que l'interaction de ces deux hormones avec le RM met en jeu des liaisons en partie distinctes. La construction d'un modèle tridimensionnel du domaine de liaison à l'hormone du RM humain, à partir de données cristallographiques du récepteur à l'acide rétinoïque associé à son ligand, a permis l'identification de plusieurs résidus du RM impliqués dans l'interaction avec l'aldostérone et le cortisol. Les résidus Gln 776 et Arg 817 font des liaisons hydrogène avec la fonction cétone en C3 du stéroïde et le résidu Asn 770 avec l'hydroxyle en C21. L'analyse de l'activité du récepteur sauvage ou muté en réponse à des stéroïdes hydroxylés en différentes positions du squelette stéroïdien ont permis d'arriver aux conclusions suivantes : 1) l'interaction entre le résidu Asn 770 du RM et la fonction hydroxyle en C21 des corticostéroïdes est déterminante pour stabiliser le RM dans sa conformation active ; 2) la présence d'un l'hémiacétal en 11-18 de l'aldostérone renforce la stabilité de la conformation active du RM, alors que les hydroxyles en 11β et en 17α du cortisol diminue sa stabilité. Ces résultats sont discutés à la lumière d'un modèle d'activation du RM.

SUMMARY Mineralocorticoid hormones: mechanisms involved in the aldosterone recognition by the mineralocorticoid receptor

Aldosterone and cortisol, the major mineralocorticoid and glucocorticoid hormones in humans, are structurally very closed. Both hormones bind to the mineralocorticoid receptor (MR) with the same affinity. Nevertheless MR is preferentially activated by aldosterone, suggesting that the binding of these two hormones to MR involved some distinct contacts. We constructed a tridimensional model of the ligand-binding domain of the human MR, by taking as a template the structural data of the retinoid receptor associated with its ligand. The MR model allowed the identification of several residues involved in the interaction with aldosterone and cortisol. The residues Gln 776 and Arg 817 make hydrogen bonds with the 3-keto function and the residue Asn 770 with the C21-hydroxyl group. Analyses of the wild type and mutant MRs activities in response to corticosteroids bearing hydroxyl groups at various steroid skeleton position led to the following conclusions: 1) the interaction between the residue Asn 770 and the C21-hydroxyl group of corticosteroids is determinant for stabilizing the active MR conformation and 2) the stability of this conformation is enhanced by the 11-18 hemiketal group of aldosterone whereas it is decreaed by the 11β- and 17α-hydroxyl groups of cortisol. These results are discussed in the light of a model for the MR activation process.

INTRODUCTION

L'aldostérone et le cortisol sont les principales hormones minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes chez l'Homme. Elles sont synthétisées à partir du cholestérol au niveau du cortex surrénalien. Leurs mécanismes d'action sont tout à fait comparables, elles agissent en se liant à un récepteur, le récepteur aux minéralocorticoïdes (RM) pour l'aldostérone et le récepteur aux glucocorticoïdes (RG) pour le cortisol. En l'absence d'hormone, le RM, comme le RG, est localisé principalement dans le compartiment cytoplasmique des cellules cibles. Il fait partie d'un complexe multiprotéique où il se trouve en interaction directe avec la protéine de choc thermique de 90 kDa de masse moléculaire, la hsp90. La liaison de l'hormone à son récepteur entraîne des modifications structurales du récepteur, notamment un changement de conformation du récepteur, la dissociation de la hsp90 et le transfert du récepteur dans le compartiment nucléaire. Il interagit alors, sous forme dimérique, avec des séquences cibles d'ADN et module la transcription de gènes et l'expression de protéines (1, 2).

Une des questions qui s'est posée au cours de ces dernières années était de savoir comment l'aldostérone peut agir *via* son propre récepteur. En effet, la concentration plasmatique des glucocorticoïdes est 100 à 1 000 fois supérieure à celle de l'aldostérone, et l'affinité des glucocorticoïdes pour le RM est du même ordre de grandeur que celle de l'aldostérone. Dans de telles conditions, on devrait s'attendre à une occupation du RM par les glucocorticoïdes sans accès possible de l'aldostérone à son récepteur, et à un effet minéralocorticoïde ne dépendant pas de l'aldostérone. Or, ceci n'est pas observé *in vivo* puisque l'aldostérone est capable de réguler la réabsorption de sodium. Il avait été proposé que la transcortine ou "corticosteroid binding globulin" (CBG) pourrait contribuer au processus de sélection hormonale minéralocorticoïde/glucocorticoïde, en « séquestrant » les glucocorticoïdes, l'aldostérone ne se liant que faiblement à cette protéine (3). Il s'est avéré que la CBG ne jouait pas un rôle important dans la sélectivité hormonale dans la mesure où l'aldostérone est capable de se lier au RM dans le cortex de rat nouveau né, alors que le taux plasmatique de cette protéine est relativement faible (4). Plus récemment, il a été montré qu'une enzyme était capable de moduler l'accessibilité du RM à l'aldostérone. Il s'agit de la 11β-hydroxystéroïde déshydrogénase (11β-HSD2) (5, 6). Cette enzyme transforme le cortisol en un métabolite (la cortisone) de faible affinité pour le RM et le RG, alors qu'elle est sans effet sur l'aldostérone qui présente un groupement hémiacétalique en position 11-18. Néanmoins, ce mécanisme n'explique pas comment le RM est protégé de l'occupation par d'autres hormones endogènes telles que la déoxycorticostérone qui a une affinité pour le RM identique à celle de l'aldostérone et qui n'est pas substrat de la 11β-HSD2. Il reste également à déterminer comment l'aldostérone peut agir *via* son propre récepteur dans des tissus où l'enzyme et le RM ne sont pas coexprimés, ce qui est le cas notamment du cerveau. On peut se demander également comment les glucocorticoïdes peuvent agir dans des tissus présentant un taux élevé de 11β-HSD2. Nous avons recherché si le RM lui-même pourrait jouer un rôle dans la sélectivité hormonale, en étant activé préférentiellement par l'aldostérone.

LES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES

Le RM et le RG appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires, à laquelle sont rattachés tous les récepteurs aux hormones stéroïdes et thyroïdiennes, les récepteurs aux rétinoïdes et à la vitamine D, et d'autres récepteurs dits orphelins, dans la mesure où leur ligand n'a pas été identifié. Tous ces récepteurs sont organisés en plusieurs domaines, chaque domaine étant caractérisé par une ou plusieurs fonctions (7) (Fig. 1). La partie N-terminale (domaine A/B), très peu conservée entre les différents récepteurs, joue un rôle important dans la fonction de transactivation ne dépendant pas de l'hormone et vraisemblablement dans l'interaction avec d'autres facteurs transcriptionnels, tissu-spécifiques, responsables de la modulation de l'expression de gènes particuliers. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD: DNA-binding domain), constitué d'environ soixante-dix acides aminés, est la région la plus conservée parmi les différents membres de la superfamille. En aval du DBD, il existe une région variable (région charnière, D). Cette région pourrait permettre une torsion ou un changement conformationnel de la protéine. Selon les récepteurs, cette région contient ou non un signal de localisation nucléaire. La partie C-terminale des récepteurs contient le domaine de liaison à l'hormone (LBD: ligand-binding domain) qui est constitué d'environ 250 acides aminés. Le LBD est impliqué dans de nombreuses fonctions telles que la liaison du ligand, la liaison de la hsp90, la dimérisation du récepteur, sa localisation nucléaire ainsi que son interaction avec d'autres facteurs qui modulent la liaison à l'ADN et l'activation de la transcription de gènes.

La structure tridimensionnelle du LBD de plusieurs récepteurs nucléaires a été déterminée à partir de données

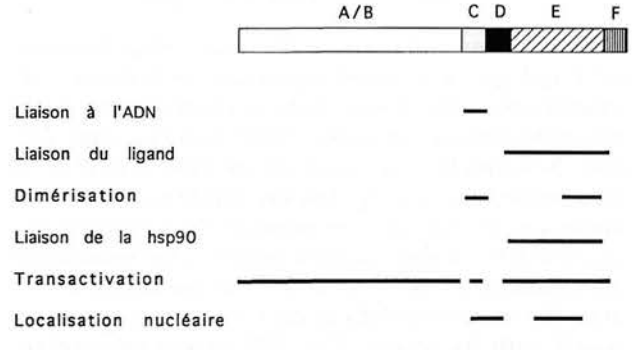


FIG. 1. – Représentation schématique de l'organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs nucléaires. La structure des récepteurs nucléaires peut être divisée en six domaines : A, B, C, D, E, F. La fonction de chaque domaine est indiquée par des traits (d'après Tsai et O'Malley, 1994).

cristallographiques (8-14). Le LBD est constitué d'un enchaînement de 11 à 12 hélices α qui adoptent un repliement tout à fait particulier délimitant une cavité dans laquelle le ligand vient se « nicher ». Cette structure serait commune à tous les récepteurs nucléaires (15). Des études faites sur des récepteurs nucléaires non ligandés ou associés à un agoniste ont montré que la différence majeure entre les deux structures se situe au niveau de la partie-C terminale du récepteur. Dans le cas du récepteur non ligandé, la dernière hélice (hélice H12), qui porte la fonction de transactivation régulée par l'hormone, est positionnée vers l'extérieur du récepteur alors qu'elle est repliée contre celui-ci lorsque le récepteur est associé à un agoniste, permettant la liaison des coactivateurs au récepteur (16).

RÔLE DU RÉCEPTEUR AUX MINÉRALOCORTICOÏDES DANS LA SÉLECTIVITE HORMONALE

Afin de préciser le rôle du RM dans la sélectivité hormonale, nous avons analysé les interactions entre le RM et l'aldostérone ou les glucocorticoïdes (cortisol et dexa-

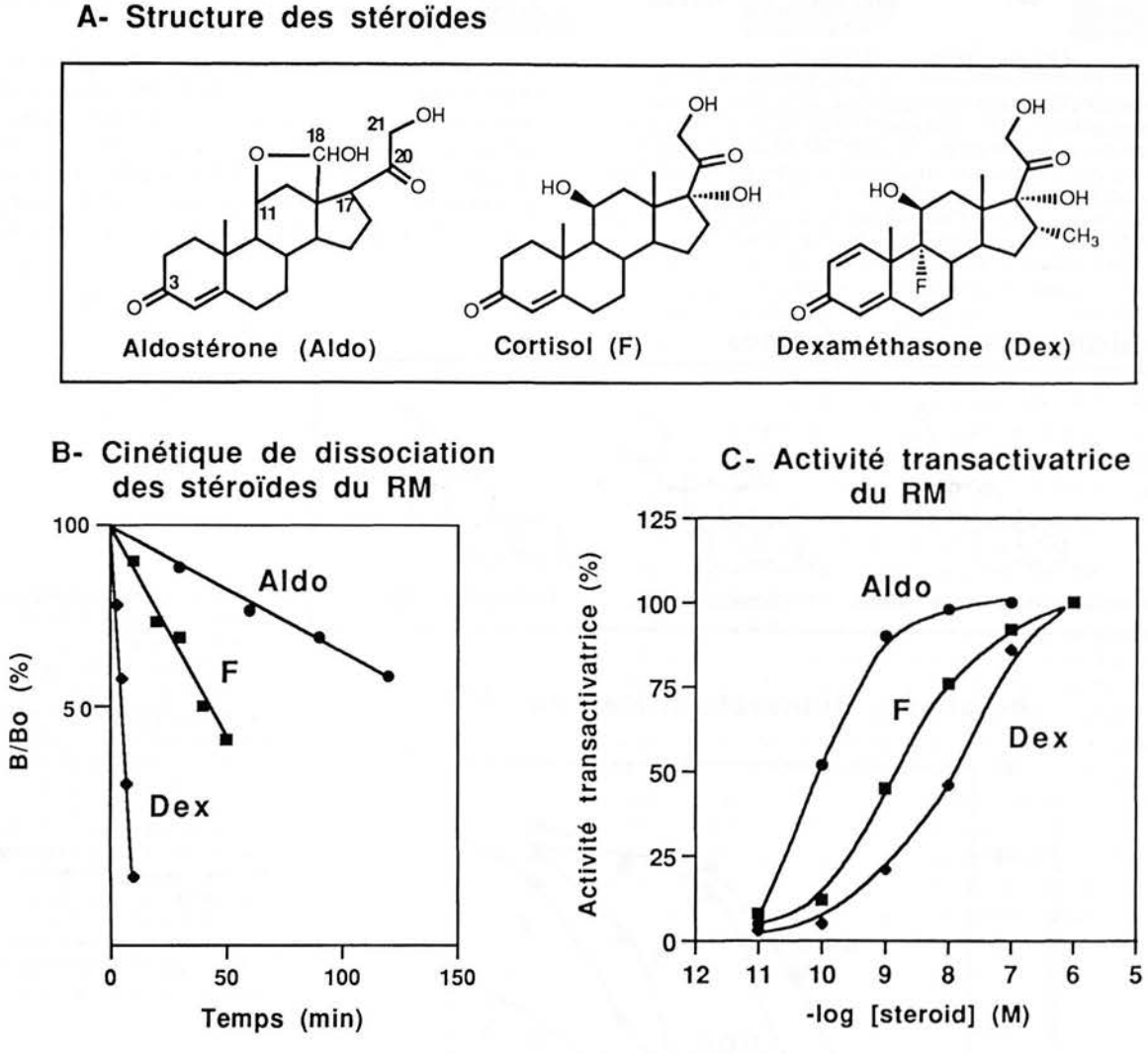


FIG. 2. – Étude des complexes stéroïde-récepteur.

A : structure des stéroïdes.

B : cinétique de dissociation des stéroïdes du récepteur aux minéralocorticoïdes : le récepteur exprimé *in vitro* dans le lysat de réticulocytes de lapin est incubé avec 10^{-8} M de [^{3}H]aldostérone, [^{3}H]cortisol ou [^{3}H]dexaméthasone pendant 1 heure à 20 °C. Le milieu d'incubation est maintenu à 20 °C pour contrôler la stabilité du complexe hormone-récepteur ou incubé avec le stéroïde froid correspondant (10^{-5} M) pour mesurer la dissociation du stéroïde à des temps variables. Le stéroïde libre est séparé du stéroïde lié au récepteur par traitement au charbon-dextran.

C : étude de la fonction de transactivation du récepteur : les cellules COS-7 sont transfectées avec un vecteur d'expression du récepteur et une construction comportant le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur du MMTV. Les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes de stéroïde pendant 24 heures et l'activité de la luciférase est mesurée sur les extraits cellulaires.

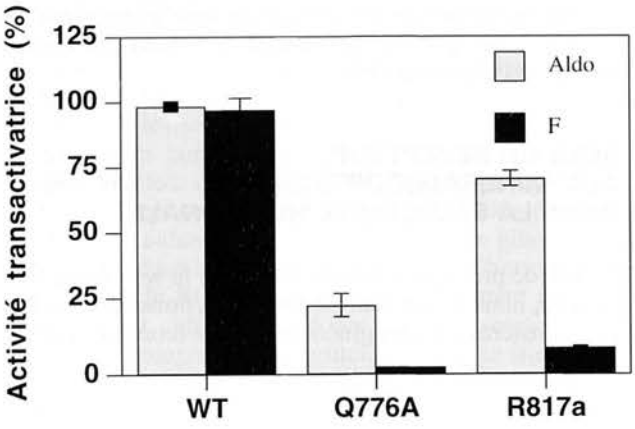
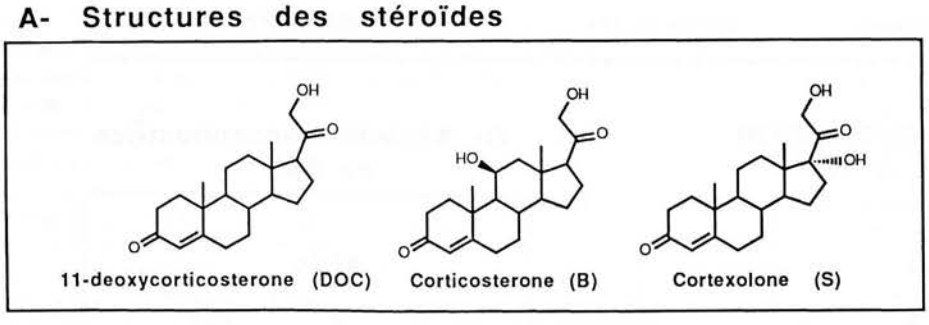


FIG. 3. – Activité transactivatrice du récepteur aux minéralocorticoïdes sauvage ou muté.

Les cellules COS-7 sont transfectées avec un vecteur d'expression du récepteur sauvage (WT: "wild type") ou du récepteur muté en alanine au niveau de la glutamine 776 (Q776A) ou de l'arginine 817 (R817A) et une construction comportant le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur du MMTV. Les cellules sont incubées pendant 24 heures avec de l'aldostérone ou du cortisol (10^{-6} M) et l'activité de la luciférase est mesurée sur les extraits cellulaires.

méthasone). La structure des stéroïdes est représentée Figure 2A. Nous avons également mesuré les propriétés de transactivation du RM en réponse à l'aldostérone et aux glucocorticoïdes. Nous avons pu mettre en évidence que les glucocorticoides, comme le cortisol et la dexaméthasone, se dissocient plus rapidement du RM que l'aldostérone (Fig. 2B) alors que leurs affinités pour le récepteur sont tout à fait comparables. Des expériences *ex vivo,* mesurant l'activité de transactivation du RM dans des cellules COS en réponse à l'aldostérone ou aux glucocorticoïdes, ont montré une sensibilité du RM plus grande à l'aldostérone qu'au cortisol et à la dexaméthasone, propriété qui s'est avérée être indépendante de la 11HSD2 (Fig. 2C). Ces résultats suggéraient que l'interaction du RM avec l'aldostérone et le cortisol mettent en jeu des liaisons en partie distinctes.

Aucune donnée cristallographique n'étant accessible à ce jour pour le RM, nous avons suivi la statégie suivante pour identifier les acides aminés impliqués dans l'interaction avec les stéroïdes. Nous avons construit un modèle tridimensionnel du LBD du RM en se basant sur la structure cristallographique du LBD du récepteur à l'acide rétinoïque de type γ associé à son ligand. Nous



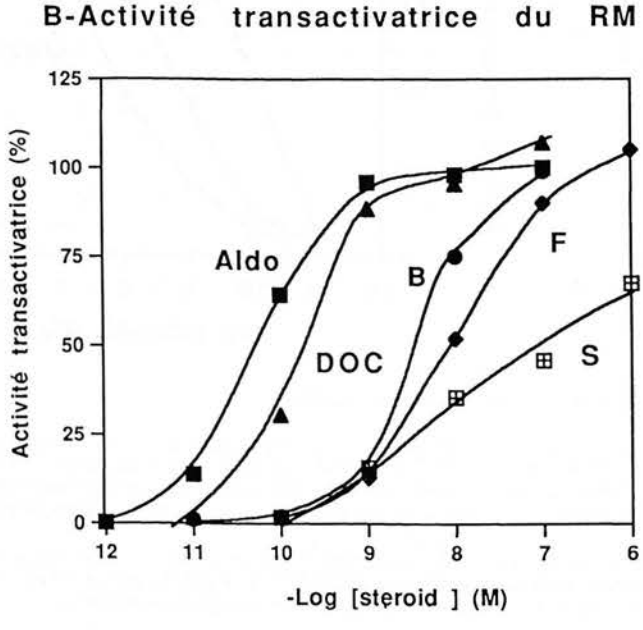


FIG. 4. – Effet de la substitution du stéroïde en 11β et 17α sur l'activité minéralocorticoïde.

A : structure des stéroïdes. B : activité transactivatrice du récepteur aux minéralocorticoïdes en réponse à différents stéroïdes. Les cellules COS-7 sont transfectées avec un vecteur d'expression du récepteur et une construction comportant le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur du MMTV. Les cellules sont incubées pendant 24 heures avec des concentrations croissantes d'aldostérone (Aldo), de 11-désoxycorticostérone (DOC), corticostérone (B) ou cortexolone (S) et l'activité de la luciférase est mesurée sur les extraits cellulaires.

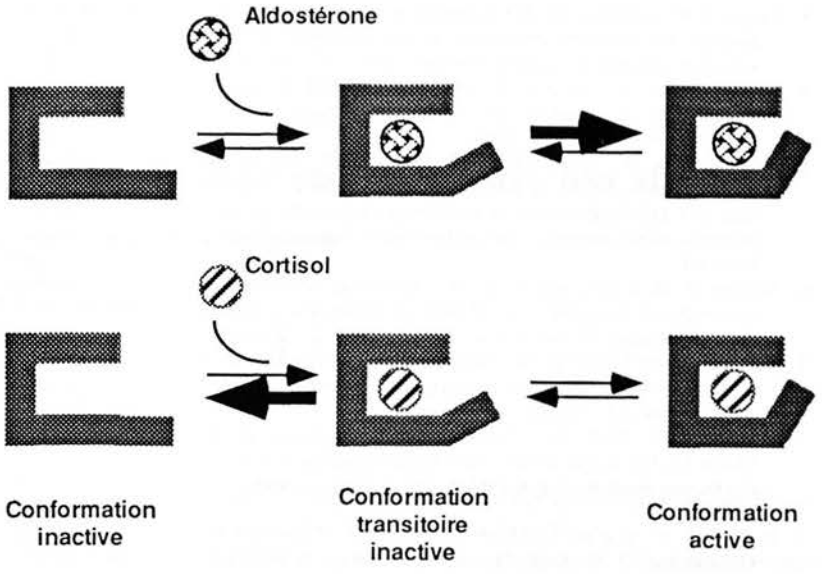


FIG. 5. – Représentation schématique de l'activation du récepteur aux minéralocorticoïdes : influence de la nature du stéroïde sur la dynamique des étapes impliquées dans le changement de conformation.

avons repéré les résidus du RM délimitant la poche de liaison du récepteur. Le rôle des résidus polaires dans l'interaction avec le ligand a été déterminé par mutagenèse dirigée (17). Les résidus Gln 776 et Arg 817 interagissent avec la fonction carboxyle en position 3, commune aux agonistes et aux antagonistes, et l'asparagine 770 fait une liaison hydrogène avec la fonction hydroxyle en position 21 qui est spécifique aux agonistes. Ces observations nous ont conduits à proposer que les contacts entre l'hydroxyle en C21 du stéroïde et l'asparagine 770 du RM sont déterminants pour que le récepteur acquiert sa conformation active.

Lorsque les résidus Gln 776 et Arg 817 sont remplacés par une alanine, le récepteur n'est plus activé par le cortisol. En revanche, une activité résiduelle du RM est observée en réponse à l'aldostérone (Fig. 3). Ces résultats laissent à penser que les contacts entre le RM et l'aldostérone sont plus forts que ceux existant avec le cortisol. L'aldostérone et le cortisol ont en commun la fonction carboxyle en 3 et la fonction hydroxyle en 21 (Fig. 2A). Ces deux hormones se différencient au niveau des positions 11, 17 et 18. L'aldostérone est caractérisée par un pont hémiacétalique en 11-18 et le cortisol par un hydroxyle en 11β et en 17α. Afin de préciser le rôle de chacun de ces substituants dans l'activité des stéroïdes nous avons mesuré l'activité transactivatrice du RM en présence de stéroïdes hydroxylés ou non en position 11β et 17α (Fig. 4A). La 11-désoxycorticostérone (DOC), qui présente uniquement les substituants communs à l'aldostérone et au cortisol, est pratiquement aussi efficace que l'aldostérone pour stimuler la fonction de transactivation du RM (Fig. 4B). La substitution de la DOC par un groupe hydroxyle en position 11β (corticostérone, B), ou en position 17α (cortexolone, S), ou bien en 11β et en 17α (cortisol, F) conduit à une diminution de l'activité de ces composés par rapport à la DOC (Fig. 4B).

Les résultats présentés dans ce travail et ceux obtenus sur les changements de conformations induits par la liaison des ligands au RM et au RG (18, 19) nous ont conduits à proposer un mécanisme en deux étapes pour l'activation du RM (Fig. 5). La liaison des agonistes au RM conduirait à un état transitoire inactif et, dans un deuxième temps, à une conformation active. La dynamique de ces étapes serait fonction des contacts entre le stéroïde et le RM : en l'absence de substituant en position 11β et 17α, le positionnement des agonistes dans la cavité de liaison du RM est tel que l'interaction entre l'asparagine 770 et l'hydroxyle en 21 permet la stabilisation de l'hélice H12 dans sa position active. La présence de l'hémiacétal en 11-18 renforce la stabilité du RM dans la conformation active. En revanche, la présence d'un hydroxyle en 11β ou en 17α modifie le positionnement du stéroïde dans la cavité de liaison, ce qui ne permet pas de stabiliser le RM dans sa conformation active. Le stéroïde se dissocie rapidement du récepteur, et des concentrations élevées de stéroïdes sont nécessaires pour l'activation du récepteur.

Il ressort de cette étude que le RM est capable de reconnaître sélectivement l'aldostérone, ce qui donne au récepteur lui-même un rôle important dans les mécanismes de sélectivité hormonale en complément de la 11β hydroxysteroid déshydrogénase.

BIBLIOGRAPHIE

1. Arriza J. L, Weinberger C., Cerelli G., Glaser T. M., Handelin B.L., Housman D. E. & Evans R. M., Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*, 1987, *237*, 268-275.
2. Evans R. M., The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 1988, *240*, 889-895.

3. Funder J. W., Feldmam D. & Edelman I. S., The role of plasma binding and receptor specificity in the mineralocorticoid action of aldosterone. *Endocrinology* , 1973, *92*, 994-1004.
4. Sheppard K. E. & Funder J. W., Mineralocorticoid specificity of renal type I receptors: *in vivo* binding studies. *Am. J. Physiol.*, 1987, *15*, E224-2293.
5. Edwards C. R. W., Stewart P. M., Burt D., Bret L., Mc Intyre M. A., Sutanto W. S., de Kloet E. R. & Monder C., Localisation of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase-tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet*, 1988, *2*, 986-989.
6. Stewart P. M. & Edwards C. R. W., Specificity of the mineralocorticoid receptor; crucial role of 11β-hydroxysteroid deshydrogenase. *Trends Endo. Metab.* 1990, *11*, 225-230.
7. Tsai M. J. & O'Malley B. W., Molecular mechanism of action of steroid/thyroid receptor superfamily. *Annu. Rev. Biochem.*, 1994, *63*, 451-486.
8. Bourguet W., Ruff M., Chambon P., Gronemeyer H. & Moras D., Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature*, 1995, *375*, 377-382.
9. Renaud J. P., Rochel N., Ruff M., Vivat V., Chambon P., Gronemeyer H. & Moras D., Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature*, 1995, *378*, 681-689.
10. Wagner R. L., Apriletti J. W., McGrath M. E., West B.L., Baxter J. D. & Fletterick R. J., A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature*, 1995, *378*, 690-697.
11. Brzozowski A. M., Pike A. C. W., Dauter Z., Hubbard R. E., Bonn T., Engstrom O., Ohman L., Greene G. L., Gustafsson J. A. & Carlquist M., Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature,* 1997, *389*, 753-758.
12. Williams S. P. & Sigler P. B., Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature,* 1998 *393*, 392-396.
13. Tanenbaum D. M., Wang Y., Williamns S. P. & Sigler P. B., Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 1998, *95*, 5998-6003.
14. Nolte R. T., Wisely G. B., Westin S., Cobb J. E., Lambert M. H., Kurokawa R., Rosenfeld M. G., Willson T. M., Glass C. K. & Milburn M. V., Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature,* 1998, *395*, 137-143.
15. Wurtz J. M., Bourguet W., Renaud J. P., Vivat V., Chambon P., Moras D. & Gronemeyer H., A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Structural Biology,* 1996, *3*, 87-94.
16. Moras D. & Gronemeyer H., The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Current Opinion In Cell Biology*, 1998, *10*, 384-39.
17. Fagart J., Wurtz J. M., Souque A., Hellal-levy C., Moras D. & Rafestin-oblin M. E., Antagonism in the human mineralocorticoid receptor. *EMBO J.*, 1998, *17*, 3317-3325.
18. Couette B., Fagart J., Jalaguier S., Lombes M., Souque A. & Rafestin-Oblin M.E., The ligand induced conformational change of the mineralocorticoid receptor occurs within its heterooligomeric structure. *Biochem. J.,* 1996, *315*, 421-427.
19. Roux S., Terouanne B., Couette B., Rafestin-Oblin M. E. & Nicolas J. C., Conformational change in the human glucocorticoid receptor induced by ligand binding is altered by mutation of isoleucine 747 by a threonine. *J. Biol. Chem.*, 1999, *274*, 10059-10065.