

50376
1985
159

50376
1985
159

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

N° d'ordre 24

T H E S E

PRESENTEE POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR EN BIOCHIMIE



par

Thierry IDZIOREK

CARACTERISATION

DU RECEPTEUR A HORMONES GLUCOCORTICOIDES DU FOIE DE RAT

PURIFIE SOUS FORME NON ACTIVEE

Présentée le 11 Décembre 1985 devant la Commission

JURY

Messieurs les Professeurs : J. MONTREUIL, PRESIDENT
M. DAUTREVAUX
E.E. BAULIEU
A. VERBERT
M. PORCHET

Le Plaisir est la Force créatrice dans la vie

(LOWEN)

Cette thèse a été effectuée dans le Laboratoire de Biochimie Structurale de la Faculté de Médecine de Lille, Laboratoire que dirige Monsieur le Professeur M. DAUTREVAUX. Je tiens à le remercier de la confiance qu'il m'a accordée lorsqu'il m'a accueilli dans son Laboratoire il y a trois ans.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur J. MONTREUIL, dont l'enseignement m'a donné le goût de la Biochimie, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur E.E. BAULIEU, qui m'ouvre présentement les portes de son laboratoire, et à Monsieur le Professeur A. VERBERT et Monsieur le Professeur M. PORCHET d'avoir accepté la tâche de juger ce travail.

A Pierre FORMSTECHE, qui a dirigé ce travail, je ne dirai que ces mots : "Ton savoir profond et ton enthousiasme communicatif m'ont poussé à persévérer dans cette voie parfois ingrate qu'est la recherche".

A Pascaline TOULOUSE, peu de mots également, juste la reconnaissance d'avoir vu du travail bien fait et d'avoir pu en bénéficier.

A tous ceux en compagnie desquels j'ai apprécié la vie dans ce laboratoire, j'exprime ma gratitude et mon amitié.

A Madame MORANDI, je donnerai le mot de la fin, car c'est elle qui l'aura frappée: merci.

RESUME

L'objet de ce mémoire est la caractérisation du récepteur à glucocorticoïdes de foie de rat purifié sous forme non activée. Nous avons tenté de caractériser tant les paramètres physicochimiques que l'aptitude du récepteur purifié à être activé.

La purification est effectuée par chromatographie d'affinité et chromatographie de gel filtration en HPLC. Nous avons participé à l'élaboration du gel d'affinité en terminant les dosages de fonctions greffées sur la matrice et en développant une nouvelle méthode d'activation du gel. La chromatographie de gel filtration haute performance nous a permis de terminer la purification.

L'emploi d'un matériel extrêmement purifié nous a amené à revoir les méthodes de dosage des protéines et de l'activité de liaison du stéroïde au récepteur.

Avant d'exposer nos travaux, nous avons jugé intéressant de présenter dans une revue générale, l'état actuel des connaissances sur ce récepteur hormonal.

TABLE DES MATIERES

	Pages
I - INTRODUCTION	1
II - LE RECEPTEUR A GLUCOCORTICOIDES : REVUE SUR LE RECEPTEUR NON PURIFIE	9
1) Présentation	9
2) Stabilisation du récepteur	12
2.1 - Liaison à l'hormone	12
2.2 - Récepteur et action du molybdate	13
2.3 - Récepteur et thiols	15
2.4 - Inhibiteur de protéases	16
2.5 - Emploi des phosphatases	17
3) Caractérisation du site de liaison	18
4) Transformation du récepteur à glucocorticoïdes	20
4.1 - Récepteur et force ionique	21
4.2 - Récepteur et action de la température	22
4.3 - Récepteur et échange d'ions	22
4.4 - Existence de facteurs de transformation	23
4.4.1 - Thiol essentiel à la transformation	24
4.4.2 - Action du phosphate de pyridoxal	25
4.4.3 - ATP et système phospho-déphospho	25
4.4.4 - Cations divalents	26
4.4.5 - Autres facteurs influençant la transformation	26
4.4.5.1 - Inhibiteur de petit poids moléculaire	26
4.4.5.2 - Inhibiteur de haut poids moléculaire	26
4.5 - Conclusion	
5) Liaison au DNA	
5.1 - Site de liaison du récepteur au DNA	28
5.2 - Site de liaison du DNA au récepteur	29

6) Récepteur : taille moléculaire et protéolyse limitée	30
7) Modèles moléculaires	33
8) Conclusion	37
III - PURIFICATION DU RECEPTEUR A GLUCOCORTICOIDES	38
A - Méthodes de purification	39
1) Purification du récepteur non lié à l'hormone	39
2) Purification du récepteur lié à l'hormone	40
2.1 - Techniques classiques	40
2.2 - Chromatographie sur DNA ou phosphocellulose	41
2.3 - Chromatographie d'affinité	44
B - Caractérisation	52
1) Le récepteur lié transformé	52
1.1 - Caractéristiques physicochimiques	52
1.2 - Utilisation des anticorps mono- et polyclonaux	53
1.3 - Protéolyse limitée du récepteur purifié	54
1.4 - Modèle de récepteur transformé	54
1.5 - Liaison au DNA - Utilisation du modèle MMTV	54
2) Le récepteur non transformé	56
2.1 - Caractéristiques physicochimiques	58
2.2 - Récepteur non transformé et échange d'ions	59
2.3 - Transformation du récepteur	59
C - Conclusion	59
TRAVAUX EXPERIMENTAUX ET RESULTATS PERSONNELS	61
A - Synthèse du gel d'affinité	62
1 - Activation du support	63
1.1 - Activation à pH alcalin	63
1.2 - Activation à pH neutre	64
1.3 - Taux de greffage théorique	67
2 - Fixation du bras	67
3 - Oxydation periodique du stéroïde	69
4 - Fixation de l'hormone oxydée	69

5 - Dosage des fonctions greffées	72
5.1 - Dosage des esters cyanates	72
5.2 - Dosage des imidocarbonates	72
5.3 - Dosage de l'azote total	74
5.4 - Dosage des amines libres des bras portés par le gel	74
5.5 - Dosage du ligand fixé sur le gel	76
6 - Stabilité du gel	76
7 - Discussion	77
 B - Dosage du récepteur à glucocorticoïdes	 81
1 - Dosage du complexe hormone-récepteur	81
1.1 - Dosage à l'équilibre	82
1.2 - Dosage par rupture d'équilibre	82
1.2.1 - Dosage par la méthode de charbon dextran	82
1.2.2 - Dosage par la méthode à l'hydroxyl- apatite	83
1.2.3 - Dosage par HPLC	83
2 - Dosage des protéines	85
2.1 - Méthode de Bensadoun	85
2.2 - Méthode au Bleu de Coomassie	87
3 - Conclusion	90
 C - Purification du récepteur non transformé	 97
1 - Choix du gel d'affinité	97
2 - Purification	98
2.1 - Protocole expérimental	98
2.2 - Importance des lavages	98
2.3 - Elution du récepteur	106
2.4 - Utilisation de la chromatographie liquide à haute performance	107
2.4.1 - Analyse des résultats obtenus par HPLC	109
2.4.2 - Reproductibilité de la méthode	111
2.5 - Protocole de purification	114

D - Caractérisation du récepteur non transformé purifié	115
1 - Caractéristiques physicochimiques	115
1.1 - Analyse électrophorétique	115
1.2 - Isoélectrofocalisation	118
1.3 - Electrophorèse "bidimensionnelle"	120
1.4 - Photoaffinité	121
1.5 - Gradient de sucrose - Mesure du coefficient de sédimentation	121
1.6 - Mesure du rayon de Stokes par HPLC de gel filtration	124
1.7 - Récapitulatif	126
2 - Chromatographie covalente sur gel à pont disulfure	127
3 - Chromatographie d'échange d'ions en HPLC	130
4 - Transformation du récepteur purifié sur DEAE-HPLC	133
CONCLUSION	138
APPENDICE TECHNIQUE	141
BIBLIOGRAPHIE	163

INTRODUCTION

Les hormones sont des molécules informatives coordonnant l'activité des différentes parties de l'organisme. Elles peuvent être classées en deux grandes catégories : les hormones polypeptidiques comprenant des dérivés d'acides aminés, des peptides et des protéines et les hormones stéroïdiennes.

Un système hormonal comporte une étape de biosynthèse au niveau de cellules glandulaires, un système de distribution circulaire et un mécanisme de catabolisme, ce mécanisme ayant pour finalité principale d'établir une concentration adéquate au niveau des organes cibles.

Les hormones abordent des cellules cibles. Le récepteur est la structure de la cellule cible qui répond au message hormonal dans des conditions physiologiques particulières (état fonctionnel, âge, etc...).

L'action des hormones stéroïdiennes nécessite l'entrée en contact avec le récepteur de structure protéique, soluble et intracellulaire, contrairement aux récepteurs des hormones polypeptidiques qui sont membranaires. Le récepteur déclenche alors la réponse. Ceci nécessite pour le récepteur de posséder deux structures fondamentales : l'une, qui est le site accepteur auquel se lie l'hormone et l'autre, le site effecteur (ou exécutif) qui interagit avec un élément cellulaire distinct (Baulieu, 1978). C'est au niveau de ce dernier qu'est lancée l'activité cellulaire. Il est évident que l'activité du site effecteur est conditionnée par l'activité du site accepteur et qu'elle nécessite une modification du récepteur

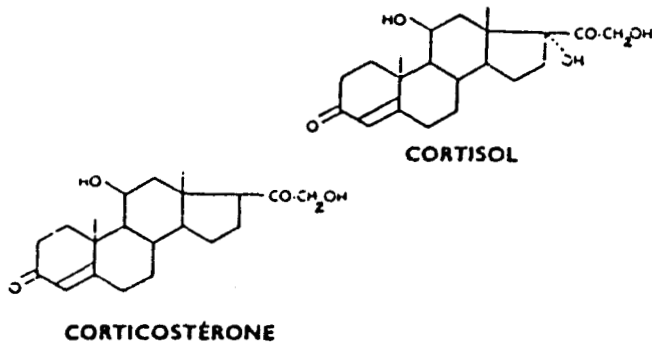


Figure n°1:

Glucocorticoïdes naturels
chez l'homme et le rat.

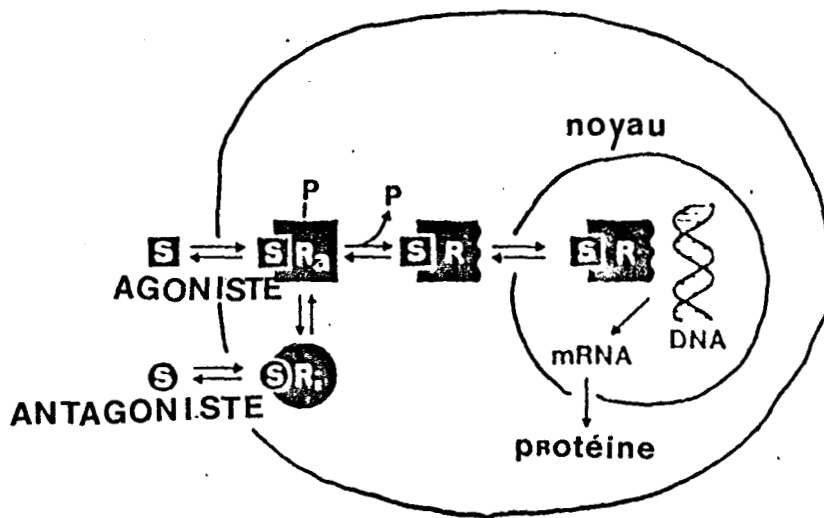
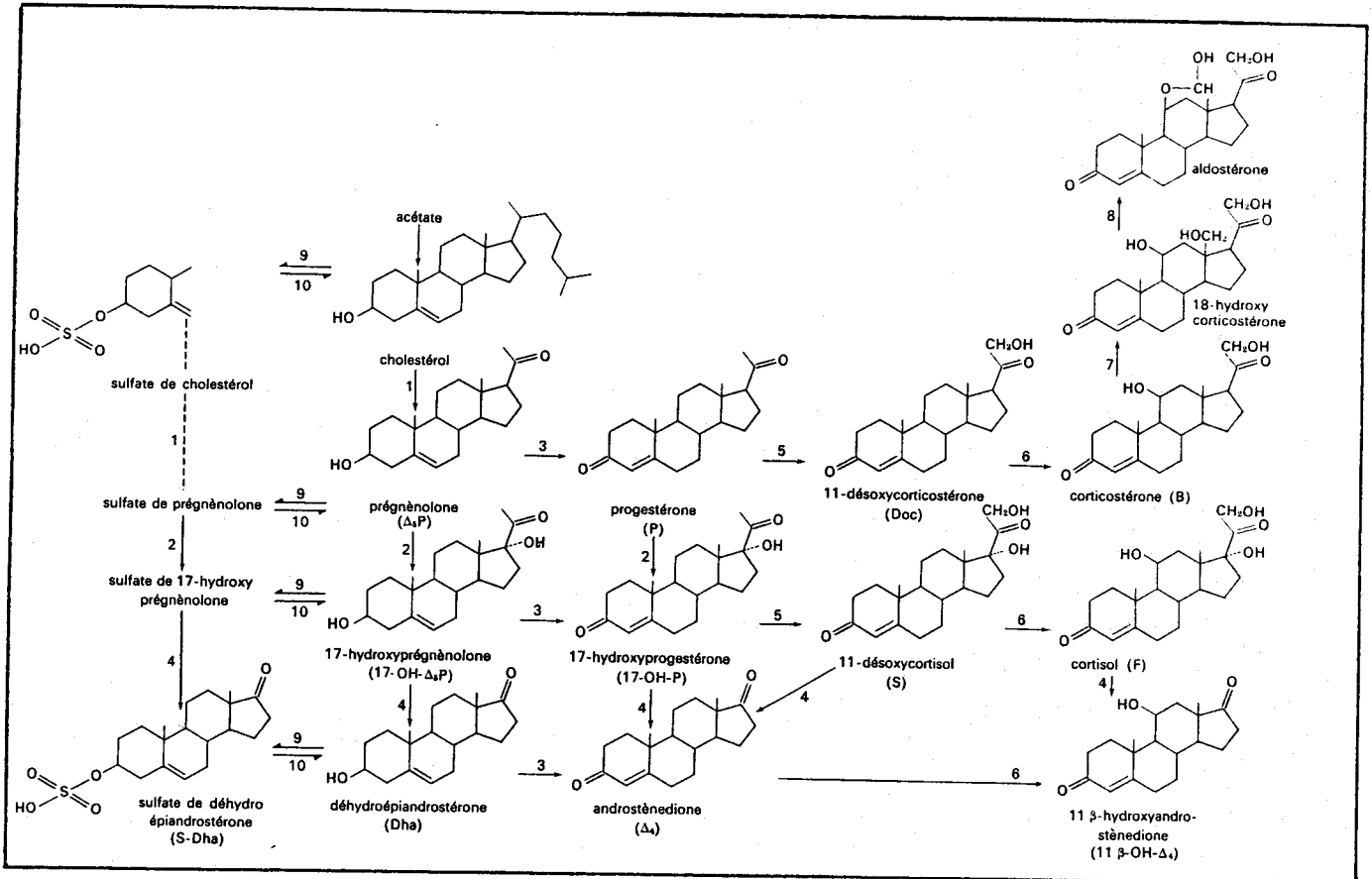


Figure n° 3 : Action de l'hormone glucocorticoïde

La figure montre une cellule cible idéale dans laquelle les glucocorticoïdes agonistes (petits carrés) ou antagoniste (petits cercles) pénètrent et se combinent réversiblement avec le récepteur pour former un complexe actif (Ra) ou inactif (Ri). L'interaction avec la chromatine nécessite une étape de transformation (R) probablement dépendante d'une déphosphorylation. Le modèle proposé est discutable (voir texte).



Biosynthèse des hormones stéroïdes dans les glandes surrénales.

- 1 système desmolase comportant des 20 et 22 hydroxylases et une desmolase
- 2 17-hydroxylase
- 3 3 β -hydroxystéroïde oxydo-réductase
· $\Delta_5 \rightarrow \Delta_4$ 3 oxo-stéroïde isomérase
- 4 desmolase C_{17}, C_{20}
- 5 21-hydroxylase
- 6 11 β -hydroxylase
- 7 18-hydroxylase
- 8 18-hydroxystéroïdes oxydo-réductase
- 9 sulfo-transférase
- 10 sulfatase

Figure n° 2 : Biosynthèse du cortisol et de la corticostérone (d'après Baulieu, 1978)

après la liaison avec l'hormone spécifique. Nous pouvons noter au passage que les antihormones sont, elles, incapables de promouvoir la modification particulière du récepteur apte à déclencher la réponse cellulaire.

L'existence des récepteurs à hormone stéroïde est démontrée expérimentalement par la découverte et la production de variants cellulaires dont le récepteur est absent. Ceci a été montré notamment dans le cas des hormones glucocorticostéroïdes pour des lignées cellulaires de lymphome dans lesquelles le récepteur est absent ou du moins indétectable par des méthodes de liaison hormonale (Sibley et al., 1974).

Avant de parler du récepteur, nous allons décrire succinctement le métabolisme de la molécule indispensable à l'activité du récepteur et qui est l'hormone glucocorticoïde. Chez le rat, le glucocorticoïde naturel est la corticostérone qui n'est pas hydroxylée en 17 α contrairement au cortisol, le glucocorticoïde naturel de l'homme (voir figure n° 1).

La biosynthèse des glucocorticoïdes s'effectue dans les glandes corticosurrénales, au niveau des zones fasciculées et réticulées du cortex, à partir du cholestérol d'origine hépatique ou alimentaire (voir figure n° 2) (Hechter et al., 1953). La régulation de la biosynthèse dépend avant tout de l'ACTH, un abaissement de la cortisolémie entraînant une augmentation de la sécrétion de l'ACTH et vice-versa.

Le cortisol et la corticostérone sont alors excrétés de la cellule productrice par des mécanismes encore inconnus.

Le cortisol plasmatique est transporté sous deux formes, libre et liée pour 5 % et 95 % respectivement. Le cortisol est lié à la transcortine d'origine hépatique, en concentration de 30 mg/l. La transcortine lie les stéroïdes en C21 ayant une structure Δ 4-3 céto, donc des stéroïdes tels que le cortisol, la corticostérone, la progestérone, etc... Elle est saturée par des taux élevés de cortisol (30 à 40 μ g/100 ml de sang). Au-delà, c'est l'albumine qui joue le rôle de protéine de transport.

Le passage du stéroïde à travers la membrane est un sujet assez peu étudié encore aujourd'hui et mériterait une attention un peu plus soutenue. L'hypothèse la plus communément admise est que les hormones stéroïdes, lipophiles, diffusent librement à travers la membrane. Cette diffusion passive est en contradiction avec l'idée même d'hormone, non pas tant pour les glucocorticoïdes que pour les hormones sexuelles, car elle aboutit à la conséquence suivante, à savoir qu'une hormone avec un taux physiologique de l'ordre de la μ mole par litre pour les glucocorticoïdes ou de la nanomole par litre pour les hormones sexuelles peut diffuser librement à travers TOUTES les membranes cellulaires, ce qui paraît difficile, compte-tenu du taux de récepteur intracellulaire variant de 10 à 20 nanomoles par litre dans le cas des récepteurs à glucocorticoïdes. Une hypothèse plus séduisante, et qui implique la saturabilité de la pénétration a été postulée : c'est celle de la diffusion facilitée. Elle a été montrée, indirectement pour le passage des oestrogènes dans les cellules de l'utérus de rate (Milgrom et al., 1973), puis en 1980 par Allera et al. pour le passage de la corticostérone dans des vésicules hépatiques purifiées. Un autre mécanisme proposé est l'endocytose. Elle serait liée à l'existence de récepteurs spécifiques transcortine-like, distincts du récepteur intracellulaire, et présent aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur de la cellule. Un tel type de récepteur a été mis en évidence grâce à l'emploi d'anticorps anti-transcortine (Koblinski et al., 1972 ; Litwack et al., 1975). Très récemment, le premier récepteur membranaire d'une hormone stéroïde a été découvert au niveau de la membrane de l'ocyte de xénope où la progestérone induit la synthèse d'un facteur promoteur de la méiose (Blondeau et Baulieu, 1984).

Quoiqu'il en soit, l'hormone se retrouve à l'intérieur de la cellule où elle est reconnue par une structure spécifique nommée récepteur, dont la nature protéique est confirmée par la perte de l'activité de liaison du stéroïde lors de l'action d'enzymes protéolytiques telles que la pronase, la papaïne, la trypsine, la chymotrypsine. Les premières études ont permis de caractériser trois formes de récepteurs. La première forme de haut poids moléculaire (280-330 kDa)

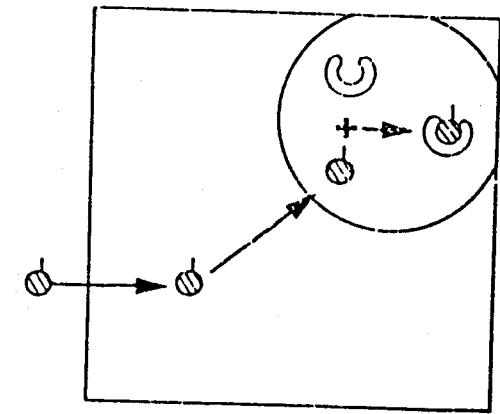
ne lie pas l'hormone (Grody et al., 1982). Elle est convertible en une forme liant l'hormone par un mécanisme dit d'activation (Grody et al., 1982 ; Wayne, 1982), réversible (Grody et al., 1982 ; Schmidt et al., 1982) et qui pourrait être un mécanisme de phosphorylation (Nielsen et al., 1977c). La deuxième forme liant l'hormone, de plus faible poids moléculaire (90-94 kDa), a été mise en évidence dans des noyaux isolés de cellules hépatiques (Milgrom et al., 1973 ; Kalimi et al., 1973), des noyaux d'hépatome de rat (Baxter et al., 1972) ; Higgins et al., 1973a, 1973b) ainsi que dans des noyaux de thymus (Munck et al., 1972). La nature de l'accepteur nucléaire semble être la chromatine (Beato et al., 1973 ; Higgins et al., 1979 et 1973c ; Rousseau et al., 1974 et 1975 ; Coty et al., 1979). Le complexe H-R de haut poids moléculaire, incapable de lier le DNA acquiert par un changement de structure ou de conformation, visualisable par la baisse du poids moléculaire, une affinité pour le DNA (Govindan, 1980 ; Vedeckis, 1983 ; Munck et al., 1980 ; Hutchens et al., 1982, Milgrom et al., 1976, Atger et al., 1976).

Plusieurs modèles cellulaires ont alors été proposés :

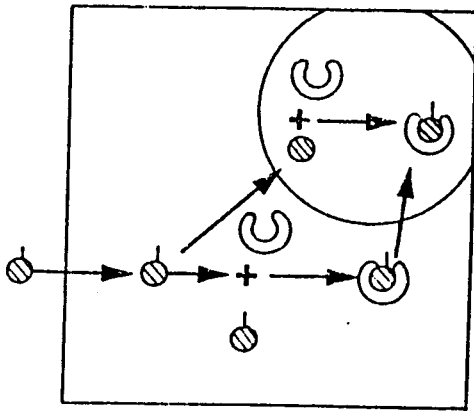
Le premier modèle est un modèle en deux étapes avec une étape cytoplasmique qui comprend la liaison du récepteur à l'hormone, puis la transformation. La deuxième étape, nucléaire, permet la fixation du récepteur transformé sur le DNA (voir figures 3 et 4 a). Pour Linkie et Siiteri (1978), la transformation serait intranucléaire.

Sheridan et al., 1979 proposent un modèle dit "à l'équilibre" (voir figure 4 b) dans lequel le récepteur non lié à l'hormone est en équilibre entre le cytoplasme et le noyau. Cet équilibre est déplacé en faveur du cytoplasme lors de l'homogénéisation du tissu.

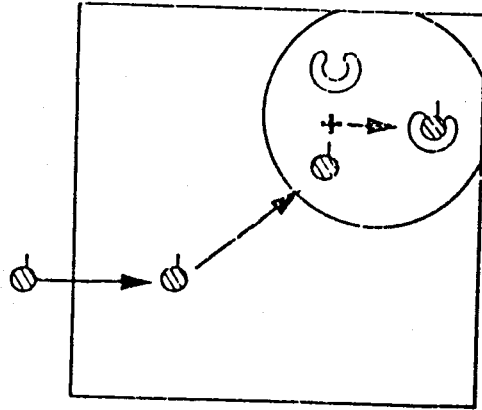
De récents travaux remettent en cause l'existence même du récepteur cytosolique et forment l'hypothèse d'un récepteur à oestrogènes primitivement nucléaire (voir figure 4 c) .la localisation du récepteur dans le cytosol serait due à un artefact de manipulation (Welshons et al., 1984 ; King et al., 1984). Si cette théorie est exacte, elle pose de nombreux problèmes. Le récepteur non lié à l'hormone est-il déjà fixé à la chromatine ? Est-ce la même chose pour tous les autres récepteurs stéroïdiens (Schrader, 1934 ; Clark, 1984) ?



(a) modèle en deux étapes



(b) modèle à l'équilibre



(c) modèle nucléaire

Figure n° 4 : Trois modèles cellulaires de l'action des glucocorticoïdes basés sur les références

Hormone stéroïde



Récepteur non lié



Récepteur lié



Govindan (1980) a montré pour le récepteur à glucocorticoïdes qu'il y avait passage du cytoplasme au noyau par une technique d'immunofluorescence de cellules intactes. Les récepteurs à glucocorticoïdes et à oestrogènes n'ont probablement pas les mêmes mécanismes cellulaires et moléculaires (Vedeckis, 1983 ; Raaka et al., 1983 ; Notides et al., 1975) mais cela ne change en rien le modèle de base en deux étapes de l'action des glucocorticoïdes : récepteur non lié inactif et récepteur lié actif (Rousseau, 1984).

La conséquence de l'activité du récepteur lié à l'hormone glucocorticoïde est la fixation sur le DNA, d'où en découle une augmentation ou une baisse de la concentration en mRNA (Rousseau, 1984). L'action biologique des glucocorticoïdes a fait l'objet de revues détaillées (Saez et al., 1976 ; Munck et al., 1977 ; Baulieu, 1978). nous nous bornerons juste à signaler qu'au niveau du foie, l'action des glucocorticoïdes se traduit par l'accroissement de la néoglycogénèse, l'accroissement de la glycogénogénèse et une action permissive sur la glycogénolyse par le glucagon.

Après le lancement de l'action cellulaire, il y a lieu d'inactiver l'hormone par l'action d'enzymes dont le but est de favoriser l'absence de recombinaison avec le récepteur. Les produits du catabolisme (Baulieu, 1978) de la cellule hépatique sont véhiculés par le sang jusqu'au rein où ils sont excrétés.

II- LE RECEPTEUR A GLUCOCORTICOIDES : REVUE SUR LE RECEPTEUR NON PURIFIE

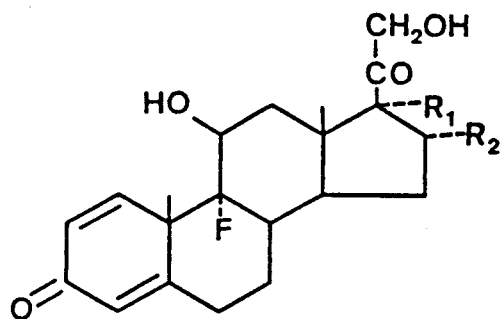
1) Présentation

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'existence du récepteur à glucocorticoïdes a été clairement démontrée (Sibley et al., 1974). Sa nature chimique, étudiée sur des préparations biologiques brutes correspond à celle d'une protéine. En effet, les enzymes protéolytiques, telles que la pronase, la papaïne, la trypsine et la chymotrypsine détruisent l'activité de liaison. Par contre, DNase, RNase, collagénase, hyaluronidase, neuraminidase et lysozyme sont sans action. Cependant, une récente publication montre que si la RNase n'a pas d'effet sur l'activité de liaison, elle convertit la forme 7-8 S du récepteur cytosolique lié à la dexaméthasone en une forme 3-4 S ce qui suggère une association entre le récepteur protéique et le RNA (Tymocko et al., 1984).

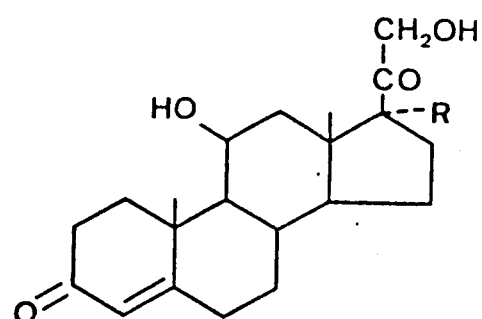
Le récepteur est une protéine fragile, sensible à l'action de la chaleur, du pH, de la force ionique et des réactifs des thiols. Son caractère amphotère lui permet de se fixer aussi bien sur des supports cationiques (DEAE-cellulose ou DEAE sur HPLC) que sur des supports anioniques (DNA-cellulose, phosphocellulose ou héparine-agarose).

La mise en évidence des récepteurs à glucocorticoïdes a pu être réalisée grâce à l'obtention de stéroïdes tritiés à haute activité spécifique, tels que la dexaméthasone ou l'acétonide de triamcinolone, dont les constantes de dissociation à l'équilibre, d'environ 1-3 nanomolaire, en font des ligands remarquables dans l'étude du récepteur (voir figure n° 5). Mais le "label" de récepteur à hormone stéroïde ne peut être donné à une protéine qu'après qu'elle ait satisfait à un certain nombre de critères (Cuatrecasas, 1974).

Ces critères sont les suivants :



Analogues de synthèse



Dérivés naturels

	R ₁	R ₂
Dexaméthasone	OH	CH ₃

	R ₁	R ₂
Triamcinolone	OH	OH
Acétonide de triamcinolone		

	R
Corticostérone	H
Cortisol	OH



Figure n° 5

Formules de glucocorticoïdes

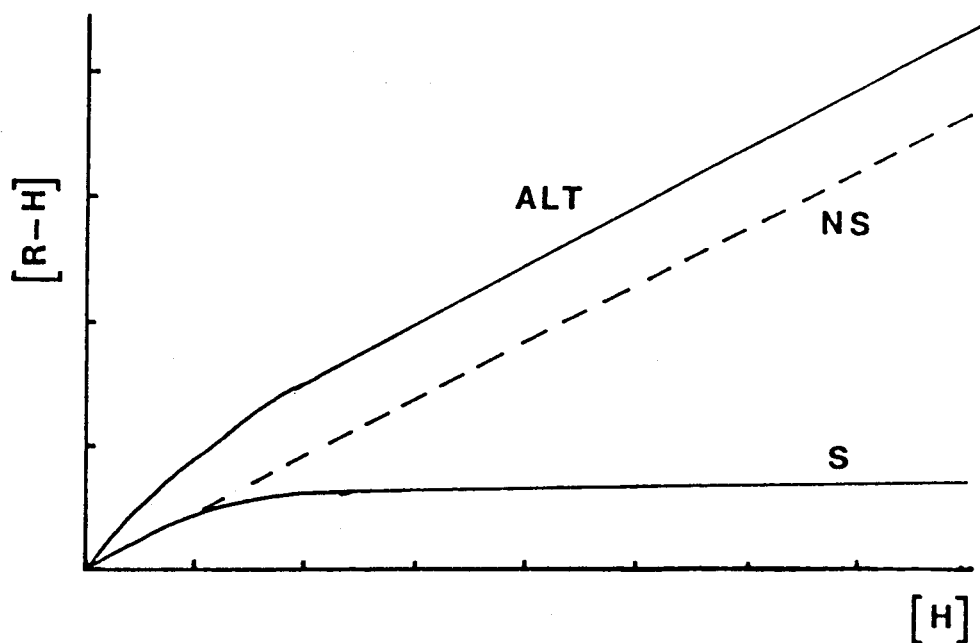


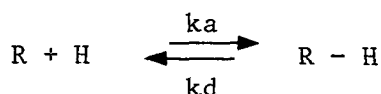
Figure n° 6

Représentation graphique d'une liaison non spécifique (NS) et effet sur celle d'une liaison spécifique (S)
 ALT : activité liée totale

- la protéine doit être spécifique vis-à-vis de l'hormone et également des analogues structuraux naturels ou de synthèse, ainsi que de ses inhibiteurs.
- la protéine doit être spécifique du tissu cible ;
- elle doit avoir une forte affinité de liaison avec l'hormone dont les taux physiologiques sont très faibles ;
- elle doit avoir une faible capacité (environ 10^4 sites accepteurs par cellule), ce qui permet de saturer le système aux taux hormonaux physiologiques ;
- la liaison hormone-récepteur doit être réversible.

L'étude du récepteur a longtemps été rendue difficile par le fait que dans les études *in vitro*, il était pratiquement impossible de visualiser la saturation du complexe H-R cytosolique (voir figure n° 6). Cette insaturabilité apparente est due à l'existence de nombreuses protéines qui fixent le stéroïde mais ne correspondent pas à la définition de récepteurs à glucocorticoïdes. Ces protéines peuvent avoir soit une origine cellulaire et dans ce cas il peut s'agir de récepteurs d'autres hormones stéroïdes, de protéines liant spécifiquement les glucocorticoïdes (enzymes ou transcortine) ou de protéines non spécifiques (protéines membranaires, albumine ...), soit une origine plasmatique où nous rencontrons de nouveau la transcortine, dont le lieu de synthèse est la cellule hépatique et qui est ensuite excrétée, et l'albumine. Les protéines qui ne lient pas spécifiquement les glucocorticoïdes sont caractérisées par une faible affinité de liaison et une très forte capacité. Généralement, cette capacité est considérée comme illimitée. L'estimation de cette liaison non spécifique se fait par incubation de la préparation brute en présence de stéroïde radioactif et d'un très fort excès de stéroïde froid.

Cet obstacle étant surmonté, il est aisé de constater que l'interaction hormone-récepteur est réversible et qu'elle suit le principe de l'action de masse.



R : récepteur non lié
 H : stéroïde libre
 R-H : complexe hormone-
 récepteur

ka et kd étant respectivement les constantes de vitesse d'association et de dissociation.

Il est possible de calculer la constante apparente de dissociation à l'équilibre K_D (mol.l^{-1}) ou la constante apparente d'association à l'équilibre K_A (l. mol^{-1}) - qui est la constante d'affinité.

$$K_A = \frac{R - H}{R \cdot H} = \frac{1}{K_D} \qquad K_A = \frac{ka}{kd}$$

2 - Stabilisation du récepteur

2.1 - Liaison à l'hormone

Le récepteur à glucocorticoïdes est instable dans le milieu cytosolique. De nombreux auteurs ont remarqué qu'il fallait ajouter l'hormone dès avant ou après le broyage cellulaire (Kirkpatrick et al., 1972), pour obtenir une fraction cytosolique contenant du récepteur capable de lier le DNA. De nombreuses études effectuées en ce sens ont montré l'effet stabilisateur de l'hormone sur le récepteur dont la durée de demi-vie est augmentée d'un facteur 10 à 0°C en présence du stéroïde (Kirkpatrick et al., 1972 ; Rafestin-Oblin et al., 1977 ; Blanchardie et al., 1983). L'effet stabilisateur de l'hormone s'estompe avec l'augmentation de la température (Blanchardie et al., 1983). Une hormone dont la constante de vitesse de dissociation est très faible augmente la demi-vie du complexe. L'emploi de l'acétonide de triamcinolone augmente la demi-vie d'un facteur 2 par rapport à la dexaméthasone (demi-vie : 48-72 heures). Par comparaison, la demi-vie du récepteur non lié est inférieure à une dizaine d'heures.

2.2 - Récepteur et action du molybdate

Un pas important dans la stabilisation du récepteur a été effectué par l'emploi du molybdate de sodium. Le groupe de Pratt a montré le premier que le molybdate stabilisait le récepteur de foie de rat non lié à l'hormone (Nielsen et al., 1977a ; Nielsen et al., 1977b).

Dans le cas des thymocytes de rat, par contre, ces auteurs ont montré que le molybdate n'avait qu'une faible activité stabilisante sur le récepteur non lié et qu'en fait, un inhibiteur de phosphatases tel que le molybdate, utilisé seul, n'empêchait pas l'inactivation, c'est-à-dire l'incapacité de lier le stéroïde (Sando et al., 1983).

Le récepteur de foie, non lié et inactivé est capable de recouvrir une activité de liaison après incubation du cytosol avec du molybdate (voir figure n° 7) (Sando et al., 1979). Des résultats analogues ont été décrits par Grody et al. (1980) qui ont montré que l'emploi de molybdate 10 mM dans du cytosol d'oviducte de poulette provoquerait une augmentation du nombre apparent de récepteurs à progestérone. Leach et al. (1979), Naray et al. (1983) montrent que le molybdate bloque réversiblement l'inactivation du récepteur et que le molybdate est capable de prévenir l'inactivation non enzymatique du récepteur non lié, causée par l'augmentation des sels ou par la précipitation au sulfate d'ammonium. Dans le cas du récepteur de foie de lapin, Blanchardie et al. (1983) ont montré que le molybdate stabilise à la fois le récepteur non lié et le récepteur lié (voir figure n° 8) et augmente de façon considérable la demi-vie du récepteur et l'affinité du stéroïde pour le récepteur.

Si le molybdate favorise l'activité de liaison du stéroïde au récepteur, il empêche par contre la transformation du complexe H-R, que ce soit par l'augmentation de la température ou l'élévation de la force ionique (Leach et al., 1979). Le tungstate a également cet effet, mais d'autres inhibiteurs de phosphatases tels que le fluorure de sodium ou le glucose-1-phosphate n'empêchent pas la transformation (Leach et al., 1979 ; Dahmer et al., 1981).

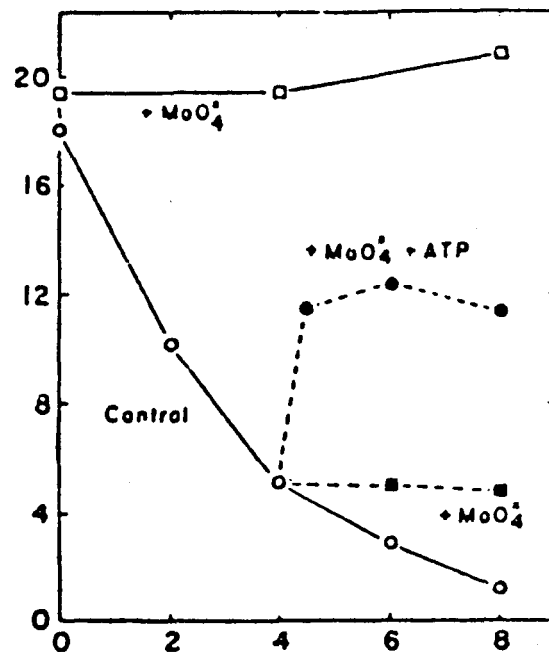


Figure n° 7 : Réactivation du récepteur à glucocorticoïdes en présence de molybdate 10 mM à 25°C.

	Demi-vie (heures)		
	0°C	20°C	30°C
Forme non liée			
- Mo	11	2	0,5
+ Mo 10 ⁻² M	20	4,5	2,5
Forme liée			
- Mo	128	12	1,5
+ Mo 10 ⁻² M	235	16	5

Figure n° 8 : Inactivation du récepteur lié ou non en présence ou en l'absence de molybdate. Les essais sont effectués à des températures différentes. La mesure de l'activité de liaison de la forme non liée est effectuée après incubation de cette dernière avec de l'hormone tritiée pendant 2 heures à 0°C.

La base moléculaire de l'action du molybdate reste encore très mal définie. Pour Naray et al. (1983), le molybdate n'aurait aucun effet sur du récepteur purifié tandis que pour Cardo et al. (1983) et Leach et al. (1979, 1983), le molybdate formerait un complexe avec des groupements phosphate du récepteur. Le molybdate en se liant ainsi soit à des groupements phosphate soit à des groupements sulfhydryl du récepteur bloquerait la transformation (Leach et al., 1979) en inhibant un mécanisme de déphosphorylation. Une seconde possibilité, suggérée par Nishigori et Toft (1980) serait que le molybdate agirait sur des résidus d'acides aminés de la protéine. En effet, il a été montré que le molybdate était capable d'interagir avec le groupement thiol de la cystéine ou le groupement imidazole de l'histidine (Weathers et al., 1979). Ceci expliquerait pourquoi un excès de phosphate ne bloque pas l'inhibition de la transformation due au tungstate (Murakami et al., 1982).

Ces auteurs ont d'abord émis l'hypothèse d'une action indirecte du molybdate par inhibition d'une phosphatase intracellulaire. Puis est venue l'hypothèse d'une action directe sur le récepteur lui-même puisque ce dernier, lorsqu'il est purifié, reste sensible à l'action du molybdate. Ces deux hypothèses pourraient être réunies en une seule si l'activité enzymatique de phosphorylation du récepteur purifié venait à être confirmée (Miller-Diener, 1985).

2.3 - Récepteurs et thiols

Schmidt et Sekeris (1976) ont montré que des agents réducteurs tels que le β -mercaptoéthanol, le dithiothréitol, le $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ et le thioglycolate, s'ils n'augmentent pas la capacité de liaison de l'hormone au récepteur, sont capables d'augmenter de 50 % la durée de demi-vie du récepteur. Grippo et Pratt (1983), pour leur part, indiquent que la capacité de lier spécifiquement le stéroïde d'une fraction cytosolique de foie de rat peut être restaurée par l'addition de dithiothréitol ou par l'addition de cytosol chauffé à 100°C avant l'incubation en présence de molybdate. Ces auteurs

pensent que ce facteur endogène thermostable peut être la thioredoxine qui maintiendrait la capacité de liaison du stéroïde au récepteur par un mécanisme NADPH dépendant. Il apparaît donc évident qu'un groupement thiol à l'état réduit est nécessaire à l'activité de liaison. Cette idée a été renforcée par l'emploi d'un stéroïde de synthèse, le mésylate de dexaméthasone dont le groupement méthyl sulfonate réagit avec les thiols (Simons et al., 1982) d'une part et de réactifs de thiols tels que les N-alkyl maléimides (Kalimi et al., 1980 ; Fomstecher et al., 1984) et les mercuriels comme le para-chloromercuribenzoate (Banerji et al., 1981). Cependant, il est impossible de dire par cette méthode si le groupement thiol est localisé près du site actif de liaison de l'hormone ou en tout autre point de la molécule dont la modification entraînerait la perte de l'activité de liaison.

En conclusion nous dirons que l'emploi d'agents réducteurs stabilise fortement le récepteur non lié. L'emploi simultané dans le tampon d'agents réducteurs (β -mercaptoéthanol ou dithiothréitol) et du molybdate produit un remarquable effet synergique sur la stabilisation du récepteur libre ou du récepteur lié (Sando et al., 1979 ; Hubbard et Kalimi, 1982).

2.4 - Inhibiteurs de protéases

Comme nous l'avons dit lors de la présentation, le récepteur est une protéine parce qu'il perd l'activité de liaison lorsqu'il est soumis à l'action de protéases. Les effets des inhibiteurs de protéases ont en fait été peu étudiés. Nous pouvons dire que certains de ces inhibiteurs montrent paradoxalement une chute de l'activité de liaison du stéroïde au récepteur. C'est le cas du TPCK et du TLCK, deux inhibiteurs de protéases à sérine (Hubbard et al., 1984). L'adjonction de réducteurs de thiols dans le tampon empêche l'action du TPCK et du TLCK (Schmidt et al., 1976 ; Hubbard et al., 1984). Le PMSF, par contre, n'a aucune action sur l'activité de liaison. Un inhibiteur de protéases à cystéine, E-64, empêche l'activité de

liaison, en présence ou en l'absence de réducteurs de thiols. L'action marginale de ces inhibiteurs pourrait en fait servir à la caractérisation d'un thiol essentiel à l'interaction récepteur-stéroïde.

Dans le cas du récepteur lié à l'hormone, deux auteurs (Sherman et al., 1978 ; Chang et al., 1983) montrent que la leupeptine prévient la dégradation du complexe cytosolique en des formes plus petites. Une littérature plus abondante décrit les effets des inhibiteurs de phosphatases tels que le molybdate, le fluorure de sodium, le lévamisole. Seul le molybdate empêche efficacement l'inactivation du récepteur non lié (Nielsen et al., 1977a). Ces inhibiteurs (molybdate, tungstate ou vanadate) sont en fait plutôt utilisés pour empêcher la transformation du complexe H-R en la forme liant le DNA (Barnett et al., 1980 ; Nielsen et al., 1977c).

2.5 - Emploi des phosphatases

L'action de la phosphatase alcaline se situe à deux niveaux. Elle convertit le récepteur non lié en une forme incapable de lier le stéroïde (Nielsen et al., 1977c). Mais la majorité des études, faites sur le complexe R-H, montre que la phosphatase alcaline transforme le complexe en une entité plus petite capable de se lier au noyau (Nielsen et al., 1977c ; Barnett et al., 1980, Schmidt et al., 1982).

3) Caractérisation du site de liaison

Tous les stéroïdes ont globalement le même squelette. C'est la nature de substitution du squelette du stéroïde qui confère ce que l'on peut appeler la "spécificité d'hôte" du récepteur pour le stéroïde (voir figure n° 9). Une structure plane, les cétones en C3 et C20 favorisent l'affinité (Lee et al., 1977 ; Weeks et al., 1973 ; Wolff et al., 1978, Rousseau et al., 1972, Ballard et al., 1975 ; Baxter et al., 1971). Les hydroxyles en C11 et C21 sont nécessaires et impliquent au niveau du récepteur, l'existence de groupements accepteurs d'hydrogène. De plus, l'hydroxyle en C11 doit être en β pour assurer une bonne affinité (Kirkpatrick et al., 1972 ; Toth et Aranyi, 1983). L'affinité d'un stéroïde de synthèse par rapport au cortisol peut être améliorée par l'introduction d'une double liaison en C1-C2 et d'un atome de fluor en C9 (c'est le cas de la dexaméthasone et de l'acétonide de triamcinolone). A partir de la dexaméthasone, de nombreux substituants dans la région 17 β ont été synthétisés. Ils gardent une bonne affinité pour le récepteur et peuvent servir à la synthèse du gel d'affinité (Formstecher et al., 1980 ; Lustenberger et al., 1981). Un autre substituant, le mésylate de dexaméthasone a la particularité de fixer covalentiellement le récepteur (Eisen et al., 1981 ; Simons et al., 1982). La réactivité du groupement méthyl-sulfonate sur une fonction thiol permet de supposer l'existence d'une cystéine, dans ou à proximité du site de liaison.

Toutes ces études effectuées à partir de stéroïdes de synthèse au début des années 1970 avaient pour but, par le moyen de la relation structure-activité (SAR) du stéroïde, de caractériser le site de liaison, le récepteur n'étant pas encore purifié à l'époque.

La purification du récepteur a rendu un peu caduque ce genre d'études car elle rend l'approche directe possible. C'est la raison pour laquelle nous ne nous sommes pas étendu sur la nature de substitution du squelette du stéroïde.

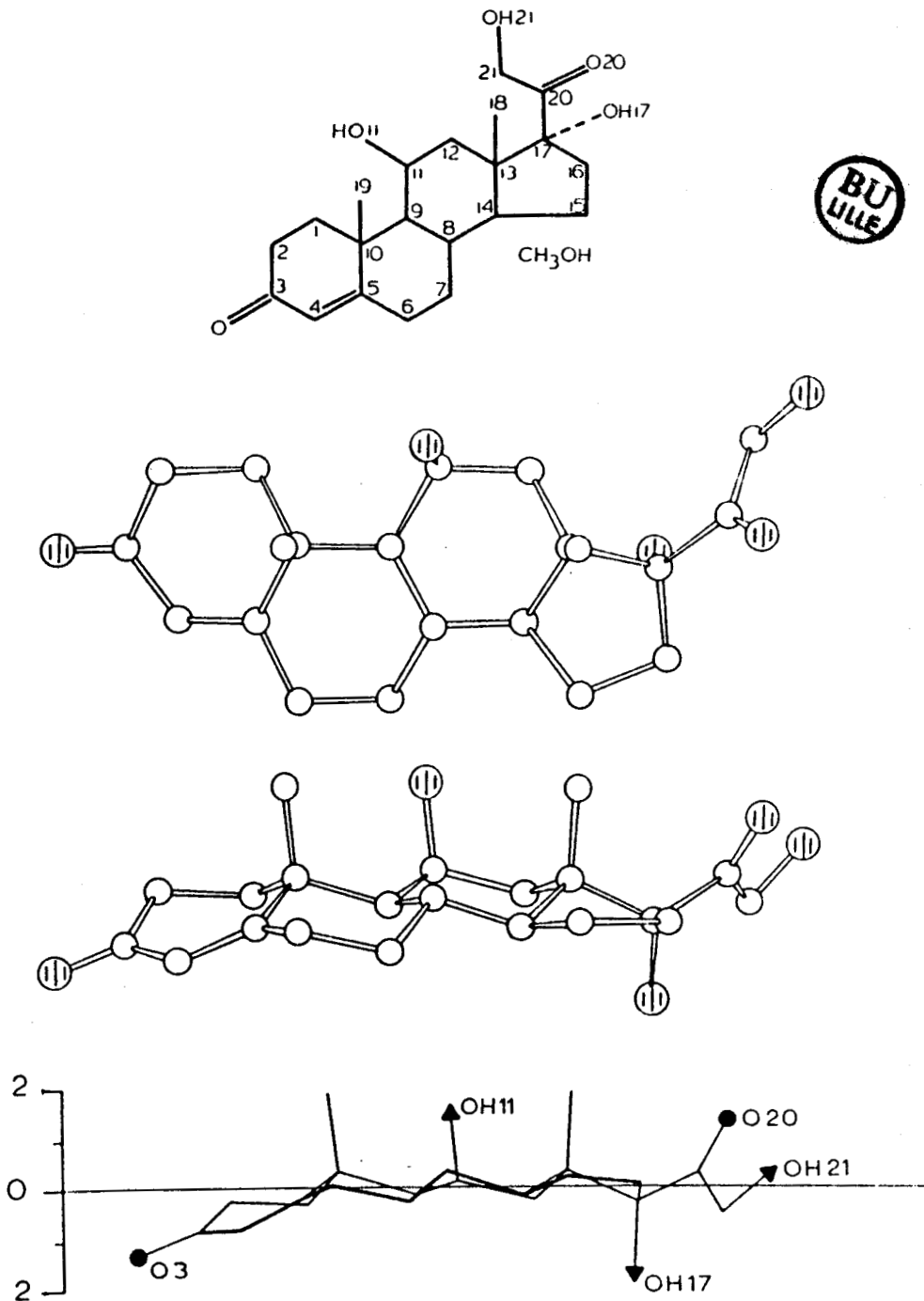


Figure n° 9 : Structure de la molécule de cortisol.
Structure dans l'espace et vue par rapport
à un plan équatorial.

4) Transformation du récepteur à glucocorticoïdes

Principe de la transformation

L'acquisition pour le complexe hormone-récepteur de la capacité à lier le DNA sur le noyau est appelée transformation. Cependant, si le signifié correspond à une réalité *in vivo* et *in vitro*, le signifiant, quant à lui, est sujet à controverse, à la fois dans sa terminologie et dans la place qu'il occupe dans le mécanisme en deux étapes de l'action du stéroïde sur le récepteur. Pour certains auteurs, l'activation et la première étape consiste en l'acquisition par le récepteur de la capacité de lier le stéroïde, la seconde étape étant la transformation. Pour d'autres auteurs, l'activation est l'acquisition de la capacité pour le complexe R-H de se lier au DNA, activation qui correspond donc à la deuxième étape du premier modèle décrit, la seconde étape, nommée translocation, étant le passage pour le complexe H-R "activé" du cytoplasme au noyau. Dans ce mémoire, nous nous référerons au premier modèle. Il faut néanmoins constater que les trois étapes décrites dans les deux modèles précités ont été montrées *in vitro* et *in vivo*. L'existence du phénomène de transfert au noyau des complexes modifiés a été visualisée par des techniques autoradiographiques qui montrent le passage progressif des marqueurs radioactifs du cytoplasme vers le noyau (Govindan, 1980). La transformation a été décrite *in vivo* et *in cello* comme l'apparition, dans une première phase, d'une entité incapable de lier le DNA, et, dans une seconde phase, par l'augmentation d'une entité capable de lier le DNA et la disparition simultanée de l'entité non liante (Markovic *et al.*, 1980 ; Munck *et al.*, 1979 ; Surks *et al.*, 1984 ; Antakly *et al.*, 1984 ; Suec *et al.*, 1983). Cependant, le mode de transport du complexe H-R transformé, si la transformation a lieu dans le cytoplasme ou non transformé si elle se passe dans le noyau, à travers la membrane nucléaire reste inconnu à ce jour, dans l'hypothèse d'un récepteur cytoplasmique. A la suite du passage dans le noyau, le complexe transformé se fixe à des éléments nucléaires (Milgrom, 1981) provoquant ainsi la formation ou non d'ARN messagers et par voie de conséquence, l'augmentation ou la diminution de synthèse des produits de transcription du gène.

Les méthodes d'études de la transformation ont d'abord été utilisées dans des systèmes acellulaires reconstitués, tels que l'incubation de complexes stéroïde-récepteurs cytosoliques avec des noyaux cellulaires isolés, la radioactivité liée incorporée dans le noyau donnant le taux de transformation. Un tel système nécessite cependant de nombreuses précautions. Il faut veiller à l'absence de complexes R - H endogènes dans le noyau, à l'absence de liaison non spécifique du récepteur à la fraction nucléaire, à la récupération quantitative des complexes H-R dans le cytosol et les noyaux à la fin de l'incubation, et finalement, à une mesure précise du complexe R- [³H]-H. D'autres systèmes de mesure ont été utilisés : des résines polyanioniques ou cationiques. Leur emploi est très simple, ne donne cependant pas toujours des résultats très quantitatifs.

Comme nous allons le voir par la suite, de nombreux facteurs agissent sur le taux de transformation du complexe H-R. L'acquisition par le DNA de la capacité de lier le DNA a suscité de nombreuses études. Plusieurs revues récentes (G.G. Rousseau, 1984 ; T.J. Schmidt et G. Litwack, 1984 ; E. Milgrom, 1981) font le tour de la question et serviront de point de référence pour ce qui va suivre.

4.1 - R-GC et force ionique

La transformation du complexe H-R est étudiée à 0°C dans un tampon hypoionique dont on augmente la force ionique par adjonction de NaCl ou de KCl (Higgins et al., 1973). La liaison au DNA ou au noyau cellulaire isolée n'est rendue possible que par la dilution du cytosol auquel on a ajouté du NaCl ou du KCl, ce qui montre la difficulté de différencier l'étape de transformation de la fixation au noyau. Cette technique nécessitant une étape de dilution est finalement peu utilisée pour la transformation du récepteur à glucocorticoïdes bien que la transformation puisse être force ionique dépendante *in vitro* (Bailly et al., 1978).

Des études parallèles menées avec des forces ioniques croissantes sur un cytosol contenant du molybdate ont montré que le complexe hormone-récepteur pouvait voir son coefficient de sédimentation passer de 8-10S à 4,6-5 S (Weatherhill et al., 1982 ; Vedeckis, 1981, Vedeckis, 1983). Cette forme intermédiaire décrite serait capable de lier le DNA. Pourtant

la purification du récepteur à glucocorticoïdes en forte force ionique et en présence de molybdate ne modifie pas son coefficient de sédimentation (Lustenberger et al., 1981 ; Idziorek et al., 1985).

4.2 - R-GC et action de la température

La température a deux effets sur la transformation. Son élévation diminue le temps d'obtention du plateau de transformation, plateau qui est le même quelle que soit la température, et augmente la perte du matériel transformé après obtention du plateau (Higgins et al., 1973). Cette diminution de la liaison au DNA du complexe H-R que l'on aurait pu attribuer à une augmentation de la vitesse de dissociation du stéroïde et du récepteur sous l'effet de la température a été interprétée par Milgrom, (1981) comme un état de désactivation, c'est-à-dire un changement de conformation de la protéine qui empêche la liaison au noyau.

Le récepteur cytosolique est pratiquement toujours obtenu dans un tampon de faible force ionique, que ce soit en tampon Tris, TES ou HEPES. Ces conditions, éloignées de l'état physiologique, nécessitent le maintien à 0°C du récepteur, et ce, à partir de la mort de l'animal, pour assurer sa stabilité. Il suffit alors d'augmenter la température à 20-25°C pendant 30 minutes (conditions optimales pour obtenir la transformation du récepteur préalablement incubé avec l'hormone (Milgrom et al., 1973 ; Bailly et al., 1978). Comme nous l'avons vu précédemment, l'augmentation de température du récepteur cytosolique non lié à l'hormone fait chuter brutalement la capacité de liaison du récepteur au stéroïde (Blanchardie et al., 1983). D'autres auteurs utilisent en complément la force ionique (0,15 M NaCl) pour obtenir la transformation (Simons et al., 1976). Néanmoins, l'augmentation de la température, utilisée seule, reste la méthode la plus employée pour la transformation du complexe H-R dans le but d'une étude ultérieure.

4.3 - RGC et échange d'ions

L'acquisition par le complexe H-R transformé de la capacité de lier des sites accepteurs nucléaires de noyaux isolés a

conduit la communauté scientifique à penser que la transformation était un processus biologique qui exposait des régions positivement chargées à la surface de la molécule (Schmidt et al., 1982). Cette hypothèse fut rapidement vérifiée lors de l'utilisation de colonnes de polyanions naturels ou synthétiques, tels que la DNA-cellulose, la phosphocellulose, l'ATP-Sépharose, le carboxyméthyl-Sephadex (Milgrom et al., 1973 ; Schmidt et al., 1982 ; Mainwaring et al., 1973 ; Cake et al., 1976, Andreasen, 1982, Simons, 1977 ; LeFevre et al., 1979, Kalimi et al., 1975 ; Miller et al., 1978). La transformation entraîne une augmentation d'affinité pour ce type de colonne, mais une étude comparative avec des noyaux isolés, montre, que d'une manière générale, la phosphocellulose retient moins bien le récepteur lié et transformé que la DNA-cellulose, et cette dernière moins bien que les noyaux isolés (Lefevre et al., 1979 ; Atger et al., 1976).

D'un autre côté, des résines polycationiques ont également été utilisées pour séparer les deux formes du complexe H-R. Ce sont en particulier la DEAE-cellulose et la DEAE-Sephadex (Milgrom et al., 1973 ; Beato et al., 1972 ; Litwack et al., 1975). La forme transformée moins acide que la forme non transformée puisqu'elle présente plus de charges positives à la surface, nécessite une force ionique plus faible pour être éluée. Il est donc ainsi possible de visualiser par chromatographie sur DEAE-cellulose la transformation au cours du temps sous l'action de la température du complexe hormone-récepteur (Munck et al., 1980).

4.4 - Existence de facteurs de transformation

Comme nous l'avons vu précédemment, la force ionique et la température jouent un rôle prépondérant dans le processus de transformation "in vitro". L'élévation du pH est également employée mais c'est une technique moins utilisée. Pour Bailly et al. (1978), la transformation par le pH est suivie d'un changement de l'équilibre entre deux formes de récepteurs, les complexes transformés et non transformés. Mais cette hypothèse a été récemment contredite par Bodine et al. (1984) pour qui la transformation induite par le pH est un phénomène irréversible.

A ces facteurs de transformation aussi peu physiologiques que possible, bien que largement employés, les auteurs ont voulu répondre par la recherche de mécanismes beaucoup plus fins et par la même plus physiologiques, même si pour certains d'entre eux, encore aujourd'hui, l'existence reste à démontrer. Ce sont les facteurs de ces mécanismes que nous nous proposons d'évoquer dans les paragraphes qui vont suivre.

4.4.1 - Thiol essentiel à la transformation

Après l'existence d'un thiol essentiel à la liaison de l'hormone au récepteur, l'existence d'un second thiol, nécessaire, lui, à la transformation, semblait communément admise, sans qu'aucune preuve directe ne puisse être apportée. Kalimi et Love (1980) ont examiné les effets des réactifs des thiols sur la transformation du complexe hépatique. Le récepteur lié non transformé, traité avec la N-éthyl-maléimide ou l'iodoacétamide ne montre pas d'augmentation de liaison au noyau après chauffage à 25°C. D'autre part, ces complexes récepteurs [³H] dexaméthasone, chauffés à 25°C, puis traités par les réactifs des thiols, montrent une activité de liaison au noyau similaire à celle obtenue avec du cytosol transformé. Ces résultats suggèrent que les réactifs des thiols agissent sur le complexe H-R non transformé en bloquant cette transformation, et par voie de conséquence, la liaison au noyau. Le traitement à la N-éthylmaléimide ne change pas le profil d'élution du complexe H-R sur colonne de gel filtration par rapport à un cytosol non traité. Donc, la N-éthylmaléimide (NEM) ne bloque pas la transformation par la fragmentation du récepteur lui-même. Pourtant, cette impossibilité de transformation du complexe traité à la NEM reste difficile à interpréter et mène à deux hypothèses. Dans la première, un groupement sulfhydryle est directement impliqué dans la transformation, et, dans ce cas, la liaison de la NEM ou de l'iodoacétamide sur ce groupement provoque un changement conformationnel tel qu'il ne puisse plus y avoir de transformation ; dans la seconde, ces réactifs des thiols ont une action sur une autre protéine cytosolique,

essentielle elle, à la transformation du complexe H-R.

Beaucoup plus récemment, Bodwell et al. (1984) ont franchi un pas décisif dans l'élucidation du mécanisme. En employant deux gels d'affinité différents comportant des groupements disulfure, ils ont pu mettre en évidence que si l'un des gels liait à la fois le complexe transformé et le non transformé, l'autre, quant à lui, ne liait que le récepteur lié transformé. Ceci semble montrer qu'en dehors des groupements thiols communs à la surface des complexes transformés et non transformés, il existe un groupement sulfhydryle placé dans un environnement ionique ou moléculaire tel qu'il ne puisse être lié que par le deuxième gel d'affinité, ce qui plaide en faveur de l'existence d'un groupement thiol, utile ou nécessaire, à la transformation ou à la liaison du DNA puisque le DNA soluble inhibe à la fois la liaison du récepteur à glucocorticoïdes transformé au DNA-cellulose et au deuxième gel d'affinité.

4.4.2 - Action du phosphate de pyridoxal

Le phosphate de pyridoxal est utilisé comme réactif des groupements NH_2 libres pouvant former des bases de Schiff. In vitro, cette vitamine a deux actions contradictoires sur le récepteur à glucocorticoïdes cytosolique. Elle augmente d'une part le taux de transformation du complexe H-R, le pyridoxal ou la pyridoxamine utilisés comme témoin, n'agissent pas sur le taux de transformation, et, elle empêche d'autre part la liaison du complexe R-H transformé avec le noyau et la DNA-cellulose (Cake et al., 1977 ; Cidlowski et al., 1979 ; Cake et al., 1978 ; Sekula et al., 1982 ; Simons, 1979). Le phosphate de pyridoxal peut donc être utilisé comme éluant non spécifique du récepteur sur une colonne de DNA-cellulose (Westphal et al., 1981).

4.4.3 - ATP et système phospho-déphospho

L'action de l'ATP et d'autres phosphoester (AMP, α ou β -glycérophosphate) ou de la phosphatase alcaline de veau lorsqu'elle n'est pas inhibée par l'ion arséniate ou le lévamisole favorisent la transformation (John et al., 1979 ; Barnett et al., 1980). D'un autre côté, des composés qui empêchent l'inactivation (molybdate, tungstate) bloquent la transformation. De telles observations donnent

à penser que de tels mécanismes agissent par des voies biochimiques similaires, phosphorylation ou déphosphorylation, dans le cas de la transformation soit du récepteur lui-même, soit d'un composé régulateur non déterminé, puisque toutes les études ont été faites avec un récepteur non purifié.

4.4.4 - Cations divalents

Les cations divalents tels que Mg^{++} , Mn^{++} , Ca^{++} ont un rôle qui reste à définir. Mg^{++} et Mn^{++} inhibent la liaison HR-DNA sans affecter le taux de transformation (Milgrom et al., 1973, 1976). Par contre le calcium inhibe la transformation et pas la liaison au DNA pour ces auteurs (Milgrom et al., 1973, 1976 ; Aranyi et al., 1980) et a l'action contraire pour Kalimi et al. (1975) à une concentration de 1 mM.

4.4.5 - Autres facteurs influençant la transformation

4.4.5.1 - Inhibiteur de petit poids moléculaire

Il est mis en évidence par la dilution, la gel filtration, la dialyse, qui par simple abaissement de sa concentration entraînent une augmentation de la transformation (Bailly et al., 1977 ; Bailly et al., 1978; Cake et al., 1976 ; Goidl et al., 1977 ; Sato et al., 1980).

Cet inhibiteur de petit poids moléculaire est thermostable à 100°C pendant 15 min., et son poids moléculaire serait inférieur à 500 daltons (Bailly et al., 1977 ; Sakaue et al., 1977). D'autres inhibiteurs de petits poids moléculaires ont pu être mis en évidence et seraient impliqués dans la stabilisation de l'activité de liaison (Sato et al., 1980).

4.4.5.2 - Inhibiteur de haut poids moléculaire

Plus récemment, Barnett et al. (1983) ont décrit un inhibiteur de ce type, thermosensible (partiellement inactivé à 45°C et totalement à 90°C), et d'un poids moléculaire supérieur à 10 000-14 000. Il a été purifié une vingtaine de fois.

A pH physiologique, cet inhibiteur est chargé négativement. Aujourd'hui, ni son mécanisme d'action, ni sa nature moléculaire ne sont connus. Cependant, Barnett et al., en regard des résultats obtenus, pensent que cet inhibiteur est un polypeptide.

Polypeptidique également, l'inhibiteur décrit par Grippo et al. (1983), et macromoléculaire, cet inhibiteur, thermostable, avait déjà été identifié comme prevenant l'inactivation du récepteur. Ce facteur, inhibant la transformation est la thioredoxine (Grippo et al., 1985).

4.5 - Conclusion

Le chapitre sur la transformation montre de manière évidente, sauf peut-être pour les deux inhibiteurs de bas et de haut poids moléculaire, dont l'existence devrait être maintenant incontestée, que ce mécanisme qui permet la liaison du complexe H-R au DNA est très complexe, et que toutes les expériences qui ont été réalisées jusqu'à présent dans des conditions non physiologiques, ne permettent pas d'abonder dans un sens ou dans l'autre.

Quoi qu'il en soit, l'aptitude du récepteur à acquérir une affinité pour le DNA, pour autant qu'elle ait été montrée in vitro, a une signification biologique. En effet, des expériences de microscopie par immunofluorescence de cellules intactes montrent que le récepteur complexé par un anticorps peut passer du cytoplasme au noyau lorsqu'il est lié à l'hormone glucocorticoïde (Govindan, 1980). La transformation des complexes H-R dans des cellules cibles intactes (cellules de thymus ou cellules tumorales de pituite de souris) dans des conditions physiologiques ont également été montrées (Miyabe et al., 1983 ; Munck et al., 1979). Récemment des auteurs ont décrit la translocation apparente du cytoplasme vers le noyau du récepteur des androgènes du foie de lapin in vivo (Sheets et al., 1985).

La transformation, dont le sujet était en perte de vitesse, vient de reprendre un brusque regain d'intérêt par la mise en évidence récente d'une capacité de transformation d'un complexe récepteur

antagoniste d'une part et du complexe récepteur-agoniste purifié d'autre part. Les résultats obtenus avec le RU 486, un puissant antagoniste des glucocorticoïdes, montrent que ce type de complexe peut être transformé par la chaleur sous une forme moins stable que le récepteur agoniste, qu'il passe de manière anormale dans le noyau et qu'il a une capacité de reconnaissance réduite de son site de liaison au niveau du DNA proviral du MMTV (Moquilevsky et al., 1984 ; Bourgeois et al., 1984). Le récepteur purifié, dont on pouvait craindre l'instabilité peut également subir la transformation avec un rendement acceptable sans adjonction de facteurs extérieurs pour Govindan et al. (1984) et Idziorek et al. ("1985"), contrairement à Grandics et al. (1984) pour qui est nécessaire l'adjonction d'un facteur cytosolique.

L'intérêt d'avoir un récepteur hautement purifié sous forme non transformée et ayant gardé la capacité de se transformer, c'est de pouvoir continuer à affiner le mécanisme de la transformation, soit en purifiant le récepteur non transformé lié à un agoniste ou à un antagoniste, soit en ajoutant autant de facteurs de transformation qu'il est possible, ce qui évite par cette technique, les difficultés d'interprétation indissociables des travaux effectués sur un récepteur cytosolique.

5) Liaison au DNA

a) Site de liaison du récepteur au DNA

La nature précise du site de liaison du récepteur au DNA, résultant de l'étape de la transformation, n'est pas encore bien comprise. L'emploi de réactifs spécifiques de certains acides aminés peut donner une idée de l'environnement chimique du site de liaison du récepteur au DNA (Schmidt et al., 1982).

La 1,2-cyclohexanedione, spécifique des résidus d'arginine, inhibe la liaison du complexe transformé au DNA-cellulose, et ceci, sans affecter la liaison stéroïde-récepteur (Disorbo et al., 1980).

L'anhydride éthoxyformique et le rose bengale qui modifient sélectivement les résidus d'histidine empêchent la liaison au DNA mais

par contre, font légèrement chuter l'affinité de liaison du stéroïde au récepteur (Disorbo et al., 1981).

Le phosphate de pyridoxal qui forme une base de Schiff avec les ϵ -NH₂ des résidus de lysine a le même effet que les réactifs précédents sur la liaison au DNA (Cake et al., 1978 ; Sekula et al., 1982).

Pris collectivement, ces résultats tendent à montrer que l'action de la transformation du complexe R-H hépatique réside dans l'exposition des résidus d'acides aminés basiques, tels que ceux nommés précédemment, à la surface de la molécule. Ces résultats sont confirmés par l'acquisition de la liaison au DNA, d'une part, et la perte d'affinité avec la DEAE-cellulose, d'autre part, pour le complexe hormone-récepteur.

Plus récemment, Schmidt et al. (1982), ont montré que l'utilisation de la 1,10 phénanthroline, un chélateur de métal provoquait une interaction de ce réactif avec le récepteur transformé qui bloquait la liaison à la DNA-cellulose. Cet effet inhibiteur n'est pas modifié par la gel filtration et suggère une action sur le récepteur lui-même. Le récepteur à glucocorticoïdes pourrait donc être une métalloprotéine, dont l'ion métallique, localisé dans ou à côté du site de liaison au DNA, serait exposé lors de la transformation. De plus, la faculté de la 1,10 phénanthroline à inhiber la DNA-polymérase, un enzyme contenant du Zn⁺⁺, laisse à penser que le complexe récepteur-hormone glucocorticoïde transformé, autre protéine liant le DNA, pourrait contenir du zinc lié.

b) Site de liaison du DNA au récepteur

La nature ou la succession des bases liant le récepteur pour l'induction du codage des gènes de certaines protéines particulières (la tyrosine-amino-transférase par exemple), n'est pas connue actuellement, ces gènes n'étant pas encore ni isolés, ni amplifiés. Par contre, une séquence répétitive de DNA d'un virus tumoral de la glande mammaire de souris appelé LTR (Long Terminal repeat), sensible à l'action des glucocorticoïdes, a pu être isolée et amplifiée. Le fait que la séquence responsable de la liaison avec le récepteur n'ait pu être mise en évidence qu'avec du récepteur hautement purifié nous a amené à aborder cette question dans le chapitre de la purification.

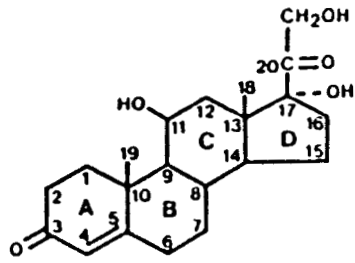
L'hormone elle-même pourrait avoir une action sur la liaison du récepteur au DNA en s'intercalant entre différentes paires de bases (Sluysers, 1983) (voir figure n° 10).

6) RGC : taille moléculaire et protéolyse limitée

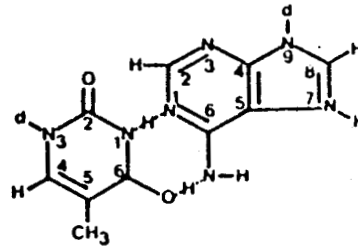
Les récepteurs stéroïdiens, qui sont indispensables à l'action de l'hormone, apparaissent aujourd'hui comme un excellent modèle d'étude de l'expression génique chez les eucaryotes (Chambon et al., 1984a, 1984b ; Beato et al., 1985). Pourtant si l'on commence à avoir une bonne vue d'ensemble du mode d'action des récepteurs stéroïdiens, de nombreux points demeurent encore obscurs quant à la description, à la fois des différents domaines fonctionnels du récepteur stéroïdien, et du mécanisme qui permet au complexe hormone-récepteur d'acquiescer une capacité de lier le DNA.

Dans ce but, l'emploi de protéases exogènes peut apporter de bonnes preuves de la structure organisée en "domaines" du récepteur et de la fonction des différents peptides obtenus. Notons dès maintenant l'obligation de tenir compte du rôle des protéases endogènes lors de l'étude de l'aspect phénotypique que peuvent présenter certains variants de récepteurs (Yamamoto et al., 1974 ; Yamamoto et al., 1976 ; Stevens et al., 1981 ; Nordeen et al., 1981). Les protéases exogènes utilisées ont permis de déterminer trois différents domaines sur le récepteur à glucocorticoïdes. Ils comprennent 1) le site de liaison au stéroïde, 2) le site de liaison au DNA et 3) un domaine dont l'expression de l'activité biologique est encore inconnue, mais qui présente une capacité immunogène très marquée (Wrange et al., 1978 ; Carlstedt-Duke et al., 1977 ; Carlstedt-Duke et al., 1982). Pourtant l'utilité de ces analyses protéolytiques a longtemps été réduite par l'emploi d'un récepteur non purifié, d'une part, et l'incapacité d'identifier tous les résidus spécifiques obtenus par les méthodes de coupure enzymatique, d'autre part. L'emploi de stéroïdes modifiés permettant une liaison covalente et la purification du récepteur transformé ont permis de confirmer la structure quaternaire du récepteur transformé (Reichman et al., 1984 ;

1



hydrocortisone



thymine - adenine

- 31 -

2

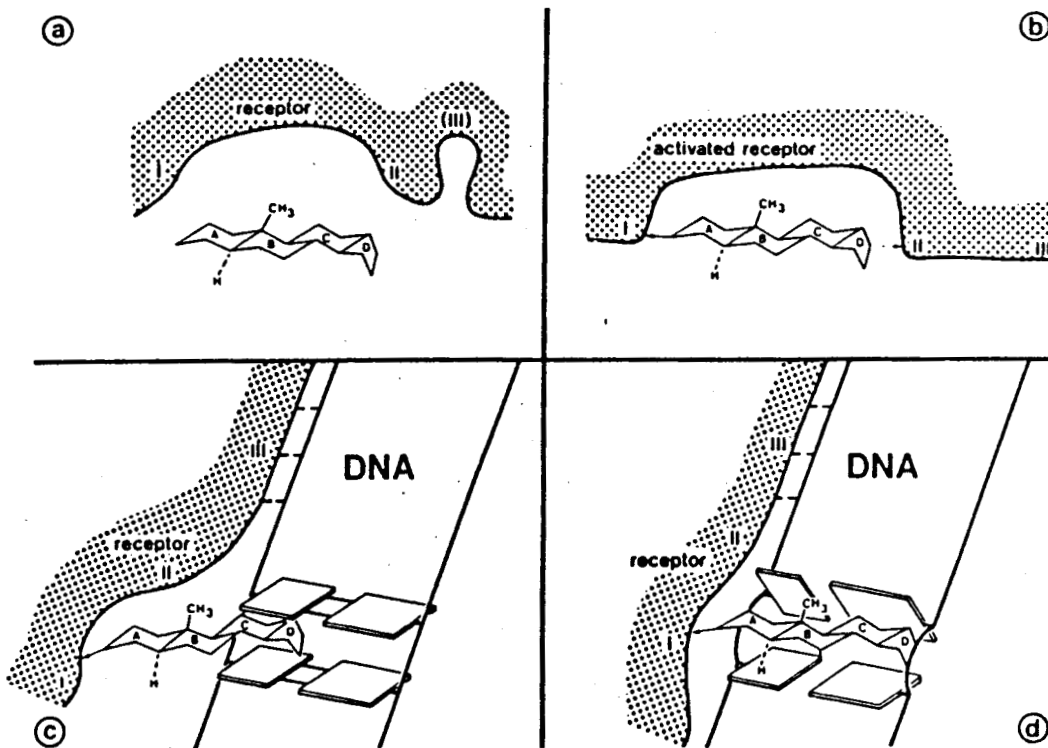


Figure n° 10 : 1) Similarité de la géométrie structurale entre un stéroïde (l'hydrocortisone prise comme exemple) et une paire de bases thymine-adenine du DNA.

- 2) Schéma proposé du mécanisme d'action du stéroïde
- approche du stéroïde
 - l'anneau A du stéroïde se fixe sur le domaine I du récepteur et l'anneau D au domaine II, ce qui occasionne un changement conformationnel de la protéine qui expose le site de reconnaissance au DNA.
 - la liaison du domaine III du récepteur au DNA détruit la liaison du domaine II à l'anneau D.
 - le stéroïde intercalé entre les paires de bases T-A du DNA provoque la déstabilisation de la double hélice et permet l'augmentation de la transcription (d'après Sluyser, 1983).

Wrange et al., 1979 ; Okret et al., 1981 ; Simons et al., 1981 ;
Simons et al., 1983 ; Eisen et al., 1981).

Les formes de récepteur, détectées par l'incubation avec du stéroïde radioactif du cytosol de tissu de mammifère, ont un poids moléculaire qui varie de 20 kDa à environ 330 kDa (Wrange et al., 1978 ; Vedeckis, 1983a ; Sherman et al., 1983 ; Holbrook et al., 1983). La forme la plus lourde, stable en présence de molybdate et d'un poids moléculaire d'environ 280-330 kDa, a été identifiée comme la forme multimérique du complexe hormone-récepteur (Vedeckis, 1983a , Sherman et al., 1983 ; Holbrook et al., 1983 ; Vedeckis, 1983b ; Luttge et al., 1984 ; Weatherhill et al., 1984). La forme 90-94 kDa, selon les auteurs, correspond au récepteur monomérique transformé (Wrange et al., 1978 ; Wrange et al., 1979 ; Vedeckis, 1983a ; Sherman et al., 1983 ; Vedeckis, 1983b ; Luttge et al., 1984 ; Alexis et al., 1983 ; Rousseau, 1984). Certains auteurs ont décrit une forme moléculaire de 176 kDa dimérique, et capable de lier le DNA, comme la forme 90 kDa et contrairement à la forme 280-330 kDa (Vedeckis, 1983b ; Sherman et al., 1984). Toutes les autres formes de récepteurs détectées, in vivo dont le poids moléculaire varie de 20 à 60 kDa, ont été considérées comme des formes dégradées du récepteur capable de lier l'hormone, certaines d'entre elles étant capables ou non de lier le DNA, les formes observées chez les variants du récepteur pouvant être considérées comme des formes dégradées (Dellweg et al., 1982). L'unité liant l'hormone, la plus petite (20-25 kDa), incapable de lier le DNA, est considérée comme le méro-récepteur (Wrange et al., 1978 ; Holbrook et al., 1983 ; Sherman et al., 1978).

L'emploi du mésylate de dexaméthasone a permis de confirmer les études précédentes. En effet, la chymotrypsine donne une forme 40-46 kDa capable de lier le stéroïde et le DNA (la trypsine donne une forme 20-25 kDa liant le stéroïde simplement (Reichman et al., 1984 ; Simons et al., 1981 ; Simons et al., 1983 ; Eisen et al., 1981)? La forme 40-46 kDa correspond au mutant de celle de lymphome de souris (Gehring et al., 1985). L'utilisation de la

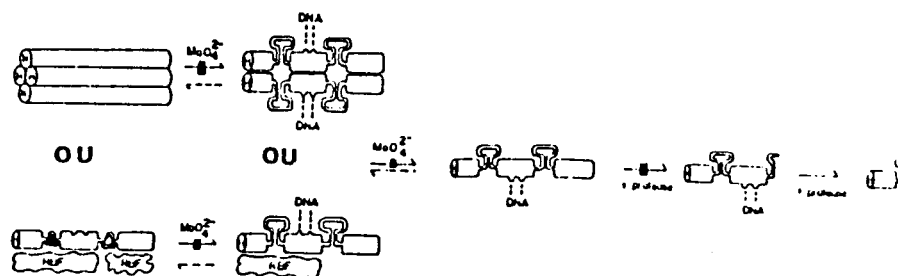
trypsine, de l' α -chymotrypsine et de la protéase V8 de *Staphylococcus aureus*, sur le récepteur transformé et non transformé lie covalentiellement (Reichman et al., 1984) montre que les deux types de complexes présentent les mêmes coupures, ce qui prouve que les unités liant l'hormone, dans le récepteur transformé et dans le récepteur non transformé, sont les mêmes. Cependant, cette technique ne permet pas de montrer si le récepteur non transformé est un homo ou un hétéropolymère.

7) Modèles moléculaires

L'utilisation de ces différentes protéases sur le récepteur transformé purifié ou non a montré que la forme monomérique était composée de trois domaines (voir figures 11, 12, 13) et qu'elle avait un poids moléculaire de 90 kDa. Cette base certaine a amené les auteurs à spéculer sur la forme multimérique du récepteur. La forme 330 kDa obtenue a autorisé les auteurs à penser que le récepteur non transformé pouvait être un tétramère (Vedeckis (1983a) ; Vedeckis, 1983b ; Sherman et al., 1984 ; Alexis et al., 1983) dont on ne savait s'il était homo ou hétéromérique ou si les quatre sous-unités étaient liantes. Cette forme, stabilisée par le molybdate et hautement purifiée ne donne en PAGE-SDS qu'une bande unique à 90 kDa. On observe la même chose pour le récepteur transformé hautement purifié (Wrange et al., 1979). Pourtant, le taux de pureté (25 %) obtenu sur la base d'une unité de liaison par forme moléculaire de 90 kDa, pour le récepteur non transformé purifié, ne cadrerait pas avec la visualisation d'une bande unique à 90 kDa qui représente 90-96 % des protéines mises en évidence sur le gel d'acrylamide. Il y avait donc deux hypothèses liées à cette forme 90 kDa non liante : une partie du récepteur avait perdu ou n'avait jamais eu de capacité de liaison d'une part, ou il existait une protéine de 90 kDa de poids moléculaire, incluse dans la structure multimérique du récepteur, mais qui ne soit pas le récepteur d'autre part. Cette dernière hypothèse est peut être la bonne. En effet, l'emploi d'un anticorps monoclonal

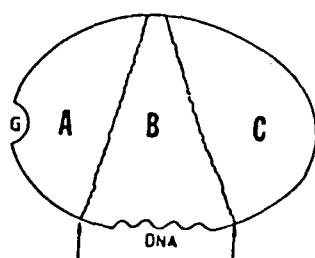
Formes du Récepteur	modèle schématique	$s_{20,w}$ S	R_s Å	M_r $\times 10^{-3}$
tétramère		9-10	80-85	320-350
dimère		5-7		
monomère		4-5	50-60	90-110
aggrégé		>20	>105	>900
fragments intermédiaires		3-4	25-40	40-60
méro-récepteur		2-3	19-24	20-25

Figure n° 11 : Modèle moléculaire hétéromérique de Sherman et al. (1983) et caractéristiques physicochimiques. Les étranglements indiquent les zones sensibles aux protéases. La forme agrégée se fixe avec des ribonucléoprotéines (RNP).



	Récepteur non transformé	Intermédiaire transformé	transformé	protéolysé	méro-récepteur
R_s (nm)	8.3	8.3	6.0	3.9	2.4
S value	9.0	5.0	3.2	3.2	2.4
M_r (g/mole)	317,000	176,000	81,000	53,000	24,000
l/l_0	1.70	2.06	1.93	1.45	1.5
Aud Ratio	14	22	18	8	3
DEAE [KCl]	0.20	0.08	0.08	0.03	DT
PC [KCl]	DT	0.17	0.17	0.30	DT
DNA-C [KCl]	DT	0.14	0.14	0.20	DT
HAP [PO]	0.11	0.11	0.11	0.17	0.02

Figure n° 12 : Modèle moléculaire hétéromérique ou homomérique de Vedeckis, 1983.



Trypsine	α chymotrypsine
Papaïne	Trypsine
extrait lysosomal	Papaïne
	extrait lysosomal

Figure n° 13 : Modèle des différents domaines fonctionnels du récepteur à glucocorticoïdes selon Gustafsson et al (1984).

A : domaine contenant le site de liaison au stéroïde

B : domaine contenant le site de liaison au DNA

C : domaine contenant le déterminant immunologique

dirigé contre le polypeptide 90 kDa non liant du récepteur à progestérone non transformé de l'oviducte de poulette a permis à Joab et al., (1984) de montrer que cet anticorps spécifique était capable d'interagir avec le récepteur à glucocorticoïdes non transformé de l'oviducte de poule. Ceci tend à montrer l'existence d'un déterminant antigénique commun à la structure de plusieurs récepteurs à hormones stéroïdes non transformés. Ce déterminant antigénique serait conservé au cours de l'évolution (Puri et Toft, non publié).

La structure hétéromérique du récepteur à glucocorticoïdes semble être confortée dans son acceptation par des travaux très récents. Gehring et Arndt (1985), on comparé un récepteur mutant ntⁱ (increased nuclear transfer) de cellules de lymphome et un récepteur de la souche sauvage. Ces formes multimériques, stabilisées par le molybdate ont des poids moléculaires respectifs de 285 kDa et 325 kDa et les formes liant le stéroïde; covalentiellement par photoaffinité des poids moléculaires respectifs de 40 kDa et 94 kDa. L'utilisation dans des conditions très douces de la chymotrypsine ont montré que le récepteur de type sauvage voyait son poids moléculaire se déplacer à 290 kDa : l'unité de liaison passant de 94 kDa à 40 kDa. La perte d'un seul fragment, attestée par l'abaissement de 40 kDa du poids moléculaire de la forme stabilisée par le molybdate montre que cette forme est hétéromérique dans la nature et qu'il n'y a qu'une seule sous-unité liant l'hormone par complexe.

Par une autre approche, Gustafsson (communication personnelle) arrive à la même conclusion. L'emploi d'un anticorps de poids moléculaire 150 kDa dirigé contre la partie immunogène du récepteur transformé montre qu'il y a un déplacement de 320 kDa à 460 kDa du récepteur non transformé non purifié.

Il semble donc de plus en plus probable que le récepteur à glucocorticoïdes non transformé soit un hétéropolymère avec une seule sous-unité liant l'hormone. Mais le récepteur est-il tétramérique ? Luttge et al., 1984 en doutent. Pour ces auteurs, la transformation du complexe H-R résulte dans une réduction d'environ trois fois de la masse moléculaire relative (elle passe de 297 kDa à 92 kDa). Cette hypothèse va dans le sens des résultats obtenus avec

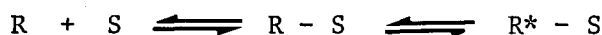
le récepteur à progestérone dont la structure trimérique a été montrée. Ce récepteur possède une sous-unité liant le stéroïde et deux sous-unités non liantes de 90 kDa associées en dimère (Renoir et al., 1984).

8) Conclusion

Les études effectuées sur le récepteur non purifié ont montré que le récepteur est stabilisé par la thréoredoxine, le molybdate, le vanadate, qu'il existe un thiol nécessaire à l'activité de liaison du stéroïde, qu'il pourrait exister un thiol nécessaire à sa transformation, que le phosphate de pyridoxal en l'ATP jouerait un rôle, que le récepteur non transformé serait un hétéropolymère avec une seule sous-unité de liaison. Mais qu'en est-il pour le récepteur purifié ?

III - PURIFICATION DU RECEPTEUR à GLUCOCORTICOIDES

La purification des récepteurs à hormones stéroïdes, en général, et celle des glucocorticoïdes en particulier, est très difficile, et ceci, pour plusieurs raisons. Les principales sont que la concentration intra-cellulaire en récepteurs est faible, d'une part, et que le récepteur lui-même existe sous trois formes distinctes, non lié à l'hormone, lié et transformé, d'autre part.



Cette diversité du récepteur entraîne un choix préalable dans la stratégie de purification qui doit tenir compte des sources limitées des tissus riches en récepteurs libres, de la présence de protéines, autres que les récepteurs, capables de lier l'hormone, du haut degré de purification nécessaire à l'obtention de préparations homogènes et enfin, de l'instabilité apparente de toutes les formes du récepteur. Stratégies dont le but est d'obtenir le récepteur purifié sous une forme unique, que ce soit en utilisant la même forme tout au long de la procédure de purification, ou en jouant sur les propriétés physicochimiques des trois formes, pour n'en sélectionner qu'une à la fin. Quand le choix de la forme finale du récepteur est fait, il ne faut pas oublier que les conversions d'une forme à une autre du récepteur deviennent de plus en plus difficiles à mesure que l'on avance dans la purification. Ainsi, la dissociation du complexe R-H pour donner un récepteur libre capable de lier ultérieurement l'hormone paraît difficile et la réversion de la forme 4S en la forme 8-9S n'a pas encore été montrée jusqu'à ce jour. Idéalement, il faudrait envisager un plan de purification maximale du récepteur non lié, de la forme 8-9S liée et de la forme 4S. De cette façon, chaque forme du récepteur serait obtenue dans un état de purification suffisant pour permettre sa caractérisation et l'étude de sa conversion

en d'autres formes.

A - Méthodes de purification

Les tissus animaux tels que le foie ou le thymus, sont une source particulièrement accessible et abondante de récepteur. Généralement, une surrénalectomie est pratiquée 48 heures avant le prélèvement du tissu pour éviter la présence d'hormone endogène et permettre une augmentation de la quantité de récepteur par effet rétroactif. Après sacrifice, les foies sont prélevés et homogénéisés dans un tampon hypotonique. La fraction limpide recueillie après ultracentrifugation représente le cytosol de départ.

1) Purification du récepteur non lié à l'hormone

Peu de choses sont connues sur le récepteur libre, si ce n'est qu'il est très instable en l'absence de réducteur et de molybdate (se référer au paragraphe sur la stabilisation des récepteurs au chapitre I). Les taux de purification sont faibles et proviennent de l'emploi de deux méthodes : la chromatographie et la précipitation.

La chromatographie de gel filtration, sur Biogel A (Santi et al., 1979) permet une récupération dans le pic exclu de 80 à 90 % du récepteur non lié avec une purification de 5 à 8 fois.

La chromatographie hydrophobe, notamment avec des n-alkyl-agarose, a également été utilisée (Santi et al., 1979). Les taux de purification les meilleurs (7-10 fois) sont obtenus avec les n-éthyl- et n-butyl-agarose, mais les rendements sont plus faibles que pour la gel-filtration (60-70 %).

Les protocoles qui utilisent les méthodes de précipitation emploient surtout une double méthode de précipitation par les sulfates de streptomycine et de protamine, le sulfate d'ammonium entraînant des agrégations et un rendement faible (\approx 50 %). La double précipitation permet une purification globale de 7 à 13 fois avec un rendement de 70 à 100 % (Lustenberger et al., 1981 ; Rousseau et al., 1975 ; Govindan et al., 1978).

Les taux de purification obtenus par ces différentes méthodes sont relativement faibles mais elles permettent de constater que le récepteur non lié est suffisamment stable pour une purification ultérieure, de la forme liée du récepteur. Ces méthodes présentent encore l'avantage d'éliminer rapidement 80 % des protéines du cytosol et de réduire les complications souvent attribuées aux protéines non spécifiques.

2) Purification du récepteur lié à l'hormone

Le ligand stabilise le récepteur (voir chapitre précédent). C'est pourquoi l'essentiel des travaux de purification de récepteurs à hormones stéroïdes a été fait sur un complexe hormone récepteur. La purification fait appel à de nombreuses techniques telles que :

- techniques classiques (précipitation, chromatographie de gel filtration et d'échange d'ions) ;
- chromatographie sur DNA ou phosphocellulose ;
- chromatographie d'affinité.

2.1 - Techniques classiques

La précipitation par les sulfates d'ammonium ou de protamine a été utilisée pour obtenir des préparations partiellement purifiées. Associées avec des techniques chromatographiques, elles permettent d'aller jusqu'à 40 fois de purification (Rousseau et al., 1975).

En 1971, Hackney et Pratt proposent un protocole en 4 étapes à partir de cytosol de fibroblastes de souris (Hackney et al., 1971). Ce protocole comprend une gel filtration sur agarose du récepteur lié, une précipitation par le sulfate d'ammonium 25 % du pic radioactif, une gel filtration sur Sephadex G25, puis une adsorption du complexe macromoléculaire sur DEAE-cellulose et une élution par gradient de KCl.

Le complexe récupéré dans les fractions 0,70-0,15 M KCl est purifié environ 800 fois avec un rendement très faible, qui ne dépasse pas 1 %. Ce rendement catastrophique est explicable par les

agrégations irréversibles produites lors de l'étape de précipitation et par la dissociation continuelle du complexe R-H dans un tampon ne contenant pas de facteurs de stabilisation.

Une purification analogue en deux étapes a toutefois été décrite par Litwack et al., (1973) à partir du cytosol de foie de rat. Le cytosol est déposé sur DEAE-Sephadex puis élué par un gradient de KCl. Le pic radioactif est mis sur une colonne de gel filtration Sephadex G100. Le récepteur lié est ainsi purifié 300 fois, mais cette méthode ne permet pas de séparer le récepteur de la CBG.

2.2 - Chromatographie sur DNA ou phosphocellulose

Ces méthodes de chromatographie ont surtout été employées pour la purification de la forme transformée du récepteur car elles tiennent compte de la différence d'affinité des deux formes du complexe R-H, 8S et 4S, pour les matrices polyanioniques (Kalimi et al., 1975) Sous sa forme 8S, le complexe H-R a une faible affinité pour ces matrices, comme de nombreuses autres protéines du cytosol, et passe dans le volume non retenu. Dans cette étape, le taux de purification est faible car seules les protéines ayant une forte affinité pour ces matrices sont retenues. Le complexe H-R est alors converti dans la forme 4S par chauffage puis de nouveau soumis à une colonne de gel polyanionique. Le complexe a acquis par la transformation une forte affinité pour la DNA- ou la phosphocellulose. Il est élué par des sels. Les protéines qui avaient de l'affinité pour ce type de gel ont été éliminées lors de la première étape ... et peu nombreuses sont les protéines qui acquièrent une affinité pour de telles matrices dans les conditions qui permettent le passage de la forme 8S à la forme 4S. De cette façon, une purification rapide et efficace peut être obtenue. Cette méthode, avec de nombreuses variantes, a été utilisée dans la purification du complexe H-R transformé par de nombreuses équipes.

Atger et Milgrom (1976) purifient partiellement le récepteur en 5 étapes.

- le récepteur lié non transformé est passé sur phosphocellulose rapidement ;
- le pic exclu est déposé sur DEAE-cellulose puis élué par un tampon KCl 0,2 M ;
- le pic élué radioactif est précipité par le sulfate d'ammonium 33 % puis repris par du tampon phosphate 50 mM ;
- le récepteur est mis à adsorber sur hydroxylapatite, lavé, puis élué par du phosphate 250 mM et dialysé contre un tampon Tris EDTA contenant de ^3H TA ;
- le complexe H-R est déposé sur phosphocellulose et élué par du KCl 0,4 M et enfin dessalé sur Sephadex G25.

Le taux de purification du récepteur, transformé après la deuxième étape est de 940 avec un rendement de 24 %. Le récepteur est à 4 % de pureté.

Eisen et Glinsmann n'utilisent que deux étapes pour la purification (1975, 1976, 1978), une filtration sur DNA-cellulose, puis passage sur une seconde DNA-cellulose après transformation. Le récepteur est élué par un tampon NaCl 0,45 M. Le taux de purification est de 11 000 et le rendement de 80 %.

Climent et al., 1976, 1977 ; Westphal et al., 1980), emploient le même protocole qu'Eisen, mais la DNA-cellulose est remplacée par la phosphocellulose. La deuxième étape étant effectuée en présence de sérumalbumine, les auteurs sont contraints d'ajouter une étape supplémentaire de précipitation par le sulfate d'ammonium 33 % pour éliminer la protéine. Le taux de purification est de 3300 avec un rendement de 25 %. Le taux de pureté est de 10 %.

En modifiant ce protocole, et par l'utilisation conjointe et répétitive de la DNA-cellulose et de la phosphocellulose, Westphal et Beato (1980) obtiennent une purification de 59000 fois avec un

rendement de 3 % en huit étapes. Comme pour les protocoles précédents, les facteurs limitant le rendement sont la précipitation par le sulfate d'ammonium et l'absence de transformation totale du récepteur.

Wrange et al. (1979) obtiennent un taux de purification de 8500 fois et un rendement de 20 %, avec un protocole comportant 4 étapes :

- filtration rapide sur phosphocellulose
- filtration du pic exclu contenant le récepteur non transformé sur DNA-cellulose
- le volume exclu est chauffé à 20°C pendant 30 minutes
- passage sur DNA cellulose, l'élution est effectuée en présence de phosphate de pyridoxal dans le tampon
- filtration sur DEAE-Sepharose à pH 7,8. Le récepteur est élué avec 0,16 M de NaCl.

les auteurs obtiennent ainsi une préparation pure à 75 %.

Récemment, Govindan et al., 1984 ont décrit un protocole de purification dérivant de ceux de Eisen et Wrange. Les tampons sont essentiellement ceux de Wrange, mais Govindan n'utilise pas de phosphate de pyridoxal.

- passage rapide sur phosphocellulose (400 ml)
- pic exclu ajusté à pH 7,8 puis passé rapidement sur 100 ml de DNA cellulose
- transformation du pic exclu à 20°C pendant 30 min.
- passage sur 40 ml de DNA cellulose. Le pic retenu est élué par un gradient 0-0,5M de NaCl
- le pic élué est précipité par 50 % de sulfate d'ammonium, dialysé puis passé sur une colonne de DEAE.

le récepteur est purifié 6500 fois avec un rendement de 15 % et une homogénéité de 60 %. Govindan a essayé de transformer le pic exclu de la deuxième colonne de DNA-cellulose puis de le passer sur une troisième colonne de DNA. Cette étape n'apporte pas de purification supplémentaire.

2.3 - Chromatographie d'affinité

Le moyen d'obtenir une purification importante du récepteur sous forme 8S est sans conteste, l'emploi de la chromatographie d'affinité. Celle-ci est rendue possible car la liaison de l'hormone au récepteur est réversible. Le principe est de charger du récepteur non lié, cytosolique ou partiellement purifié, sur une colonne contenant un stéroïde relié à une matrice d'agarose par un bras, généralement diaminé. Après lavage du gel, l'élution est effectuée avec un tampon contenant de l'hormone radioactive.

Une des premières tentatives de purification des récepteurs à glucocorticoïdes par chromatographie d'affinité a été celle de Wong et al. en 1973. Sur un gel de sépharose 4B activé au BrCn, il fixe la diaminopropylamine puis couple l'hémisuccinate de cortisol. La concentration de ligand lié est de 2 $\mu\text{M}/\text{ml}$ de gel. Après adsorption 2 heures en batch, le gel est lavé en colonne par 20 volumes de tampon. L'élution est faite par passage d'un tampon contenant du KCl 0,35 M. Malheureusement, il s'est avéré par la suite que la protéine purifiée n'était pas le récepteur, mais le transporteur plasmatique, la transcortine.

De Kloet et Burbach (1978) ont utilisé un adsorbant similaire dans lequel le bras est la sérumalbumine et le ligand l'hémisuccinate de déoxycorticostérone-(concentration finale de ligand 66 nM/ml de gel) - l'adsorption est faite en batch à raison de 1 ml de gel par ml de cytosol. Le lavage se fait surcolonne avec 10 volumes de tampon. La solution éluante (3 ml) contient 10^{-6}M de de ^3H corticostérone et l'élution est poursuivie pendant 16 heures. La purification ainsi obtenue est de 200 fois avec un rendement de 20 %.

L'équipe de Fanestil (Ludens et al., 1972) a utilisé également un stéroïde 21-hémisuccinate pour immobiliser le stéroïde sur le gel. Dans ce cas, comme dans le précédent, la liaison stéroïde-bras est une liaison ester. Il n'est donc pas étonnant que les taux

de purification obtenus par ces équipes soient faibles, les estérases étant en concentration suffisante dans le cytosol pour dégrader le support.

Pour cette raison, Failla et al. (1975) ont synthétisé un adsorbant dans lequel la liaison du stéroïde au bras est une liaison étheroxyde beaucoup plus stable. La matrice est l'aminohexylagarose sur laquelle on greffe la 21-(4-carboxyphenoxy)progestérone (voir figure n° 14). L'affinité du stéroïde modifié est suffisante vis-à-vis du récepteur (K_D : $0,25 \cdot 10^{-6} M$ à $0^\circ C$) pour effectuer l'adsorption. Seuls 0,0012 % des sites de liaison semblent fonctionnels mais cela est suffisant pour adsorber 80 % du récepteur présent. Après lavage par 30 volumes de tampon, l'élution est faite par de l'acétonide de triamcinolone $10^{-6} M$ pendant 18 heures. Le taux de purification varie de 80 à 300 fois avec un rendement d'élution ne dépassant jamais 50 %. Une étape de gel filtration sur Biogel A 0,5 M supplémentaire donne une purification globale de 1726 fois avec une pureté de 10 %.

Avec un gel du même type que celui de Failla, Weisz et al. (1984) purifient le récepteur 114 fois avec un rendement de 55 % en présence de molybdate. Le taux de purification obtenu après gel-filtration et DEAE-cellulose est de 5000 fois avec une pureté de 10 %.

Grandics et al. (1984) ont utilisé également un gel qui reprend la méthode de Failla et al. (1975) mais en modifiant la longueur et la polarité du bras (voir figure n° 15). Ce gel a été utilisé auparavant pour la purification du récepteur à progestérone aviaire non transformé (Grandics et al., 1982). 20 ml de cytosol sont incubés avec 8 ml de gel d'affinité pendant 2 heures puis le gel est lavé avec 200 ml de tampon. L'élution est effectuée avec 8 ml de tampon contenant $2 \mu M$ de [3H] TA pendant 16 heures. L'utilisation d'étapes ultérieures telles que la gel filtration et la DEAE-cellulose permet une purification d'environ 4000 fois dont 150 fois pour la seule étape de chromatographie d'affinité.

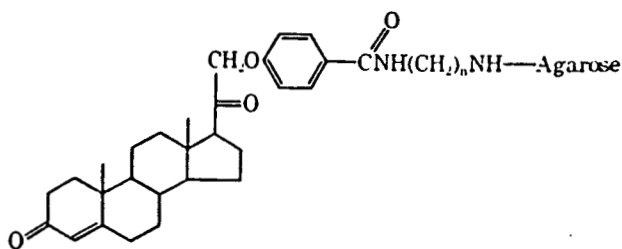


Figure n° 14 : Structure du gel d'affinité déoxycorticostérone-benzamido-hexyl-agarose (n=6) (Failla et al, 1975)

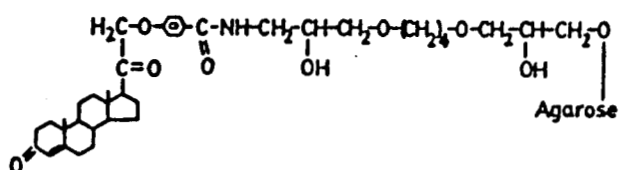


Figure n° 15 : Structure du gel d'affinité à déoxycorticostérone de Grandics et al (1982).

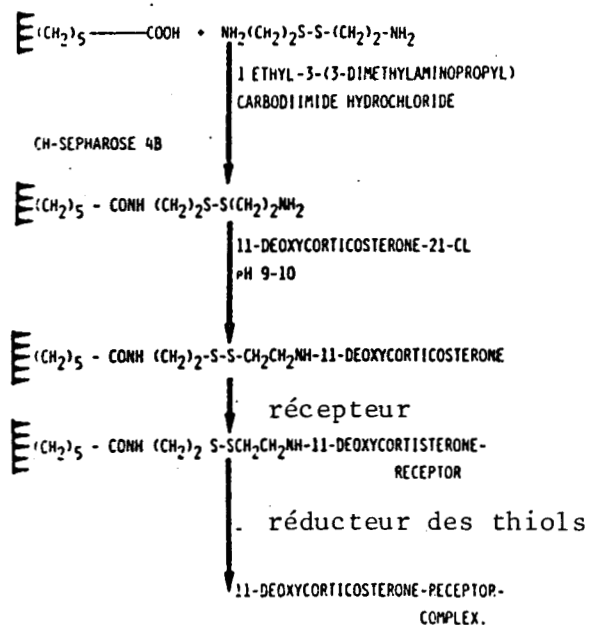


Figure n° 16 : Structure du gel à bras clivable de Govindan et Sekeris (1978).

L'équipe de Govindan est partie d'un autre principe pour purifier le récepteur à glucocorticoïdes. Elle a employé la technique de Sweet et Adair (1975), qui utilise un gel d'affinité à bras clivable.

Les premières purifications (Govindan et al., 1976) employaient un gel aminohyxlsepharose auquel était couplé le [³H] déoxycorticostérone hémisuccinate cystamine. Le bras comporte donc un bras disulfure clivable par l'adjonction de thiols. La capacité du gel est de 0,03 µM de stéroïde par gramme de gel. 100 ml de cytosol débarrassés du β-mercaptoéthanol sont mis à adsorber sur 8 ml de gel. Après le lavage, l'élution est effectuée par l'adjonction de 100 mM de β-mercaptoéthanol. Le complexe récepteur-³H]DOC cystéinamine est purifié 6500 fois avec un rendement de 36 %. Après la purification, le stéroïde est échangé contre de la dexaméthasone tritiée.

La présence de la liaison ester a amené Govindan et al. (1978, 1979) à modifier ce gel en couplant le stéroïde au bras disulfure par une liaison C-N (voir figure n° 16). La capacité du gel est de 0,25 µmole de stéroïde par gramme de gel. Govindan introduit la double précipitation par les sulfates de streptomycine et de protamine avant de soumettre le récepteur préalablement débarrassé des réducteurs de thiol au gel d'affinité. L'élution se fait en présence de β-mercaptoéthanol. L'hormone est ensuite échangée par de la dexaméthasone tritiée. La purification totale est de 12 000 fois avec un rendement de 46 %, la chromatographie d'affinité apportant seule un facteur de 1500 fois avec un rendement de 90 %.

Pourtant, ce gel a été de nouveau modifié. La structure semble rester la même, sauf que la déoxycorticostérone a été remplacée par la dexaméthasone (Papamichaïl et al., 1980). Les auteurs ne précisent pas les taux de purification et de pureté obtenus.

En 1981, ces auteurs (Tsawdaroglou et al., 1981) présentent une purification effectuée à partir d'un nouveau gel d'affinité synthétisé avec le 21-méthane-sulfonate de dexaméthasone. Le stéroïde

est couplé à l'aminohexylcystaminylsépharose. Comme les précédents, ce gel est à bras clivable. Il permet une purification de l'ordre de 8300 fois du récepteur cytosolique par cette seule étape.

Malgré ces résultats, Govindan et al. (1984) changent de protocole et reprennent en grande partie celui décrit par Lustenberger et al. (1981). La seule différence réside dans la capacité du gel qui est de 5 μ moles de stéroïde par ml de gel. Le récepteur élué avec de l'acétonide de triamcinolone est purifié 5800 fois avec un rendement de 90 % et une homogénéité de 47 %. Le complexe obtenu, hautement purifié, est cependant transformable.

Le gel décrit par Lustenberger et al. (1980, 1981) est beaucoup moins greffé que celui de Govindan. Sa capacité varie de 0,3 à 0,5 μ mole de stéroïde par ml de gel. Au Sépharose CL 4B activé au BrCN est couplé un bras diammonononane. L'acide 17 β -carboxylique, correspondant à la dexaméthasone oxydée par l'acide periodique, est couplé à la matrice en présence de HOBt et de DCCI (voir figure n° 17).

L'étape de chromatographie d'affinité est effectuée sur le récepteur non lié après précipitation par le sulfate de protamine. Après un lavage intensif, le récepteur est élué par de l'acétonide de triamcinolone radioactif. Le complexe H-R obtenu est purifié 7500 fois avec un rendement de 18 %. Le taux de pureté est de plus de 30 %. L'étape de chromatographie apporte une purification de 900 fois.

En 1983, Manz et al. ont proposé un nouveau gel d'affinité, appelé "sandwich", obtenu à partir de dérivés de la dexaméthasone. Le dérivé 17 β -carboxylique est couplé à la biotine en utilisant le diaminopentane comme bras de liaison (voir figure n° 18). Le dérivé bifonctionnel se lie au récepteur à glucocorticoïdes du cytosol de cellules tumorales humaines, puis le complexe est incubé avec un gel d'avidine-Sépharose. L'élution est effectuée avec de la dexaméthasone 3,2 μ M. Le taux de purification obtenu est d'environ 20 000 fois en une seule étape avec un rendement de 60 %. Cependant le taux de pureté, calculé à partir des résultats donnés, n'est que

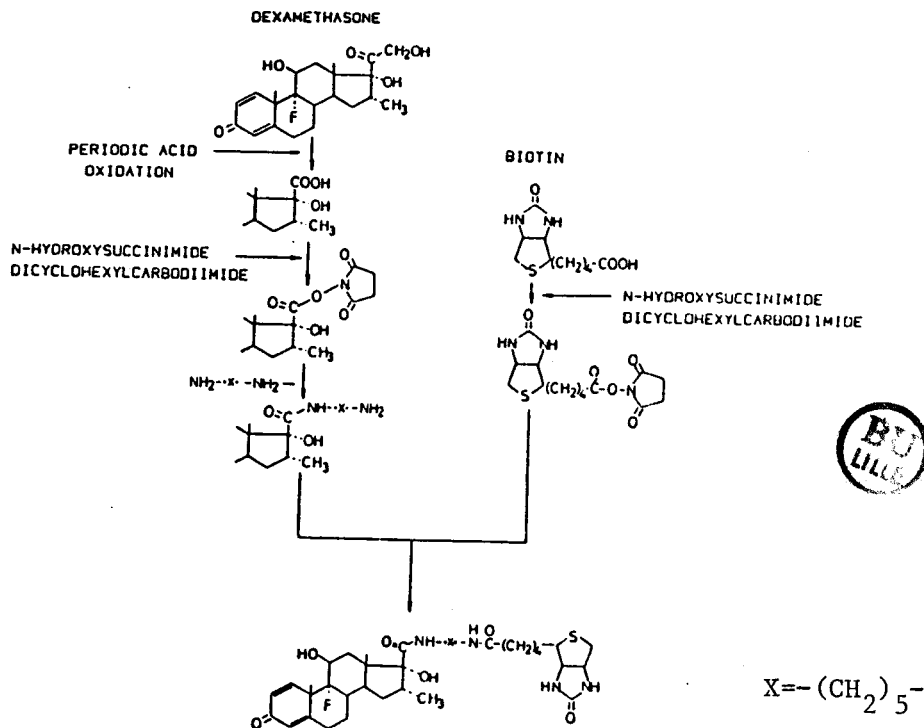


Figure n° 18 : Structure du système biotinyl-dexaméthasone de Manz et al (1983).

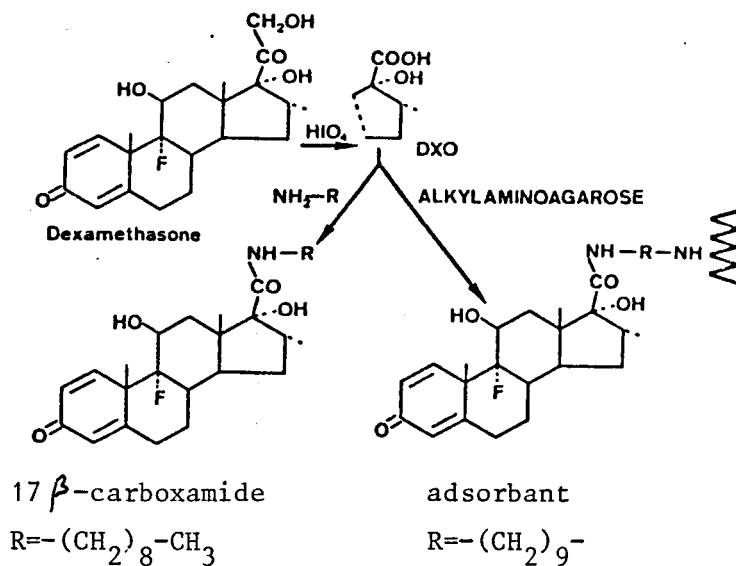


Figure n° 17 : Structure des dérivés 17-carboxamides et du gel d'affinité de Lustenberger et al (1981).

8,7 %.

La revue rapide présentée dans les paragraphes précédents nous amène à faire quelques remarques. Pour en souligner la portée, un tableau récapitulatif rassemble les résultats des différentes équipes (voir Tableau).

La première remarque porte sur la purification en général. Il existe un grand décalage entre les taux de purification et les taux de pureté obtenus par les différentes équipes, 5800 fois et 47 % respectivement pour Govindan et al. (1984), 20000 fois et 8,7 % pour Manz et al. (1983), 12000 et 50 % pour Idziorek et al. (1985) alors que l'homogénéité est généralement considérée comme totale lorsque le récepteur est purifié entre 20000 et 30000 fois. Cette discordance pose en fait le problème des dosages des protéines et de l'activité de liaison d'une solution contenant une protéine hautement purifiée. Ces dosages seront l'un des thèmes que nous aborderons au niveau de nos résultats.

La seconde remarque porte sur la chromatographie d'affinité et plus précisément sur les choix du bras, du stéroïde à greffer et de son taux de greffage.

La longueur du bras a une conséquence importante sur la chromatographie. S'il est trop court, 5 ou 8 équivalents liaisons carbone-carbone, il permet l'adsorption et pas l'élution (Lustenberger et al., 1981). S'il est trop long, il a tendance à se replier. Un bras avec 11 équivalents liaisons carbone-carbone au moins semble favorable à une bonne adsorption et une bonne élution du récepteur (Lustenberger et al., 1981 ; Govindan et al., 1978 ; Grandics et al., 1982). Ainsi, le gel décrit par Manz et al. (1983), le biotinyl-dexaméthasone a un bras qui semble trop court pour permettre le taux de purification annoncé. En effet, l'utilisation d'un système biotinyl-oestradiol pour la purification du récepteur à oestrogène (Redeuilh et al., 1985), dont le bras a une longueur supérieure à 15 équivalents liaison carbone-carbone, ne donne un taux de purification que de l'ordre de 500-1500 fois pour l'étape de chromatographie. Le second problème est posé par le bras clivable qui oblige à travailler

	Eluat µg/ml	Récepteur total lié pmoles	Purification	Pureté %	Rdt adsorp- tion %	Rdt chromato d'affinité %	gels, capacité µmol/ml gel	Taux saturation du gel %
Failla <u>et al.</u> 1975	85	12	265	0,5	88	44	DOC, 1	0,0012
Govindan <u>et al.</u> 1978	92	N.D.	1480	N.D.	?	77	DOC clivable 0,25	N.D.
Tsawdaroglou <u>et al.</u> 1981	6,7	46,8	8181	4,2	68	42	Dexa clivable 0,045	0,002
Lustenberger <u>et al.</u> , 1981	56	950	932	30	?	23,5	Dexa ; 0,35	0,8
Manz <u>et al.</u> , 1983	62	300	19414	8,7	?	60	biotinyl- Dexa	?
Govindan, 1984	12	3160	4630	47	?	90	Dexa, 1	0,016
Grandics <u>et al.</u> , 1984	115	340	163	1,97	80	56	Doc, 2,9	0,0017
Weisz <u>et al.</u> , 1984	180	180	114	0,34	?	55	Doc, ?	?
Idziorek <u>et al.</u> , 1985	130	3330	826	50	70	37	Dexa, 0,3	2,2

TABLEAU COMPARATIF POUR DIFFERENTES EQUIPES DE LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

N.D. : non déterminable



en l'absence de réducteurs de thiols, ce qui nuit à la stabilité du récepteur non encore lié, et qui oblige également à l'échange du stéroïde clivé fixé sur le récepteur par un stéroïde d'affinité supérieure.

Cette constatation nous montre que le choix du stéroïde à greffer est également important. Le choix de nombreux auteurs s'est porté sur la déoxycorticostérone qui pourtant présente le désavantage de fixer également la transcortine (Rousseau et al., 1972) le récepteur à progestérone (Grandics et al., 1982) et d'avoir une affinité moindre que la dexaméthasone qui ne fixe que le récepteur.

Le taux de greffage du stéroïde sur le gel influe beaucoup sur la chromatographie et plus particulièrement l'élution. C'est ce qui oblige Govindan et al. (1984) à diluer son gel greffé à 5 μ moles de stéroïde/ml de gel avec du gel non greffé pour en diminuer l'activité spécifique. Le meilleur compromis adsorption-élution est réalisé avec un gel greffé à 0,15-0,40 μ moles de stéroïde par ml de gel (Lustenberger, 1980, et al. 1981; Renoir et al., 1982) ce qui n'est rendu possible que par l'utilisation d'un protocole simple, permettant le dosage des fonctions greffées, et facile à modifier en cours de route.

B - Caractérisation

1) Le récepteur lié transformé

1.1 - Caractéristiques physicochimiques

Le récepteur lié transformé a un poids moléculaire apparent de 92 000 Da + 2 000 en PAGE-SDS (Atger et al., 1976 ; Eisen et al., 1975, Climent et al., 1976 ; Wrange et al., 1979 ; Govindan et al., 1984, Weisz et al., 1984 ; Singh et al., 1985). Un récepteur de 40 000 Da a également été décrit (Westphal et al., 1980) mais cette hypothèse est restée sans suite. Il a un rayon de Stokes de 6 nm et un coefficient de sédimentation de 3,5 + 0,2 S selon la force ionique du tampon (Wrange et al., 1979). Pour le groupe de Beato (Climent et al., 1976, Westphal et al., 1980), pour Atger et

al. (1976), Eisen et al. (1975), Grandics et al. (1984), le coefficient de sédimentation est de 4 S, ce qui correspond aux valeurs obtenues pour le récepteur transformé cytosolique. En DEAE-cellulose, il est élué entre 0,16 et 0,2 M de KCl ou NaCl (Govindan et al., 1978 ; Wrange et al., 1979). Pour Grandics et al. (1984), la force ionique d'éluion est de 0,08 M de NaCl. Il possède un point isoélectrique sur acrylamide de 5,8 (Wrange et al., 1979) ou 6,0 (Eisen et al., 1975, 1976, 1978 ; Singh et al., 1985). Singh et Moudgil (1985) montrent de plus que le complexe H-R transformé purifié 2000 fois est phosphorylé in vitro en présence d'ATP par une kinase AMP cyclique dépendante. Pour Miller-Diener et al. (1985), cette phosphorylation in vitro du récepteur purifié 5000 fois est calcium dépendante. Ceci tend à montrer que le récepteur à glucocorticoïde est une phosphoprotéine.

1.2 - Utilisation des anticorps mono et polyclonaux

Le récepteur transformé purifié (10-30 % d'homogénéité) a permis l'obtention d'anticorps, polyclonaux d'abord, puis monoclonaux, dont l'utilisation principale a été la localisation immunocytochimique du récepteur à glucocorticoïdes (Eisen, 1982 ; Okret, 1983 ; Antakly et al., 1984). Ces études ont montré que le récepteur existe sous une forme nucléaire (Govindan, 1980 ; Antakly et al. 1984). Ils ont également permis de nombreuses études sur des récepteurs de cellules de lymphome de souris (Westphal et al., 1980) et permis de montrer que le récepteur pourrait être un hétéropolymère (Gustaffson, communication personnelle).

Le groupe de Gustaffson (Okret et al., 1981 ; Carlstedt-Duke, 1979 ; Gustaffson, 1984) ont utilisé un anticorps polyclonal pour identifier différents domaines du récepteur transformé après l'emploi d'enzymes protéolytiques sur du cytosol incubé. Le récepteur à glucocorticoïdes peut être divisé en trois sous-unités par protéolyse limitée avec la trypsine ou la chymotrypsine. Il est possible de caractériser ainsi, une partie responsable de l'activité de liaison au stéroïde (domaine A), le domaine liant le DNA (domaine B) et la partie immunoréactive (domaine C) (voir paragraphe 1-4 pour

figure). Les auteurs isolent 4 formes après protéolyse, une forme de 6 nm de rayon de Stokes comportant les domaines A-B-C, une forme de 3 nm comportant les domaines A-B, le domaine immunoréactif de 2,6 nm et enfin une forme de 2 nm, obtenue après digestion du complexe de 3 nm qui ne possède plus que l'activité de liaison au récepteur. La forme de 2 nm représente le méro-récepteur.

1.3 - Protéolyse limitée du récepteur purifié

Wrange et al. (1984) ont utilisé un récepteur purifié couplé covalentiellement à l'acétonide de triamcinolone radioactif par photoaffinité pour le soumettre à l'action de la trypsine ou de la chymotrypsine. Il apparaît ainsi un fragment de 39 kDa qui retient l'hormone et est capable de se lier au DNA-cellulose. Le fragment 39 kDa n'est plus capable de lier les anticorps dirigés contre le 94 kDa. Ce fragment 39 kDa peut encore être dégradé par la trypsine mais pas par la chymotrypsine pour donner deux fragments de 25 et 27 kDa liant l'hormone. Ces résultats concordent avec ceux obtenus lors de l'emploi de la protéolyse limitée sur du cytosol

1.4 - Modèle de récepteur transformé

L'emploi de la protéolyse limitée et des anticorps (Carlstedt-Duke, 1982 ; Gustaffson, 1984) permet de donner un modèle de récepteur dans sa forme 92 ± 2 kDa (voir figure n° 19).

1.5 - Liaison au DNA - utilisation du modèle MMTV

L'expression du virus tumoral de la glande mammaire de souris (MMTV) chez des cellules en culture est reconnue comme un modèle important pour l'étude du mécanisme d'action des hormones glucocorticoïdes (Ringold et al., 1975). Les expériences de clonage et de transfert du gène proviral ont montré que la séquence de DNA responsable de l'induction hormonale du MMTV est présente à l'intérieur

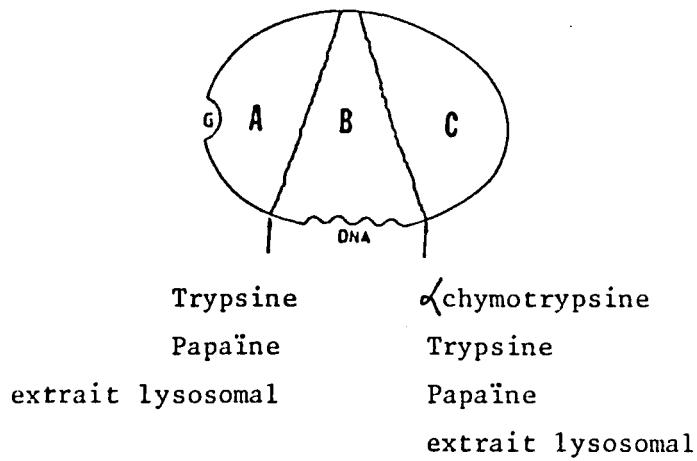


Figure n° 19 : Modèle des différents domaines fonctionnels du récepteur à glucocorticoïdes selon Gustafsson et al (1984).

A : domaine contenant le site de liaison au stéroïde

B : domaine contenant le site de liaison au DNA

C : domaine contenant le déterminant immunologique

du provirus (Hynes et al., 1983). Des molécules chimériques contenant des séquences répétitives terminales longues (LTR) du MMTV liées avec différents gènes ont été construites et utilisées pour montrer que les gènes situés en 3' du LTR du MMTV étaient inductibles par l'hormone. La séquence du LTR du MMTV comprend 1328 paires de bases et le site d'initiation du RNA se trouve près de la partie 3' du LTR (Rousseau, 1984a, 1984b ; Groner et al., 1983 ; Miller et al., 1984 ; Fasel et al., 1982 ; Geisse et al., 1982 ; Scheidereit et al., 1983 ; Israel, 1985). Scheidereit et Beato (1984), les premiers, ont montré par des techniques de "Foot-printing", qu'il existe des zones protégées contre l'action de la DNase I lorsque le récepteur transformé et purifié est présent. Parmi les 4 hexanucléotides TGTCTC protégés contre l'action de la DNase, deux sont capables de lier fortement le récepteur à glucocorticoïdes et les deux autres plus faiblement. Le récepteur à progestérone transformé est également capable de lier cet hexanucléotide avec cette condition que la séquence capable de lier fortement le récepteur à progestérone lie faiblement le récepteur à glucocorticoïdes et vice-versa (Von der Ahe et al., 1985). Les essais de méthylation du N₇ de la base purique des résidus guanine des fragments par le diméthylsulfate montrent que les résidus guanine -118, -174, -184, entre autres sont protégés de la méthylation lorsque le récepteur est présent (Scheidereit et al., 1984). Une étude assistée par ordinateur (voir figure n° 20) montre que les guanines -174, -184, séparées par 10 ± 1 paires de bases, et à cause de cela, localisées sur le même côté de l'hélice, sont situées dans le sillon majeur de la double hélice. Il est donc possible d'envisager un contact entre les deux résidus guanine et le récepteur. Le groupe de Beato a été le premier à décrire un site spécifique de liaison du récepteur sur le DNA. Ce dernier commence à être caractérisé mais le site de liaison du DNA sur le récepteur ne l'est pas encore.

2) Le récepteur non transformé

La purification du récepteur à glucocorticoïdes non transformé n'a pu être poussée très loin que grâce à l'emploi du molybdate

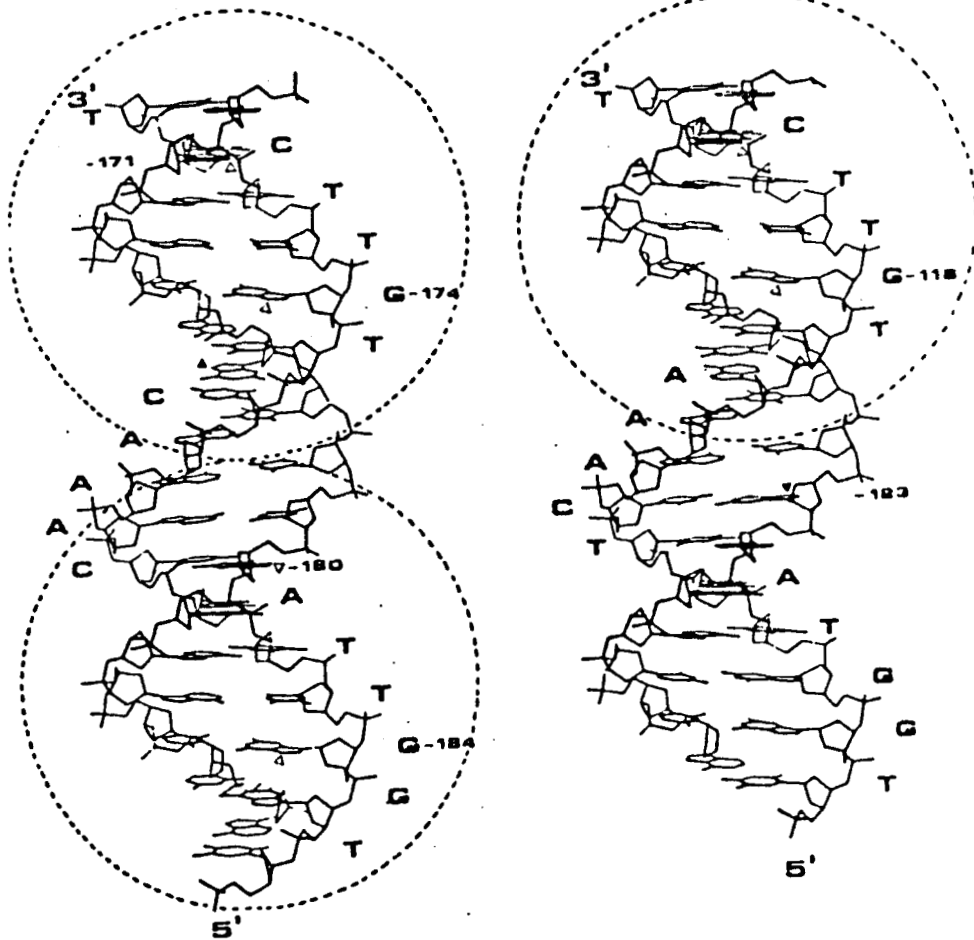


Figure n° 20 : Schéma des deux sites de liaison à l'intérieur de l'élément régulateur par les glucocorticoïdes (Scheidereit et Beato, 1984).

La séquence nucléotidique entre -186 et -170 (à gauche) et -129 et -114 (à droite) sont représentées sous forme de double hélice. Les bases puriques qui sont protégées contre la méthylation par la présence du récepteur sont indiquées par les triangles clairs et celles hyperméthylées en présence du récepteur par les triangles noirs. Les cercles en pointillé indiquent la position du complexe H-R.

de sodium tout au long des manipulations (Lustenberger et al., 1981 ; Govindan et al., 1984 ; Grandics et al., 1984 ; Idziorek et al., 1985). Il faut donc en tenir compte pour les paragraphes qui vont suivre.

2.1 - Caractéristiques physicochimiques

Tous les auteurs décrivent le récepteur non transformé purifié comme ayant un coefficient de sédimentation de 8-9 S en fonction de la force ionique du tampon (Failla et al., 1975 ; Lustenberger et al., 1981 ; Grandics et al., 1984 ; Idziorek et al., 1985). Il aurait un rayon de Stokes de 5,1 nm pour Lustenberger et al. (1981), 6,0 nm pour Grandics et al. (1984) et 7,0 nm pour Idziorek et al. (1985). En présence de sérumalbumine, ce rayon passe de 6,0 à 7,3 nm pour Grandics et al. (1984). Cette diversité pourrait être due à une dégradation du récepteur apparaissant pendant la durée de la gel filtration. Le récepteur passé sur PAGE-SDS a un poids moléculaire apparent de 92 + 2 kDa (Failla et al., 1975 ; Lustenberger et al., 1981 ; Grandics et al., 1984 ; Idziorek et al., 1985). Les auteurs observent également des bandes à 72 kDa (Govindan et al., 1984), 40 kDa (Govindan et al., 1984 ; Grandics et al., 1984) et 24 kDa (Grandics et al., 1984), capables de lier l'hormone et séparables par DEAE-cellulose.

Contrairement au récepteur à progestérone où la nature hétéromérique du récepteur purifié en présence de molybdate a été mise en évidence en PAGE-SDS et par anticorps monoclonaux (Renoir et al., 1984), il n'a pas encore été possible de montrer la nature homomérique ou hétéromérique du récepteur à glucocorticoïdes purifié en présence de molybdate. La taille moléculaire du récepteur oligomérique varie de 260 kDa en forte force ionique (Idziorek et al., 1985) à 303 kDa en faible force ionique (Grandics et al., 1984), ce qui correspond au récepteur non purifié (280-330 kDa) (Sherman et al., 1983).

2.2 - Récepteur non transformé et échange d'ions

En toute logique, la force ionique d'élution du récepteur non transformé purifié doit être supérieure à celle du récepteur transformé purifié. Pour Govindan et al. (1978), elle est de 0,2 M dans un tampon ne contenant pas de molybdate, pour Weisz et al. (1984), elle est de 0,29 M de phosphate de potassium pour un récepteur sans molybdate et de 0,23 M pour un récepteur dans un tampon contenant du molybdate. Les auteurs suggèrent que la chute de la force ionique nécessaire à l'élution quand le molybdate est présent, est due à une interaction directe du molybdate avec le récepteur. Pour Grandics et al. (1984), elle est également de 0,23-0,26 M de K_2PO_4 en présence de molybdate.

2.3 - Transformation du RNT

Le récepteur non transformé purifié par Grandics et al. (1984) en présence de molybdate est passé sur une colonne de Sephadex G25 pour enlever le molybdate. Le récepteur est alors légèrement transformé (18 %). Le molybdate inhibe complètement cette transformation. Grandics pense que le molybdate empêcherait un facteur cytosolique de bas poids moléculaire de se séparer du complexe. Pour étayer cette hypothèse, Grandics transforme le récepteur purifié en présence de cytosol préincubé avec de l'hormone radioactive et montre qu'il acquiert ainsi la même capacité de transformation que le récepteur cytosolique, soit 45 %.

Ce résultat semble contraire à celui de Govindan et al. (1984) qui arrivent à transformer le récepteur purifié en présence de molybdate avec un rendement de 70 % sans ajouter de facteurs. Le même type de transformation est obtenu par Idziorek et al. (1985).

C - Conclusion

Le récepteur à glucocorticoïdes, purifié sous sa forme monomérique ou multimérique reste encore un inconnu. La séquence de la forme monomérique n'est pas encore connue, et la nature des sites

de liaison du stéroïde et du DNA non plus.

Pour Housley et Pratt (1983), le récepteur semble être phosphorylé mais ne posséderait pas d'activité auto-phosphorylante, contrairement à Miller-Diener et al. (1985) pour qui l'activité phosphorylante du récepteur purifié est stéroïde et calcium dépendante.

La forme multimérique, quant à elle, serait un hétéropolymère qui contiendrait une ou plusieurs sous-unités 98-100 kDa phosphorylées liant le stéroïde et une ou plusieurs sous-unités phosphorylées ne liant pas l'hormone, lorsque le récepteur est purifié à partir de cellules L de souris (Housley et al., 1983, 1985). Pour ces mêmes cellules, Beato obtient deux bandes en PAGE-SDS. La bande 97 kDa lie l'hormone et est phosphorylée, la bande 90 kDa ne lie pas l'hormone. Pour Beato, la bande 90 kDa serait une forme dégradée de la bande 97 kDa, car elle est reconnue comme la bande 97 kDa par l'anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur (communication personnelle).

La séquence répétitive terminale (LTR) du MMTV, aussi bon modèle soit-elle, présente quand même un inconvénient ; elle lie également le récepteur non transformé qu'il soit lié ou non à l'hormone (Beato, communication personnelle).

Il semble donc que l'étude du récepteur transformé, seul, ne soit plus suffisante pour expliquer le mécanisme d'action de l'hormone et des récepteurs. C'est pourquoi de nombreuses équipes se sont tournées vers le récepteur non transformé et tentent la purification pour essayer d'expliquer le mécanisme de la transformation.

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

ET

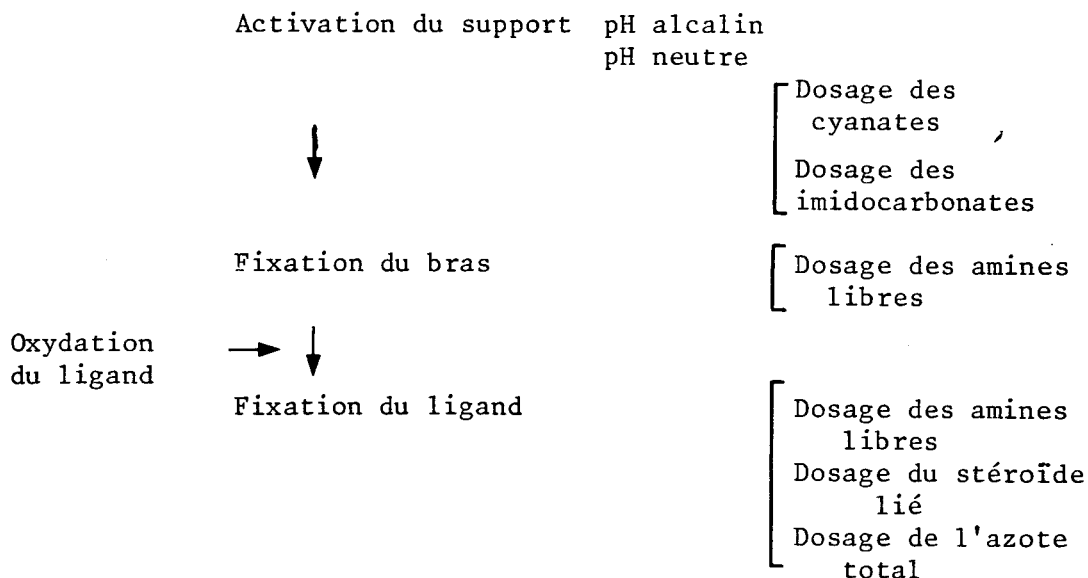
RESULTATS PERSONNELS

SYNTHESE DU GEL D'AFFINITE

La mise au point d'un gel d'affinité pour la purification du récepteur à glucocorticoïdes du foie de rat a été réalisée il y a quelques années, au laboratoire, par Patrick Lustenberger et al. (1981). Les auteurs ont optimisé la technique d'activation à pH alcalin, ont choisi le bras, le ligand et ont mis au point la technique de dosage des fonctions amines libres portées par le gel (Lustenberger et al., 1980a).

Notre rôle, dans un premier temps a été de compléter les dosages des fonctions greffées après activation au BtCN à pH alcalin, c'est-à-dire de doser les fonctions cyanates et imidocarbonates et de doser l'azote total du gel. Dans un second temps, nous avons testé une nouvelle méthode d'activation au BrCN à pH neutre, cette fois.

Le schéma général de la synthèse du gel d'affinité et du dosage des fonctions greffées est le suivant :



1) Activation du support

Le support présentant les meilleures qualités physico-chimiques à la fois pour les étapes de synthèse en milieu organique et pour une utilisation en chromatographie d'affinité est l'agarose sous forme de billes de Sepharose CL 4B. Il s'agit en fait d'un enchaînement de D-galactose et de 3-6-anhydro-L-galactose. La réticulation est due à l'action du dibromopropane.

1.1 - Activation à pH alcalin

Le protocole utilisé est celui de Lustenberger et al. (1981). Ces auteurs ont optimisé les protocoles de Sharma et al. (1975) et de March et al. (1974). L'activation est effectuée par le BrCN dissous dans de l'acétonitrile, ce qui en permet une utilisation plus facile et un stockage à -20°C . Une synthèse effectuée par P. Lustenberger (1980b) sur les réactifs employés lors de l'activation montre qu'ils sont généralement d'une utilisation peu aisée et souvent très toxiques. La base forte employée lors de l'activation est le phosphate de potassium 5M. Son rôle est d'augmenter la nucléophilicité du support dans le but de faciliter l'attaque du BrCN sur les ions alkoxydes formés (voir fig. n° 1).

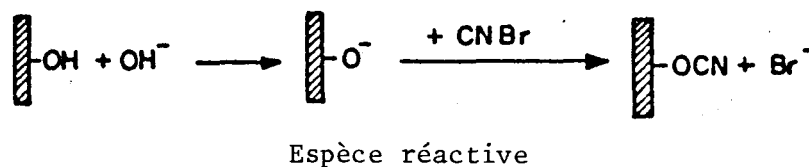


Figure n° 1 : Activation en présence d'une base.

Cependant, en milieu basique, l'estercyanate (R -OCN) formé est instable et rapidement hydrolysé en carbamates inertes, imido-carbonates linéaires très peu réactifs et imidocarbonates cycliques

peu réactifs (voir figure n° 2). En milieu basique 95 % de l'ester cyanate est hydrolysé.

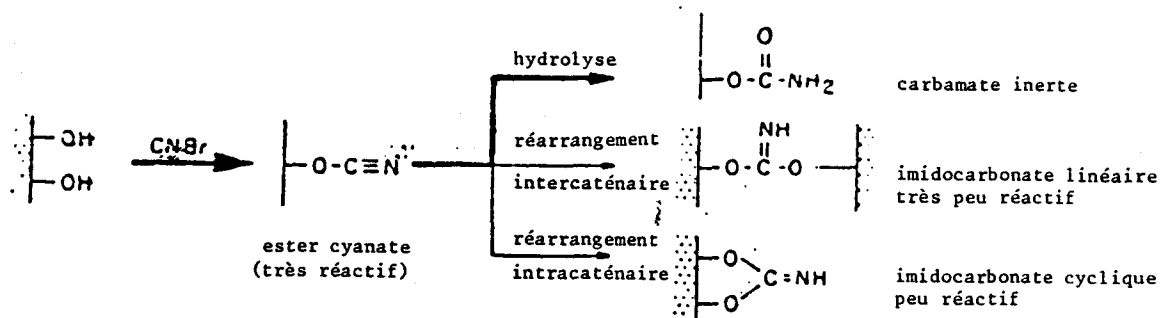


Figure n° 2 : Hydrolyse à pH alcalin de l'ester cyanate (d'après Kohn et Wilchek, 1981).

1.2 - Activation à pH neutre

La présence d'une quantité importante d'imidocarbonates peu réactifs et donc indésirables a amené Kohn et Wilchek (1982) à travailler à pH neutre, pH qui permet aux esters cyanates d'être stables pendant environ une heure, et de limiter ainsi l'hydrolyse en imidocarbonates. Cependant, à pH neutre, les groupements hydroxyles du Sepharose CL 4B sont très peu nucléophiles. Kohn et Wilchek ont alors augmenté l'électrophilicité du bromure de cyanogène en employant la triéthylamine comme agent de transfert des cyanates (voir figure n° 3)

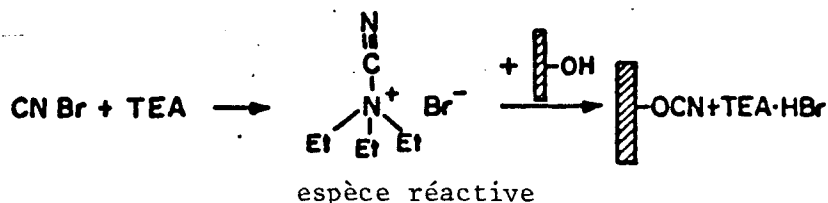


Figure n° 3 : Activation au BrCN en présence de TEA.

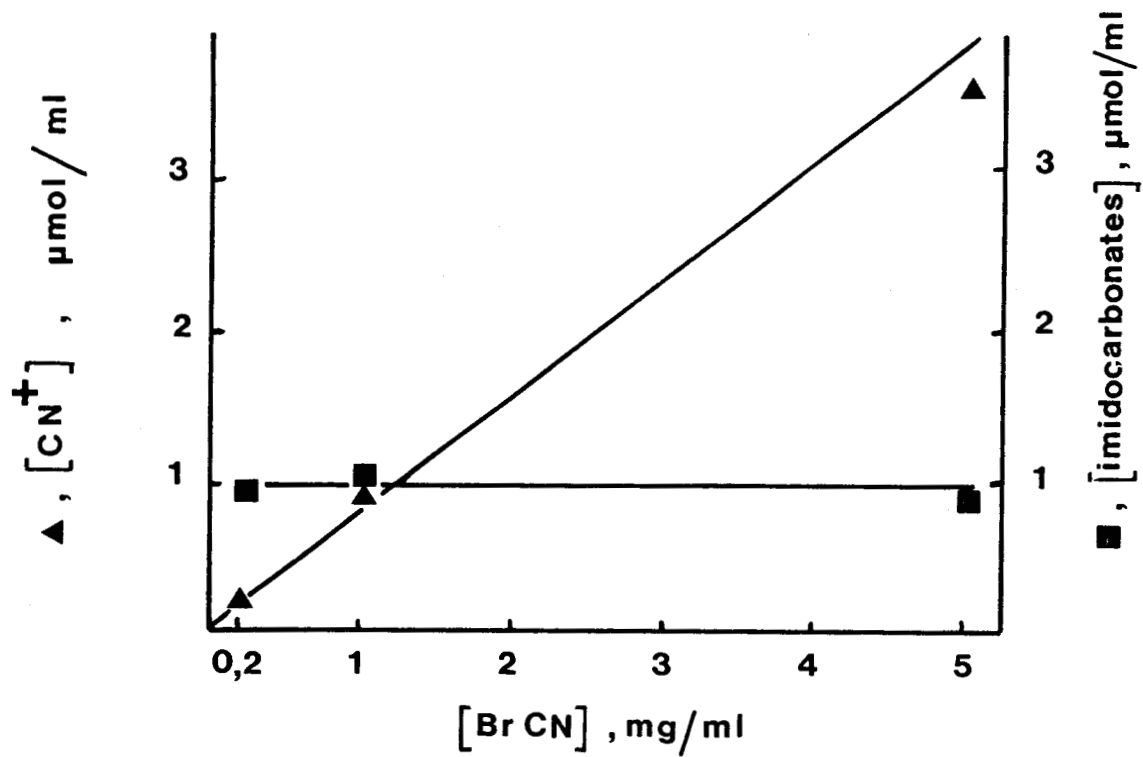


Figure n° 21 : Courbes étalons de l'incorporation des esters cyanates et des imidocarbonates.

L'emploi de l'acétone, comme milieu réactionnel, permet de baisser la température à -15°C et d'augmenter ainsi la stabilité de l'ester cyanate obtenu.

Kohn et Wilchek ont étudié l'incorporation d'esters cyanates actifs sur le Sépharose 4B en fonction de la quantité de BrCN ajoutée dans le milieu réactionnel sur une gamme très large allant jusqu'à 40 mg de BrCN par gramme de Sepharose 4B égoutté.

La quantité de bromure de cyanogène employée au laboratoire (7,5 mg par ml de gel égoutté) lors de l'activation à pH alcalin est faible, mais elle a été choisie pour le greffage du stéroïde à un taux optimal permettant à la fois une bonne adsorption et une bonne élution du récepteur à glucocorticoïdes. Les auteurs ayant montré que l'activation à pH neutre était au minimum dix fois plus efficace que l'activation à pH alcalin, il était nécessaire d'étudier l'incorporation d'esters cyanates dans une zone de faible activation. Les quantités de BrCN choisies ont été de 0,2, 1 et 5 mg par ml de gel égoutté et le temps de réaction est de 2 minutes. Les résultats obtenus montrent que l'incorporation du CN^+ à pH neutre est une fonction linéaire de la quantité de BrCN ajoutée. Il est à remarquer que, quelle que soit la quantité de BrCN ajoutée au milieu réactionnel, l'hydrolyse de l'estercyanate en imidocarbonate est faible et qu'elle se stabilise autour de 1 μmole par ml de gel égoutté, soit environ dix fois moins que lors de l'activation à pH alcalin. A la vue de la courbe étalon établie dans ces conditions, il apparaît qu'une quantité de 0,7 mg de BrCN par ml de gel est suffisante pour obtenir de 0,5 à 0,6 μmole d'ester cyanate par ml de gel. La quantité employée est dix fois moindre que celle utilisée lors de l'activation à pH alcalin. 50 ml de gel ont été activés et nous obtenons les résultats suivants

BrCN (mg/ml de gel)	CN^+ ($\mu\text{mole}/\text{ml}$ gel)	Imidocarbonate ($\mu\text{mole}/\text{ml}$ de gel)
0,7	0,38	1,57

1.3 - Taux de greffage théorique

Comme nous l'avons dit précédemment, l'estercyanate et l'imidocarbonate n'ont pas la même réactivité. Kohn et Wilchek (1981) ont montré que le rendement de couplage de la méthionine sur un gel ne contenant que des esters cyanates variait autour de 80 %, et, que la liaison de la méthionine sur un gel soumis à l'action de la soude 0,1 N pendant 10 min, ne portant donc plus que des fonctions imidocarbonates, n'avait plus qu'un rendement de 15 %. Ce sont ces rendements que nous utiliserons pour le calcul du taux de greffage théorique du bras diaminé sur les fonctions activées, ce qui donne la formule suivante :

$$\text{Capacité totale de couplage} = A \left[\text{esters cyanates} \right] + B \left[\text{imidocarbonates} \right]$$

$$\text{avec } A = 0,8 \text{ et } B = 0,15$$

2) Fixation du bras

Elle suit le protocole de March et Cuatrecasas (1974), pour les deux types de gel, elle se fait à pH alcalin. La nature du bras espaceur, tant par sa longueur que par son caractère hydrophile ou hydrophobe, influe sur les résultats de l'étape de chromatographie d'affinité. Truong et al. (1973) utilisent un bras aliphatique de longueur variable pour la purification du récepteur à oestradiol, la taille optimale étant de 10 carbones. Le récepteur à glucocorticoïdes a été purifié avec un gel d'affinité dont le bras espaceur comporte un noyau benzénique (Failla et al., 1975). Lustenberger(1980b) a montré qu'un bras hydrocarboné aliphatique comportant neuf atomes de carbone avait une capacité d'adsorption plus forte que les bras aliphatiques de longueur plus faible, que les bras plus hydrophiles comportant une amine secondaire ou que des bras renfermant un noyau aromatique, dans le cas de la purification

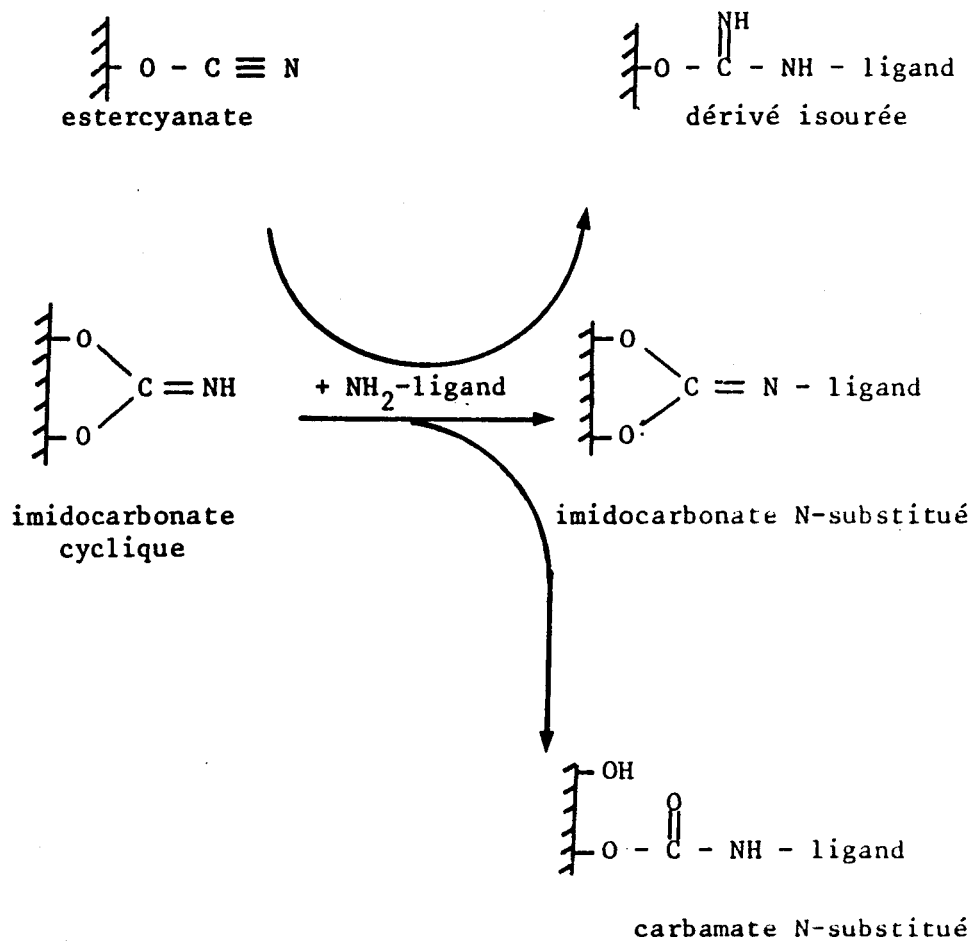


Figure n° 22 : Réactions de couplage du bras avec les fonctions activées au BrCN.

du récepteur à glucocorticoïdes. Le bras choisi est la diamino-nonane. La figure 22 illustre les différents cas de couplage du bras avec les fonctions activées.

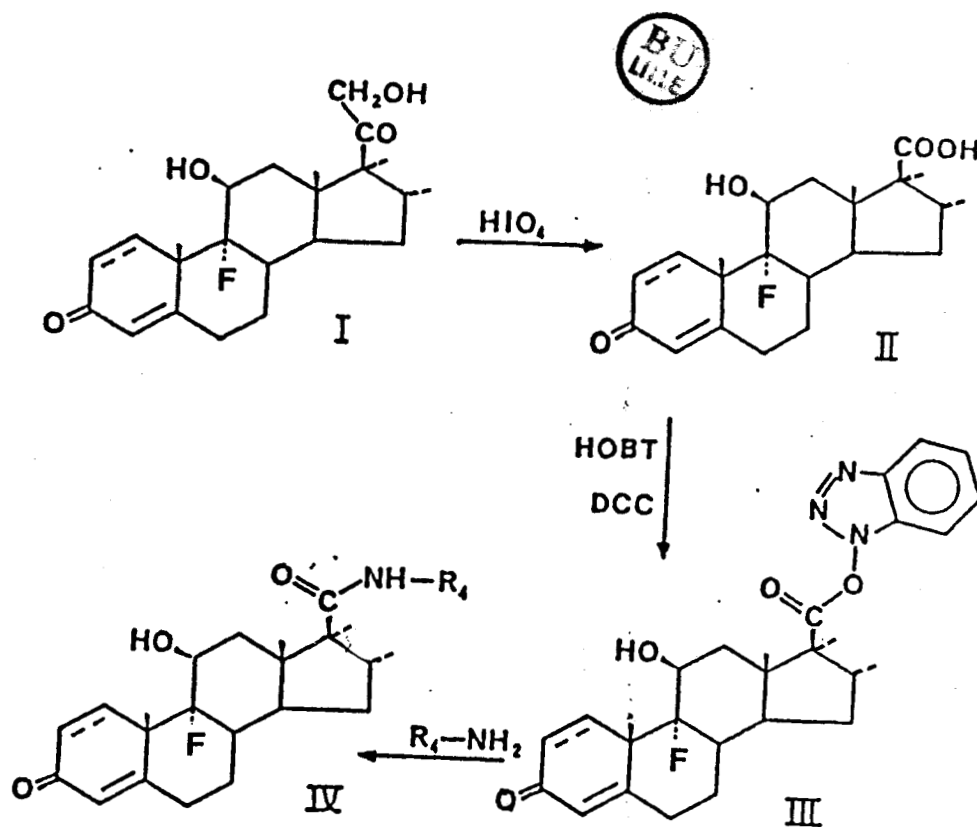
3) Oxydation periodique du stéroïde

Lustenberger et al. (1981) ont utilisé la dexaméthasone comme ligand, parce que les modifications sur le carbone 21 du stéroïde sont les plus favorables à l'utilisation du dérivé en chromatographie d'affinité ainsi que le montrent les résultats de la mesure de l'affinité de différents stéroïdes modifiés vis-à-vis des cellules tumorales HTC (Rousseau et al., 1977 ; Lustenberger et al., 1981) ont montré que des dérivés aminés du stéroïde gardaient une affinité suffisante pour être employés en chromatographie.

Le carbone 21 de la dexaméthasone est porteur d'une fonction alcoolique primaire, susceptible d'être estérifiée par un diacide. La fonction acide non estérifiée est alors couplée à la fonction amine du bras espaceur. Les essais effectués en ce sens (Sica et al., 1979 ; Hubener et al., 1954) montrent l'inconvénient de ce type de liaison en chromatographie d'affinité sur un cytosol contenant des estérases. C'est pourquoi, une liaison de type amide, plus stable, a été préférée. Mais la formation d'une liaison de ce type nécessite la présence sur le squelette stéroïdien d'une fonction carboxylique. Celle-ci est rendue possible par l'existence en 17β des glucocorticoïdes, du maillon $-CO-CH_2OH$, facilement oxydable par l'acide periodique (Lustenberger et al., 1981) (voir figure n° 23).

4) Fixation de l'hormone oxydée

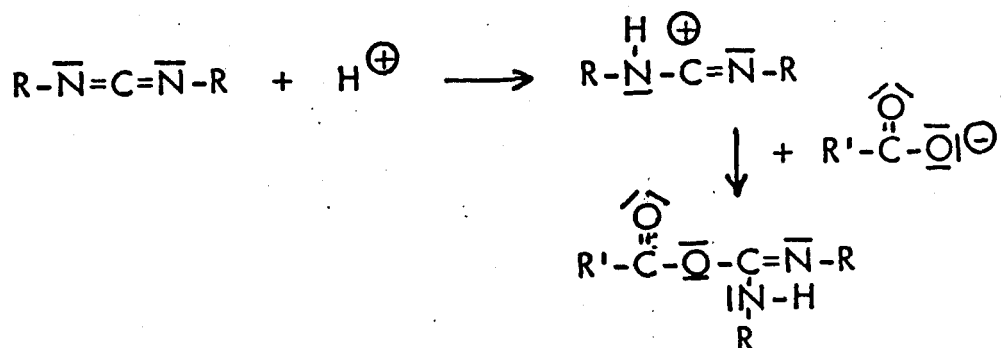
L'agent activateur généralement utilisé lors du couplage est un carbodiimide. L'atome de carbone de ce dernier correspond à l'état d'hybridation sp . Il peut donner lieu à des additions électrophiles, en particulier avec les acides carboxyliques. Les acides ainsi activés peuvent être aisément substitués par des



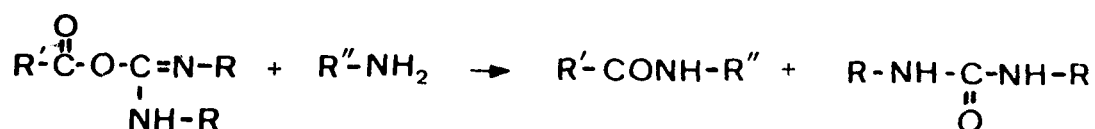
- I : Dexaméthasone
- II : Dexaméthasone oxydée (DXO)
- III : Ester activé
- IV : 17 β -carboxamide

Figure n° 23 : Schéma de couplage du stéroïde à l'amine libre du gel.

réactifs peu nucléophiles (voir figure ci-dessous).



La dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) employée se transforme lors de la réaction de couplage en dicyclohexylurée insoluble, qui est facile à éliminer.



La méthode de couplage au bras diaminé est effectuée en deux temps. La dexaméthasone oxydée (DXO) est d'abord activée en présence de DCCI et d'HOBT (hydroxybenzotriazole) en léger excès, à 4°C et en milieu tétrahydrofurane (voir figure n° 23). La réaction est suivie en chromatographie couche mince. L'ester activé (III) est isolé par filtration, puis ajouté au gel aminé à raison de 2,5 µmoles d'ester par ml de gel, ce qui correspond à un excès de 2 à 5 fois par rapport à l'amine libre. Le couplage est

réalisé dans le diméthylformamide qui est un meilleur solvant que le tétrahydrofuranne.

5) Dosages des fonctions greffées

Ces dosages sont importants puisqu'ils permettent de prévoir la marche à suivre à chaque étape de substitution du gel et de prévoir les qualités "biologiques" du gel d'affinité à la fin de la synthèse.

La synthèse se faisant en trois étapes, les dosages se font de même, comme le montre le schéma général présenté au début du chapitre.

5.1 - Dosage des esters cyanates

Il repose sur la réaction colorée des esters cyanates avec la pyridine et l'acide diméthylbarbiturique (réaction de König) (Kohn et Wilchek, 1981). L'étape cruciale est l'attaque électrophile du $-O-C N$ sur la pyridine. Elle conduit à une rupture du cycle pyridinyl et à la formation d'un aldéhyde glutaconique. Cette réaction est responsable également du départ du groupement cyanhydrique de la résine par formation d'une amine cyanhydrique (voir figure 24 et tableau récapitulatif). L'acide diméthylbarbiturique n'étant pas commercial, nous l'avons remplacé par l'acide barbiturique en conservant le coefficient d'extinction molaire du premier produit. Ces dosages restent néanmoins quantitatifs.

5.2 - Dosage des imidocarbonates

L'ammoniac obtenu par hydrolyse est dosé par la méthode à la ninhydrine et à l'hydrindantine, dans laquelle, après réaction avec l'ammoniac, l'hydrindantine en excès réagit avec le formaldéhyde ajouté pour donner une coloration bleue, dont l'absorbance est mesurée à 570 nm.

Sur les trois produits majeurs (carbammates, imidocarbonates et esters cyanates) résultant de l'activation par le bromure de cyanogène, seuls les imidocarbonates sont hydrolysés rapidement à pH 1, selon le mécanisme suivant (I)

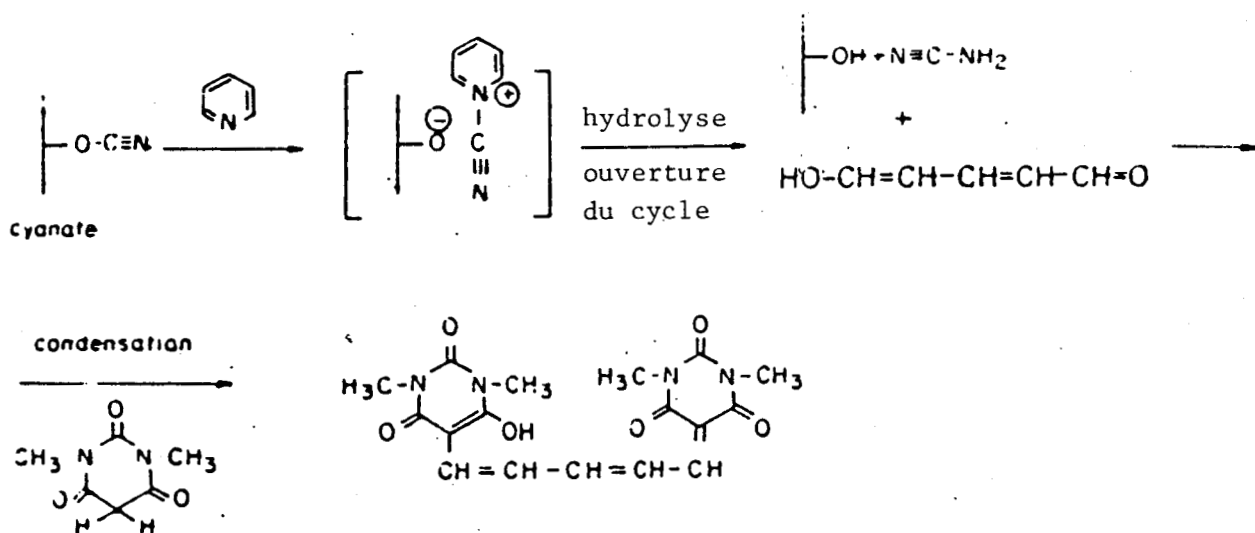
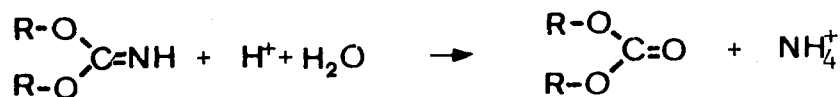


Figure n° 24 : Dosage des ester cyanates.

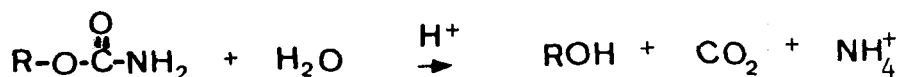
Mécanisme de la formation du complexe coloré par la réaction de König.

1



En principe, les carbamates peuvent aussi être soumis à une hydrolyse acide. Cependant la réaction (2)

2



est très lente à pH 1 et négligeable dans les conditions de la réaction.

Les esters cyanates, quant à eux sont hydrolyssés en carbamates par des acides forts, ce qui nous reporte au cas de figure ci-dessus (2).

Comme les imidocarbonates, les carbamates et les esters cyanates représentent la presque totalité de l'azote contenu dans le gel, la quantité de NH_4^+ obtenue lors de l'hydrolyse acide par l'HCl 0,1 N peut être considérée comme due à la quantité d'imidocarbonates présents sur la résine (Kohn et Wilchek, 1981).

5.3 - Dosage de l'azote total

L'ammoniac est obtenu par minéralisation du gel en présence de H_2SO_4 concentré (méthode de Kjeldahl). L'ammoniac est dosé comme décrit ci-dessus par Kohn et Wilchek, 1981).

5.4 - Dosage des amines libres des bras portés par le gel

Ce dosage est important parce qu'il assure le lien entre la connaissance du stéroïde fixé sur la matrice, essentielle quant à l'adsorption et l'éluion du matériel biologique à purifier, et

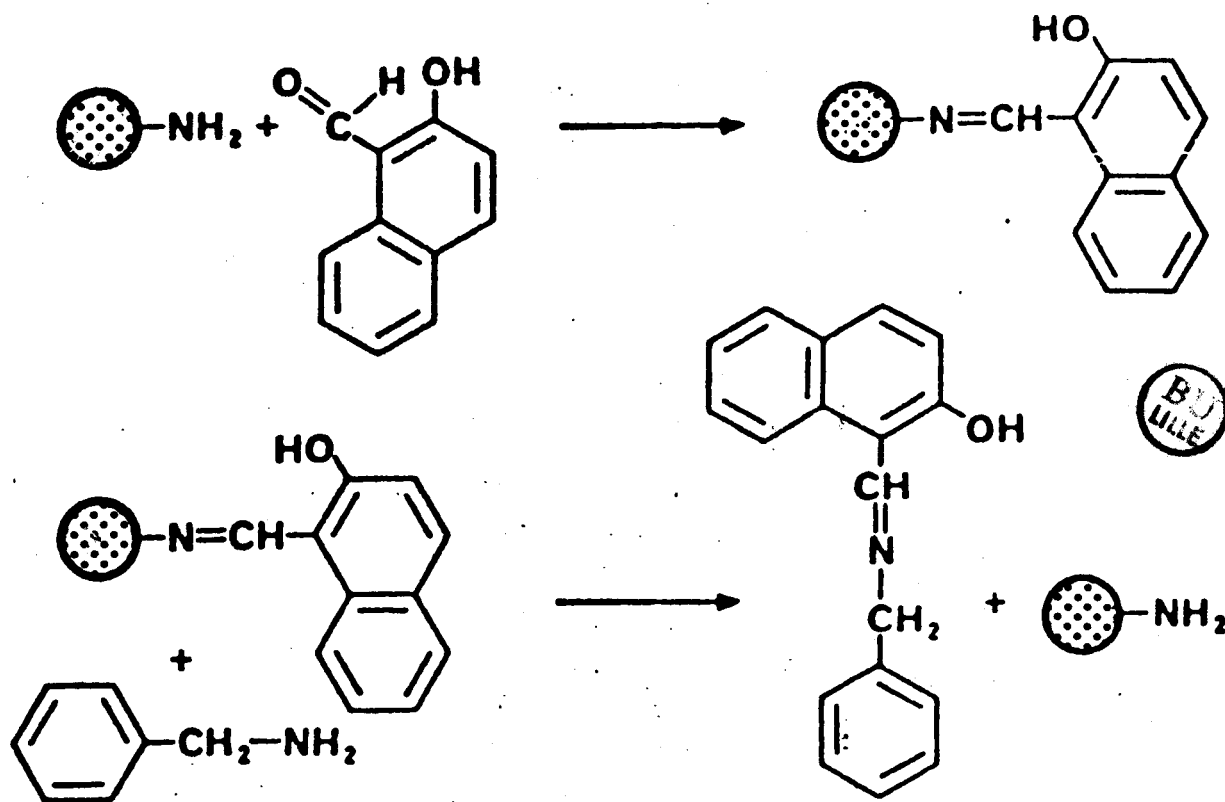


Figure n° 25 : Principe de la méthode de dosage des amines libres d'après Schmidt et Walker.

la première étape d'activation au bromure de cyanogène, qui conditionne toutes les étapes ultérieures.

Cette méthode permet, de plus, de donner une estimation du ligand fixé sur le bras par le dosage des groupements aminés libres avant et après couplage du stéroïde activé.

Le protocole utilisé est celui de Schmidt et Walker (1977) modifié par Lustenberger et al. (1980a). Il repose sur la formation d'une base de Schiff entre l'amine libre du support solide et la 2-hydroxy-1-naphtaldéhyde. Après lavage du gel, la base est déplacée par la benzylamine avec laquelle elle forme une nouvelle base de Schiff soluble, qui peut être déterminée par spectrophotométrie (voir figure n°25).

5.5 - Dosage du ligand fixé sur le gel

L'emploi d'un ligand radioactif à dose traceuse ($[^3\text{H}] \text{DXO/DXO} = 10^{-6}$) permet un dosage rapide et efficace du groupement fixé sur le gel. Le dosage est effectué contre un gel témoin non greffé auquel on rajoute une quantité connue de ligand radioactif.

La disparition d'amines libres après le couplage du stéroïde permet de donner à la fois, la quantité de stéroïde fixé sur le bras, ainsi que la quantité de stéroïde fixé sur les fonctions du gel, susceptibles de réagir avec la fonction carboxylique du stéroïde oxydé (en majorité des groupements hydroxyles).

Tous les dosages décrits ci-dessus ont été regroupés dans le tableau récapitulatif. Une figure d'ensemble montre également toutes les fonctions présentes sur le gel d'affinité au cours et à la fin de sa synthèse.

6) Stabilité du gel

Le second avantage de l'utilisation d'un ligand radioactif est le contrôle au cours du temps de la stabilité du gel. La libération de radioactivité dans le milieu de conservation du gel d'affinité peut être due soit à l'hydrolyse de la liaison

bras-ligand de la liaison bras support ou à l'hydrolyse des sucres du gel.

L'absence de radioactivité contenue dans le milieu de conservation, constatée au cours de vérifications périodiques, a permis de confirmer la bonne tenue mécanique et physicochimique d'un ligand greffé dans les conditions décrites ci-dessus.

7) Discussion

Le récepteur à glucocorticoïdes du foie de rat a été purifié presque à homogénéité avec un protocole en trois étapes. La chromatographie d'affinité en est l'étape principale ; c'est pourquoi une attention particulière est portée à la fabrication du gel d'affinité. Comme l'ont montré Lustenberger et al. (1981), plusieurs points sont essentiels à l'obtention d'un adsorbant bio-spécifique convenable. Premièrement, un dérivé de la dexaméthasone a été choisi comme ligand à cause de sa haute spécificité et de son affinité. De plus, un long bras aliphatique de neuf carbones lié au stéroïde par une liaison stable de type amide semble nécessaire pour augmenter les propriétés d'adsorption sur le gel. Un contrôle du degré de substitution du gel paraît également nécessaire à l'optimisation de l'adsorption et de l'élution du récepteur. Ces dernières sont optimales lorsque le gel est peu dérivé (0,2 - 0,5 μ mole de stéroïde par ml de gel humide). Grâce aux contrôles analytiques systématiques, le gel d'affinité semble bien défini et donne peu d'interactions ioniques et hydrophobes car la concentration en amines libres résiduelles est faible ainsi que la concentration de tous les autres dérivés (voir Tableau général des fonctions greffées). La forte concentration en amidocarbonates (8,3 μ moles/ml de gel humide) est due à l'activation au BrCN en milieu très alcalin. Les groupes sont très labiles et se transforment spontanément en carbamates inertes inutilisables pour un couplage ultérieur. La formation d'imidocarbonates peut être évitée en activant le gel à pH neutre en présence d'un agent de transfert des cyanates tel que la triéthylamine (Kohn et

BrCN (mg/ml)	CN ⁺ (μmol/ml)	Imido-carbonate (μmol/ml)	Greffage théorique (μmol/ml)	NH ₂ libres gel activé (μmol/ml)	³ H Dexa (μmol/ml)	NH ₂ libres après couplage (μmol/ml)	N ₂ total calculé (μmol/ml)	N ₂ total (μmol/ml)	³ H Dexa fixée sur le bras (μmol/ml)
--------------	---------------------------	---------------------------	------------------------------	---	-------------------------------	---	--	--------------------------------	---

- Activation à pH alcalin (100 ml de Sepharose CL 4B)

7,5	0,547	8,30	1,68	0,559	0,586	0,265	9,87	12,5	0,30
-----	-------	------	------	-------	-------	-------	------	------	------

- Activation à pH neutre (10 ml de Sepharose CL 4B)

0,2	0,175	0,93	0,28	0,12	0,137	0,111	1,34	nd	0,009
1	0,868	1	0,84	0,39	0,4	0,14	2,64	2,43	0,25
5	3,57	0,85	2,08	1,16	1,31	0,255	6,74	7,5	0,91

- 50 ml de gel activé à pH neutre

0,7	0,38	1,57	0,54	0,26	0,18	0,18	2,47	nd	0,08
-----	------	------	------	------	------	------	------	----	------

nd : Non déterminé

TABLEAU GENERAL DES FONCTIONS GREFFÉES SUR LE GEL DE SEPHAROSE CL 4B.

Wilchek, 1982). Les essais effectués en ce sens montrent qu'il en est presque ainsi. La formation des imidocarbonates peut être limitée à environ 1 μ mole par ml de gel humide (voir tableau général et voir figure n° 21). Cette méthode a de plus l'avantage d'être environ dix fois plus efficace que la méthode à pH alcalin quand on compare la quantité de BrCN ajoutée par rapport à la quantité d'estercyanate produite (voir tableau). Pour ces raisons, 50 ml de gel ont été actifs à pH neutre. La concentration plus forte (1,57 μ mole/ml de gel) observée en imidocarbonates est certainement due à un réarrangement des cyanates plus important occasionné par la forte quantité de gel manipulée. La première conséquence en est la chute de la présence d'estercyanate attendue (0,38 μ mole au lieu de 0,6)0,8 prévisibles) et donc une plus faible capacité de greffage théorique. La seconde plus grave, est le faible taux de greffage du stéroïde sur le bras (0,08 μ mole de stéroïde/ml de gel humide. Ce résultat était déjà prévisible au moment du calcul de la capacité de greffage théorique puisque l'on remarque qu'à taux de greffage trois fois plus faible (0,54 μ mole pour le gel activé à pH neutre et 1,68 μ mole pour le gel activé à pH alcalin) correspond à un taux de stéroïde greffé 3 fois plus faible (0,08 pour 0,3 μ mole par ml de gel humide). Pourtant la synthèse de ce gel mérite d'être poursuivie ne serait-ce qu'à cause de la faible quantité d'imidocarbonates présents.

Le gel d'affinité préparé par la méthode conventionnelle donne pourtant d'excellents résultats si on le compare aux gels d'autres auteurs.

Les gels utilisant la déoxycorticostérone comme ligand ont été récemment utilisés pour la purification du récepteur (Weisz et al., 1984 ; Grandics et al., 1984). Les facteurs de purification obtenus, beaucoup plus faibles (100-200 au lieu de 800-900 pour notre gel) sont probablement dûs au choix de la déoxycorticostérone dont l'affinité pour le récepteur est beaucoup plus faible que la dexaméthasone. Le choix du bras de liaison et du taux élevé de greffage du stéroïde sur le gel peut également être discuté. Ce taux élevé (5 μ l/ml de gel) oblige Govindan (1984) avec un gel semblable au nôtre, à diluer son gel au 1/5 pour pouvoir effectuer correctement la chromatographie. Le choix de

Govindan d'utiliser le protocole décrit par Lustenberger et al. (1981) a été certainement dicté par le fait que les précédentes utilisations de ligands et de bras variés n'étaient pas satisfaisantes (Govindan et al., 1976, 1978, 1980 ; Tsawdaroglov et al., 1981). L'emploi d'un ligand fixé à un bras comportant un bras disulfure oblige les auteurs à effectuer l'adsorption avec un tampon ne contenant pas de réducteurs de thiols. Dans de telles conditions, le récepteur non lié est très fragile.

Le gel dont nous décrivons la synthèse est un gel d'un emploi facile, adaptable à la purification d'autres récepteurs (récepteur à progestérone, Renoir et al., 1982) très solide puisqu'il n'est pas sensible aux estérases, et réutilisable, contrairement aux gels à pont disulfure qui nécessitent une nouvelle synthèse pour leur réutilisation.

B - DOSAGE DU RECEPTEUR A GLUCOCORTICOIDES

Ce chapitre sur le dosage de l'activité de liaison et le dosage des protéines n'a sa raison d'être, dans ce mémoire, que parce que nous nous adressons à des protéines hautement purifiées. Cette pureté nuit à la précision des dosages en raison de la faible quantité de protéines dans l'éluat et de la fragilisation de la protéine purifiée. Comme nous l'avons dit dans le chapitre sur la purification (paragraphe 2.3), la différence observée par différentes équipes entre les taux de purification et les taux de pureté obtenus (5800 fois et 47 % par Govindan et al. (1984), 20.000 et 8,7 % pour Manz et al. (1983), 12.000 fois et 50 % par Idziorek et al. (1985) pose le problème analytique de ces dosages ; a fortiori lorsqu'on s'aperçoit que Chang et al. (1982) purifient un récepteur à androgènes 540.000 fois avec 3 µg de protéines pour 50 ml d'éluat. Les protéines sont dosées au bleu de Coomassie en PAGE-SDS contre une gamme de sérumalbumine déposée dans les puits. Ce récepteur est purifié avec une homogénéité apparente (sic) de 100 %...

Les dosages de l'activité de liaison et de la quantité de protéines sont en effet nécessaires au calcul de l'activité spécifique. Dans le cas des récepteurs à hormones stéroïdes, le dosage de l'activité spécifique est lié à la quantité de complexe hormone-récepteur dosable dans le milieu. Elle correspond au nombre de cpm ou de nmoles liés par mg de protéines, de la molécule à purifier à chaque étape. Le rapport des activités spécifiques donne le taux de purification pour une étape.

1) Dosage du complexe hormone-récepteur

Il n'est possible qu'à la condition de disposer de méthodes permettant de doser spécifiquement le ligand sous forme libre et/ou lié.

Le ligand utilisé est très souvent une molécule marquée à haute activité spécifique, ce qui permet des dosages précis à des

concentrations en ligand de l'ordre de la constante de dissociation du système.

Il existe deux catégories de méthodes permettant le dosage du stéroïde lié au récepteur ; des méthodes ne nécessitant pas de rupture de l'équilibre et les méthodes occasionnant une rupture de l'équilibre.

1.1 - Dosage à l'équilibre

Il est effectué soit par gel-filtration, soit par dialyse. La méthode de la gel-filtration consiste à passer sur une colonne de gel-filtration équilibrée avec une solution de ligand, un échantillon de la protéine dans la même solution de ligand. Cette méthode est utilisable en HPLC (Sebille et al., 1970). Son principal inconvénient est de consommer une grande quantité de ligand. La dialyse permet à la fois la mesure du stéroïde libre et du stéroïde lié. Cette méthode est très précise mais elle est limitée par la lenteur de l'établissement de l'équilibre de diffusion du ligand libre à travers les parois de la membrane de dialyse (24 à 72 heures pour les stéroïdes avec des boudins de dialyse courants). Par cette méthode, il est impossible d'espérer pouvoir effectuer des contrôles au cours des différentes étapes avec un protocole de purification planifié sur trois jours.

1.2 - Dosage par rupture d'équilibre

La méthode la plus utilisée consiste en une adsorption sur une phase solide. La phase solide peut adsorber soit le stéroïde libre, soit le complexe hormone-récepteur.

1.2.1 - Dosage par la méthode de charbon-dextran

Cette méthode est connue depuis près de 20 ans. Le charbon activé présente la particularité d'adsorber le stéroïde libre (il est souvent associé à 10 % de dextran). La méthode doit être parfaitement standardisée (Rousseau et al., 1972).

Le récepteur purifié est très sensible à l'action du charbon. Il est donc nécessaire de traiter l'éluat de chromatographie d'affinité de façon différente de celle du cytosol et de l'extrait au sulfate de protamine pour avoir des résultats équivalents à ceux obtenus par la méthode à l'hydroxylapatite prise comme référence. Le complexe H-R est stabilisé par adjonction de sérumalbumine bovine (1 mg/ml) (Buller et al., 1976). De plus, la quantité de charbon dextran, et le temps d'incubation de l'éluat avec de dernier sont diminués de moitié par rapport aux conditions utilisées sur cytosol. Le dosage du non spécifique est effectué sur la solution éluante de chromatographie à laquelle est rajoutée la même quantité de sérumalbumine que pour le dosage de la liaison non spécifique. Malgré cela, la méthode au "charbon-dextran" ne donne pas toujours des résultats corrects (voir tableau comparatif n° 1).

1.2.2 - Dosage par la méthode à l'hydroxylapatite

En faible force ionique, le complexe hormone-récepteur est retenu sur le gel d'hydroxylapatite contenu dans une mini colonne. Le gel est lavé puis disposé en fiole de comptage (Atger et al., 1976). Ce dosage n'est effectué que pour le récepteur purifié. Le dosage du non spécifique se fait par incubation préalable d'un aliquote de la solution éluante avec de la sérumalbumine pendant 30 minutes avant le dépôt sur l'hydroxylapatite.

Cette méthode, assez contraignante (c'est pourquoi elle n'est pas utilisée pour les dosages du cytosol et de l'extrait au sulfate de protamine) donne de meilleurs résultats que la méthode au charbon-dextran. Elle est très reproductible et la liaison non spécifique est très faible (moins de 5 % de la valeur de la liaison spécifique) (voir tableau comparatif).

1.2.3 - Dosage par HPLC

La chromatographie de gel filtration a été utilisée pour la séparation des stéroïdes libres et liés. Elle présente pourtant plusieurs inconvénients (Baulieu et al., 1970) : le complexe H-R se

Méthodes	Charbon-dextran (x 10 ⁻⁶ cpm/ml)	HAP (10 ⁻⁶ cpm/ml)	HPLC TSK G 3000 (10 ⁻⁶ cpm/ml)	HPLC précolonne (10 ⁻⁶ cpm/ml)
Eluat 1	0,79	10,8	1,54	
Eluat 2	0,68	0,956	0,99	
Eluat 3		1,308	1,32	
Eluat 4			0,504	0,60
Eluat 5			0,92	0,99

TABLEAU n° 1

- Comparaison des différentes méthodes de dosage de l'activité de liaison du récepteur purifié.

dissocie en cours de chromatographie à un degré qui dépend de nombreux facteurs (durée de la chromatographie, géométrie de la colonne, volume et concentration de l'échantillon). La gel filtration en HPLC, par sa rapidité, par l'inertie du support silice en force ionique supérieure à 200 mM, permet d'utiliser des échantillons peu concentrés (récepteur purifié) pour le dosage de l'activité de liaison.

- Utilisation de la colonne totale

La colonne TSK G 3000 SW (60 cm) avec un débit de $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ permet de séparer aisément le récepteur lié de l'hormone libre qui sort avec le volume total au bout de 90 min (voir figure n°26). Les résultats obtenus sont de plus très reproductibles (voir paragraphe sur l'emploi de l'HPLC, page 111). Le dosage du non spécifique n'est pas effectué par cette méthode pour deux raisons : l'HPLC apporte un facteur de purification, d'une part, et le dosage du non spécifique par la méthode de l'hydrosylapatite est négligeable, d'autre part (voir tableau comparatif n° 1).

- Utilisation de la précolonne seule

Elle représente l'aboutissement de la méthode de dosage par l'HPLC. Comme nous pouvons le voir sur la figure n° 26 , avec le même débit de $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, la séparation du stéroïde libre et du complexe hormone-récepteur est suffisante pour être exploitable pour un dosage de l'activité de liaison. C'est une méthode rapide, qui donne des résultats équivalents à ceux de l'HPLC-colonne totale (voir tableau comparatif n° 1).

2) Dosage des protéines

Une quantification aussi précise que possible est nécessaire lorsque le but d'une manipulation est la purification d'une protéine. Nous aborderons ici deux types de méthodes de dosage, celle de Lowry et celle au bleu de Coomassie.

2.1 - Méthode de Bensadoun

La méthode classique du dosage des protéines est celle

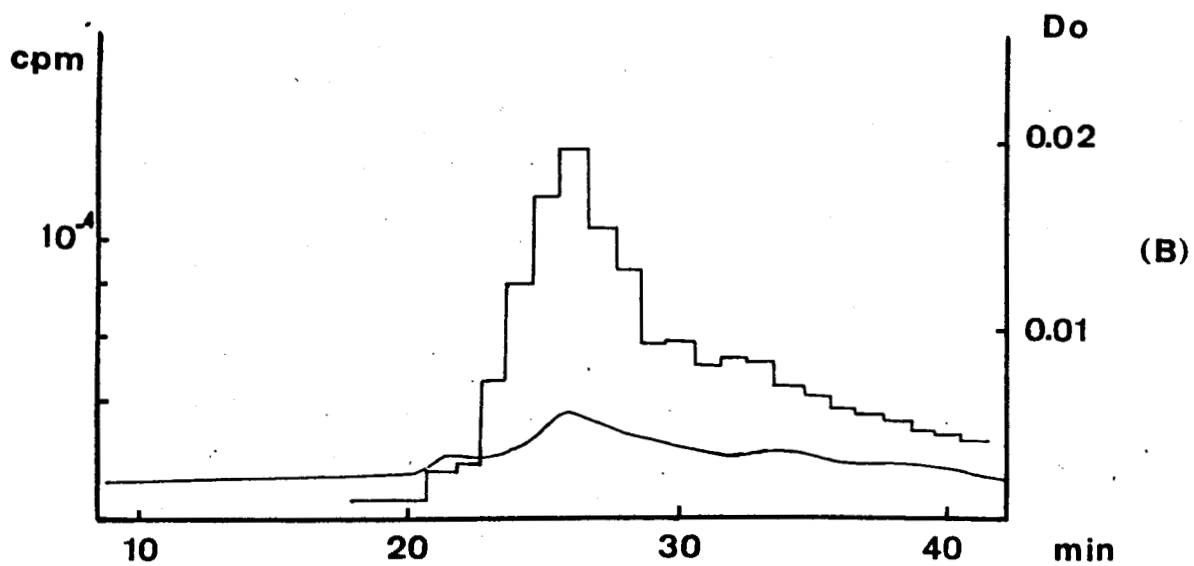
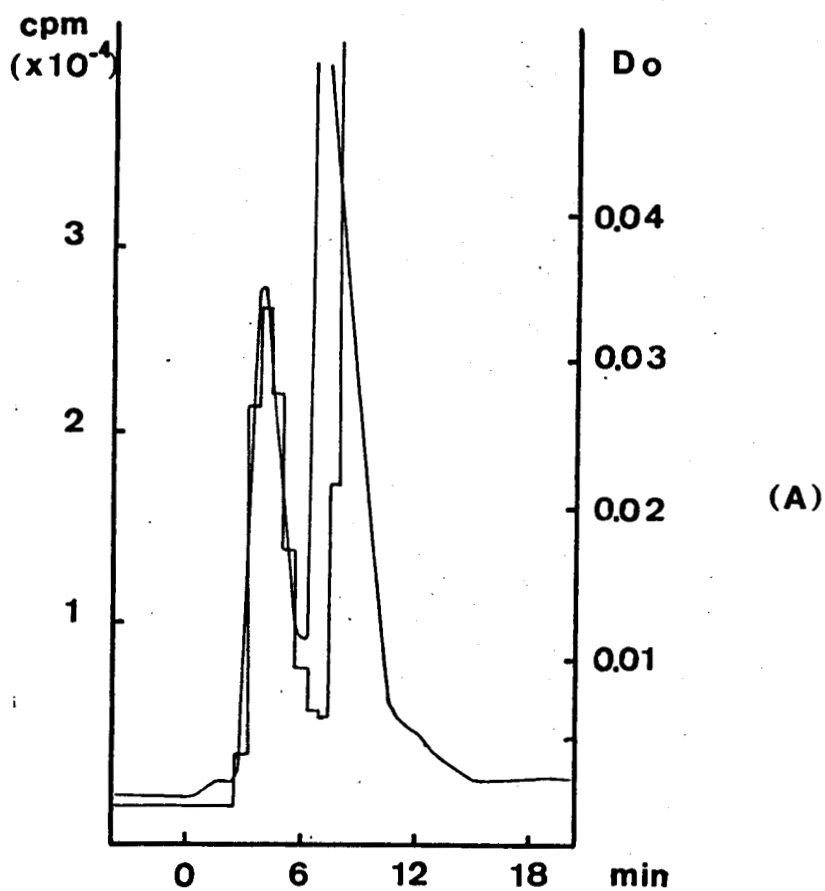


Figure n°26 : Dosage du complexe hormone-récepteur hautement purifié par HPLC avec la pré-colonne seule (A) ou la précolonne + colonne SW G 3000 (B).

de Lowry et al. (1951). Cependant, cette méthode est sensible à certaines interférences comme le tampon, par exemple. Bensadoun et al., (1976) évitent ces interférences en introduisant une étape supplémentaire de précipitation des protéines par l'acide trichloracétique en présence de déoxycholate de sodium. Cette méthode élimine l'influence du tampon, mais introduit un risque de sous-estimation du dosage, puisqu'il est difficile de savoir si les protéines sont précipitées à 100 %. C'est une méthode longue, qui ne pose pas de problème pour le dosage de faibles quantités de protéines ($Q \geq 30 \mu\text{g/ml}$). Mais le seul inconvénient de cette méthode est de consommer une quantité importante de matériel lorsque ce dernier est purifié. Un simple dosage de protéines peut requérir jusqu'à 20 % de l'éluat de chromatographie d'affinité, ce qui est beaucoup trop lorsque l'on part d'une quantité aussi faible que 2,5 ml d'éluat. Par cette méthode, il a été impossible de doser le récepteur purifié après passage de celui-ci sur colonne de gel-filtration en HPLC. Aussi était-il nécessaire d'employer d'autres méthodes plus sensibles consommant moins de matériel biologique.

Parallèlement aux essais effectués avec le colorant bleu de Coomassie, les protéines suivantes, sérumalbumine bovine, lysozyme, cytochrome c, pepsine et trypsine ont été employées avec la méthode de Bensadoun, sur une gamme allant de 0 à 200 μg de protéines par ml. Ces protéines sont à une concentration initiale de 1 mg/ml. La transcortine cristallisée (1 ou 2 mg/ml) a été utilisée comme témoin pour tous les dosages (voir figure n° 27, voir tableau n° 2).

2.2 - Méthode au Bleu de Coomassie

Cette méthode est basée sur l'observation de l'existence de deux formes colorées pour le bleu de Coomassie G250. La forme bleue est obtenue lorsque la forme rouge se lie à la protéine. Le colorant interagirait avec les $-\text{NH}_3^+$ des protéines, dont l'apparition est favorisée par le travail à pH acide (Sedmaic et al., 1977). Le complexe colorant-protéine a une extinction molaire élevée, ce qui permet une grande sensibilité dans la mesure des protéines.

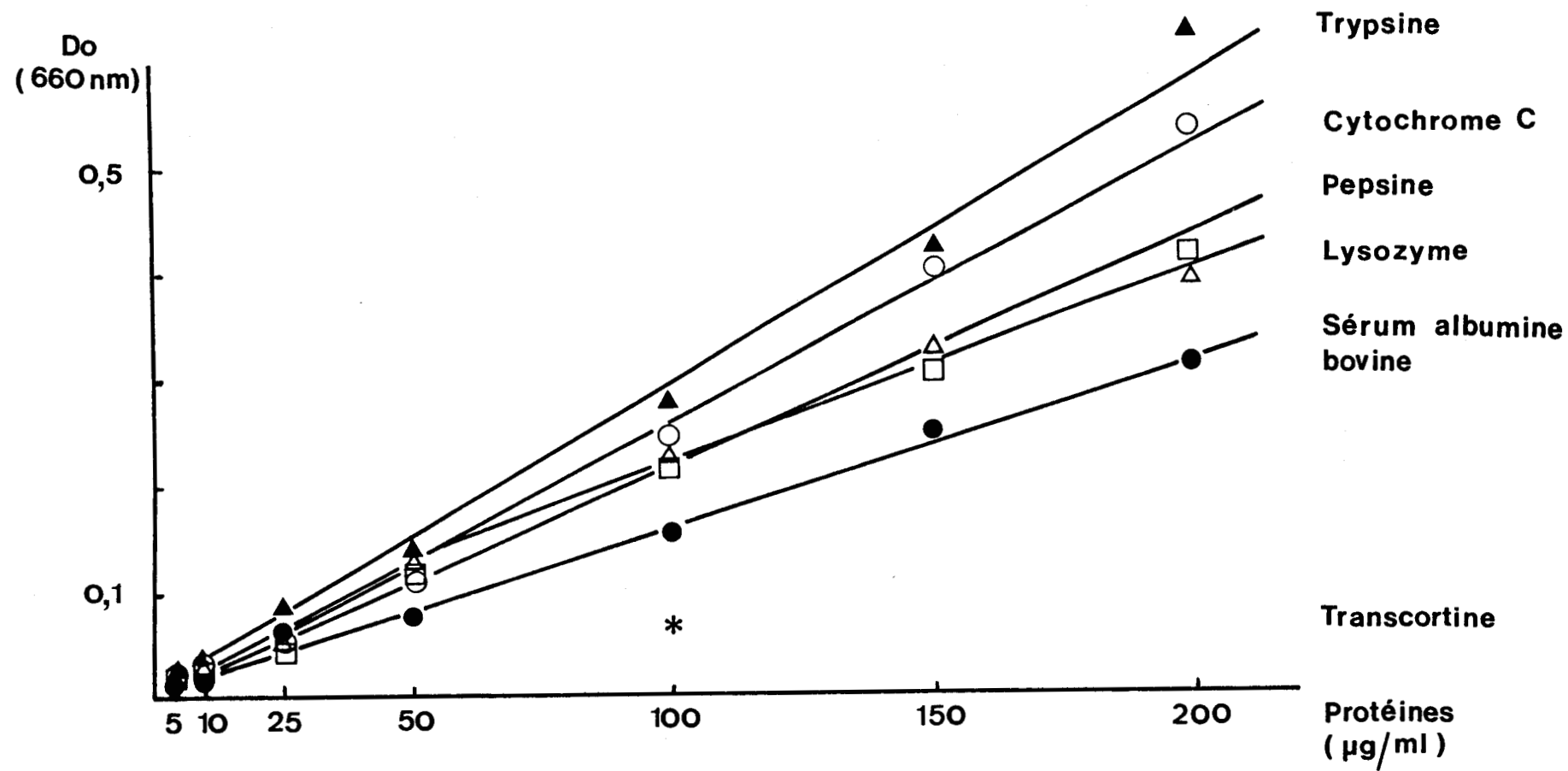


Figure n°27 : Dosage des protéines par la méthode de Bensadoun



	BRADFORD		READ		BENSADOUN	
	D.O.	%	D.O.	%	D.O.	%
SAB	0,2201	100	0,2563	100	0,156	100
LYSOZYME	0,0517	23,5	0,3143	123	0,213	136
Cyt. c	0,3565	162	0,4356	170	0,248	159
PEPSINE	0,0609	27,7	0,1315	51,3	0,23	147
TRANSCORTINE	0,0239	10,9	0,0397	15,4	0,063*	40

(*) 2 mg/ml au lieu de 1 mg/ml dans les autres protocoles

TABLEAU n° 2 - Comparaison des variations des différentes méthodes de dosages pour des quantités de protéines de 100 µg/ml.

Les deux méthodes utilisées sont les méthodes de Bradford (1976) et celle de Read et Northcote (1981) qui ne diffèrent en fait que par le colorant utilisé. Bradford utilise le CBB G250, de SERVA, et Read, le SERVA Blue G. Ce dernier est environ deux fois plus pur que le CBB 250 comme le montre l'absorbance au point isobestique ($\lambda \approx 550 \text{ nm}$). A poids égal, la quantité de réactifs sera donc deux fois plus grande pour la méthode de Read que pour celle de Bradford.

3 - Conclusion

Le dosage de l'activité de liaison du récepteur purifié par les trois méthodes décrites montre que le charbon dextran est la moins bonne méthode. Les valeurs obtenues sont de 20 à 50 % inférieures à celle de l'HPLC (voir tableau comparatif n° 2). L'action drastique du charbon est d'autant plus forte que le récepteur est purifié. Les valeurs obtenues par l'HPLC de gel filtration sont comprises entre 90 et 120 % de la méthode considérée comme la plus fiable, c'est-à-dire le dosage par hydroxylapatite (HAP). Les résultats des dosages par la précolonne sont souvent légèrement supérieurs à ceux de la colonne totale, une séparation du libre et du lié imparfaite pouvant expliquer ce résultat.

Une quantification valable de l'activité de liaison d'un récepteur purifié nécessite généralement l'emploi de deux méthodes de dosage différentes, la moyenne des deux donnant l'activité de liaison. Devant le remarquable résultat obtenu par HPLC, le dosage par la méthode au charbon-dextran a été délaissée au profit de cette dernière, moins rapide mais beaucoup plus performante.

Le grand problème posé par le dosage des protéines, c'est, entre autres, l'exactitude des méthodes employées. En fait, aucune des trois méthodes utilisées ne donne de résultats exacts (voir figures n° 27, 28, 29). Elles donnent toutes un éventail de réponses très variables en fonction des protéines employées. La méthode qui présente le moins de variation est celle de Bensadoun, avec un écart de 1 à 2 entre la SAB et la trypsine ; celle qui présente le plus de variation est celle de Bradford, avec un écart de 1 à 8 entre

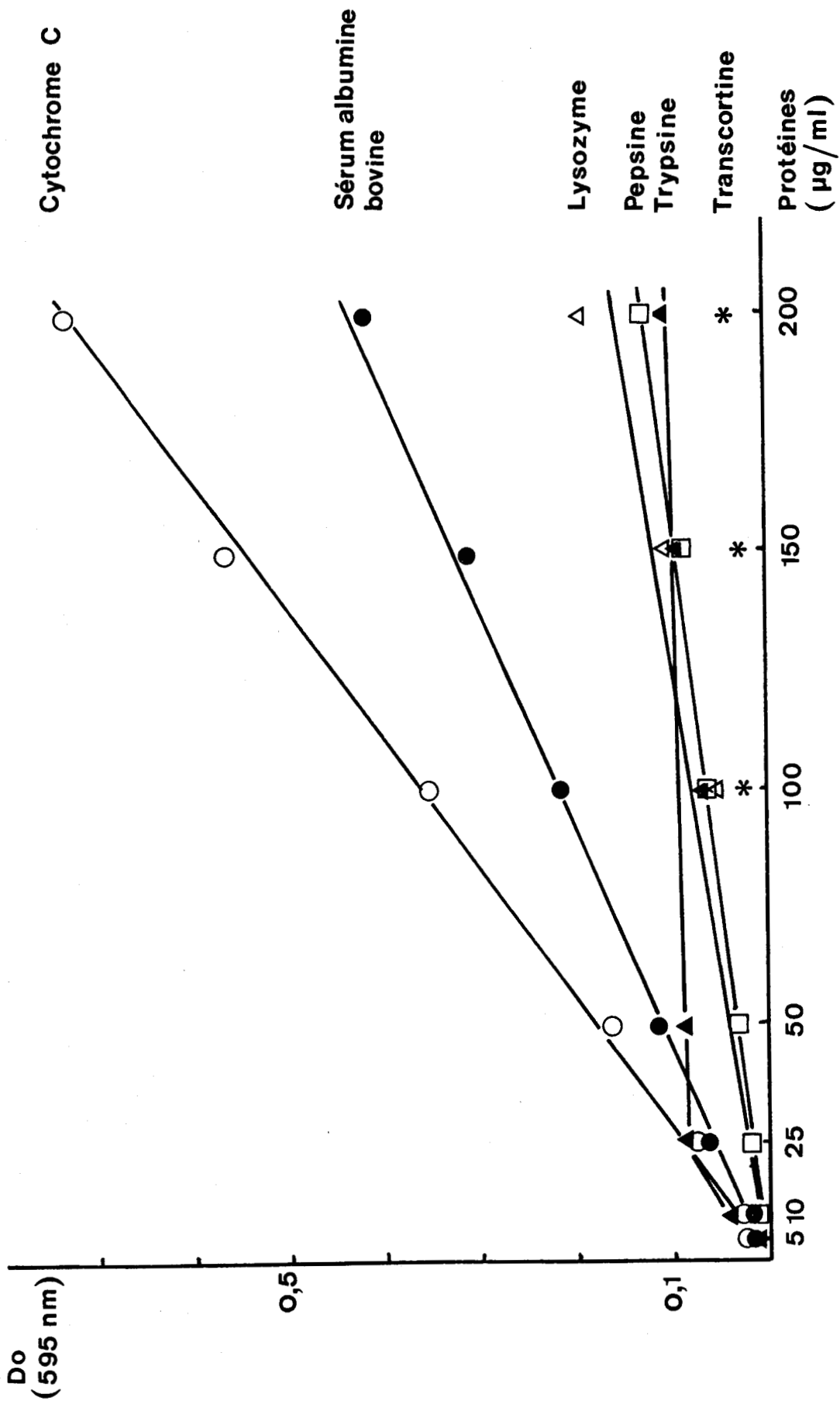


Figure n° 28 : Dosage des protéines au bleu de Coomassie par la méthode de Bradford.

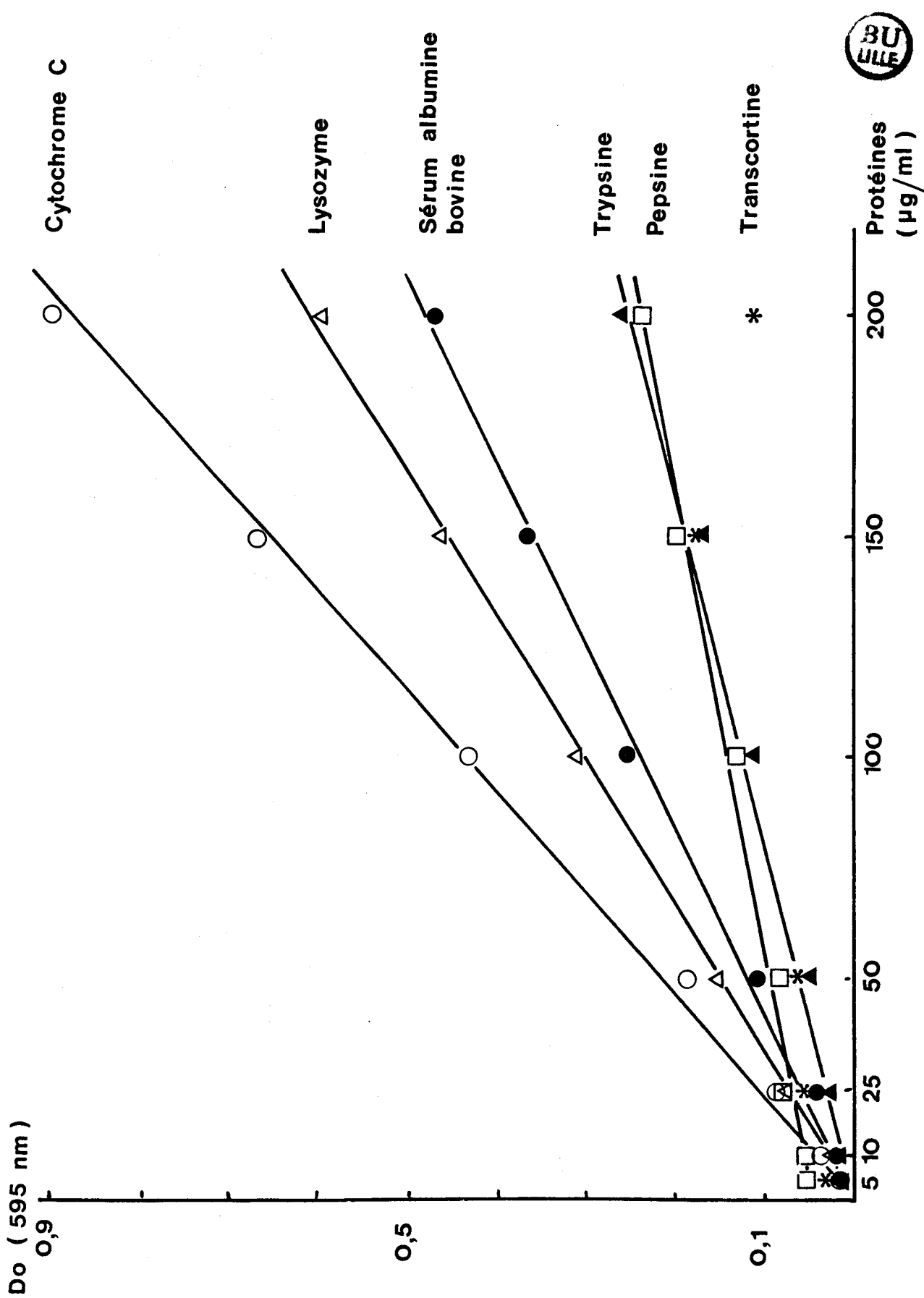


Figure n° 29 : Dosage des protéines au bleu de Coomassie par la méthode de Read.

la trypsine et le cytochrome c, cet écart chute de 1 à 4 avec la méthode de Read. Cette diminution de l'écart observée est due à un doublement de la sensibilité de la méthode de Read, lorsque l'on dose la pepsine ou la trypsine. Ce résultat est probablement dû à la pureté du réactif. La transcortine, molécule de transport plasmatique des glucocorticoïdes répond très faiblement aux dosages, quelle que soit la méthode employée (voir figures n° 27 , 28 ,). Si les dosages des protéines du cytosol et de l'extrait au sulfate de protamine présentent des résultats relativement équivalents pour la méthode de Bensadoun et celle de Read, par contre pour le récepteur purifié, nous observons de grands écarts, cet écart variant de 1 à 3 entre les deux méthodes (voir Tableau n° 3).

Une récente publication, parue pendant la rédaction de ce mémoire, tente de donner une explication de la variation des résultats obtenus en fonction des protéines employées (Tal et al., 1985). Comme Sedmak et al. (1977), Tal et al. (1985) montrent que les molécules de colorant se fixent sur les charges positives des protéines. Le cytochrome c est la protéine qui réagit le plus, et la pepsine le moins, confirmant ainsi nos résultats. Un environnement hydrophobique autour de la charge positive facilite l'interaction du colorant qui peut se fixer à raison de 1,5 à 3 molécules par charge positive. Cette fixation supplémentaire est certainement responsable des variations observées. Ces auteurs constatent de plus que l'emploi de la sérumalbumine dans la gamme étalon entraîne une sous-estimation du dosage de la quantité de protéine parce que la SAB présente environ 16 sites basiques pour 100 acides aminés. Une moyenne effectuée sur la séquence de 200 protéines connues ne donne que 13 sites basiques pour 100 acides aminés. Les auteurs conseillent donc d'employer, pour cette méthode, le lysozyme de blanc d'oeuf (13,2 sites basiques %) comme protéine de référence de préférence à la sérumalbumine.

Le second problème posé pour le dosage des protéines est la détectabilité. Au cours de nos travaux, et pour des purifications différentes, les taux de protéines les plus bas obtenus pour les méthodes de Bensadoun et de Read avoisinaient 50 µg/ml, avec, respectivement, 200 et 15 µl de prise d'essai pour les deux méthodes.

		CYTOSOL (mg/ml)	SULFATE (mg/ml)	ELUAT (µg/ml)
Purification a	CBB	35	10,5	95
	Lowry	37,3	12	210
Purification b	CBB	30,8	9,8	54
	Lowry	33	12	160
Purification c	CBB	34	7,5	47,5
	Lowry	37,9	8,4	135
Purification d	CBB	N.D.	13,5	75
	Lowry	35,5	11,25	180

N.D. : non déterminé

TABLEAU n° 3 - Comparaison des méthodes de Read (CBB)
et Bensadoun (Lowry) au cours d'une purification.

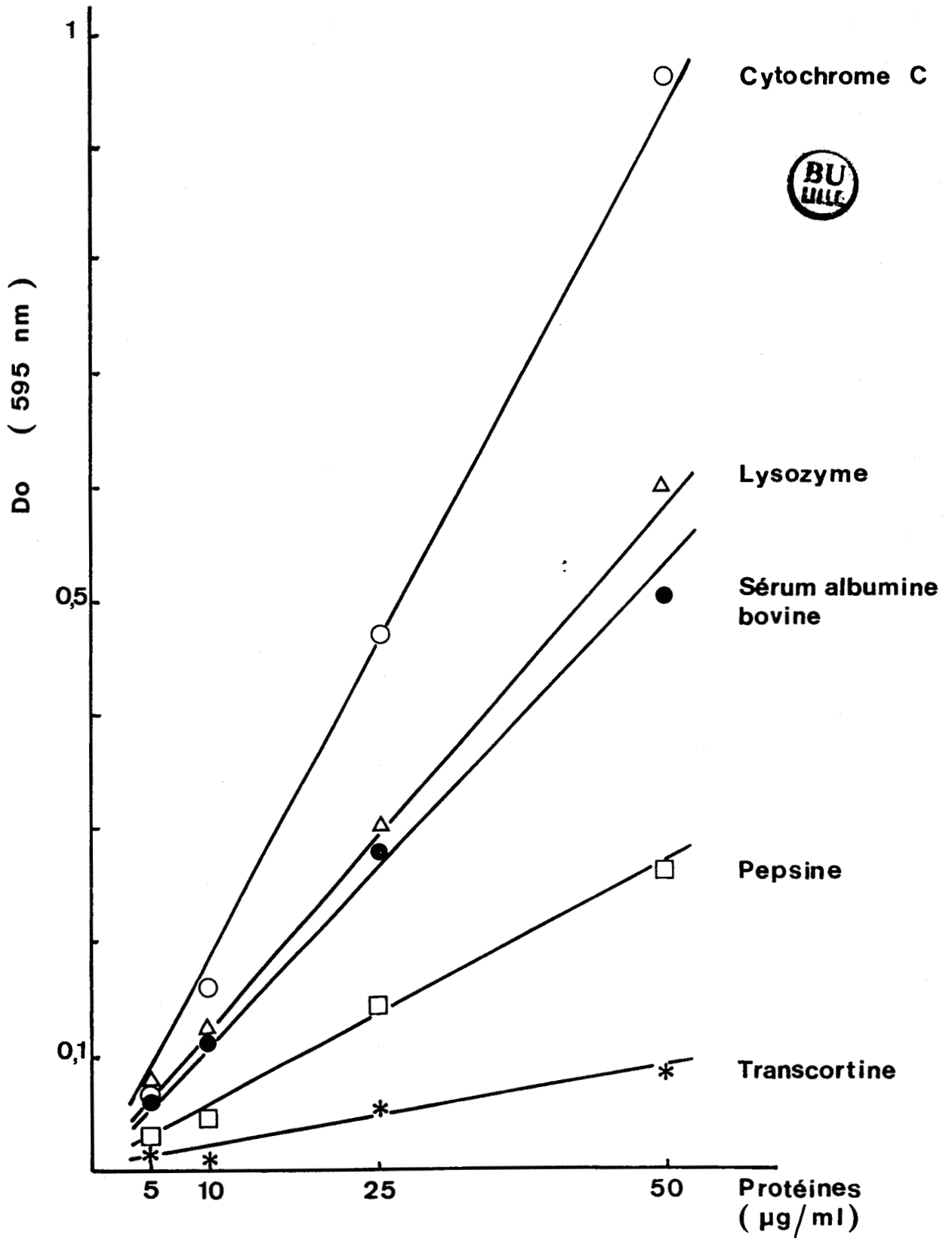


Figure n° 30 : Microdosage des protéines au bleu de Coomassie par la méthode de Read.

Ceci donne une capacité de détection de 10 μg pour la méthode de Bensadoun et de 0,75 μg pour celle de Read. Ce résultat nous a conduit à essayer une méthode de microdosage pour les éluats très purifiés après passage de l'éluat sur HPLC de gel filtration en multipliant la prise d'essai par 4 par rapport au dosage normal (voir figure n° 30). La détectabilité augmente et passe à 0,36 μg pour la prise d'essai.

La méthode de dosage au bleu de Coomassie est, de plus, très simple à mettre en oeuvre, très rapide et se prête bien à une standardisation poussée. L'emploi d'un analyseur centrifuge tel que le COBAS BIO permet le dépôt automatique des échantillons dans une couronne contenant 24 tubes de spectrophotomètre et comportant une cellule pour le dépôt du réactif. La centrifugation met en contact simultanément le réactif avec tous les échantillons déposés. Une cellule photoélectrique lit pendant la rotation, la densité optique de chaque tube à un temps donné.

Tous ces avantages, détectabilité, sensibilité, facilité de mise en oeuvre et possibilité de standardisation poussée nous ont fait pencher pour la méthode de Read.

C - Purification du récepteur non transformé

Cette purification a été menée à bien il y a quelques années au laboratoire par Lustenberger et al. (1980a et b). Après la synthèse des deux gels d'affinité, notre premier travail a consisté à les tester selon le protocole employé par Patrick Lustenberger. Le choix du meilleur gel d'affinité effectué, nous avons essayé de régler les problèmes posés par les lavages du gel après adsorption du récepteur (problèmes de temps et de mise en oeuvre). Notre troisième travail a été de mettre au point la gel filtration en HPLC et de terminer ainsi la purification.

1) Choix du gel d'affinité

La purification a été tentée parallèlement sur les deux gels d'affinité qui ont été synthétisés. Pour mémoire, nous rappellerons que le gel activé à pH alcalin porte 0,3 μ mole de stéroïde par ml de gel sur le bras diaminé et que le second n'en porte que 0,08.

La purification a été menée de la manière suivante. 2 x 40 ml d'extrait au sulfate de protamine, correspondant à 2 x 200 ml de cytosol de foie de rat, ont été mis en contact avec 1,5 ml de chaque gel d'affinité. Les pourcentages d'adsorption sont respectivement de 60 % et 40 % pour les gels I et II. Les gels ont été lavés en batch sur une colonne IBF 11 par les tampons phosphate de potassium 0,16 M, tampon phosphate 0,16 M plus chlorure de potassium 0,2 M. Puis les gels sont de nouveau équilibrés par le tampon phosphate. Ces étapes, menées selon le protocole de P. Lustenberger (1980) ont duré au total 4 heures. L'élution est effectuée avec 2 ml de tampon phosphate dans lequel a été dissout 2 μ M de [3 H] dexaméthasone dont l'activité spécifique est de 48,9 Ci/mmole. Les rendements d'élution sont de 42 % pour le gel I et 6 % pour le gel II, ce qui donne des rendements globaux pour la chromatographie d'affinité de 26 % et 2,4 % respectivement. Le taux de substitution très faible du gel activé à pH neutre peut expliquer

le faible pourcentage d'adsorption sur ce gel.

Devant le rendement catastrophique de la chromatographie d'affinité obtenu pour le gel n° II, c'est le gel activé à pH alcalin qui a été choisi pour les purifications ultérieures.

2) Purification

2.1 - Protocole expérimental

La fraction cytosolique des foies de rats surrénalectomisés, est soumise à une double précipitation par les sulfates de streptomycine, puis de protamine. La dernière précipitation nécessite l'emploi d'un tampon de forte force ionique pour solubiliser le récepteur à glucocorticoïdes (Govindan, 1978). L'extrait de sulfate de protamine, dont le taux de purification moyen est de 8 à 10 fois, est ensuite mis en contact avec le gel d'affinité selon un rapport de charge variant de 25 à 50 (volume d'extrait au sulfate/volume de gel = 25 à 50). Le rapport de charge de 25 sera progressivement abandonné au profit de celui à 50 parce que ce dernier assure une meilleure adsorption du récepteur sur le gel (Greene et al., 1980, Lustenberger et al., 1980b). Après 15 heures d'adsorption à 4°C, le mélange gel + sulfate est déposé sur une colonne IBF pour récupérer le gel et effectuer les lavages (x x 10 ml) en batch. Le gel est d'abord lavé avec le tampon phosphate 160 mM, puis avec le tampon phosphate auquel on ajoute du KCl 0,2M final. Le gel est enfin équilibré par le tampon phosphate. Pour chaque lavage, un aliquote est prélevé pour le dosage du récepteur perdu.

L'élution spécifique est effectuée contre un stéroïde de synthèse, dexaméthasone ou acétonide de triamcinolone marqués, dissous dans le tampon phosphate. Pour chaque étape de la purification, le dosage des protéines et de l'activité de liaison sont effectués selon les modalités décrites dans le chapitre précédent.

2.2 - Importance des lavages

Comme le montre la figure n° 31, un gel d'affinité n'est pas inerte et fixe de nombreuses protéines, autres que celle à purifier. Le rapport de charge élevé utilisé pour la purification

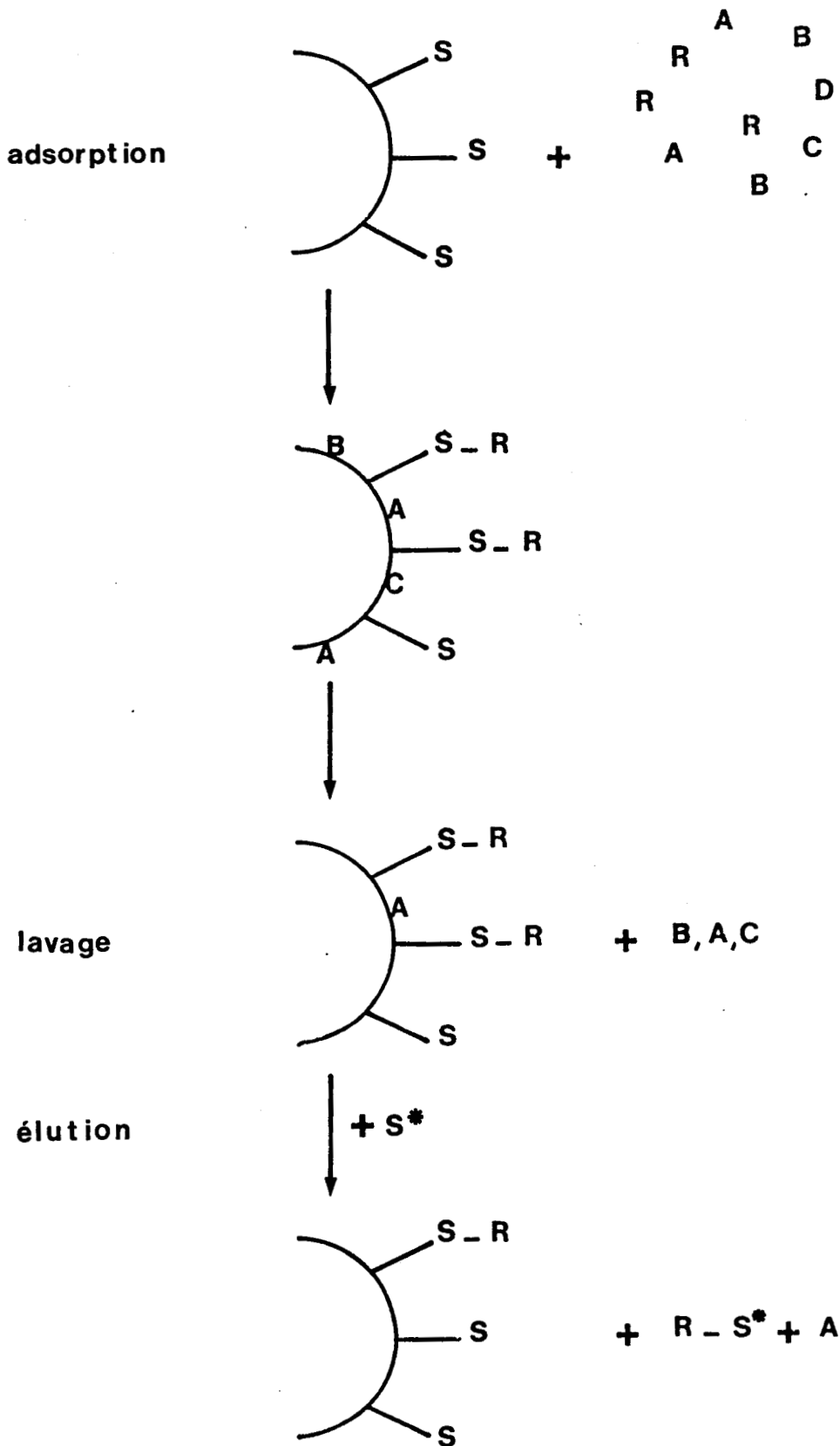


Figure n° 31 : Représentation schématique de l'adsorption et de l'élution du récepteur lors de l'étape de chromatographie d'affinité. R représente le récepteur et A,B,C,D des protéines non spécifiques.

a pour but de maximiser l'adsorption du récepteur d'une part, de minimiser l'interaction du non spécifique sur le gel, d'autre part. L'étape de lavage est chargée d'éliminer du gel toute interaction non spécifique sans pour autant toucher au complexe récepteur-ligand du gel. L'étape de lavage doit donc être à la fois efficace et douce.

La première étape a été de changer de type de colonne (IBF 25 au lieu de IBF 11). L'IBF 25 permet un meilleur brassage du gel dans la colonne lors du lavage en batch, dont le protocole est décrit au paragraphe 2.1, ce qui améliore d'un facteur 4 le taux de purification de la chromatographie d'affinité (voir Tableau n° 4).

La seconde étape a été de modifier la force ionique du tampon de lavage. Suite à l'article de Buchov et al. (1983) sur la purification du récepteur à progestérone d'utérus de poulette, un lavage à l'urée 2,5 M dans le tampon a été tenté. Malheureusement, ce dernier fait chuter le rendement d'un facteur 3 sans augmenter significativement le facteur de purification (voir Tableau 4). A ce lavage trop drastique, nous avons préféré utiliser le chlorure de potassium 400 mM (ce qui donne une force ionique globale d'environ 700 mM en présence du tampon phosphate). Ce lavage beaucoup moins énergique ne fait pas chuter le rendement de l'étape de chromatographie d'affinité et permet même une augmentation substantielle du taux de purification de cette étape (voir Tableau 4).

Les lavages tels qu'ils viennent d'être décrits ont été effectués par la technique du lavage en batch. Bien que l'emploi des colonnes IBF facilite l'élimination du tampon, cette technique entraîne une perte de temps considérable (3 à 4 heures pour l'étape de lavage). Nous avons préféré substituer à cette technique facilement employable pour la faible quantité de gel que nous utilisons, une technique dite de "batch-colonne" dont le principe est illustré sur la figure n° 32 , et qui consiste à plonger dans le tampon dans lequel le gel est en suspension, une tige de verre en forme de palette. Simultanément au brassage effectué par la tige en rotation, une pompe amène le tampon de lavage par le haut de la colonne et évacue le tampon chargé des



	V_S/V_G	% ADSORPTION	% ELUTION	Rendement chromatographique d'affinité	Protéines éluat (mg/ml)	Activité Spécifique 10 ⁶ cpm x mg	Taux de Purification	Taux de Purification final
LAVAGES IBF 11	27	65	42	27	1,2	2,4	22	206
LAVAGES IBF 25	39	71	47	33	0,4	6,5	94	526
LAVAGES UREE 2,5 M	39	78	13,5	10,5	0,25	7,2	94	560
LAVAGES KCL 0,4 M	48	62	50	31	0,11	27	170	1200
LAVAGES KCL 0,4 M	58	69	26	17,7	0,12	14,3	110	1450

Tableau n° 4 : Comparaison de l'efficacité de différents lavages.

V_S/V_G = volume d'extrait au sulfate de protamine sur le volume de gel d'affinité.

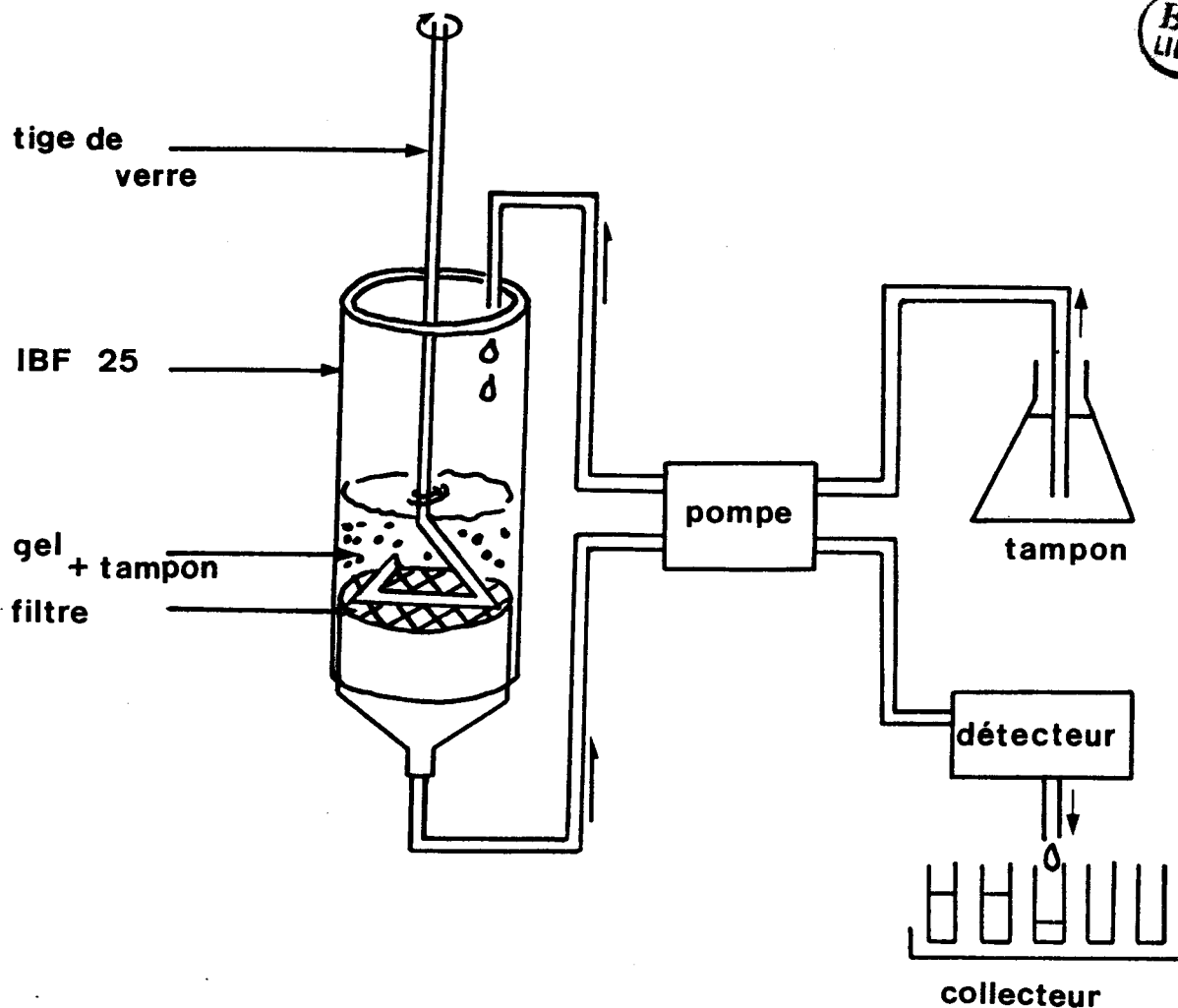
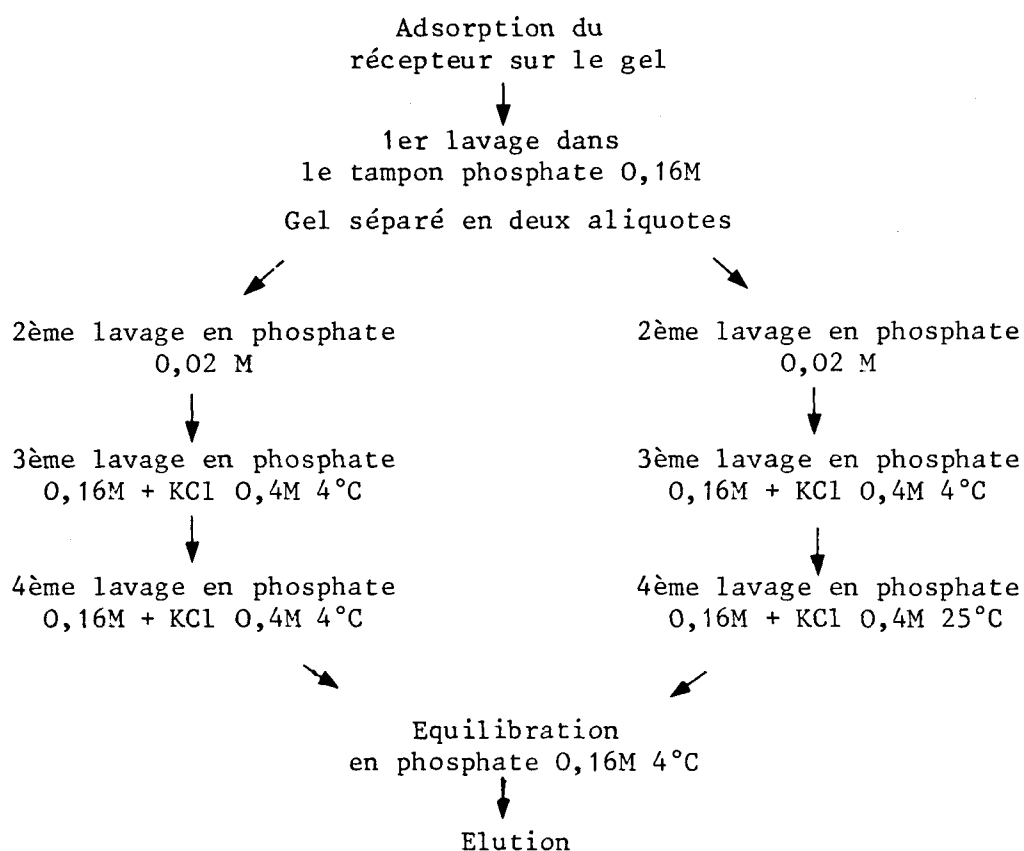


Figure n° 32 : Appareillage employé lors du protocole de lavage du récepteur adsorbé sur le gel d'affinité.

résidus emportés par le brassage, par le bas.

L'emploi de ce dispositif automatisable, en dehors du gain de temps appréciable apporté, nous a permis de reconsidérer l'étape de lavage par la force ionique sous un autre angle. Tout le travail effectué dans le but de l'optimisation du protocole de lavage au moyen de cet appareillage est résumé sur le schéma récapitulatif ci-dessous



Le gel sur lequel est adsorbé le récepteur est d'abord soumis à un premier lavage avant d'être séparé en deux aliquotes.

La deuxième étape effectuée en faible force ionique (phosphate 20 mM) a été introduit dans ce protocole pour créer une forte différence de force ionique entre le 2ème et le 3ème lavage sans déstabiliser le récepteur lié au stéroïde du gel. Cette étape

a été introduite ou non selon les essais. Elle précède le 3ème lavage classique effectué en forte force ionique en présence de chlorure de potassium 400 mM à 4°C pour les deux aliquotes du même gel. Cette étape est suivie d'un quatrième lavage, effectué avec le même tampon. La seule modification tient en l'augmentation de la température du tampon qui passe de 4 à 25°C pour l'un des deux protocoles. En présence de molybdate de sodium, le récepteur lié reste stable, même lorsque la température augmente (Blanchardie et al., 1983). Les deux aliquotes sont mis à équilibrer dans le tampon phosphate 160 mM avant d'être soumis à l'élution biospécifique.

Nous ne donnerons pas de tableau de purification montrant les améliorations apportées par les différents lavages. Le tableau n° 5 sur la purification en trois étapes du récepteur et le tableau comparatif des chromatographies des différentes équipes présentés dans le chapitre général sur la purification, page suffisent à attester de la qualité d'un lavage effectué à la fois en présence du tampon phosphate 20 mM et du tampon contenant le chlorure de potassium à 25°C. La chromatographie d'affinité apporte un taux de purification de 826 fois avec un rendement de plus de 50 % pour l'élution.

Les auteurs utilisent de préférence la technique de lavage en batch (Govindan et al., 1978 ; Lustenberger et al., 1981 ; Grandics et al., 1984 ; Weisz et al., 1984) à celle de lavage sur la colonne (Govindan, 1979, 1984 ; Tsawdaroglou, 1981). Aucun des auteurs, sauf Lustenberger ne charge fortement le gel d'affinité avec le récepteur. A titre indicatif, Weisz et al. (1984) adsorbent en batch 6 ml de cytosol sur 2 ml de gel alors que nous utilisons environ la même quantité de gel pour 90 ml d'extrait de sulfate de protamine, soit 450 ml d'équivalent cytosol. Grandics et al. (1984) adsorbent 20 ml de cytosol sur 8 ml de gel, soit un rapport de charge très faible de 1,5. Ces quantités relativement fortes de gel ont l'inconvénient de fixer beaucoup plus de non spécifique et les deux méthodes employées, batch ou colonne ne permettent pas un lavage rapide. Lustenberger et al. (1981) et Govindan et al. (1984)

	Volume	Protéines totales	Activité de liaison ³ H TA totale x10 ⁻⁶ (corrigée)	Activité Spécifique	Purification	Rendement
	ml	mg	dpm	dpm x mg ⁻¹	taux	%
Cytosol	450	15750	282	0,0179	1	100
Extrait au sulfate de protamine	90	1329	177	0,133	7,3	63
Eluat de gel d'affinité	4,6	0,597	66,3	111	6028	23,5
FILTRATION sur TSK G 3000						
Echantillon chargé	0,5	0,065	7,2	111	6028	23,5
Eluat	1,5	0,027	5,8	212	11800	18,8

Tableau n° 5 : Purification en trois étapes du récepteur à glucocorticoïdes non transformé du foie de rat.

Le récepteur a été purifié à partir du cytosol de 50 foies de rat. Les rendements d'adsorption et d'éluion de l'étape d'affinité sont respectivement de 70 et 53 %. La correction tient compte de la dilution isotopique de 4 fois utilisée lors de l'éluion du récepteur de la colonne d'affinité.

ont été les seuls jusqu'à présent à utiliser la force ionique pour décrocher le non spécifique, les autres auteurs se contentant d'avoir une absorbance maximale en faible force ionique pour passer à l'étape d'éluion biospécifique. Un lavage abondant est également très important. Seuls Tsawdaroglou et al. (1981) ont appliqué ce principe (5 litres de tampon en faible force ionique pour 5 ml de gel). Pour notre part, le gel est lavé par 200 fois son propre volume, en moins d'une heure. La technique du "batch-colonne" permet de renouveler totalement et automatiquement le tampon dans la colonne toutes les cinq minutes. Les pertes pendant les lavages représentent moins de 5 % du récepteur adsorbé.

Les auteurs qui utilisent un gel d'affinité à bras clivable (Govindan et al., 1978 ; Tsawdaroglou et al., 1981) sont obligés d'effectuer les lavages dans un tampon ne contenant pas de réducteurs de thiols. Un lavage abondant et donc beaucoup trop long sera donc nuisible à la stabilité du récepteur fixé sur le gel d'affinité.

La technique de lavage que nous utilisons grâce à l'emploi conjugué de la faible force ionique, de la forte force ionique, de la chaleur et du système "batch-colonne" donne d'excellents résultats (Idziorek et al., 1985). Cette technique est de plus, semi-automatisable et standardisable (voir appendice technique).

2.3 - Elution du récepteur

Les premiers essais d'éluion biospécifiques ont été faits avec de la dexaméthasone marquée (2 μM dans le tampon à raison de 2,5 ml de solution éluante par ml de gel. La dexaméthasone a rapidement été remplacée par l'acétonide de triamcinolone qui a une affinité trois fois plus forte ($K_d \approx 1 \text{ nM}$). La solution éluante employée est de 4 μM , ce qui correspond à ce que les auteurs utilisent généralement (1-2 μM) (Lustenberger et al., 1981 ; Govindan et al., 1984 ; Weisz et al., 1984 ; Grandics et al., 1984). Govindan et al. (1984) sont cependant obligés d'ajouter à la solution éluante un peu de thiocyanate de sodium (agent chaotropique) parce que leur gel est trop greffé (1 μmole de stéroïde par ml de gel). Les auteurs qui

utilisent un gel à bras clivable éluant plus simplement en rajoutant des réducteurs des thiols dans le tampon d'éluion, mais la faible affinité de leur ligand les oblige à introduire une étape supplémentaire d'échange avec de la dexaméthasone.

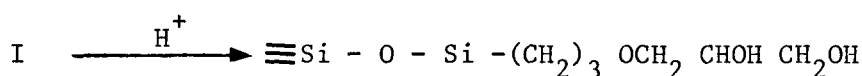
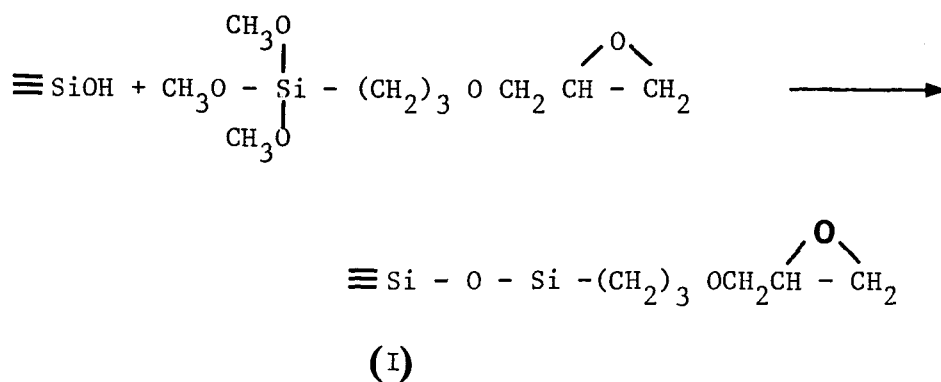
L'avantage de l'emploi d'une faible quantité de gel pour l'adsorption et les lavages est encore présent pour l'éluion. Une faible quantité de gel permet en effet d'éluier le récepteur avec une faible quantité de solution éluante, ce qui concentre et stabilise à la fois le récepteur.

2.4 - Utilisation de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Des progrès récents réalisés dans les domaines de la porosité et l'inertie du gel de silice ont permis un développement important de l'analyse des protéines par les méthodes de chromatographie liquide haute performance. Il y a peu d'années, les techniques HPLC étaient réservées à plus de 75 % à la chromatographie de partage à polarité de phase inversée. La phase stationnaire apolaire, de type hydrocarboné, est greffée sur le gel de silice. L'éluion du matériel biologique retenu est effectuée par une phase mobile plus ou moins polaire. Malgré son succès, ce type de chromatographie n'est réservé qu'à un petit nombre de molécules d'intérêt biologique. En sont exclues les macromolécules telles les protéines. Et ceci pour deux raisons : la taille trop importante de la molécule, et la nature de la phase mobile qui entraîne souvent une perte de l'activité biologique de la protéine.

Pour remédier à cette carence et permettre le fractionnement de polymères hydrosolubles sur une phase stationnaire rigide de type silice, ont été greffées sur le gel des fonctions capables de supprimer l'adsorption des molécules due aux silanols ($\equiv\text{Si-OH}$) du support et de rendre cette phase stationnaire polaire et pratiquement inerte vis-à-vis des solutés macromoléculaires.

En pratique, la plupart des supports à base de silice utilisés pour la chromatographie d'exclusion par la taille sont des supports de type "Diol" obtenus par greffage de la silice avec un agent tel que le γ -glycidoxypropyltriméthoxysilane dont l'usage a été popularisé par Chang et Regnier (1976).



Si le greffage est réalisé dans de bonnes conditions, la réaction est complète, il ne reste plus de groupements silanol libres et la phase stationnaire obtenue est polaire et inerte.

Le point important qui conditionne les propriétés du gel perméation du support est bien sûr la porosité du gel de silice. Cette porosité doit être bien définie et constante et pour un type de gel correspondant à une zone particulière de fractionnement par la taille. On trouve ainsi des gels de porosité 60, 100, 300, 500, 1000 et 4000 Å chez Merck dont seules les variétés 60, 100, 500 et 1000 sont disponibles en dérivés diol. Les premiers lots de ces supports présentaient des propriétés d'adsorption non négligeables à cause d'un greffage sans doute incomplet. Les résultats sur le plan de la séparation des protéines s'en ressentaient. Un autre fabricant, Toyo Soda, propose depuis 3 ans des supports sans doute du même type (bien que les détails techniques à leur sujet soient très peu nombreux), et d'une efficacité remarquable. Ils existent en trois porosités, notées 2000, 3000 et 4000, bien adaptées aux domaines usuels de fractionnement des macromolécules biochimiques et se sont révélés à l'usage particulièrement inertes, ce qui explique leur succès actuel.

Aux techniques de chromatographie conventionnelles à débit et efficacité faibles, l'HPLC répond par la rapidité de la séparation, et son efficacité élevée. La base théorique des techniques HPLC est liée à l'augmentation de l'efficacité de la séparation, qui

représente en fait l'aptitude d'une colonne à limiter l'étalement des pics d'éluion. Elle est mesurée par N, qui est le nombre de plateaux théoriques portés par la colonne. N est une fonction du temps de rétention (t_r) du pic sur la colonne et de la largeur à mi-hauteur (δ) de ce dernier.

$$N = 5,54 (t_r/\delta)^2$$

Plus le nombre de plateaux est grand et plus δ est petit, donc meilleure est la séparation. Pour les techniques HPLC, N varie de 1000 à 50000 plateaux par mètre alors qu'il ne varie que de 100 à 500 pour les techniques de chromatographies classiques. Le gain d'efficacité est dû pour l'essentiel à l'utilisation de supports à granulométrie fine (10 μ).

Quelques auteurs, ont, depuis l'avènement de ce type de gel, cherché à caractériser des complexes récepteurs-stéroïdes par chromatographie de gel perméation en HPLC (Paulik et al., 1982 ; Lonsdorfer et al., 1983, Kirdani et al., 1984). Mais ces études ont toutes été menées sur un récepteur non fractionné. Aussi, devant l'inconnue de l'utilisation de ce type de colonne avec un récepteur purifié, avons-nous choisi d'adjoindre au récepteur purifié un peu de sérumalbumine (0,5 mg/ml final). Les résultats encourageants obtenus (aucune perte de complexe H-R par cette technique) nous ont conduit à supprimer la sérumalbumine pour effectuer une étude plus systématique du complexe H-R purifié sur la colonne.

2.4.1 - Analyse des résultats obtenus par HPLC

Comme le montre la figure n° 33 , l'analyse par spectrophotométrie d'absorption à 280 nm met en évidence 3 pics (I, II, III). Le pic II dans lequel on retrouve la radioactivité est celui du complexe hormone-récepteur.

Les dosages des protéines ont été effectués sur les trois pics avec la méthode de Bensadoun et al. (1976)

- les protéines du pic I sont indosables par cette méthode ;

- pour le pic II, les résultats sont mauvais (seul le dosage par la méthode de Read apportera des résultats valables).

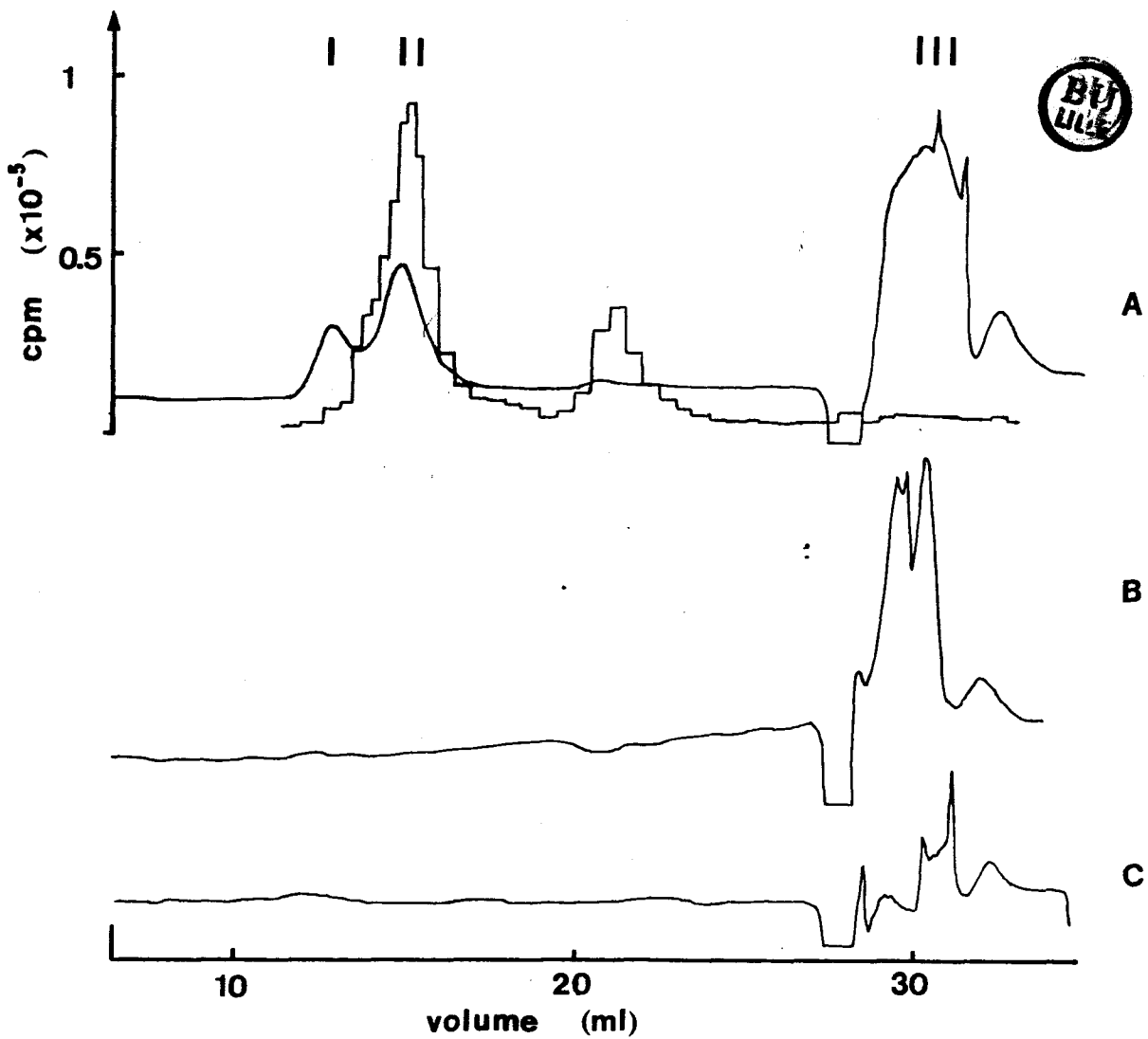


Figure n° 33 : Analyse densitométrique (280 nm) des pics obtenus après passage de l'éluat de chromatographie sur la colonne de gel filtration en HPLC.

A : 500 μ l de l'éluat de chromatographie contenant le récepteur.

B : 500 μ l de la solution éluante mise à incuber deux heures avec du gel d'affinité neuf avant passage sur la colonne de gel filtration.

C : 500 μ l de la solution éluante passée directement sur la colonne de gel filtration.

- le dosage des protéines du pic III s'est révélé impossible : l'apparition d'une coloration bleue intense dans le tube empêchait l'emploi du réactif de Folin.

Une analyse un peu plus poussée a été menée. La figure n° 33 montre que la solution éluante ne contenant que de l'hormone froide, passée sur la colonne, peut contribuer à expliquer la variation de densité optique. De plus, un aliquote d'une solution éluante mis en contact avec du gel d'affinité sur un appareil rotatif pendant deux heures donne un pic semblable au pic III obtenu lors du passage du récepteur purifié sur la colonne de gel perméation en HPLC. L'apparition de la coloration bleue intense lors du dosage des protéines pourrait être expliquée par la formation d'un complexe phosphomolybdique en présence de résidus du gel d'affinité.

L'absence de protéines détectées dans le pic I nous a conduit à penser que le pic obtenu pourrait être dû à un complexe polynucléotidique, Ioannidis et Rousseau (1984), ayant montré une interaction entre de l'ARN et le récepteur à glucocorticoïdes cytosolique. Le rapport D0260/D0280 de 10 n'est pas en faveur de cette hypothèse (voir figure n° 34).

2.4.2 - *Reproductibilité de la méthode*

Des injections répétées d'aliquotes d'un même éluat de chromatographie montrent une bonne reproductibilité de la gel perméation en HPLC, tant au niveau de la courbe densitométrique qu'au niveau du dosage de l'activité de liaison dans chaque fraction (voir figure n° 35).

Un pic secondaire de radioactivité est parfois détecté dans une zone de plus faible rayon de Stokes (voir figure n° 33). Ce pic, qui avoisine généralement 5 à 10 % de la radioactivité totale, mais qui peut atteindre 30 %, représente le complexe hormone-récepteur transformé, voire légèrement dégradé.

2.5 - Protocole de purification

Nous employons un protocole de purification en trois étapes (voir tableau de purification). Il comporte une étape de

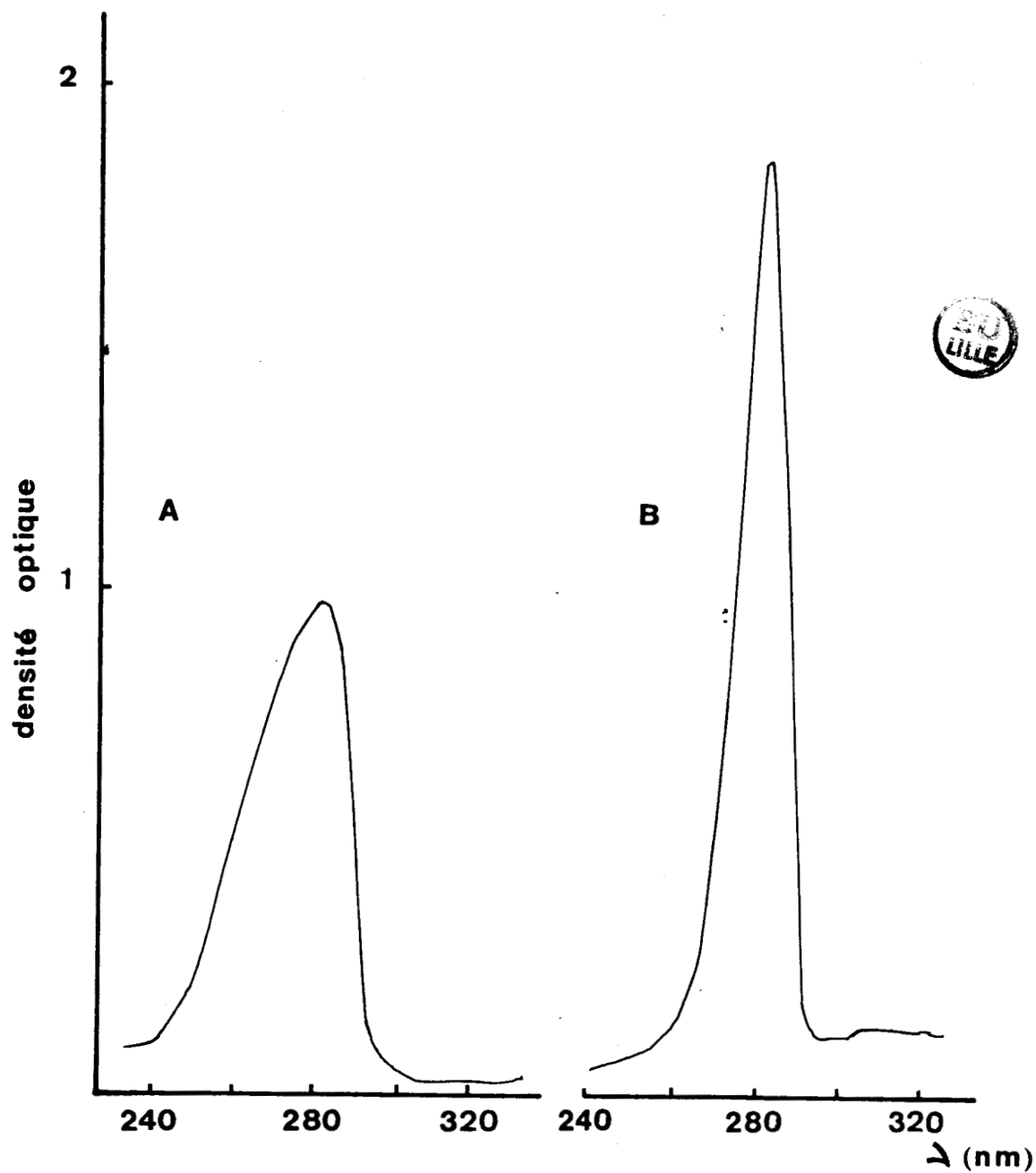


Figure n° 34 : Profil densitométrique, en fonction de la longueur d'onde, du pic I-A de la figure n° .

A: DNA (1mg/ml) DO 280/DO 260 = 1,84

B: Pic I-A DO 280/DO 260 = 12,76

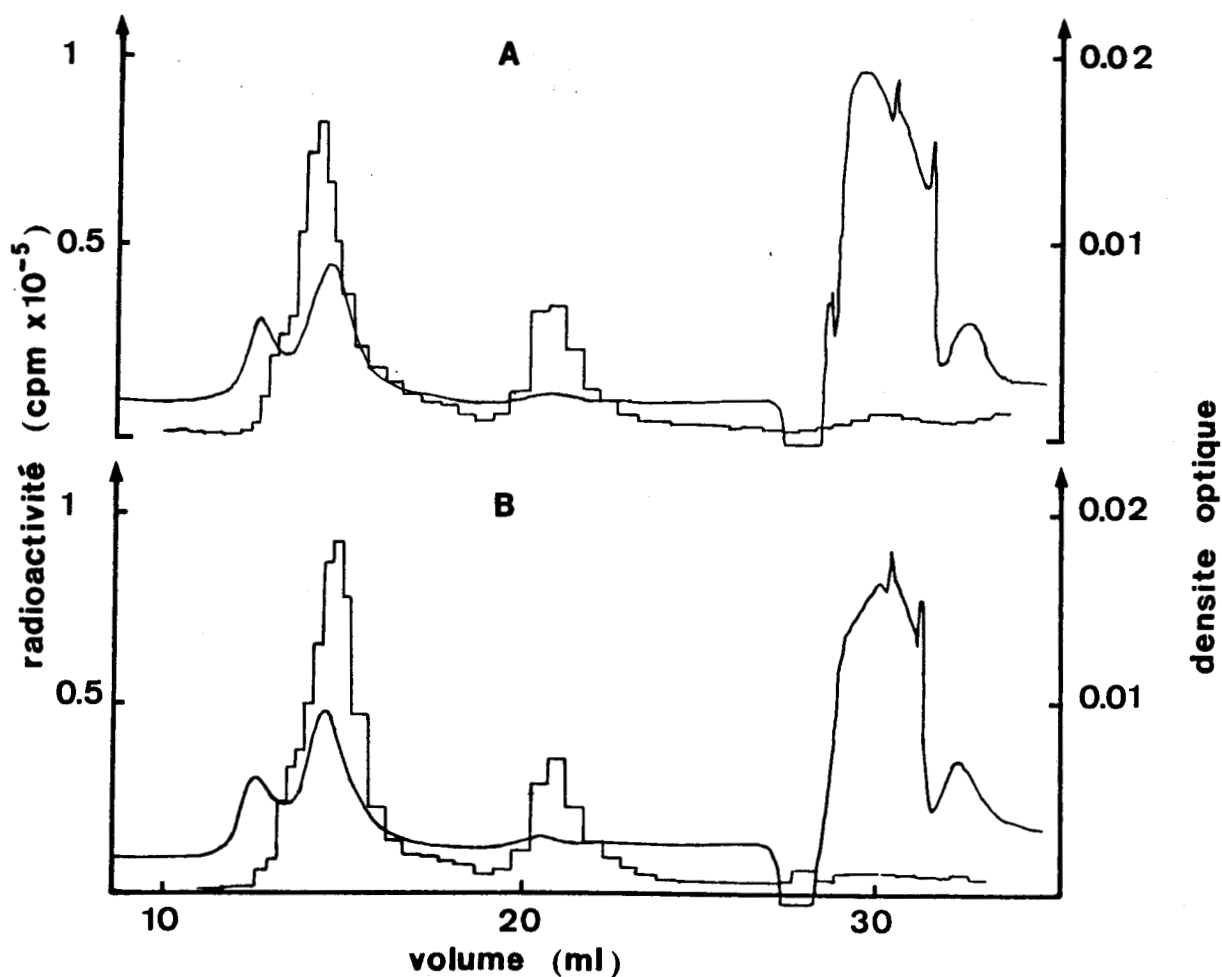


Figure n° 35 : Reproductibilité des injections sur la colonne TSK G 3000 SW (60 cm).

Deux aliquotes A et B de 500 μ l de récepteur purifié ont été injecté sur la colonne équilibrée en tampon phosphate 160 mM, mercaptoéthanol 20 mM, molybdate de Na ,10 mM ,pH 7,4. Le débit est de 0,5 ml.min⁻¹. 50 μ l de chaque fraction sont comptés en radioactivité.

précipitation au sulfate de protamine qui donne un taux de purification 8-10 fois avec un rendement de 60-100 %, une étape de chromatographie d'affinité qui donne la purification maximale (800-900 fois) avec un rendement de 15-40 %. La purification est pratiquement terminée par l'HPLC qui apporte un facteur de purification de 2 à 4 selon les cas, avec un rendement de 90-100 %.

Le récepteur à glucocorticoïdes est ainsi purifié dans sa forme non transformée entre 10000 et 14000 fois en trois étapes rapides avec un assez bon rendement (10-30 % final).

D - CARACTERISATION DU RECEPTEUR NON TRANSFORME PURIFIE

Le récepteur à glucocorticoïdes de foie de rat non transformé a été purifié dans un état proche de l'homogénéité en présence de molybdate par un protocole simple comportant trois étapes. Le récepteur purifié est obtenu lié et en relativement forte concentration (par rapport aux autres équipes). Cette particularité alliée à la stabilisation du complexe purifié en présence de molybdate nous a permis de tenter une approche globale de la caractérisation du récepteur purifié non transformé, ce que n'ont pu faire les autres équipes ayant purifié le récepteur non transformé (voir Tableau n° 6).

1) Caractéristiques physicochimiques

1.1 - Analyse électrophorétique

L'éluat de chromatographie d'affinité et les fractions contenant le récepteur lié obtenues après passage sur la colonne de gel filtration en HPLC ont été soumises à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Les gels sont ensuite colorés par la méthode au nitrate d'argent dans le but d'augmenter la sensibilité de la détection des protéines. Sur des préparations purifiées 4000-6000 fois après chromatographie d'affinité, la technique du PAGE-SDS révèle généralement une seule bande paraissant homogène, de poids moléculaire apparent de 90.000 daltons (voir figure n° 35 et photographie n° 1). Avec des préparations moins purifiées (2000-4000 fois), quelques bandes mineures, de poids moléculaire apparent de 78 000, 72 000 et 48 000 daltons sont parfois détectées. Après passage sur la colonne de gel filtration en HPLC, le récepteur apparaît virtuellement pur. L'efficacité du protocole de chromatographie et l'aide apportée par l'HPLC dans la purification ultime du récepteur peuvent ainsi être montrées.

Pourtant la différence obtenue entre le taux de

	Nos résultats	GRANDICS <u>et al.</u> (1984)	WEISZ <u>et al.</u> (1984)	LUSTENBERGER <u>et al.</u> (1981)	GOVINDAN <u>et al.</u> (1984)	GOVINDAN <u>et</u> SEKERIS (1978)	GOVINDAN (1979)	TSAWDAROGLOV <u>et al.</u> (1981)
Constante de sédimentation $S_{20,w}$	8,2	8-10	5,0	8,2	-	-	-	-
Rayon de Stokes en nm (R_s)	7,0	7,3	6,0	5,0-5,1	-	-	-	-
Poids moléculaire calculé (à partir de R_s et $S_{20,w}$)	250.000	303.000	-	-	-	-	-	-
Poids moléculaire apparent en acrylamide SDS	90.000	90.000 + 40.000	-	90.000	90.000	30.000 45.000	90.000 45.000	90.000 72.000 45.000
Point isoélectrique	5,1 (agarose)	-	-	5,9 (acrylamide)	-	-	-	-
Transformabilité	complète	incomplète	-	-	complète	-	-	-
Taux de purification	11.510	4.400	3000-5000	7.500	5.900	12.000	12.000	8.000
Homogénéité en %	> 50	20	10	30	50	-	-	-
Rendement en %	18	30	45	15-20	90	50	50	44

TABLEAU n° 6 : Comparaison des caractéristiques du récepteur purifié en présence de molybdate par différentes équipes



Photographie n° 1 : Visualisation du récepteur purifié coloré à l'argent après électrophorèse en PAGE-SDS.

- 1 : éluat de chromatographie d'affinité
- 2 : éluat de chromatographie de gel filtration en HPLC .

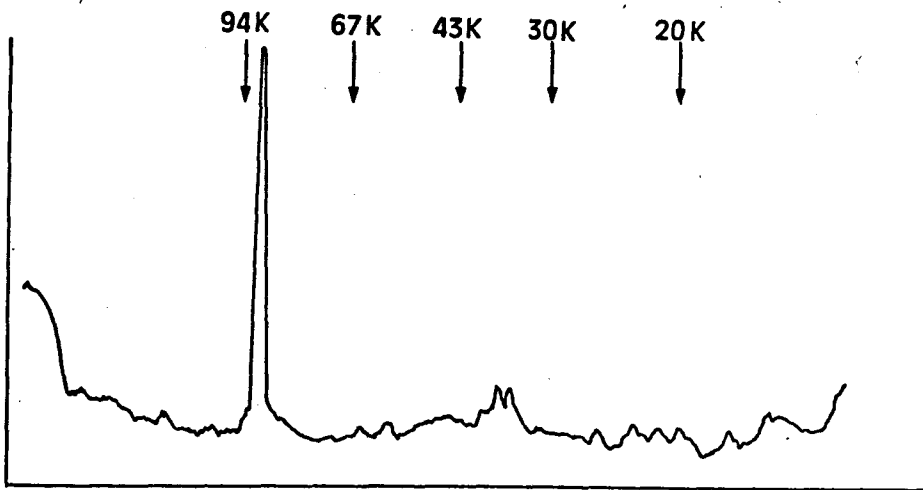
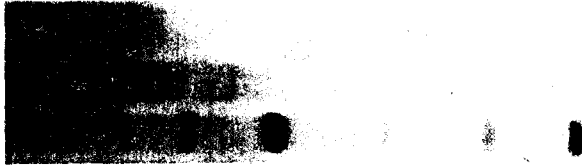


Figure n° 36 : Courbe densitométrique du récepteur purifié après chromatographie d'affinité. Elle est obtenue grâce à l'emploi d'un spectrophotomètre Vernon PH1-6 après coloration des protéines à l'argent.

pureté calculé (> 50 %, voir chapitre B) et la pureté apparente supérieure à 90 % visualisée lors de l'électrophorèse laissaient planer un doute quant à l'homogénéité de cette bande 90 000 Da. Joab et al. (1984), ont montré qu'il existait une protéine de poids moléculaire 90 000 Da ne liant pas l'hormone, associée au récepteur à glucocorticoïdes non transformé du cytosol d'utérus de poulette. Une telle protéine a été primitivement décrite dans le récepteur à progestérone d'utérus de poulette, grâce à l'emploi d'un anticorps monoclonal. Cet anticorps monoclonal ne croise malheureusement pas avec l'unité non liante du récepteur des mammifères.

1.2 - Isoélectrofocalisation

Le complexe [^3H] TA-récepteur purifié a été analysé par isoélectrofocalisation sur gel d'agarose (voir figure n° 37). Une dissociation importante du complexe a lieu au moment de la focalisation et une grande partie de la radioactivité est retrouvée dans la région du dépôt de l'échantillon. Elle correspond à de l'hormone libre. Le protocole nécessite une dilution du complexe H-R purifié pour abaisser la force ionique avant le dépôt. Des essais effectués pour dessaler et concentrer le complexe purifié ne donnent pas de meilleurs résultats. En effet, le passage du complexe H-R purifié sur la colonne TSK G 3000 SW en HPLC équilibrée en tampon phosphate 100 mM contenant du molybdate et du β -mercaptoéthanol conduit à une perte de la radioactivité détectée au niveau du pic densitométrique à 280 nm, de l'ordre de 70 % par rapport aux résultats obtenus avec la même colonne équilibrée en tampon phosphate 160 mM. Il est fortement probable que le récepteur ne soit adsorbé sur le gel de silice de la colonne, à cette force ionique.

Des essais ont également été effectués avec un dialyseur-concentreur microprodicon (Bioblock). Cette dialyse, effectuée sous vide partiel, contre un tampon phosphate 50 mM, pH 7,4, concentre le récepteur en moyenne 3 fois en moins de trois heures. Malheureusement, la perte de l'activité de liaison détectée par la méthode à l'hydroxylapatite s'élève généralement à plus de 50 %. Nous pensons que cette perte de radioactivité liée n'est pas due à une perte d'activité de liaison mais plutôt à une interaction de type hydrophobe du complexe H-R purifié avec le boudin de dialyse.

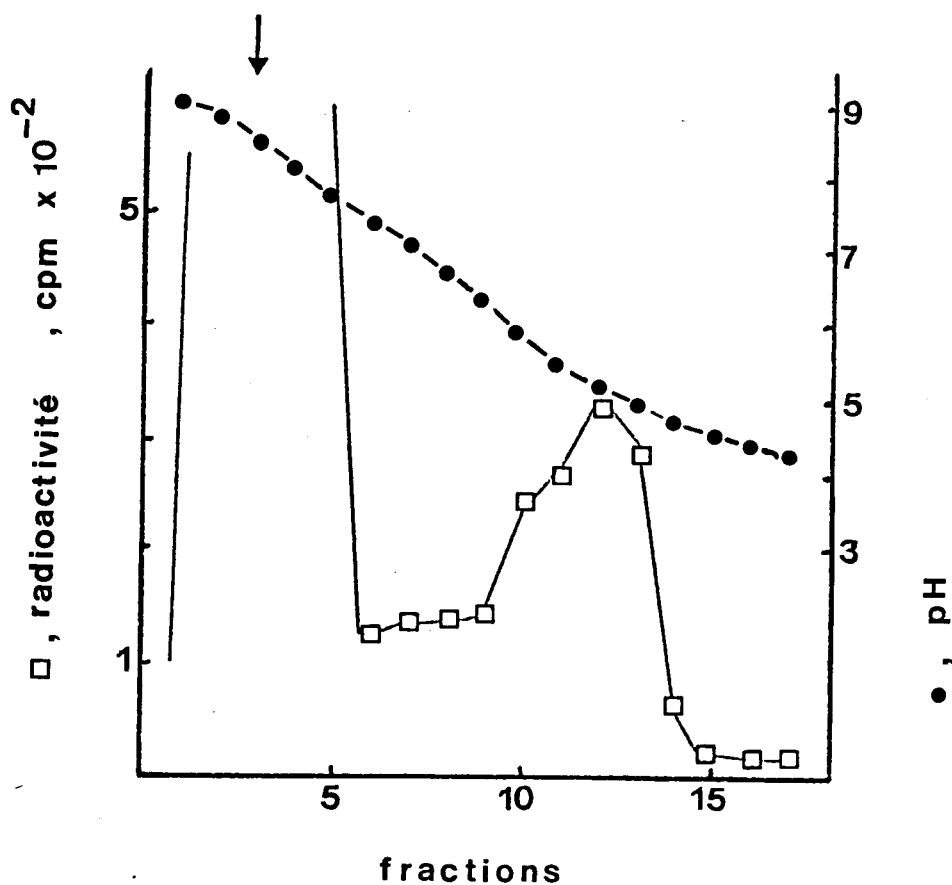


Figure n° 37 : Isoélectrofocalisation du récepteur purifié après chromatographie d'affinité.

La flèche indique l'endroit du dépôt. L'aliquote (15 μ l) est diluée au quart avant le dépôt pour abaisser la force ionique.

Des bandes de 5 mm sont prélevées dans un couloir témoin mises dans un ml d'eau ultrapure. L'ensemble est agité 10 min avant la prise du pH .

Malgré les pertes du complexe, soit avant le dépôt soit après le dépôt sur le gel d'agarose, la radioactivité liée peut être détectée en quantité suffisante pour permettre la détermination du point isoélectrique (voir figure n° 37). Le pI de 5;1 obtenu plus de 6 fois pour le récepteur purifié est le même que celui obtenu au laboratoire sur le récepteur lié cytosolique.

L'isoélectrofocalisation, lorsqu'elle est effectuée en gel d'agarose donne des valeurs plus faibles que lorsqu'elle est faite en gel de polyacrylamide. Lustenberger et al. (1981) observent un pI de 5,9. Cet écart peut être expliqué par le haut poids moléculaire et le caractère probablement hydrophobe du récepteur dont l'interaction avec le gel d'acrylamide gêne la focalisation. Smith et Harmon, 1985 observent deux points isoélectriques de 5,7 et 6,0-6,5 en gel d'acrylamide (technique de O'Farrel) pour un récepteur de lymphome humain purifié par immunoabsorbant. Ce récepteur est dénaturé mais la migration peut être suivie car il est lié covalentiellement au mésylate de dexaméthasone.

Les résultats que nous obtenons ne sont certainement pas dûs à une dénaturation du récepteur puisque la radioactivité que nous détectons ne résulte pas d'une liaison covalente entre le récepteur et l'hormone (les essais en vue d'obtenir un récepteur lié covalentiellement se sont révélés insuffisants pour une utilisation en isoélectrofocalisation, voir paragraphe 1-4). Cependant, il est possible que le complexe H-R soit dégradé dans le sens de la transformation pendant l'électrofocalisation puisqu'elle est effectuée en l'absence de molybdate. La coloration à l'argent du récepteur après focalisation s'est avérée impossible, la présence d'ampholines introduisant beaucoup trop d'interférences au niveau de la coloration.

1.3 - Electrophorèse "bidimensionnelle"

Cette électrophorèse n'a pas été faite selon la technique de O'Farrel (1975) en boudin d'acrylamide pour la première dimension. Des bandes d'agarose, découpées dans le gel réalisé pour l'électrofocalisation ont été déposées dans les puits d'un gel en gradient d'acrylamide 5-20 %, après contact avec le SDS. Cette électrophorèse bidimensionnelle a été réalisée dans le but de visualiser, soit la sous-unité 90 kSa non liante dans le cas où elle existerait, soit de montrer la transformation si elle se produit lors de la focalisation.

Que la première dimension soit effectuée en présence ou non d'un détergent non ionique tel que le Nonidet P40, les résultats sont les mêmes pour la deuxième dimension avec des bandes 90 kDa uniquement au point isoélectrique 5,1 (résultats obtenus deux fois). Cette technique n'a donc pas permis, comme nous l'espérions, de préciser la nature homo ou hétéromérique du récepteur purifié.

1.4 - Photoaffinité

L'acétonide de triamcinolone possède des doubles liaisons conjuguées qui augmentent la réactivité de la cétone en 3 lorsque le stéroïde est soumis à une excitation par les ultra-violetts. Une longueur d'onde supérieure à 300 nm est cependant conseillée pour éviter la dégradation des protéines. Le complexe [³H] TA-récepteur purifié a donc été soumis à l'action des rayons ultra-violetts dans le but d'obtenir un marquage covalent utilisable pour une caractérisation physicochimique ultérieure du récepteur dégradé ainsi qu'une analyse du site de liaison par coupure enzymatique. Les résultats obtenus après une excitation de deux minutes du complexe par les U.V. n'ont jamais donné de rendement de liaison covalente globale supérieure à 2 % alors que les auteurs annoncent généralement un rendement atteint avoisinant les 10 % (Wrange et al., 1985 ; Dure et al., 1980 ; Dellweg et al., 1982 ; Gehring et al., 1983). Le passage en gel de polyacrylamide SDS du récepteur purifié soumis aux U.V. donne un résultat difficilement interprétable (voir figure n° 38) puisqu'il existe des pics radioactifs plus importants que celui qui correspond au récepteur purifié.

1.5 - Gradient de sucrose - mesure du coefficient de sédimentation

Des aliquotes du pic radioactif élué après gel-filtration sur HPLC sont déposés sur un gradient de sucrose 5-20 % dans le tampon phosphate 160 mM contenant du molybdate 10 mM. Le complexe H-R purifié non transformé sédimente à 8,0-8,3S après centrifugation dans un tampon en forte force ionique (voir figure n° 39). Les valeurs sont les mêmes que celles obtenues après ultracentrifugation de l'extrait au sulfate de protamine et du récepteur après chromatographie d'affinité.

Pour le récepteur purifié, le coefficient de sédimentation varie en fonction de la force ionique du tampon (Grandics et al., 1984 ont un coefficient qui varie de 8 à 10 S) et de la nature du tampon (résultats du laboratoire). Des variations similaires sont observables pour

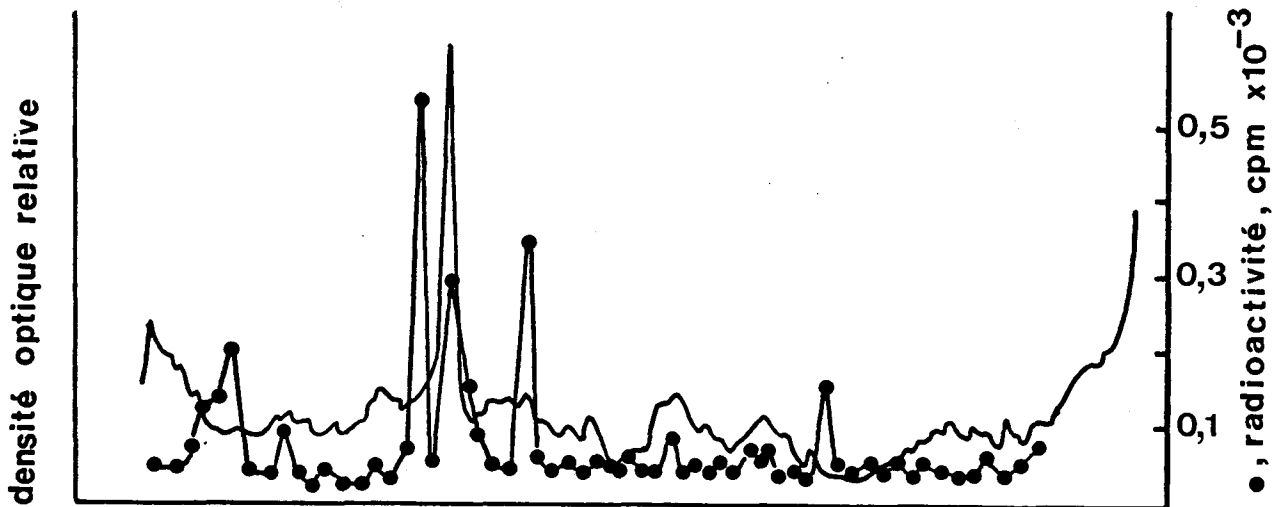


Figure n° 38 : Expérience de photoaffinité du complexe ^3H - TA- récepteur purifié.

L'aliquote (100 μl) soumis pendant deux minutes à l'excitation par les U.V. ,est précipité par l'ATCA 10% puis repris dans le tampon de dépôt pour l'électrophorèse en PAGE-SDS.

Après électrophorèse,des bandes de 2 mm sont découpées après coloration à l'argent puis dissoutes par l'eau oxygénée avant comptage de la radioactivité.

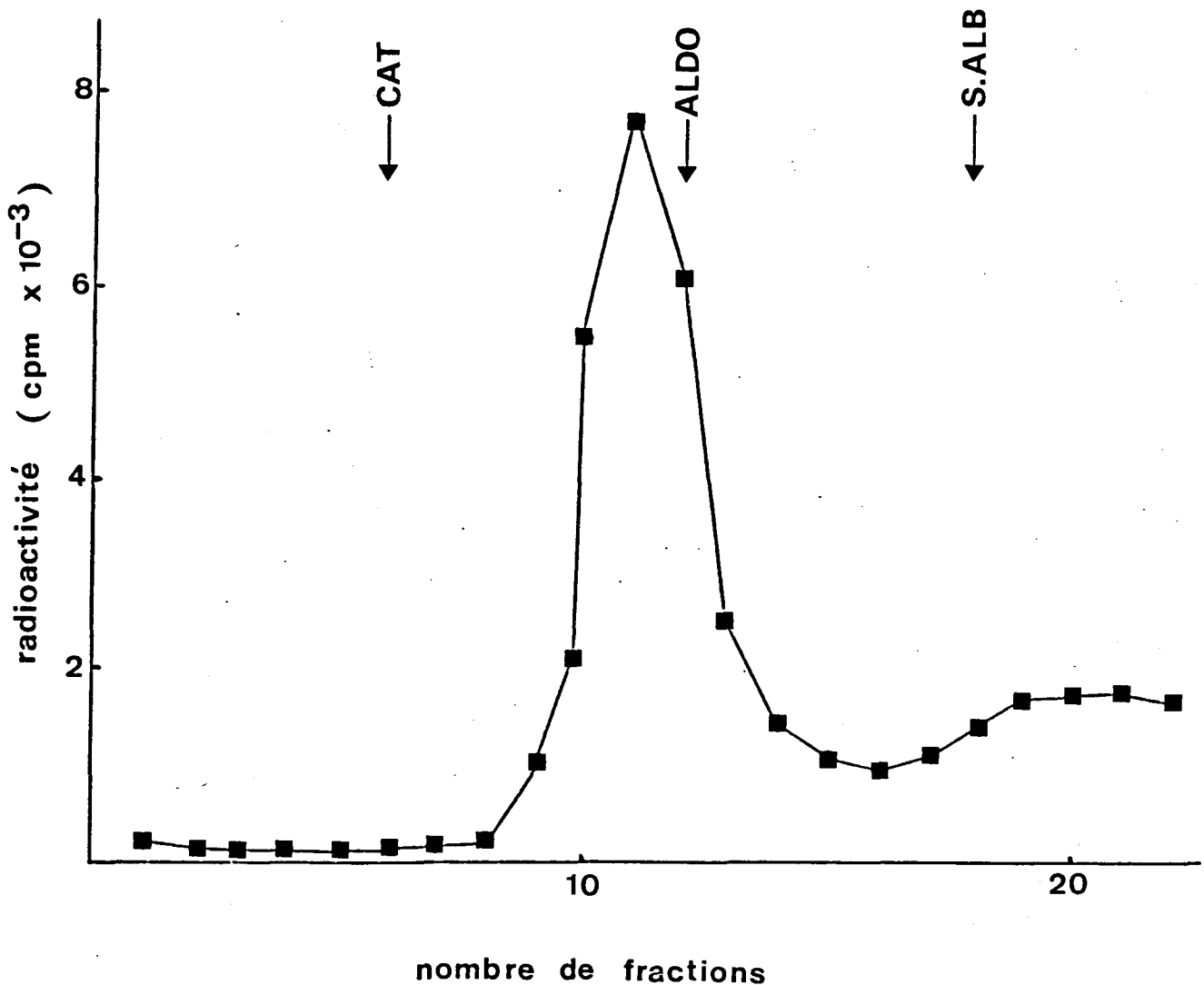


Figure n° 39 : Centrifugation en gradient de sucrose du récepteur purifié .
Des aliquotes de 200 μ l sont déposés au sommet d'un gradient linéaire de sucrose (5-20 %).Après 17 heures de centrifugation à 55000 rpm, des fractions de 200 μ l sont prélevées par la base des tubes puis comptées en radioactivité.
Les protéines standards utilisées sont la catalase (11,3 nm) l'aldotase (7,8 nm) et la sérumalbumine (4,3 nm).

un récepteur cytosolique stabilisé par le molybdate (Sherman et al., 1982).

Dans certains cas, nous avons pu observer une petite quantité du récepteur transformé sédimentant à 4S en plus du récepteur non transformé.

1.6 - Mesure du rayon de Stokes par HPLC de gel filtration

Le rayon de Stokes est déterminé par chromatographie de gel filtration sur la colonne TSK G4000 SW équilibrée dans le tampon phosphate 160 mM (voir figure n° 40). Il est de $7,0 \pm 0,2$ nm. Nous trouvons la même valeur pour le récepteur cytosolique natif ou légèrement fractionné.

Il est calculé selon la formule :

$$R_s = a (Kd)^{1/3} + b$$

$$\text{avec } Kd = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Kd : coefficient de distribution

Vt : volume total de la colonne

Vo : volume exclu

Ve : volume d'éluion pour une protéine donnée

Les standards employés pour la courbe de calibration sont l'z thyroglobuline ($R_s = 8,5$ nm), la β -galactosidase (6,9 nm), la ferritine (6,1 nm), la catalase (5,2 nm) et l'aldolase (4,8 nm).

Cette valeur est sensiblement équivalente à celle obtenue par Grandics et al. (1984) en faible force ionique sur une colonne de gel filtration conventionnelle (voir tableau 6). Ils obtiennent un rayon de Stokes de 7,3 nm.

Le rayon de Stokes de 5,0 nm obtenu par Lustenberger et al. (1981) sur une colonne de Ultrogel ACA 34 pourrait être dû à une mauvaise calibration de la colonne et à une dégradation du complexe purifié pendant la durée de la chromatographie, comme le suggèrent Grandics et al. (1984).

La valeur que nous obtenons est également plus faible que celles obtenues par d'autres auteurs sur du matériel non purifié avec un rayon de Stokes variant de 7,3 à 8,2 nm (Westphal et Beato, 1980 ; Sherman et al., 1982, 1983).

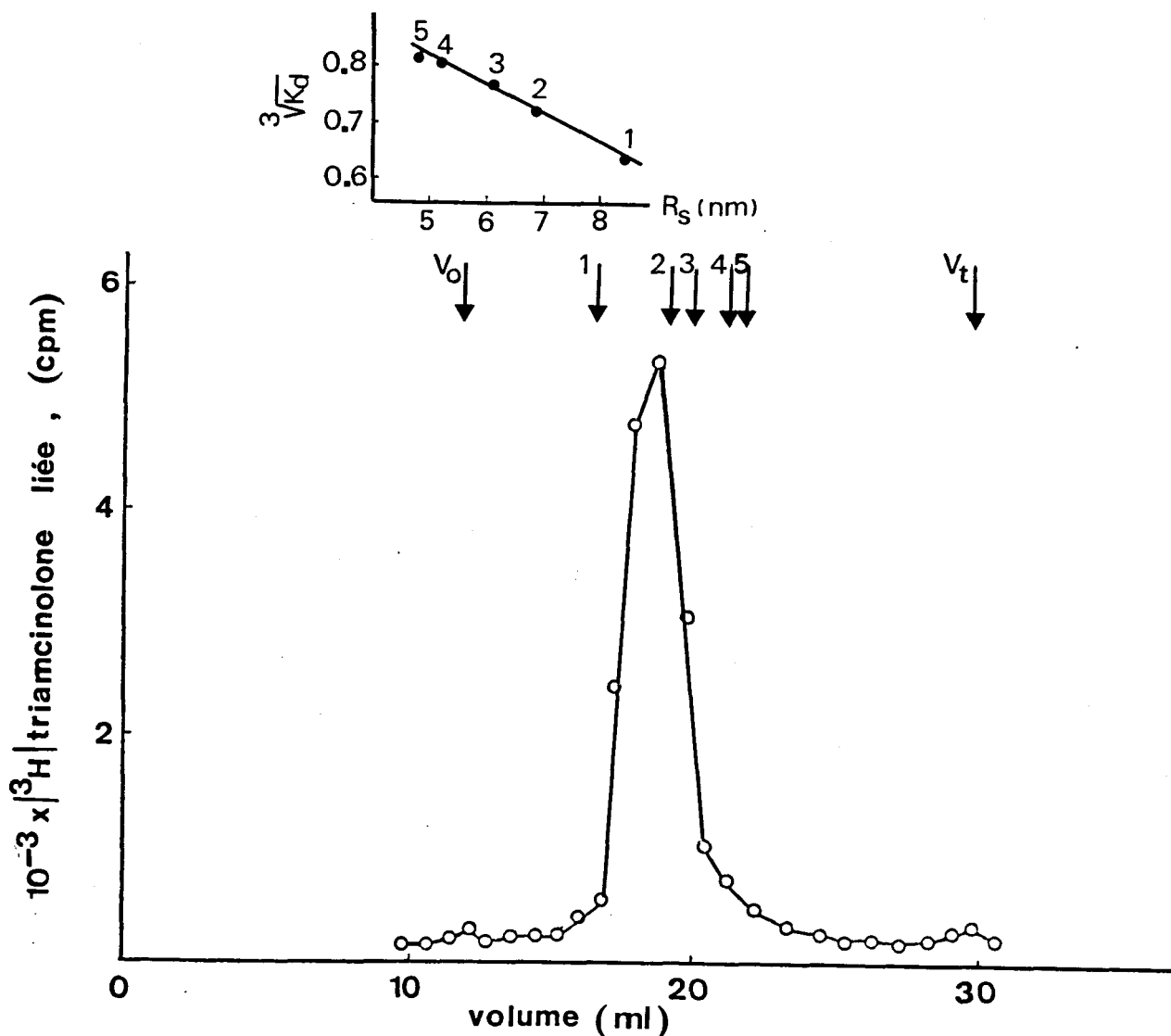


Figure n° 40 : Détermination du rayon de Stokes du récepteur purifié.

500 μl de l'éluat de chromatographie d'affinité sont déposés sur la colonne TSK G 4000 SW équilibrée dans le tampon phosphate 160 mM contenant du molybdate et des réducteurs des thiols. 50 μl de chaque fraction sont comptés en radioactivité.

V_0 et V_t représentent respectivement le volume exclu et le volume total de la colonne. La calibration est obtenue en utilisant comme standards : 1) la Thyroglobuline (8,5 nm) , 2) la β -galactosidase (6,9 nm) , 3) la ferritine (6,1 nm) , 4) la catalase (5,2 nm) et 5) l'aldolase (4,8 nm) .

La figure en insert représente la courbe étalon obtenue à partir de ces valeurs.

Un rayon de Stokes de 7,0 nm est obtenu pour le récepteur purifié.

Cet écart observé peut être expliqué par l'emploi de techniques différentes pour la détermination du rayon de Stokes, la gel filtration en HPLC dans notre cas, au lieu de techniques classiques de chromatographie pour les autres auteurs.

1.7 - Récapitulatif

L'emploi de techniques et de conditions différentes pour la mesure du rayon de Stokes expliquent la différence observée dans le calcul du poids moléculaire par les auteurs. Nous trouvons un poids moléculaire de 25.000 daltons en forte force ionique contre 298.000-319.000 (Sherman et al., 1982 ; Vedeckis, 1983).

Le poids moléculaire de 250.000 daltons est obtenu par la formule de Siegel et Monty (1966) ;

$$M = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot N \cdot R_S \cdot S (1 - \bar{v} \rho) \quad (1)$$

le rapport de friction F/Fo par la formule

$$F/Fo = R_S / \left(\frac{3 \bar{v} M}{4 \pi N} \right)^{1/3} \quad (2)$$

avec M = poids moléculaire (daltons)

R_S = rayon de Stokes (Angströms)

S = coefficient de sédimentation (Svedberg)

\bar{v} = volume spécifique partiel ($\text{cm}^3 \times \text{g}^{-1}$)

$$= 0,732$$

η = viscosité du milieu

ρ = densité

N = nombre d'

F/Fo = rapport de friction

Le rapport axial a/b est déterminé en prenant comme hypothèse que le récepteur a la forme d'un ellipsoïde allongé. Le rapport axial a/b est une fonction de l'équation :

$$F/F_0 = \frac{(1 - b^2/a^2)^{1/2}}{(b/a)^{2/3} \log \frac{1 + (1-b^2/a^2)^{1/2}}{b/a}}$$

En ce qui concerne les récepteur stéroïdiens, Sherman (1975), Sherman et al. (1982, 1983) donnent pour les équations(1) et (2) les valeurs suivantes :

$$M = 422,4 \times R_S \times S$$

$$F/F_0 = 1,393 \times (R_S/M)^{1/3}$$

le calcul de ces paramètres donne donc pour le complexe H-R purifié un poids moléculaire de 245.000 daltons, un rapport de friction de 1,56 et un rapport axial a/b = 11, semblable à celui calculé par Weisz et al. (1984) qui est de 12. Un tel rapport axial révèle une molécule asymétrique. Le poids moléculaire de 250.000 daltons passe à 278.000 lorsque les expériences sont effectuées dans un tampon de faible force ionique. Comme le supposent Luttge et al. (1984), il est possible que le récepteur ait une structure trimérique, chaque sous-unité faisant 90.000 daltons.

2) Chromatographie covalente sur gel à pont disulfure

Le complexe hormone-récepteur à glucocorticoïdes purifié 3000 fois est adsorbé sur une colonne de chromatographie covalente à pont disulfure. Cette chromatographie est pratiquée en l'absence de réducteurs de thiols et en présence de séralbumine traitée à la N-éthylmaléimide, pour stabiliser le récepteur (Idziorek et al., 1985b). L'élution est effectuée en présence de mercaptoéthanol en excès (voir figure n° 41). Les deux pics I et II obtenus (figure n° 42 a) avant et après élution ont été analysés par chromatographie de gel perméation haute performance. Un aliquote du récepteur purifié après chromatographie d'affinité est déposé en HPLC comme témoin. Le pic exclu I représente 22 % de la radioactivité et ne contient que de l'hormone libre (voir figure n° 42 b). Le pic élué par le β -mercaptoéthanol représente 61 % de la radioactivité et contient le récepteur lié, dont la forme reste inchangée après chromatographie covalente (voir figure n° 42 b). Le rendement d'obtention du complexe purifié après élution par le β -mercaptoéthanol n'est que de 35 %. La forte

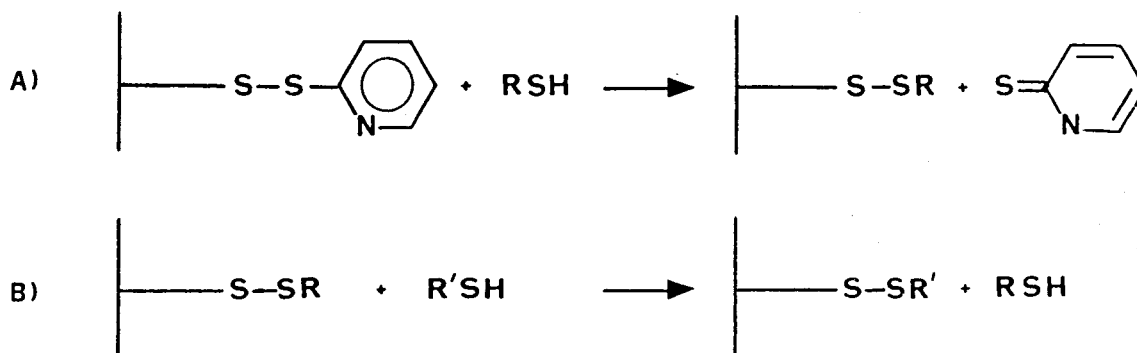


Figure n° 41 : Schéma de réaction de la chromatographie covalente du récepteur à glucocorticoïdes purifié sur le thiol Sépharose 4B. A) Un groupement thiol du récepteur purifié subit une réaction d'échange avec le groupement 2-pyridyl-sulfure de la matrice. B) Après lavage, l'élution est effectuée par des composés sulfhydryls ajoutés en excès.

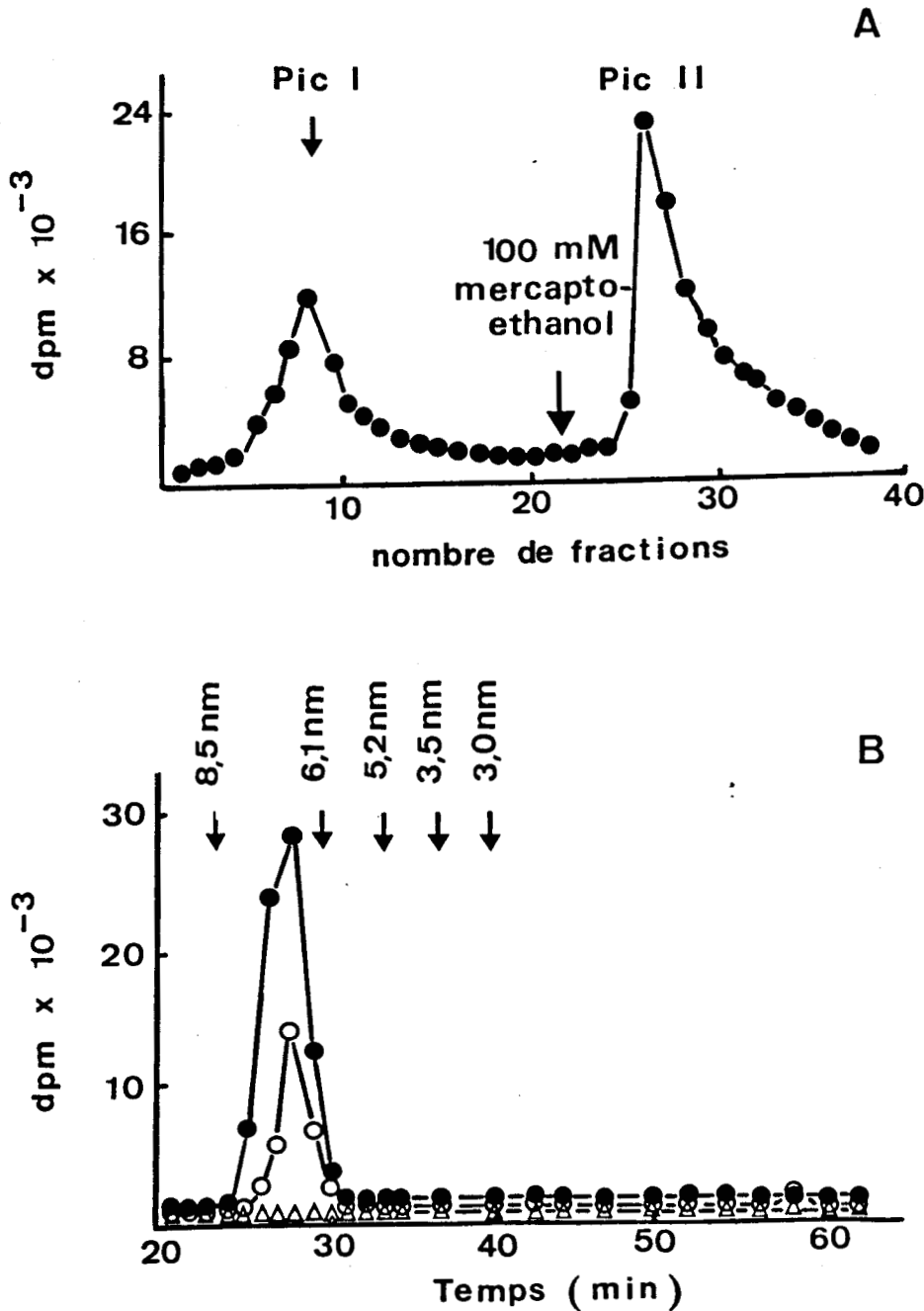


Figure n° 42 : Chromatographie covalente du récepteur à glucocorticoïdes hautement purifié (3000 fois) en présence de molybdate.

A- A 0,5 ml d'éluat de chromatographie d'affinité contenant le complexe ³H-R est ajouté 0,5 mg de sérumalbumine bovine traitée par de la N-éthylmaléimide ,puis l'ensemble est soumis à une gel filtration sur une colonne d'ACA 202 équilibrée dans un tampon ne contenant pas de thiols (pH 7,6) (K₂PO₄ ,100 mM , NaCl , 200 mM , EDTA , 1mM).Le pic exclu est chargé sur une colonne de 1 ml de thiol Sépharose 4B équilibrée dans le même tampon.Après 90 min d'incubation à 0°C, l'élution est effectuée en présence de -mercaptoéthanol 100 mM avec un débit de 0,1 ml min⁻¹.Les fractions de 4min recueillies sont ensuite testées en radioactivité.

B- Les pics radioactifs I (Δ) et II (○) obtenus en A sont analysés en chromatographie de gel filtration HPLC sur la colonne TSK G 3000 SW et comparés à l'éluat de chromatographie d'affinité (●).

perte d'activité de liaison peut être facilement expliquée par l'instabilité du récepteur purifié en l'absence de réducteurs de thiols.

Les premiers auteurs à montrer l'existence de groupements thiols par un système de chromatographie covalente ont été Harrison et al. (1983) qui ont utilisé un récepteur dénaturé lié covalentiellement à la dexaméthasone. Ces expériences ne donnent donc pas d'information sur l'existence de groupements thiols accessibles sur le complexe H-R natif. Pendant la rédaction de la publication, Bodwell et al. (1984) ont montré en utilisant deux gels à pont disulfure différents que l'environnement électronique ou stérique de la ou des cystéines interagissant avec le gel n'était pas le même suivant que le complexe H-R était transformé ou non. L'un des gels lie à la fois le complexe non transformé et transformé, l'autre ne lie que le complexe transformé. Le gel que nous avons utilisé par la répartition des charges sur le bras, ressemble à celui de Bodwell et al. (1984) qui lie à la fois les complexes non transformés et transformés (Idziorek et al., 1985b). Les résultats que nous avons obtenus montrent clairement que le complexe purifié contient au moins un thiol accessible autre que celui du centre actif et que l'élution par de fortes concentrations de β -mercaptoéthanol n'a pas d'influence sur le taux de transformation du complexe H-R, contrairement à ce que l'on aurait pu penser (Mac Donald et al., 1982).

3) Chromatographie d'échange d'ions en HPLC

Le complexe [^3H] TA-récepteur hautement purifié obtenu après chromatographie de gel-filtration en HPLC a été chargé sur une colonne de DEAE (TSK 545 DEAE, LKB) équilibrée dans un tampon phosphate de potassium 50 mM contenant des réducteurs de thiols et du molybdate. Le récepteur est élué par un gradient linéaire de chlorure de potassium 0-0,5 M. Le récepteur lié purifié est obtenu dans un pic unique radioactif élué à 315 mEq d'ion potassium (soit 235 mM de KCl) (voir figure n° 43). Ce résultat correspond à celui obtenu avec le récepteur cytosolique (voir figure n° 44 A). L'efficacité de la séparation est excellente. Le pic obtenu est très étroit et plus de

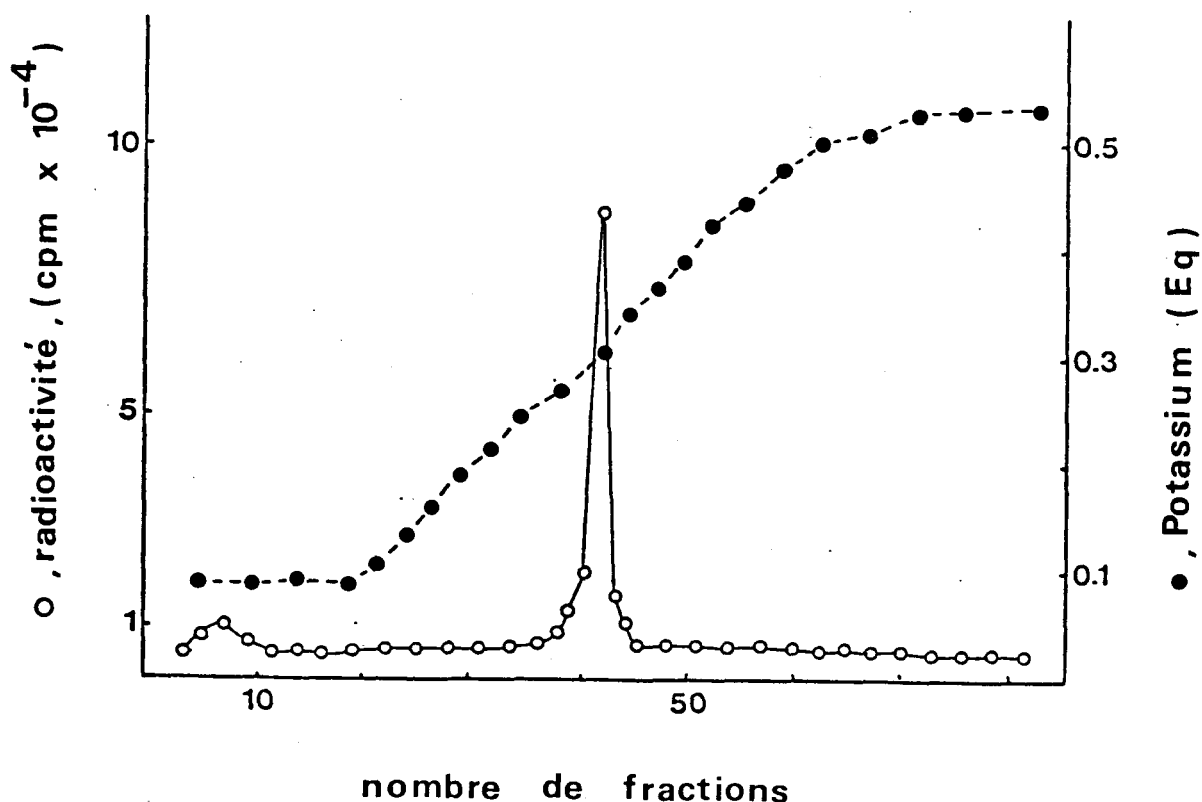


Figure n° 43 : Chromatographie d'échange d'ions en HPLC.

Un aliquote (500 μl) du récepteur hautement purifié obtenue après chromatographie de gel filtration en HPLC est dilué quatre fois avec du tampon phosphate 10 mM pH 7,4 puis chargé sur une colonne DEAE 545 LKB équilibrée dans le tampon phosphate 50 mM contenant du molybdate et des réducteurs de thiols ,pH 7,4 à 0°C. Après 20 min de lavage ,l'éluion est effectuée avec un gradient linéaire de KCl 0-0,5 M. Le débit est de 0,5 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$.Des fractions de 0,5 ml sont collectées et 50 μl de chaque fraction sont analysées pour le dosage de la radioactivité et du potassium.

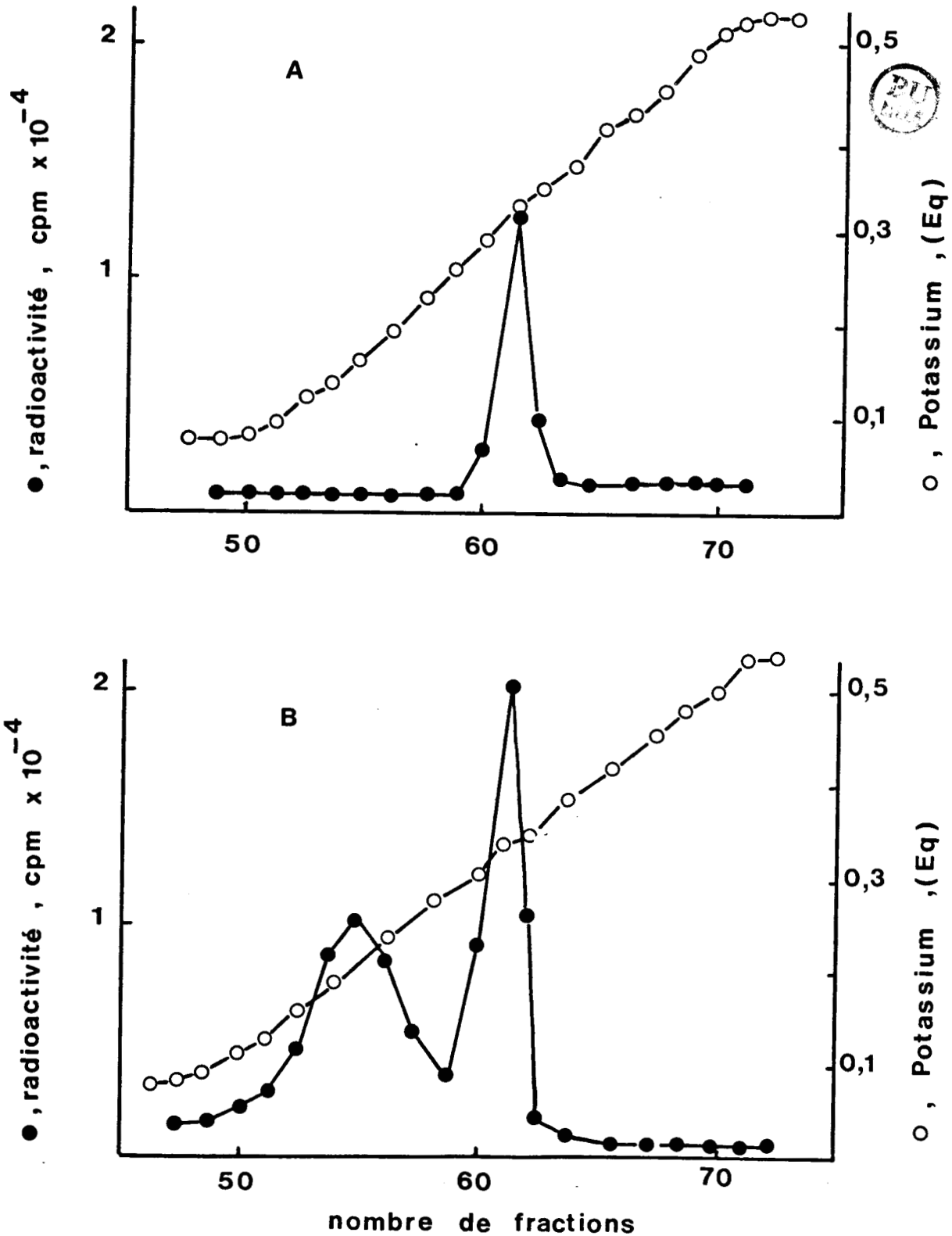


Figure n° 44 : Chromatographie d'échange d'ions en HPLC du cytosol de foie de rat incubé en présence de ³H TA 30 nM dans le tampon Tris 20 mM ,mercaptoéthanol 20 mM EDTA 1 mM glycérol 10 % , pH 7,4.

A - passage du complexe H-R non transformé

B - passage du complexe H-R transformé pendant 30 min à 30°C.

50 % de la radioactivité liée est retrouvée dans une seule fraction de 0,5 ml sur un gradient comportant 40 fractions. Cependant, le rendement de la DEAE en HPLC est faible puisqu'il est compris entre 30 et 40 % de l'activité de liaison déposée. Un aliquote de chaque fraction déposée en PAGE-SDS montre qu'à l'activité de liaison correspond la bande 90 kDa (voir photographie n° 2 et figure n° 45). Un aliquote de la fraction contenant 50 % de l'activité de liaison a été de nouveau déposé sur la colonne de gel filtration haute performance. Le rayon de Stokes de 7,0 nm observé montre que le complexe reste intact après la DEAE en HPLC. Le rendement faible (25 %) peut être imputé à la grande instabilité du complexe résultant de sa purification extrême.

Sur des colonnes de DEAE classiques, le récepteur purifié est élué avec une force ionique équivalente (0,23 M pour Weisz et al., 1984) ou plus forte (0,28 M pour Grandics et al., 1984) de phosphate de potassium. Mais ces résultats ne sont pas comparables avec les nôtres, n'étant effectués, ni avec la même technique, ni avec le même ion d'éluion.

4) Transformation du récepteur purifié sur DEAE-HPLC

Une étude préliminaire effectuée sur un récepteur cytosolique transformé montre que la transformation par le chauffage du complexe H-R en l'absence de molybdate provoque une baisse de la force ionique d'éluion du récepteur. Les résultats sont équivalents à ceux décrits dans la littérature (voir revue de Schmidt et Litwack, 1982). Cette force ionique passe de 320 mEq à 160-220 mEq d'ion potassium (voir figure n° 44 B) et montre ainsi que la transformation entraîne l'exposition de charges positives à la surface de la protéine. Le rendement de transformation du récepteur cytosolique est de 50 %.

Le récepteur purifié en présence de molybdate a été déposé après chromatographie d'affinité (taux de purification = 6000) sur la colonne de DEAE en HPLC équilibrée dans le tampon sans molybdate. La colonne est lavée 20 minutes avec le tampon avant de lancer le gradient.(voir figure n° 46).

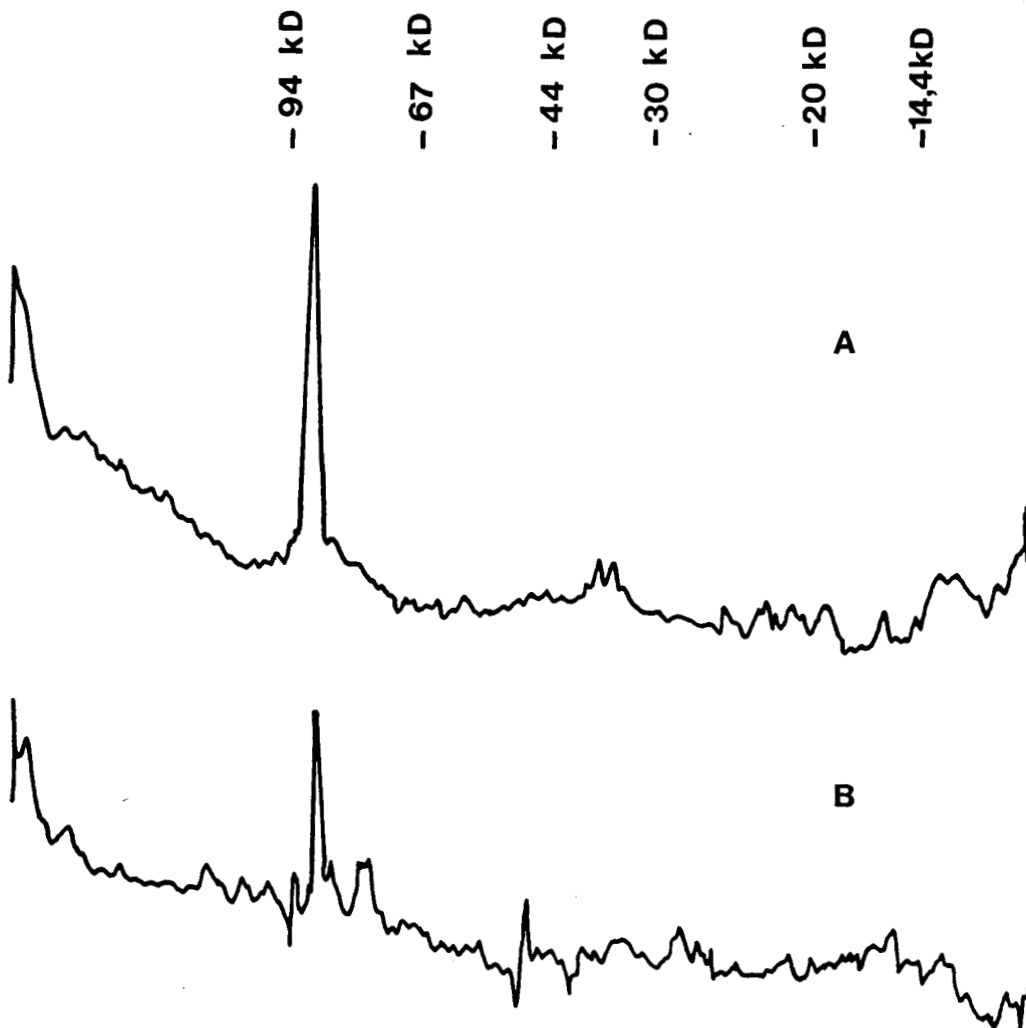
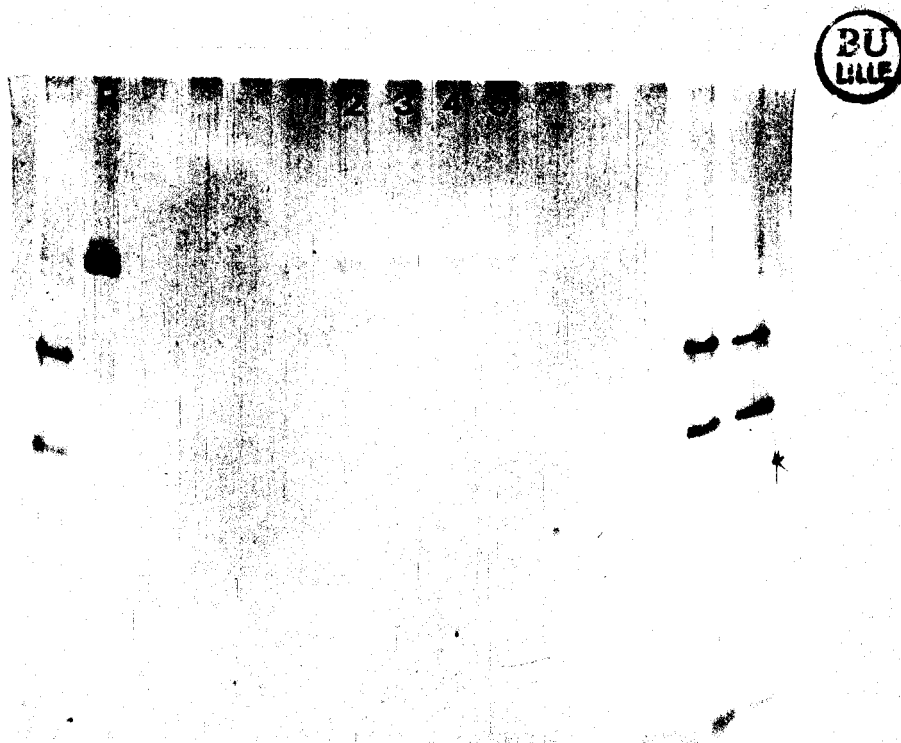


Figure n° 45 : Courbe densitométrique du récepteur purifié après électrophorèse en PAGE-SDS et révélation à l'argent.

- A - Récepteur purifié après chromatographie d'affinité
- B - Récepteur purifié après chromatographie d'échange d'ions en HPLC.L'aliquote déposé correspond au sommet du pic radioactif obtenu après élution par le gradient de KCl.



Photographie n° 2 : Révélation à l'argent après électrophorèse en PAGE-SDS d'aliquotes des fractions obtenues après chromatographie d'échange d'ions en HPLC (figure 43). Les fractions 1, 2, 3, 4, 5 correspondent au pic de radioactivité obtenu à la figure 43. A la fraction 3 correspondent le sommet de pic radioactif et la courbe densitométrique de la figure 45 B .

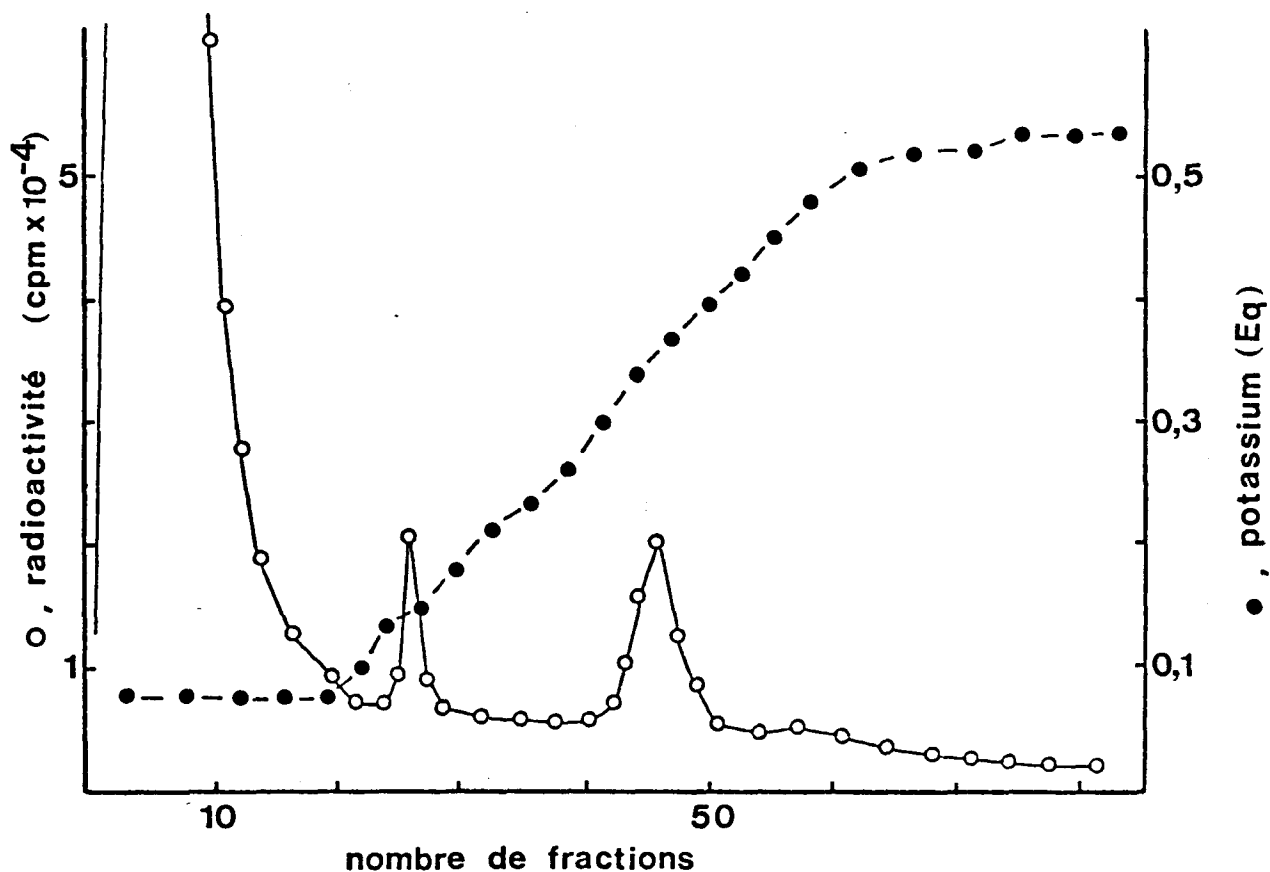


Figure n° 46 : Transformation à 0°C du récepteur hautement purifié sur la colonne d'échange d'ions en HPLC. Un aliquote (500 µl) de l'éluat de chromatographie contenant le récepteur purifié est dilué quatre fois par le tampon $K_x PO_4$ 20 mM pH 7,4 et chargé sur la colonne DEAE 545 LKB équilibrée dans le tampon $K_x PO_4$ 50 mM ,mercaptoéthanol 20 mM , pH 7,4 . Après un lavage de 20 min qui permet l'élimination de l'excès de stéroïde libre et la transformation car le tampon ne contient pas de molybdate, l'élution est effectuée contre un gradient linéaire de KCl 0-0,5 M dans le tampon. Le débit est de 0,5 ml x min⁻¹. Des fractions de 0,5 ml sont collectées et des aliquotes de 50 µl de chaque fraction sont analysées pour le dosage de la radioactivité et du Potassium.

Les résultats obtenus sur 3 expériences montrent que le complexe [^3H] TA-récepteur purifié est élué sous forme de deux pics dont l'un est élué à 325 mEq d'ion potassium et le second à 140-180 mEq. Par comparaison avec les formes cytosoliques obtenues, le premier pic correspond au récepteur purifié non transformé et le second au récepteur purifié transformé. Cette dernière forme représente 35 % de l'activité de liaison élue. Les profils d'éluion que nous obtenons par l'HPLC sont similaires à ceux obtenus après chromatographie sur DEAE-cellulose du récepteur de foie de rat transformé cytosolique (Sakaue et Thompson, 1977 ; Parchman et Litwack, 1977) ou hautement purifié (Wrange et al., 1979, 1984 ; Grandics et al., 1984).

Le rendement de transformation de 10 % par rapport à l'activité de liaison totale déposée peut être expliquée par l'instabilité du complexe hautement purifié en l'absence de molybdate.

Nos résultats montrent ainsi que le récepteur hautement purifié est capable de se transformer spontanément à 0°C lorsque l'on a enlevé le molybdate. Ce résultat est confirmé par Govindan et al. (1984) qui réussissent à transformer à 90 % par la chaleur un récepteur dont le taux de purification est de l'ordre de grandeur du nôtre, contrairement à Grandics et al. (1984) dont le récepteur purifié n'est transformable qu'en présence de facteurs cytosoliques rajoutés au moment de la transformation.

CONCLUSION

Le meilleur facteur de purification dans le protocole que nous utilisons est apporté par la chromatographie d'affinité. Le dosage des fonctions greffées sur le gel, dont nous avons terminé l'étude, a permis d'avoir une bonne approximation de la structure du gel à la fin de la synthèse. Le gel activé à pH alcalin s'est révélé efficace et excellent.

Intégrée dans le protocole de purification en trois étapes, et optimisée par l'emploi d'un lavage rapide et efficace, la chromatographie d'affinité permet d'obtenir un complexe purifié en fin de chaîne plus de 10 000 avec un rendement de l'ordre de 20 % et un taux de pureté de l'ordre de 50 %. La synthèse du gel effectuée à pH neutre n'a pas donné les résultats escomptés, mais elle mérite d'être poursuivie car elle limite de façon conséquente l'apparition de fonctions greffées de réactivité faible telles que les imidocarbonates.

Parallèlement aux progrès réalisés avec les dosages des protéines, la gel filtration par chromatographie liquide à haute performance a permis d'améliorer les dosages de l'activité de liaison du récepteur purifié et pratiquement de terminer la purification du récepteur non transformé.

Employée dans le cadre de la gel filtration ou de l'échange d'ions, la chromatographie liquide à haute performance a également permis de caractériser le récepteur purifié.

L'ensemble des résultats que nous avons présentés permettent, pour la première fois, d'avoir une idée globale du complexe hormone-récepteur purifié en présence de molybdate. Bien sûr, cette caractérisation n'est pas complète. Un marquage covalent efficace permettrait à la fois de connaître le site de liaison du stéroïde sur le récepteur et de pouvoir déterminer la structure quaternaire (homo- ou hétéromérique) du récepteur. Des anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur et contre la structure non

liante associée pourraient étayer la seconde hypothèse.

Le second point, prometteur et à mettre en valeur,, c'est la possibilité qu'offre le récepteur hautement purifié, de se transformer spontanément par la chaleur ou la force ionique en l'absence de molybdate. Une étude menée sur cette base peut contribuer à ouvrir une voie nouvelle dans la compréhension du mécanisme d'action moléculaire des hormones stéroïdes.

APPENDICE TECHNIQUE

MESURE DE LA LIAISON AU RECEPTEUR

1) Récepteur cytosolique ou extrait de sulfate de protamine

0,5 ml de cytosol ou 50 µl d'extrait de sulfate de protamine dilué au 1/10 sont incubés avec 30 nM de stéroïde tritié, [³H]dexaméthasone ou [³H]acétonide de triamcinolone d'activité spécifique 20-40 Ci/mmole - AMERSHAM ou NEN) pendant 18 heures à 0°C. Une incubation en présence d'un excès de 500 à 1000 fois du stéroïde froid (Dex ou TA) permet de mesurer la liaison non spécifique. Toutes les incubations sont faites en double - deux techniques permettent de mesurer le stéroïde lié.

a) Charbon-dextran (Rousseau et al., J. Mol. Biol., 1972, 67, 99-115)

- Réactif

Suspension de charbon

Charbon activé Norit	1,5 g
Dextran T70	0,15 g
Tampon phosphate de K 160 mM, pH 7,4	50 ml

- Mode opératoire

A l'arrêt de l'incubation, on prélève 2 fois 0,2 ml dans chaque tube d'incubation auxquels on mélange 0,1 ml de suspension de charbon. Après 10 secondes d'agitation au Vortex et 15 minutes de contact, les tubes sont centrifugés à 5000 cpm pendant 3 minutes.

150 µl de surnageant sont prélevés et ajoutés à 5 ml d'Aqualuma.

b) Hydroxyapatite (Atger et al., Biochemistry (1976) 15, 4298-4304)

- Réactifs

Hydroxyapatite (Biorad)	2g
Phosphate de K 10 mM pH 7,4	10 ml

Ce réactif est préparé 2 heures avant l'emploi et refroidi à 4°C.

- Mode opératoire

A l'arrêt de l'incubation, 2 fois 0,2 ml de cytosol sont déposés sur 1,4 ml d'HAP disposés dans des microcolonnes. On fait pénétrer le cytosol dans le gel. Après 2 minutes, les colonnes sont reliées à une trompe à vide. Sous aspiration, on fait passer 50 ml de tampon phosphate 10 mM pour éliminer l'hormone libre. Le gel est amené à sec sous aspiration douce, puis récupéré et placé dans une fiole à scintillation avec 5 ml d'Aqualuma.

c) Calcul

Pour chaque point, on aura 2 x 2 résultats dont on calcule la moyenne. La liaison spécifique est calculée par différence entre la moyenne obtenue pour l'incubation en présence d'hormone tritiée seule et la moyenne de l'incubation en présence d'hormone tritiée et froide et ramenée en coups $\text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$

2) Récepteur purifié

a) Charbon dextran

<u>Spécifique</u>		<u>Non spécifique</u>	
Eluat	90 μ l	Solution éluante	90 μ l
SAB (10mg/ml)	45 μ l	SAB (10mg/ml)	45 μ l
Tampon phosphate 160 mM	315 μ l	Tampon phosphate 160 mM	315 μ l
-----		-----	
450 μ l		450 μ l	

On prélève 3 fois 150 μ l auxquels on ajoute 75 μ l de solution de charbon diluée au 1/2 (sur les préparations les plus pures, le charbon dextran à 3 % dissocie le complexe hormone-récepteur et nous préférons utiliser un charbon à 1,5 %). Après 7 minutes et 30 secondes de contact les tubes sont centrifugés à 5000 cpm pendant 3 minutes, puis 100 μ l du surnageant sont prélevés et ajoutés à 5 ml d'Aqualuma.

b) Hydroxyapatite

<u>Spécifique</u>		<u>non spécifique</u>	
Eluat	66 μ l	Solution éluante	66 μ l
Tampon phosphate 10 mM	264 μ l	SAB 1mg/ml	33 μ l

		contact 30 minutes	
		Tampon phosphate 10 mM	231 μ l

		330 μ l	

Il est nécessaire d'effectuer une dilution au 1/5 du récepteur purifié pour baisser la force ionique et permettre l'adsorption du complexe hormone-récepteur sur l'HAP. La suite des opérations s'effectue comme au § 1-b)

c) Gel perméation sur précolonne LKB

On utilise une pompe HPLC Shimadzu à laquelle est reliée la précolonne LKB TSK GSWP (7,5 x 100 mm) équilibrée dans le tampon phosphate de K 160 mM, 2-mercaptoéthanol 20 mM, Na₂MoO₄ 10 mM, pH 7,4. Le débit de la pompe est de 0,5 ml min⁻¹ et nous recueillons des fractions de 0,3 ml. Après injection de 0,5 ml de récepteur hautement purifié des aliquotes de 30 μ l sont prélevés et ajoutés à 5 ml d'Aqualuma.

DOSAGE DES PROTEINES

- 1) Méthode de Bensadoun et Weinstein, Anal. Biochem. (1976) 70, 241-250.

Réactifs

- Solution de désoxycholate de Na 0,2 %
 - Acide désoxycholique 50 mg
 - Soude N/19 2,5 ml

- Solution d'acide trichloracétique 25 %
 - ACTA 25 g
 - H₂O qsp 100 ml

- Tampon bicarbonate
 - Solution A
 - NaHCO₃ 84 g
 - H₂O qsp 500 ml
 - Solution B
 - NaOH 45 g
 - H₂O qsp 300 ml

mélanger les solutions A et B et compléter à 1000 ml avec H₂O distillée

- Solution cuprotartrique
 - Solution cuivrique
 - CuSO₄ 2 g
 - H₂O qsp 1000 ml

- Solution tartrique
 - tartrate de Na et K 4 g
 - H₂O qsp 1000 ml

mélanger en parties égales au moment de l'emploi.

Mode opératoire

	Blanc	2,5µg	5 µg	Gamme 10 µg	25 µg	50 µg	Dosage
Solution d'albumine	0	5 µl	10 µl	20 µl	50 µl	100 µl	0
Sol. à doser	0	0	0	0	0	0	10 à 200 µl
Tampon	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,45ml	0,40ml	qsp 0,5 ml
Eau distillée	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Désoxycholate	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
		Agiter 10' au Vortex Laisser reposer 15'					
ATCA	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Centrifuger 30' à 4500 t/min à 0°C

puis le surnageant est éliminé soigneusement à la pipette Pasteur.

Réaction colorée

- Ajouter à chaque tube en passant 10 secondes au Vortex à chaque fois
 - 1,5 ml de solution cuproalcaline
 - 0,15 ml de solution de Folin concentrée
- Les tubes sont laissés à l'obscurité pendant 45 minutes
- La D.O. est lue à 660 nm contre de l'eau distillée.

2) Méthode au bleu de Coomassie (G250)

Read et al., Anal. Biochem. (1981) 116, 53

Réactif

- Bleu de Coomassie G250 (Merck)	15 mg
- Ethanol absolu	4,7 ml
- H ₃ PO ₄ 85 %	10 ml
- H ₂ O	qsp 100 ml

Filtration sur papier Whatman et conservation à l'abri de la lumière. Réactif stable quelques jours. Les dosages ont été effectués sur un analyseur centrifuge COBAS BIO selon les protocoles suivants :

- | | |
|-------------------------|--------|
| - Température des cuves | 30°C |
| - Longueur d'onde | 595 nm |
| - Temps de 1ère lecture | 2 min. |
- pour une gamme étalon allant de 0 à 200 µg/ml de SAB
 - 15 µl d'échantillon
 - 60 µl de diluant (H₂O)
 - 225 µl de réactif

 - pour une gamme étalon allant de 0 à 50 µg/ml
 - 60 µl d'échantillon
 - 15 µl de diluant
 - 225 µl de réactif

Le programme détaillé est donné ci-après :

Paramètres

1 Unité	mg/l
2 Facteur de calcul	1
3 Standard 1 conc.	0
4 Standard 2 conc.	0
5 Standard 3 conc.	0
6 Limite	300
7 Température (deg.c.)	30.0
8 Type d'analyse	1
9 Longueur d'onde (nm)	595
10 Vol. échantillon (µl)	15
11 Vol. diluant (µl)	60
12 Vol. Réactif (µl)	225
13 Temps d'incubation (S)	0
14 Vol. Réactif demar. (µl)	0
15 Temps 1ère lecture (S)	120.0
16 Intervalle temps (S)	60
17 Nombre de lectures	03
18 Blanc réactif	1
19 Mode de calcul	3

ACTIVATION DU SEPHAROSE CL 4B PAR LE BROMURE DE CYANOGENE (BrCN) A
pH ALCALIN

Le protocole suivant est celui de March et Cuatrecasas (Anal. Biochem., 60 (1974) 149) avec une modification : le tampon carbonate de Na 2 M est remplacé par du tampon phosphate de potassium 5 M, pH 11,9 dont le pouvoir tampon est plus élevé (Sharma, Slaunwhite, Anal. Biochem., 68, 1975, 79).

Réactifs

- Solution de bromure de cyanogène dans l'acétonitrile.
50 ml d'acétonitrile redistillé et desséché sont ajoutés à 1 flacon de 100 g de BrCN. Après dissolution complète, on obtient 97,1 ml de solution à 1,03 g de BrCN/ml.

- Tampon phosphate de potassium 5M, pH 11,9

K_3PO_4	3,33 M	70,7 g
K_2HPO_4	1,67 M	29,1 g
Eau bidistillée	qsp	100 ml

- Tampon bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 9,5

$NaHCO_3$	8,4 g
H_2O bidistillée	qsp 1000 ml

- Tampon bicarbonate de sodium 0,2 M, pH 9,5

$NaHCO_3$	16,8 g
H_2O bidistillée	qsp 1000 ml

- Tampon acétate de sodium 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4,0

Acétate de sodium	8,2 g
NaCl	29,3 g
H_2O bidistillée	qsp 1000 ml

- Urée 2 M, NaCl 0,5 M

- Tampon bicarbonate de sodium 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 10,0

$NaHCO_3$	8,4 g
NaCl	29,3 g
H_2O bidistillée	qsp 1000 ml

- Solution de l'amine à coupler

Amine à coupler diaminononane : 2 mmoles, soit 316 mg dans 100 ml de tampon bicarbonate de sodium 0,2 M, pH 9,5 à 10,5 ajusté avec HCl 6N.

Mode opératoire

Les 100 ml de gel Sepharose CL 4B (PHARMACIA) sont lavés avec 10 volumes d'eau bidistillée sur un fritté. Avec 100 ml de gel lavé on ajoute 100 ml d'eau bidistillée et 100 ml de tampon phosphate 5M, pH 11,9. On mélange lentement avec un agitateur, puis on accélère l'agitation pour obtenir une suspension homogène juste avant d'ajouter en une seule fois la solution de BrCN (0,75 ml, soit environ 7,5 mg de BrCN par ml de gel). L'agitation vigoureuse est maintenue pendant deux minutes puis on passe rapidement le gel sur fritté. Le gel est ensuite lavé par 10 volumes de tampon bicarbonate 0,1, 10 volumes d'eau distillée, 10 volumes de tampon bicarbonate 0,2M. Toutes ces solutions sont à 4°C et les lavages ne doivent pas durer plus de 90 secondes en tout car les fonctions activées au BrCN sont instables.

Après le dernier lavage, la filtration est arrêtée avant séchage du gel. Celui-ci est transféré rapidement dans un tube à bouchon à visser contenant la solution de diamino-nonane à coupler refroidie à 4°C (100 ml). Le couplage est poursuivi 20 heures à 4°C sous agitation rotative puis le gel est lavé à température ambiante sur un fritté par :

- | | |
|---|---------|
| - tampon acétate de Na, 0,1M, pH 4,0 | 20 vol. |
| - Urée 2M, NaCl 0,5 M | 20 vol. |
| - Bicarbonate de Na 0,1 M, pH 10,0, NaCl 0,5M | 20 vol. |
| - Eau bidistillée | 10 vol. |
| - Azide de Na 0,02 % | 5 vol. |

Le gel est conservé à + 4°C dans un volume d'eau azidée à 0,02 %.

ACTIVATION DU SEPHAROSE CL 4B PAR LE BrCN à pH NEUTRE

- Acétone fraîchement distillée
 - HCl 0,1 N
 - BrCN 1,03g/ml d'acétonitrile
 - milieu de couplage diammonononane (0,79 g) pour 50 ml de tampon bicarbonate 0,2 M pH 9,5 contenant 50 % d'éthylène glycol refroidi à -15°C
 - Cryostat HUBER HS40
- 50 ml de Sepharose CL4B sont lavés sur 1 fritté par 200 ml d'eau bidistillée puis par 200 ml d'acétone à 30 % (dans l'eau bidistillée) puis par 200 ml d'acétone à 60 %.
- le gel est repris par 50 ml d'acétone à 60 % ; le mélange est refroidi à - 15°C
- Au Sépharose en suspension agité par un mélangeur en verre fixé à un rotor à vitesse variable on ajoute la solution de BrCN (35 µl de BrCN dans 1 ml d'acétone pure)
- En refroidissant et en agitant vigoureusement on ajoute à -15°C la solution de triéthylamine (TEA) marquée (70 µl dilué dans 1 ml d'acétone à 60 %, soit un rapport molaire CNBr/TEA 1 : 1,5) goutte à goutte sur une période de 2 minutes, puis tout le mélange est rapidement versé dans 500 ml de liquide de lavage glacé (acétone/HCl 0,1 N, 1 : 1) Le gel est ensuite lavé sur fritté par :
- | | |
|------------------------|--------|
| - acétone 60 % 0°C | 250 ml |
| - acétone 30 % 0°C | 250 ml |
| - H ₂ O 4°C | 500 ml |
- le gel est recueilli et versé dans un flacon à bouchon à vis contenant les 50 ml du milieu de couplage à 4°C ; le reste des opérations étant similaires à la technique précédente.
- A chaque étape de la synthèse du gel, des dosages sont effectués pour contrôler les fonctions fixées sur le gel.

1) Dosage des ions CN^+ et des fonctions cyanate portées par les gels activés au BrCN

Réactif

- acide diméthylbarbiturique	500 mg
recristallisé dans l'eau ultra pure	
- eau ultra pure	5 ml
- pyridine fraîchement distillée	45 ml

Ce réactif est à préparer extemporanément car il jaunit même si on le conserve à -20°C .

Dosage

à 0,5 ml de gel humide fraîchement activé, lavé et mesuré à la seringue (soit environ 20 mg de gel sec) on ajoute 5 ml de réactif et l'on met au bain-marie à 40°C dans un tube à bouchon à vis pendant 25 minutes sous agitation. Après filtration et dilution on effectue le dosage à 588 nm contre un témoin contenant du gel non activé et placé dans les mêmes conditions. Le coefficient d'extinction molaire = 137 000 est utilisé pour le calcul.

N.B. - Ce dosage est à faire dans l'heure qui suit la réaction d'activation car les fonctions cyanates sont peu stables surtout à pH alcalin.

2) Détermination des groupes imidocarbonates sur des gels activés au BrCN

A 0,5 ml de gel activé humide placé dans un tube à bouchon à vis on ajoute 5 ml de HCl 0,1N. L'hydrolyse est effectuée au bain-marie sous agitation à 40°C pendant 30 min.

Après centrifugation, on prélève 1 ml du surnageant que l'on complète à 5 ml avec de l'acétate de sodium 0,2 M, pH 5,5.

Le dosage de l'ammoniac est effectué par gamme étalon avec un témoin 0 contenant du gel non activé.

3) Détermination de l'azote contenu dans les gels d'affinité activés

A 0,5 ml de gel humide, séché dans un dessiccateur contenant du P_2O_5 on ajoute 0,5 ml de H_2SO_4 96 %. On chauffe à $120^\circ C$ pendant 15 minutes puis on ajoute progressivement 0,2 ml de H_2O_2 30 %. La solution s'éclaircit alors et le chauffage est poursuivi pendant 30 minutes. La solution incolore est diluée à 50 ml avec de l'acétate de sodium 0,2 M, pH 5,5. Pour le dosage de l'ammoniac, on utilise des aliquotes de 1 ml.

Réactif

- Hydrindantine 880 mg
- Ninhydrine 4 g
- 2 méthoxyéthanol qsp 100 ml

(solution à conserver au froid et à l'abri de la lumière.
A remplacer chaque semaine).

Dosage

Dans un tube très propre à bouchon à vis, contenant 1 ml d'échantillon, on ajoute 1 ml d'acétate de sodium 2M, pH 5,5 et 1,5 ml de réactif. Après mélange, la solution devient rouge. Les tubes sont fermés puis portés au bain-marie à $100^\circ C$ pendant 20 minutes. Le contenu de chaque tube est dilué à 10 ml sans refroidissement préalable avec une solution glacée de formaldéhyde à 0,5 % dans l'isopropanol/eau (1 : 1). La quantité d'ammoniac est déterminée par une courbe de dosage à 570 nm en établissant une courbe d'étalonnage avec une solution de sulfate d'ammonium et ses dilutions (gamme entre 0,050 et 1 mM).

4) Dosage des fonctions amines libres portées par des gels de Sépharose activé

Réactifs

- 2-hydroxy-1-naphtaldéhyde 0,2M dans le diméthylformamide (DMF)
- Benzylamine 0,4 M dans l'éthanol absolu

Mode opératoire

0,5 ml de gel à doser sont mesurés sur une microcolonne et lavés par de l'eau ultrapure, puis du DMF.

Le gel est placé dans un tube de 10 ml à bouchon à vis. On y ajoute 5 ml de la solution de 2-hydroxynaphtaldéhyde. Le tube est agité 15 heures à température ambiante sur un agitateur rotatif. Le gel est alors centrifugé et lavé successivement par

- DMF 5 fois 10 ml
- Ethanol absolu 5 à 6 fois 10 ml, en fait jusqu'à ce qu'on obtienne une absorbance nulle à 270 nm.

Au gel lavé on ajoute 5 ml de la solution de benzylamine. Le tout est alors soumis à agitation rotative jusqu'au lendemain. Après centrifugation et filtration du surnageant sur Millipore 0,22 μ (à la seringue) la densité optique du surnageant est déterminée à 420 nm et la concentration en amine calculée à partir de

$$\epsilon = 1,09 \cdot 10^4 \quad \text{soit}$$

$$\text{NH}_2 \text{ libre } \text{ fmoles/ml de gel} = \frac{\text{DO} \times 10^3 \times 2 \times 5}{1,09 \times 10^4} = \frac{\text{DO}}{1,09}$$

OXYDATION PERIODIQUE DE LA DEXAMETHASONE

A 6,28g (16 mM) de dexaméthasone dissous dans 320 ml de méthanol on ajoute 96 ml d'acide periodique 10 %. La réaction est complète après 3 heures d'agitation à température ambiante. L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie en couche mince (gel de silice 60F 254,0,2mm, Merck) dans le système solvant dichlorométhane/acétone (4/1) avec visualisation des taches sous lumière ultraviolette à 254 nm. Après évaporation sous vide à 60°C, le précipité est lavé à l'eau distillée (40 ml) puis séché 15h à 70°C. De la poudre sèche dissoute dans 1 litre d'acétate d'éthyle, la dexaméthasone oxydée est extraite 4 fois par 200 ml de bicarbonate de soude 0,6 M. Les phases bicarbonatées recueillies sont immédiatement acidifiées par HCl 1 N car le stéroïde oxydé est instable en solution alcaline. Précipité lors de l'acidification, le stéroïde oxydé est lavé par quelques ml d'eau distillée, séché à 70°C puis contrôlé par chromatographie couche mince dans le système solvant donné ci-dessus. Le rendement réactionnel avoisine 90 %.

MATERIEL BIOLOGIQUE

1) Tampons

- Tampon TMG

Tris (Trizma R Sigma)	20 mM
Mg Cl ₂ ·6H ₂ O	3 mM
Na ₂ MoO ₄	10 mM
2-mercaptoéthanol	20 mM
Glycérol	10 %
Eau ultra pure	qsp 1000 ml

Le pH est ajusté à 7,4 avec HCl 1M. Avant l'emploi, le pH est de nouveau ajusté à 7,4

- Tampon phosphate 160 mM

KH ₂ PO ₄	160 mM (Merck)
2-mercaptoéthanol	20 mM
Na ₂ MoO ₄	10 mM
Glycérol	10 %
H ₂ O ultra pure	qsp 1000 ml

Le pH est ajusté à 7,4 avec KOH 2N

- Sulfate de streptomycine (Merck) 10 % dans l'eau ultra pure

- Sulfate de protamine (Merck) 0,75 % dans l'eau ultra pure (dissoudre à chaud)

2) Préparation du cytosol

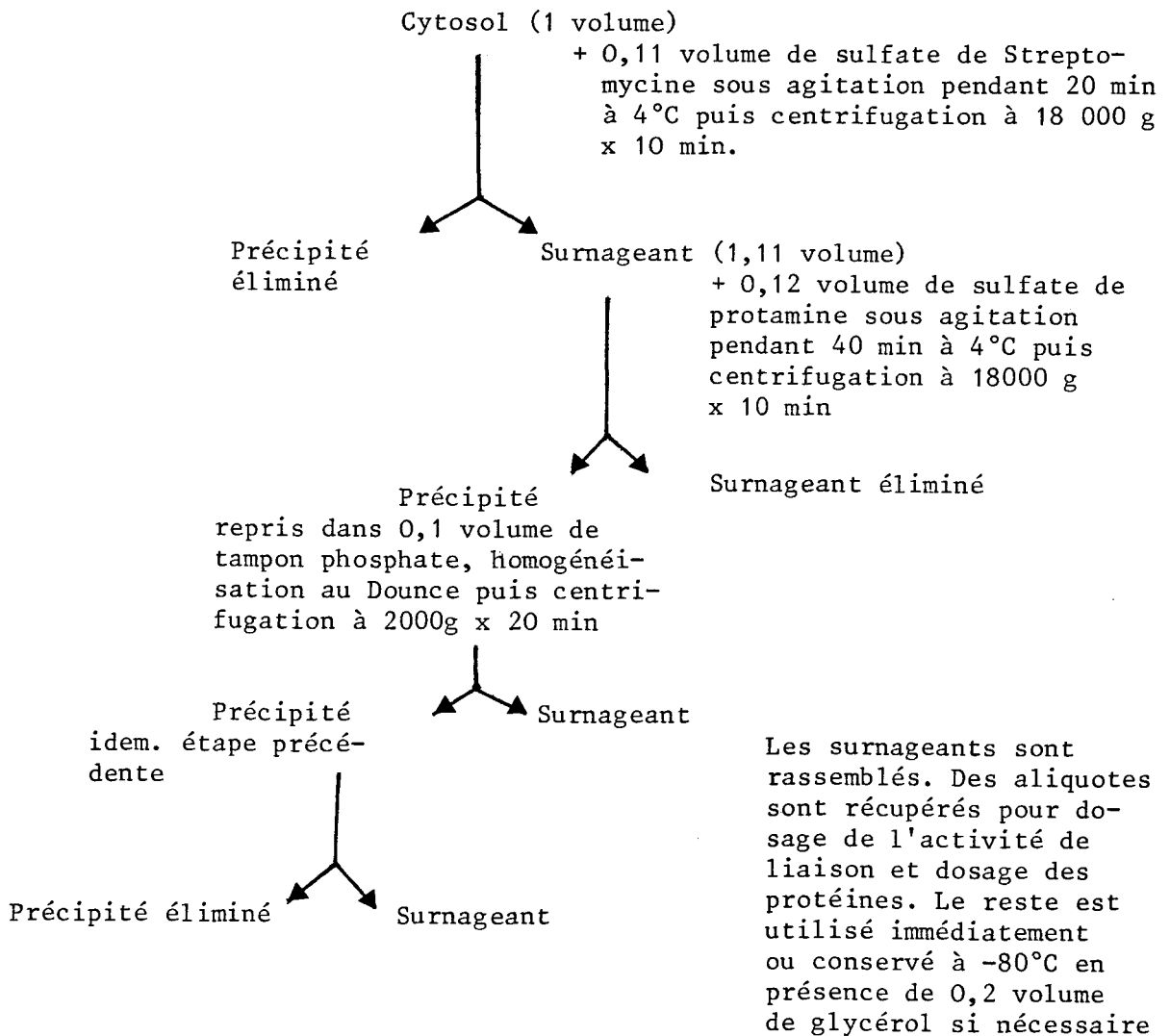
Des rats mâles (250-300 g) sont surrénalectomisés et reçoivent de l'eau salée (NaCl 0,9 %) ad libitum. Après 3 jours, les rats sont tués par dislocation cervicale. Le foie est prélevé rapidement et perfusé avec du NaCl à 0,9 % et du tampon TMG refroidis à 4°C. Les étapes suivantes se déroulent à + 4°C.

Après avoir épongé et pesé les foies on ajoute dans un bécher

1,5 ml de tampon TMG par gramme de foie. L'homogénéisation est faite à 4°C, 5 à 6 secondes à l'Ultra Turrax, puis au Potter. L'homogénat est centrifugé à 105 000 g pendant 2 heures 30 minutes à + 4°C. Le cytosol est récupéré en plongeant à travers la couche lipidique une pipette Pasteur reliée à une pompe aspirante. Le cytosol est ajusté à pH 7,4 à l'aide de Tris 1M.

3) Isolement du récepteur

a) Précipitation par le sulfate de protamine (Govindan et al., Eur. J. Biochem. (1978) 89, 95-104)



b) Chromatographie d'affinité

- tampons utilisés

Tampon A

KH_2PO_4	160 mM
2 mercaptoéthanol	20 mM
Na_2MoO_4	10 mM
Glycérol	10 %
H_2O ultra pure	qsp 1000 ml

ajusté à pH 7,4 avec KOH 2 M

Tampon B

KH_2PO_4	20 mM
2 mercaptoéthanol	20 mM
Na_2MoO_4	10 mM
Glycérol	10 % pH 7,4

Tampon C

Tampon A + 0,4 M de KCl

Adsorption

A 1 ml de gel d'affinité lavé par 10 volumes d'eau et équilibré par 15 volumes de tampon A et transféré dans un tube à bouchon à vis, on ajoute 50 ml d'extrait du précipité sulfate de protamine (EPS). Le tube est agité pendant 15 heures à 4°C sur un appareil rotatif. Des aliquotes d'EPS sont conservés pour le contrôle d'activité, de stabilité ainsi que pour le dosage des protéines.

A l'arrêt du batch, l'ensemble est transféré dans une colonne IBF 25 dans laquelle plonge un agitateur en verre. L'EPS est éliminé et un aliquote est conservé pour le contrôle de l'adsorption. Le gel resté dans la colonne est lavé de la manière suivante :

-Tampon A	100 volumes de gel	
-Tampon B	10-12 volumes	à 4°C
-Tampon C	10-12 volumes	
-Tampon C	12-15 volumes	à 30°C
-Tampon A	50-80 volumes	à 4°C

Le protocole de lavage doit être rapide (60 minutes au maximum) et l'ensemble des étapes de lavage par les tampons B et C ne doit pas excéder 10 à 12 minutes. Un aliquote de chaque lavage est conservé pour les contrôles d'activité.

La DO 280 du dernier ml de lavage doit être égale à 0.

Les incubations de mesure d'activité se font en présence de 30 nM [^3H] TA pendant 18 heures (§ mesure de liaison).

Elution

On ajoute alors 2 ml de solution éluante contenant 4 μM d'acétonide de triamcinolone trit é, activité spécifique finale 5-10 Ci mmole^{-1} , dans le tampon phosphate par ml de gel, le volume de la colonne est ramené à 5 ml et la colonne bouchée est agitée pendant 18 heures à 4°C par agitation rotative.

En fin d'élution, l'éluat est recueilli par gravité et le gel est lavé par 0,5 ml de tampon A. On récupère ainsi 2,5 ml d'éluat.

Les dosages d'activité du récepteur purifié sont effectués conformément au paragraphe

TECHNIQUES DE SEPARATION SUR GELS

1- PAGE-SDS à gradient de réticulation 5-20 % (Laemmli, 1970)

Matériel

Cuve à électrophorèse verticale : Protean double Slab
Electrophorèse Cell BIORAD, ref. 716.514.20

Réactifs

Solution A d'acrylamide à 5 %

Acrylamide	50,0 g
Bisacrylamide	1,33 g
Tris	45,3 g
SDS	1,0 g
TEMED	300 μl
HCl 5,6 N	qsp pH 8,8
H ₂ O	qsp 1 litre

Solution B d'acrylamide à 20 %

Acrylamide		200,0 g
Bisacrylamide		5,32 g
Tris		45,3 g
SDS		1,0 g
TEMED		300 µl
Glycérol		200 ml
HCl 5,6 N	qsp	pH 8,8
H ₂ O	qsp	1 litre

Solution C de concentration

Acrylamide		30,0 g
Bisacrylamide		0,8 g
Tris		15,1 g
SDS		1,0 g
TEMED		500 µl
HCl 5,6 N	qsp	pH 6,8
H ₂ O	qsp	1 litre

Les solutions A, B, C se conservent à + 4°C pendant plusieurs semaines.

Tampon d'électrophorèse

Tris		12,0 g
Glycocolle		57,2 g
SDS		4,0 g
HCl 5,6 N	qsp	pH 8,3
H ₂ O	qsp	1 litre

Le tampon est à diluer au quart avant l'emploi

- Kit de "faible" masse moléculaire calibré pour l'électrophorèse
Pharmacia 17-0446-01

Mode opératoire

Entre des plaques de verre (150 x 100 et 1,5 mm d'épaisseur du gel) un bouchon d'acrylamide est coulé pour maintenir l'étanchéité du système (5 ml B + 50 µl de persulfate d'ammonium). Le gradient est ensuite formé (27,5 ml A + 50 µl de persulfate d'ammonium dans une

chambre et 27,5 ml B + 50 µl de persulfate d'ammonium dans l'autre). Le gel de concentration est coulé (7,5 ml de C + 15,0 µl de persulfate) et le peigne est rajouté immédiatement.

Les protéines traitées à 100°C pendant 5 minutes en présence de 2,5 % SDS et 5 % β-mercaptoéthanol sont déposées en présence de bleu de bromophénol 0,001 % et glycérol 10 %.

L'électrophorèse s'effectue à 100 V et 10 mA pendant 1 nuit. Les étapes de fixation et de coloration des protéines du gel se font selon le protocole du kit de coloration à l'argent BIORAD.

2- Isoélectrofocalisation

Réactifs

Agarose		144 mg
Sorbitol		180 mg
H ₂ O	qsp	17,10 ml

L'ensemble est mis à ébullition pendant 30 minutes puis ajusté à 17,10 ml. La solution chaude est refroidie à 75°C avant d'ajouter les ampholines (3,5-9,5) à 2 % (p/v) en concentration finale. Le gel est coulé en 0,5 mm d'épaisseur.

Après une préélectrophorèse à 500 V pendant 30 min, les protéines en faible force ionique sont déposées à pH basique et l'isoélectrofocalisation est menée à 1000-1500 V pendant 45 minutes.

Le pH est contrôlé sur des échantillons de 5 mm d'agarose pris le long d'un couloir témoin. Ces échantillons sont prélevés et placés dans des tubes contenant 1 ml d'eau ultra pure pour la mesure du pH avec une microélectrode.

3- Electrophorèse bidimensionnelle

Des bandes de 5 mm d'agarose sont prélevées le long du couloir de migration, mises dans des tubes et supplémentées de 50 µl de SDS 10 %, portées à 100°C pendant 5 minutes puis déposées selon le protocole du paragraphe 1.

PHOTOAFFINITE

Le récepteur purifié (200 μ l) après gel filtration en HPLC ou dialysé grâce au microprodicon (Bioblock) est déposé sur un verre de montre posé sur de la glace sèche de façon à former un film de moins d'un millimètre d'épaisseur. La lampe UV au Xénon VBO 450W (Zeiss), refroidie à 0°C par un cryostat Huber HS40, est placée horizontalement à 1 cm de la solution biologique contenant le récepteur purifié. L'irradiation est poursuivie pendant 2 min (Dellweg et al., 1982).

L'aliquote irradié est précipité à l'ATCA 10 % puis redissous avec NaOH 1N. Le surnageant est ensuite soumis à l'électrophorèse en polyacrylamide-SDS selon le protocole décrit. Après coloration à l'argent et enregistrement des pics densitométriques par le spectrophotomètre Vernon PH 1-6, le gel est découpé en bandes de 2 mm. Chaque bande est déposée dans un tube à scintillation à vis fermant hermétiquement, puis supplémentée par 200 μ l d'eau oxygénée avant digestion. Cette digestion de l'acrylamide est poursuivie pendant une nuit à 55°C. Chaque tube est ensuite rempli par 4,5 ml de scintillateur Aqualyte (J.T. Baker) puis soumis au comptage.

CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

La gel filtration est effectuée sur un appareil Waters 204 U/6/6 GN, équipé d'une pompe 6000 A, d'un injecteur universel U6K avec une bande de 2 ml, d'un détecteur Waters modèle 480 réglé à 280 nm. Les colonnes TSK G3000 SW et G4000 SW (7,5 x 600 mm) (LKB) sont plongées dans un bain de glace. Elles sont équilibrées dans le tampon phosphate de potassium 160 mM, β -mercaptoéthanol 20 mM et molybdate 10 mM, pH 7,4. Le tampon est filtré et dégazé sur filtre Millipore 0,45 μ avant l'emploi. Le débit de la pompe est de 0,5 ml min^{-1} . Le récepteur purifié (0,5 ml) est injecté dans la colonne et l'on recueille des fractions de 0,5 ml. Des aliquotes de 50 μ l de chaque fraction sont pris pour le comptage de radioactivité sur un appareil Intertechnique SL 4000 avec comme produit de scintillation l'Aqualyte (J.T. Baker).

Pour l'échange d'ions en DEAE, une seconde pompe est couplée à un programmeur de gradient Waters 660. La colonne TSK 545 DEAE (LKB) est équilibrée dans le tampon phosphate de potassium 50 mM, β -mercaptoéthanol 20 mM, molybdate de sodium 10 mM, pH 7,4 à 0°C. L'élution est effectuée contre le même tampon supplémenté de KCl 0,5M final. Le récepteur purifié est dilué au 1/4 juste avant l'injection avec du tampon phosphate 5 mM, pH 7,4 contenant du molybdate et du β -mercaptoéthanol. Le débit est de 0,5 ml x min⁻¹ avec une pression de l'ordre de 250 psi. Après l'injection, la colonne est lavée pendant 20 minutes avant de lancer le gradient sur 40 minutes. Des fractions de 0,5 ml sont collectées sur un appareil Gilson programmable 201. Des aliquotes de 50 μ l sont prélevés pour les dosages de la radioactivité et de la concentration en potassium. Cette dernière est mesurée sur un spectrophotomètre de flamme (Flame photometer, model 143, Instrumentation Laboratory, Inc.).

Pour la transformation sur la colonne d'échange d'ions, le protocole est le même que précédemment sauf pour le tampon dans lequel le molybdate est absent.

BIBLIOGRAPHIE

- ALEXIS, M.N., DJORDEVIC-MARKOVIC, R., SEKERIS, C.E. (1983)
J. Steroid Biochem., 18, 655-663 (p. 32, 33)
- ALLERA, A., RAO, G.S., BREVER, H. (1980)
J. Steroid Biochem., 12, 259-266 (p. 5)
- ANDREASEN, P.A. (1982)
J. Steroid Biochem., 17, 577-579 (p. 23)
- ANTAKLY, T., EISEN, H.J. (1984)
Endocrinology, 115, 1984-1989 (p. 20, 53)
- ARANYI, P., NARAY, A. (1980)
J. Steroid Biochem., 12, 267-272 (p. 26)
- ATGER, M., MILGROM, E. (1976)
Biochemistry, 15, 4298-4304 (p. 6, 23, 42, 52, 53, 83, 143)
- BAILLY, A., SALLAS, N., MILGROM, E. (1977)
J. Biol. Chem., 252, 858-863 (p. 26)
- BAILLY, A., SAVOURET, J.F., SALLAS, N., MILGROM, E. (1978)
Eur. J. Biochem., 88, 623-632 (p. 21, 22, 23, 26)
- BALLARD, P.L., CARTER, J.B., GRAHAM, B.S., BAXTER, J.D. (1975)
J. Clin. Endocrinol., 41, 290 (p. 18)
- BANARJI, A., KALIMI, M. (1981)
Steroids, 37, 409-421 (p. 16)
- BARNETT, C.A., SCHMIDT, T.J., LITWACK, G. (1980)
Biochemistry, 19, 5446-5455 (p. 17, 25)
- BARNETT, C.A., PALMOIR, R.M., LITWACK, G., SEEGMILLER, J.E. (1983)
Endocrinology, 112, 2059 (p. 26)
- BARNETT, C.A., SPECK, L., LITWACK, G. (1983)
Eur. J. Biochem., 134, 231-235 (p. 26)

- BAULIEU, E.E., RAYNAUD, J.P., MILGROM, E. (1970)
in Karolinska Symposia in Research Methods in Reproductive Endocrinology.
2nd Symposium Steroid Assay by Protein Binding pp. 104-121 (p. 83)
- BAULIEU, E. (1978)
Les Hormones, in Hormones - Paris : Hermann (p. 1, 3, 8)
- BAXTER, J.P., TOMKINS, G.M. (1971)
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 68, 932 (p. 18)
- BAXTER, J.D., ROUSSEAU, G.G., BENSON, M.C. (1972)
Proc. Natl. Acad. Sci., 69, 1892 (p. 6)
- BEATO, M., FEIGELSON, P. (1972)
J. Biol. Chem., 247, 7890-7896 (p. 23)
- BEATO, M., KALIMI, M., KONSTAM, M., FEIGELSON, P. (1973)
Biochemistry, 12, 3372-3379 (p. 6)
- BEATO, M. (1985)
(voir Von der Ahe), (p. 30)
- BENSADOUN, A., WEINSTEIN, D. (1976)
Anal. Biochem., 70, 241-250. (p. 87, 109, 142)
- BLANCHARDIE, P., LUSTENBERGER, P., ORSONNEAU, J.L., BERNARD, J. (1983)
J. Steroid Biochem., 18, 789-799 (p. 12, 13, 22, 104)
- BLONDEAU, J.P., BAULIEU, E.E. (1984)
Biochem., J., 219, 785-792 (p. 5)
- BODINE, P.V., SCHMIDT, T.J., LITWACK, G. (1984)
J. Steroid Biochem., 20, 683-689 (p. 23)
- BODWELL, J.E., HOLBROOK, N.J., MUNCK, A. (1984)
Biochemistry, 23, 4237-4242 (p. 25 130)
- BOURGEOIS, S., PFAHL, M., BAULIEU, E.E. (1984)
Embo J., 3, 751-755 (p. 28)
- BRADFORD, M.M. (1976)
Anal. Biochem., 72, 248-254 (p. 90)

- BUCHOU, T., MESTER, J., RENOIR, J.M., BAULIEU, E.E. (1983)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 114, 479-487 (p. 100)
- BULLER, R.E., SCHRADER, W.T., O'MALLEY, B.W. (1976)
J. Steroid Biochem., 7, 321-326 (p. 83)
- CAKE, M.H., GOIDL, J.A., PARCHMAN, L.G., LITWACK, G. (1974)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 71, 45-52 (p. 23, 26)
- CAKE, M.H., DISORBO, D.M., LITWACK, G. (1977)
J. Biol. Chem., 253, 4886-4891 (p. 25)
- CAKE, M.H., LITWACK, G. (1978)
Eur. J. Biochem., 82, 97-103 (p. 25, 29)
- CARDO, P.P., GAMBETTI, M., VIGNALE, B., DIVANO, M.C. (1983)
Eur. J. Biochem., 137, 173-178 (p. 15)
- CARLSTEDT-DUKE, J., GUSTAFSSON, J.A., WRANGE, O. (1977)
Biochim. Biophys. Acta, 497, 507-524 (p. 30)
- CARLSTEDT-DUKE, J., WRANGE, O., DAHLBERG, E., GUSTAFSSON, J.A., HOGBERG, B.
(1979)
J. Biol. Chem., 254, 2537-1539 (p. 53)
- CARLSTEDT-DUKE, J., OKRET, S., WRANGE, O., GUSTAFSSON, J.A. (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 4260-4264 (p. 30, 54)
- CHAMBON, P., GAUB, M.P., LE PENNEC, J.P., DIERICH, A., ASTINOTTI, A. (1984a)
in Endocrinology, F. Labrie, L. Proulx, Eds., Elsevier Science
Publishers 3-10 (p. 30)
- CHAMBON, P., DIERICH, A., GAUB, M.P., JAKOWLEN, S., JONGSTRA, J., KRUST, A.
LE PENNEC, J.P., OUDET, P., REUDELHUBERT, T. (1984b)
in Recent Progress in Hormone Research, vol. 40, pp. 1-42 (p. 30)
- CHANG, C.H., ROWLEY, D.R., LOBL, T.J., TINDALL, D.J. (1982)
Biochemistry, 21, 4102-4109 (p. 81)
- CHANG, S.H., GOODING, K.M., REGNIER, F.E. (1976)
J. Chromatogr., 120, 321-333 (p. 107)
- CHANG, C.H., TINDALL, D.J. (1983)
Endocrinology, 113, 1486-1493 (p. 17)

- CIDLOWSKI, J.A., THANASSI, J.W. (1979)
Biochemistry, 18, 2378-2384 (p. 25)
- CLARK, C.R. (1984)
Trends in Biochem. Sci., 9, 207-208 (p. 6)
- CLIMENT, F., BUGANY, H., BEATO, M. (1976)
FEBS Lett., 66, 317-321 (p. 42, 52)
- CLIMENT, F., DOENECKE, D., BEATO, M. (1977)
Biochemistry, 16, 4694-4703 (p. 42)
- COTY, W.A., SCHRADER, W.T., O'MALLEY, B.W. (1979)
J. Steroid Biochem., 10, 1 (p. 6)
- CUATRECASAS, P. (1974)
Biochem. Pharmacol., 23, 2353 (p. 9).
- DAHMER, M.K., QUASNEY, M.W., BISSEN, S.T., PRATT, W.B. (1981)
J. Biol. Chem., 256, 4901-4905 (p. 13)
- DE KLOET, E.R., BURBACH, P. (1978)
J. Neurochem., 30, 1505-1507 (p. 44)
- DELLWEG, H.G., HOTZ, A., MUGELE, K., GEHRING, U. (1982)
Embo J., 1, 285-289 (p. 32, 121, 161)
- DISORBO, M.D., PHELPS, D.S., SAPICO-OLM, V., LITWACK, G. (1980)
J. Biol. Chem., 155, 3866-3870 (p. 28)
- DISORBO, M.D., LITWACK, G. (1981)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 99, 1203-1208 (p. 29)
- DURE, L.S., SCHADER, W.T., O'MALLEY, B.W. (1980)
Nature, 283, 784-786 (p. 121)
- ECONOMIDIS, I.V., ROUSSEAU, G.G. (1984)
FEBS Lett., 181, 47-51 (p. 111)
- EISEN, H.J., GLINSMANN, W. (1975)
J. Steroid Biochem., 6, 1171-1173 (p. 42, 52, 53)
- EISEN, H.J., GLINSMANN, W. (1976)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 70, 367-372 (p. 42, 53)

- EISEN, H.J., GLINSMANN, W. (1978)
Biochem. J., 171, 177-183 (p. 42, 53)
- EISEN, H.J., SCHLEENBAKER, R.E., SIMONS, S.S. (1981)
J. Biol. Chem., 256, 12920-12925 (p. 18, 32)
- EISEN, H.J. (1982)
in Biological Action and Hormones, vol. IX, Academic Press, pp. 255-270.
(p. 53)
- FAILLA, D., TOMKINS, G.M., SANTI, D.V. (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 72, 3849-3852 (p. 45, 58, 67)
- FASEL, N., PEARSON, K., BUETTI, E., DIGGELMANN, H. (1982)
Embo J., 1, 3-7 (p. 56)
- FORMSTECHEER, P., LUSTENBERGER, P., DAUTREVAUX, M. (1980)
Steroids, 35, 265-272 (p. 18)
- FORMSTECHEER, P., DUMUR, V., IDZIOREK, T., DANZE, P.M., SABLONNIERE, B.
DAUTREVAUX, M. (1984)
Biochim. Biophys. Acta, 802, 306-313 (p. 16)
- GEHRING, U., HOTZ, A. (1983)
Biochemistry, 22, 4013-4018 (p. 121)
- GEHRING, U., ARNDT, H. (1985)
FEBS Lett., 179, 138-142 (p. 32, 36)
- GEISSE, S., SCHEIDEREIT, C., WESTPHAL, H.M., HYNES, N.E., BEATO, M. (1982)
Embo J., 1, 1613-1619 (p. 56)
- GOIDL, J.A., CAKE, M.H., DOLAN, K.P., PARCHMAN, L.G., LITWACK, G. (1977)
Biochemistry, 16, 2125-2130 (p. 26)
- GOVINDAN, M.V., SEKERIS, C.F. (1976)
Steroids, 28, 499-507 (p. 47, 80)
- GOVINDAN, M.V., SEKERIS, C.F. (1978)
Eur. J. Biochem., 89, 95-104 (p. 39, 47, 50, 53, 59, 80, 98, 104, 106,
156)
- GOVINDAN, M.V. (1979)
J. Steroid Biochem., 11, 323-332 (p. 47, 104)

- GOVINDAN, M.V. (1980)
Biochim. Biophys. Acta, 631, 327-333 (p. 6)
- GOVINDAN, M.V. (1980)
Exp. Cell. Res., 127, 293-297 (p. 8, 27, 53)
- GOVINDAN, M.V., MANZ, B. (1980)
Eur. J. Biochem., 108, 47-53 (p. 80)
- GOVINDAN, M.V., GRONEMEYER, H. (1984)
J. Biol. Chem., 259, 12915-12924 (p. 28, 43, 48, 50, 52, 58, 59, 79, 81,
104, 106, 137).
- GRANDICS, P., PURI, R.K., TOFT, D.O. (1982)
Endocrinology, 110, 1055-1057 (p. 45, 50, 52)
- GRANDICS, P., MILLER, A., SCHMIDT, T.J., MITTMAN, D., LITWACK, G. (1984)
J. Biol. Chem., 259, 3173-3180 (p. 28, 45, 53, 58, 59, 79, 104, 106, 121,
124, 133, 137)
- GREENE, G.L., NOLAN, C., ENGLER, J.P., JENSEN, E.V. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5115-5119 (p. 98)
- GRIPPO, J.F., TIENRUNGROJ, W., DAHMER, M.K., HOUSLEY, P.R., PRATT, W.B. (1983)
J. Biol. Chem., 258, 13658-13664 (p. 15, 27)
- GRIPPO, J.F., HOLMGREEN, A., PRATT, W.B. (1985)
J. Biol. Chem., 260, 93 (p. 27)
- GRODY, W.W., COMPTON, J.G., SCHRADER, W.T., O'MALLEY, B.W. (1980)
J. Steroid Biochem., 12, 120-125 (p. 13)
- GRODY, W.W., SCHRADER, W.T., O'MALLEY, B.W. (1982)
Endocrine Reviews, 3, 142-156 (p. 6)
- GRONER, B., PONTA, H., BEATO, M., HYNES, N.E. (1983)
Mol. Cell. Endocrinol., 32, 101-116 (p. 56)
- GUSTAFSSON, J.A., CARLSTEDT-DUKE, J., OKRET, S., WIKSTROM, A.C., WRANGE, O.,
PAYVAR, F., YAMAMOTO, K.R. (1984)
J. Steroid Biochem., 20, 1-4 (p. 35, 53, 54)

- HACKNEY, J.F., PRATT, W.B. (1971)
Biochemistry, 10, 3002-3008 (p. 40)
- HARRISON, R.W., WOODWARD, C., THOMPSON, E. (1983)
Biochim. Biophys. Acta, 759, 1-6 (p. 130)
- HECHTER, O., SOLOMON, M.M., ZAFFARONI, A., PINCUS G. (1953)
Arch. Biochem. Biophys., 46, 201-214 (p. 4)
- HIGGINS, S.J., ROUSSEAU, G.G., BAXTER, J.D., TOMKINS, G.M. (1973)
J. Biol. Chem., 218, 5866-5872 (p. 6, 21)
- HIGGINS, S.H., ROUSSEAU, G.G., BAXTER, J.D., TOMKINS, G.M. (1973)
J. Biol. Chem., 218, 5873-5879 (p. 6, 22)
- HIGGINS, S.J., ROUSSEAU, G.G., BAXTER, J.D., TOMKINS, G.M. (1973)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 3415-3418 (p. 6)
- HIGGINS, S.J., BAXTER, J.D., ROUSSEAU, G.G. (1979)
in Glucocorticoid Action, Eds J.D. Baxter and G.G. Rousseau (Springer Verlag, Heidelberg) pp. 135-160 (p. 6)
- HOLBROOK, N.J., BODWELL, J.E., JEFFRIES, M., MUNCK, A. (1983)
J. Biol. Chem., 258, 6477-6485 (p. 32)
- HOUSLEY, P.R., PRATT, W.B. (1983)
J. Biol. Chem., 258, 4630-4635 (p. 60)
- HOUSLEY, P.R., SANCHEZ, E.R., PRATT, W.B. (1985)
Federation Proceedings, 44, Abstracts, p. 1476 (p. 60)
- HUBBARD, J., KALIMI, M. (1982)
J. Biol. Chem., 257, 14263-14270 (p. 16)
- HUBBARD, J.R., BARRETT, A., KALIMI, M. (1984)
Biochim. Biophys. Acta, 798, 187-191 (p. 16)
- HUBENER, H.J., SCHMIDT, J.G.H. (1954)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 296, 246-256 (p. 69)
- HUTCHENS, T.W., HAWKINS, E., MARKLAND, F. (1982)
J. Steroid Biochem., 16, 705-711 (p. 6)

- HYNES, N., VAN OOYEN, A.J.J., KENNEDY, N., HERRLICH, P., PONTA, H.,
GRONER, B. (1983)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 3637-3641 (p. 56)
- IDZIOREK, T., FORMSTECHEK, P., DANZE, P.M., SABLONNIERE, B., LUSTENBERGER, P.
RICHARD, C., DUMUR, V., DAUTREVAUX, M. (1985)
Eur. J. Biochem., sous presse (p. 22, 28, 50, 58, 59, 81, 106)
- IDZIOREK, T., SABLONNIERE, B., FORMSTECHEK, P., DUMUR, V., DAUTREVAUX, M. (1985)
J. Steroid Biochem. (in press) (p. 127, 130)
- ISRAEL, A. (1985)
La Recherche, 16, 398-400 (p. 56)
- JOAB, I., RADANYI, C., RENOIR, M., BUCHOU, T., CATELLI, M.G., BINART, N.,
MESTER, J., BAULIEU, E.E. (1984)
Nature, 308, 850-853. (p. 36, 118)
- JOHN, J.K., MOUDGIL, U.K. (1979)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 80, 1242-1249 (p. 25)
- KALIMI, M., BEATO, M., FEIGELSON, P. (1973)
Biochemistry, 12, 3365-3371 (p. 6)
- KALIMI, M., COLMAN, P., FEIGELSON, P. (1975)
J. Biol. Chem., 250, 1080-1086 (p. 23, 26, 41)
- KALIMI, M., LOUE, K. (1980)
J. Biol. Chem., 255, 4687-4690 (p. 16, 24)
- KING, W.J., GREENE, G.L. (1984)
Nature, 307, 745-747 (p. 6)
- KIRDANI, R.Y., PONTES, E.J., MURPHY, G.P., SANDBERG, A.A. (1984)
J. Steroid Biochem., 20, 401-406 (p. 109)
- KIRKPATRICK, A.F., KAISER, N., MILLHOLLAND, R.J., ROSE, F. (1972)
J. Biol. Chem., 247, 70-74 (p. 12, 18)
- KOBLINSKI, M., BEATO, M., KALIMI, M., FEIGELSON, P. (1972)
J. Biol. Chem., 247, 7897-7902 (p. 5)
- KOHN, J., WILCHEK, M. (1981)
Anal. Biochem., 115, 375-382 (p. 64, 67, 72, 74)

- KOHN, J., WILCHEK, M. (1982)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 107, 878-884 (p. 64, 79)
- LAEMMLI, U.K. (1970)
Nature, 227, 680-685 (p. 158)
- LEACH, K.L., DAHMER, M.K., HAMMOND, N.D., SANDO, J.J., PRATT, W.B. (1979)
J. Biol. Chem., 254, 11884-11890 (p. 13, 15)
- LEACH, K.L., DAHMER, M.K., PRATT, W.B. (1983)
J. Steroid Biochem., 18, 105-107 (p. 15)
- LEE, D.L., KOLLMAN, P.A., MARSH, F.J., WOLFF, N.E. (1977)
J. Med. Chem., 20, 1139 (p. 18)
- LE FEVRE, B., BAILLY, A., SALLAS, N., MILGROM, E. (1979)
Biochim. Biophys. Acta, 585, 266-272 (p. 23)
- LINKIE, D.M., SIITERI, P.K. (1978)
J. Steroid Biochem., 9, 1071-1078 (p. 6)
- LITWACK, G., FILLER, R., ROSENFELD, S.A., LICHTASH, N., WISHMAN, C.A.,
SINGER, S. (1973)
J. Biol. Chem., 248, 7481-7486 (p. 41)
- LITWACK, G., ROSENFELD, S. (1975)
J. Biol. Chem., 250, 6799-6805 (p. 5, 23)
- LONSDORFER, M., CLEMENTS, N.C., WITTLIFF, J.L. (1983)
J. Chromatogr., 266, 129-139 (p. 109)
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951)
J. Biol. Chem., 193, 265-275 (p. 87)
- LUDENS, J.H., DEVRIES, J.R., FANESTIL, D.D. (1972)
J. Biol. Chem., 247, 7533-7538 (p. 44)
- LUSTENBERGER, P., FORMSTECHEK, P., DAUTREVAUX, M. (1980a)
J. Chromatogr., 193, 451-457 (p. 62, 76, 97, 98)
- LUSTENBERGER, P. (1980b)
Mémoire de DERBH (p. 48, 52, 63, 67, 97)

- LUSTENBERGER, P., FORMSTECHEK, P., DAUTREVAUX, M. (1981)
J. Steroid Biochem., 14, 697-703 (p. 18, 22, 39, 48, 50, 52, 58, 62, 63,
69, 77, 80, 104, 106, 120, 124)
- LUTTGE, W.G., GRAY, H.E., DENSMORE, C.L. (1984)
J. Steroid Biochem., 20, 545-553 (p. 32, 36, 127)
- MAC DONALD, R.G., LEAVITT, W.W. (1982)
J. Biol. Chem., 257, 311-315 (p. 130)
- MAINWARING, W.I.P., IRVING, R. (1973)
Biochem. J., 134, 113-127 (p. 23)
- MANZ, B., HEUBNER, A., KOHLER, I., GRILL, H.J., POLLOW, K. (1983)
Eur. J. Biochem., 131, 333-338 (p. 48, 50, 81)
- MARCH, S.C., PARIKH, I., CUATRECASAS, P. (1974)
Anal. Biochem., 60, 149-152 (p. 63, 67, 148)
- MARKOVIC, R.D., EISEN, H.J., PARCHMAN, L.G., BARNETT, C.A., LITWACK, G. (1980)
Biochemistry, 19, 4556-4564 (p. 20)
- MARKOVIC, R.D., LITWACK, G. (1980)
Arch. Biochem. Biophys., 202, 374-379 (p. 20)
- MILGROM, E., ATGER, M., BAULIEU, E.E. (1973)
Biochim. Biophys. Acta, 320, 267-283 (p. 5, 6, 22, 23, 26)
- MILGROM, E., ATGER, M., BAILLY, A. (1976)
Eur. J. Biochem., 70, 1-6 (p. 6, 26)
- MILGROM, E. (1981)
in Biological Actions of Hormones, vol. VIII, ed. G. Litwack, Academic
Press, London, pp. 465-492 (p. 20, 21, 22)
- MILLER, E., TOFT, D.D. (1978)
Biochemistry, 17, 173-177 (p. 23)
- MILLER, P.A., OSTROWSKI, M.C., HAGER, G.C., SIMONS, S.S. (1984)
Biochemistry, 23, 6883-6889 (p. 56)
- MILLER-DIENER, A., SCHMIDT, T.J., LITWACK, G. (1985)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4003-4007 (p. 15, 53, 60)

- MIYABE, S., HARRISON, R.W. (1983)
Endocrinology, 112, 2174 (p. 27)
- MOGUILLEWSKY, M., PHILIBERT, D. (1984)
J. Steroid Biochem., 20, 271-276 (p. 28)
- MUNCK, A., WIRA, C., YOUNG, D.A., MOSNER, K.A., HALLAHAN, C., BELL, P. (1972)
J. Steroid Biochem., 3, 567-578 (p. 6)
- MUNCK, A., LEUNG, K. (1977)
in Receptors and mechanism of action of steroid hormones, edited by
J. PASQUALINI, Marcel DEKKER INC., N.Y. and Basel (p. 8)
- MUNCK, A., FOLEY, R. (1979)
Nature, 278, 752-754 (p. 20, 27).
- MUNCK, A., FOLEY, R. (1980)
J. Steroid Biochem., 12, 225-230 (p. 6, 23)
- MURAKAMI, N., HEALY, S.P., MOUDGIL, U.K. (1982)
Biochem. J., 204, 777-786 (p. 15)
- NARAY, A. (1983)
Biochim. Biophys. Acta, 756, 328-334 (p. 13)
- NIELSEN, C.J., VOGEL, W.M., PRATT, W.B. (1977)
Cancer Res., 37, 3420-3426 (p. 13, 17)
- NIELSEN, C.J., SANDO, J.J., VOGEL, W.M. (1977)
J. Biol. Chem., 252, 7568-7578 (p. 13)
- NIELSEN, S., SANDO, J.J., PRATT, W.B. (1977)
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 1398-1402 (p. 6, 17)
- NISHIGORI, H., TOFT, D. (1980)
Biochemistry, 19, 77-83 (p. 15)
- NORDEEN, S.K., LAN, N.C., SHOWERS, M.O., BAXTER, J.D. (1981)
J. Biol. Chem., 256, 10503-10508 (p. 30)
- NOTIDES, A.C., HAMILTON, D.E., AUER, H.E. (1975)
J. Biol. Chem., 250, 3945-3950 (p. 8)

- O'FARREL, P.H. (1975)
J. Biol. Chem., 250, 4007-4021 (p. 120)
- OKRET, S., CARLSTEDT-DUKE, J., WRANGE, O., CARLSTROM, K., GUSTAFSSON, J.A. (1981)
Biochim. Biophys. Acta, 677, 205-219 (p. 32, 53)
- OKRET, S. (1983)
J. Steroid Biochem., 19, 1241-1248 (p. 53)
- PAPAMICHAIL, M., TSOKOS, G., TSAWDAROGLOU, N., SEKERIS, C.E. (1980)
Exp. Cell. Res., 125, 490-493 (p. 47)
- PARCHMAN, L.G., LITWACK, G. (1977)
Arch. Biochem. Biophys., 183, 374-382 (p. 137)
- PAULIK, E.J., JAN NAGELL, J.R., MUNCEY, M., DONALDSON, E.S., HANSON, M.,
KENADY, D., REES, E.D., TALWALKAR, V.R. (1982)
Biochemistry, 21, 139-145 (p. 109)
- RAAKA, B.N., SAMUELS, H.H. (1983)
J. Biol. Chem., 258, 417-425 (p. 8)
- RAFESTIN-OBLIN, M.E., MICHAUD, A., CLAIRE, M., COR VOL, P. (1977)
J. Steroid Biochem., 8, 19-23 (p. 12)
- READ, S.M., NORTHCOTE, D.H. (1981)
Anal. Biochem., 116, 53-54 (p. 90, 147)
- REDEUILH, G., SECCO, C., BAULIEU, E.E. (1985)
J. Biol. Chem., 260, 3996-4002 (p. 50)
- REICHMAN, M.E., FOSTER, C.M., EISEN, L.P., EISEN, H.J., TORAIN, B.F.,
STONEY SIMONS, S. (1984)
Biochemistry, 23, 5376-5384 (p. 30, 32, 33)
- RENOIR, M., YANG, C.R., FORMSTECHE, P., LUSTENBERGER, P., WOLFSON, A.,
REDEUILH, G., MESTER, J., RICHARD-FOY, H., BAULIEU, E.E. (1982)
Eur. J. Biochem., 127, 71-79 (p. 52, 80)
- RENOIR, J.M., BUCHOU, T., MESTER, J., RADANYI, C., BAULIEU, E.E. (1984)
Biochemistry, 23, 6016-6023 (p. 37, 58)

- RINGOLD, G.M., YAMAMOTO, K.R., TOMKINS, G.M., BISHOP, J., VARMUS, H.E. (1975)
Cell, 6, 299-305 (p. 54)
- ROUSSEAU, G.G., BAXTER, J.D., TOMKINS, G.M. (1972)
J. Mol. Biol., 67, 99-105 (p. 18, 52, 82, 142)
- ROUSSEAU, G.G., HIGGINS, S.H., BAXTER, J.D., TOMKINS, G.M. (1974)
J. Steroid Biochem., 5, 935-939 (p. 6)
- ROUSSEAU, G.G., HIGGINS, S.J., BAXTER, J.D., GELFAND, D., TOMKINS, G.M. (1975)
J. Biol. Chem., 250, 6015-6021 (p. 6, 39, 40)
- ROUSSEAU, G.G., SCHMIDT, J.P. (1977)
J. Steroid Biochem., 8, 911-919 (p. 69)
- ROUSSEAU, G.G. (1984)
Mol. Cell. Endocrinol., 38, 1-11 (p. 8, 56)
- ROUSSEAU, G.G. (1984)
Biochem. J., 224, 1-12 (p. 8, 21, 32, 56)
- SAEZ, S., BERTRAND, J. (1976)
Lyon Médical, 236, 47-70 (p. 8)
- SAKAUE, Y., THOMPSON, E.B. (1977)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 77, 533-541 (p. 26, 137)
- SANDO, J.J., LA FOREST, A.C., PRATT, W.B. (1979)
J. Biol. Chem., 254, 4772-4778 (p. 13, 16)
- SANTI, D.V., WASHTIEN, W., POGOLOTTI, A.L. (1979)
in *Glucocorticoid Hormone Action*. J.D. Baxter, G.G. Rousseau, eds, Springer Verlag, Berlin, New-York, pp. 109-122 (p. 39)
- SATO B., NOMA, K., NISHIZAWA, Y., NAKATAO, K., MATSUMOTO, K.,
YAMAMURA, Y. (1980)
Endocrinology, 106, 1142-1148 (p. 26)

- SCHEIDEREIT, C., GEISSE, S., WESTPHAL, H.M., BEATO, M. (1983)
Nature, 304, 749-752 (p. 56)
- SCHEIDEREIT, C., BEATO, M. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3029-3033 (p. 56)
- SCHMIDT, T.J., SEKERIS, C.E. (1976)
Mol. Cell. Endo. ,5 , 223-241 (p. 15, 16)
- SCHMIDT, T.J., LITWACK, G. (1982)
The American Physiological Society. Physiol. Rev., 62, 1131-1187 (p. 6, 17,
21, 23, 28, 29, 133)
- SCHMITT, M.W., WALKER, J.P. (1977)
FEBS Lett., 81, 403-405 (p. 75, 76)
- SCHRADER, W.T. (1984)
Nature, 308, 17-18 (p. 6)
- SEBILLE, B., THUAUD, N., TILLEMENT, J.P. (1978)
J. Chromatogr., 167, 159-170 (p. 82)
- SEDMAK, J.J., GROSSBERG, S.E. (1977)
Anal. Biochem., 79, 544-552 (p. 87, 93)
- SEKULA, B.C., SCHMIDT, T.J., OXENHAM, E.A., DISORBO, D.M., LITWACK, G. (1982)
Biochemistry, 21, 2915-2922 (p. 25, 29)
- SHARMA, M., SLAUNWHITE, W.R. (1975)
Anal. Biochem., 68, 79-86 (p. 63, 148)
- SHEETS, C.S., ATEN, R.F., KATES, R.S., PRESTON, P.E., EISENFELD, A.J. (1985)
Endocrinology, 116, 677 (p. 27)
- SHERIDAN, P.J., BUCHANAN, J.M., ANSELMO, V.C., MARTIN, P.N. (1979)
Nature, 282, 579-582 (p. 6)
- SHERMAN, M.R. (1975)
Methods in Enzymol., 36, 211-224 (p. 127)
- SHERMAN, M.R., PICKERING, L.A., ROLLWAGEN, F.M., MILLER, L.K. (1978)
Federation Proceedings, 37, 167-173 (p. 17, 32)

- SHERMAN, M.R., MORAN, N.C., NEAL, R.M., NIU, E.M., TUAZON, F.B. (1982)
in Progress in Research and Clinical Applications of Corticosteroids,
H.J. Lee and T.J. Fitzgerald, ED., Heyden, London, pp. 45-65 (p. 124,
126, 127)
- SHERMAN, M.R., MORAN, M.C., TUAZON, F.B., STEVENS, Y.W. (1983)
J. Biol. Chem., 258, 10336-10377 (p. 32, 34, 58, 124, 127)
- SHERMAN, M.R., STEVENS, J. (1984)
Ann. Rev. Physiol., 46, 83-105 (p. 32, 33)
- SIBLEY, C.H., TOMKINS, G.M. (1974)
Cell, 2, 221-227 (p. 4, 9)
- SICA, V., BRESCIANI, F. (1979)
Biochemistry, 18, 2369-2378 (p. 69)
- SIEGEL, M., MONTY, K.J. (1966)
Biochim. Biophys. Acta, 112, 346-362 (p. 126)
- SIMONS, S.S., MARTINEZ, H.M., GARCEA, R.L., BAXTER, J.D., TOMKINS, G.M. (1976)
J. Biol. Chem., 251, 334-343 (p. 22)
- SIMONS, S.S. (1977)
Biochim. Biophys. Acta, 496, 349-358 (p. 23)
- SIMONS, S.S. (1979)
Glucocorticoid Hormone Action in Monograph. on Endocrinology, Ed. by
J.D. Baxter and G.G. Rousseau, Springer-Verlag, New-York, Berlin, pp.161-187
(p. 25)
- SIMONS, S.S., THOMPSON, E.B. (1981)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3541-3545 (p. 32)
- SIMONS, S.S., THOMPSON, B. (1982)
in Biological Action of Hormones, vol. IX, bu Academic Press, pp.221-254
(p. 16, 18)
- SIMONS, S.S., SCHLEENBAKER, R.E., EISEN, H.J. (1983)
J. Biol. Chem., 258, 2229-2238 (p. 32)

- SINGH, V.B., MOUDGIL, V.K. (1985)
J. Biol. Chem., 260, 3684-3690 (p. 52, 53)
- SLUYSER, M. (1983)
T.I.B.S., 8, 236-238 (p. 30, 31)
- SMITH, A.C., HARMON, J.M. (1985)
Biochemistry, 24, 4946-4951 (p. 120)
- STEVENS, J., STEVENS, Y.W. (1981)
Cancer Res., 41, 125-133 (p. 30)
- SURKS, M.I., KUMARA-SIRI, M.H. (1984)
Endocrinology, 114, 873 (p. 20)
- SVEC, F., WILLIAMS, J. (1983)
Endocrinology, 113, 1528-1533 (p. 20)
- SWEET, F., ADAIR, N.K. (1975)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 63, 99-105 (p. 47)
- TAL, M., SILBERSTEIN, A., NUSSER, E. (1985)
J. Biol. Chem., 260, 9976-9980 (p. 93)
- TOTH, K., ARANYI, P. (1983)
Biochim. Biophys. Acta, 761, 196-203 (p. 18)
- TRUONG, H., GEYNET, C., MILLET, C., SOULIGNAC, R., BUCOURT, R., VIGNAU, M.
TORELLI, V., BAULIEU, E.E. (1973)
FEBS Lett., 35, 289-294 (p. 67)
- TSAWDAROGLOU, N.G., GOVINDAN, M.V., SCHMID, W., SEKERIS, C.E. (1981)
Eur. J. Biochem., 114, 305-313 (p. 47, 80, 104, 106)
- TYMOCZKO, J/L/, PHILLIPS, M.M., VERNON, S.M. (1984)
Arch. Biochem. Biophys., 230, 345-354 (p. 9)
- VEDECKIS, W.V. (1981)
Biochemistry, 20, 7237-7245 (p. 21)
- VEDECKIS, W.V. (1983a)
Biochemistry, 22, 1975-1983 (p. 6, 21, 32, 33, 34, 126)

- VEDECKIS, W.V. (1983b)
Biochemistry, 22, 1983-1989 (p. 8, 32, 33)
- VON DER AHE, D., JANICH, S., SCHEIDEREIT, G., RENKAWITZ, R., SCHUTZ, G.,
BEATO, M. (1985)
Nature, 313, 706-709 (p. 56)
- WAYNE, A.B. (1982)
Endocrine Reviews, 3, 141 (p. 6)
- WEATHERHILL, P.J., BELL, P.A. (1982)
Biochem. J., 206, 633-640 (p. 21)
- WEATHERHILL, P.J., BELL, P.A. (1984)
J. Steroid Biochem., 21, 287-291 (p. 32)
- WEATHERS, B.J., GRATE, J.H., SCHRAUZER, G.N. (1979)
J. Am. Chem. Soc., 101, 917-924 (p. 15)
- WEEKS, C.M., DUAX, W.L., WOLFF, M.E. (1973)
J. Am. Chem. Soc., 95, 2865 (p. 18)
- WEISZ, A., BAXTER, J.D., LAN, N.C. (1984)
J. Steroid Biochem., 20, 289-293 (p. 45, 52, 59, 72, 104, 106, 127, 133)
- WELSHONS, W.V., LIEBERMAN, M.E., GORSKI, J. (1984)
Nature, 307, 747-749, (p. 6)
- WESTPHAL, M., BEATO, M. (1980)
Eur. J. Biochem., 106, 395-403 (p. 42, 52, 53, 124)
- WESTPHAL, H.M., BEATO, M. (1981)
FEBS Lett., 124, 189-192 (p. 25)
- WOLFF, M.E., BAXTER, J.D., KOLLMAN, P.A., LEE, D.L., KUNTZ, I.D.
BLOOM, E., MATULICH, D.T., MORRIS, J. (1978)
Biochemistry, 17, 3201 (p. 18)
- WONG, K.C., KORNEL, L., BEZKOROVAINY, A., MURPHY, B.E.P. (1973)
Biochim. Biophys. Acta, 328, 133-143 (p. 44)
- WRANGE, Q., GUSTAFSSON, J.A. (1978)
J. Biol. Chem., 253, 856-865 (p. 30, 32)

WRANGE, O., CARLSTEDT-DUKE, J., GUSTAFSSON, J.A. (1979)

J. Biol. Chem., 154, 9284-9290 (p. 32, 33, 43, 52, 53, 137)

WRANGE, O., OKRET, S., RADOJCIC, M., CARLSTEDT-DUKE, J., GUSTAFSSON, J.A. (1984)

J. Biol. Chem., 259, 4534-4541 (p. 54, 121, 137)

YAMAMOTO, K.R., STAMPFER, M.R., TOMKINS, G.M. (1974)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 3901-3905 (p. 30)

YAMAMOTO, K.R., GEHRING, U., STAMPFER, M.R., SIBLEY, C.H. (1976)

in Recent Progress in Hormone Research, 32, 3-32 (p. 30)

ERRATA :

Wrange et al. ,1985 , (p. 121) ,voir WRANGE, O.,et al. (1984)

