

50376
1986
337
Année 1986

N° d'ordre 706

50376
1986
237

THESE

présentée à

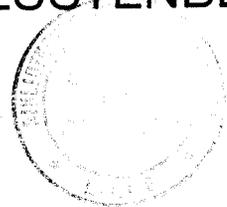
L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

Patrick LUSTENBERGER



**LA CHROMATOGRAPHIE
D'AFFINITE DES RECEPTEURS
DES HORMONES STEROIDES :
APPLICATION A LA PURIFICATION
DU RECEPTEUR
DES GLUCOCORTICOIDES
DU FOIE DE LAPIN**

Présentée le 28 Novembre 1986 devant la Commission d'Examen

- | | |
|---------------|------------|
| J. MONTREUIL | Président |
| B. DESCOMPS | Rapporteur |
| S. BOUQUELET | Rapporteur |
| E.E. BAULIEU | Examineur |
| M. DAUTREVAUX | Examineur |
| S. BERNARD | Examineur |

A mon épouse

A nos enfants

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur DAUTREVAUX qui a guidé ce travail et en a suivi les progrès.

Monsieur le Professeur MONTREUIL, malgré ses lourdes responsabilités, a accepté de présider ce jury de thèse. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de mes remerciements.

Je remercie chaleureusement Messieurs les Membres du Jury qui ont bien voulu accepter de juger ce travail.

Je voudrais enfin remercier tous ceux qui, à divers titres, ont contribué à l'élaboration de ce travail. En particulier, les personnes des Laboratoires de Biochimie Structurale de Lille et de Biochimie Médicale à Nantes, et mes collègues P. BLANCHARDIE, J.L. ORSONNEAU et G. CORNU qui m'ont apporté leur aide. Madame COMBALOT a assuré avec gentillesse la dactylographie de cette thèse, je la remercie.

R E S U M E

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude du mécanisme d'action des hormones glucocorticoïdes.

La mise au point d'un gel d'affinité spécifique a été réalisée en étudiant les divers paramètres : nature du ligand et son immobilisation ; type de support et son activation ; nature du bras espaceur et degré de substitution du gel. La matrice d'affinité retenue comporte un dérivé de la dexaméthasone couplé sur un bras aliphatique comportant douze atomes de carbone. Cette démarche a été appliquée à la préparation de gels d'affinité destinés à la purification d'autres récepteurs des hormones stéroïdes.

Un protocole de purification du récepteur des glucocorticoïdes sous forme non transformée du foie de lapin a été élaboré. Une étape de précipitation par le sulfate de protamine précède la chromatographie d'affinité. Après élution biospécifique, l'étape finale met en oeuvre la chromatographie d'exclusion haute performance et aboutit à une préparation purifiée 8000 fois environ avec un rendement de 20%. Cette fraction purifiée a été caractérisée du point de vue physicochimique et s'est révélée identique à la protéine native présente dans le cytosol.

Après élimination du molybdate, le récepteur purifié a été soumis à des conditions induisant sa transformation. La forme transformée a été également caractérisée. Ces résultats montrent que le récepteur purifié reste fonctionnel in vitro si l'on se réfère aux caractéristiques physicochimiques.

Mots-clés :

Récepteur des glucocorticoïdes ; chromatographie d'affinité ; purification ; caractérisation.

S U M M A R Y

This work lies within the scope of the study of the mechanism of action of glucocorticoid hormones.

The design of a specific affinity matrix was carried out by studying various parameters : choice of the ligand and of its immobilisation ; choice of the matrix and of the method of activation ; choice of the spacer arm and of the degree of substitution of the gel. The affinity matrix chosen contains a dexamethasone derivative coupled to a twelve carbons aliphatic spacer arm. This process was also applied to the preparation of affinity matrix intended to the purification of other steroid receptors.

A purification procedure of the untransformed rabbit liver glucocorticoid receptor was elaborated. A first step of protamine sulfate precipitation precedes the affinity chromatography step. After biospecific elution, the final step implements high performance size exclusion chromatography and results in a 8,000 fold purification with 20% yield. This purified material displayed the same physicochemical characteristics as the native protein in crude cytosol.

After molybdate elimination, the purified receptor was transformed by heat/salt exposure. The transformed receptor was characterized from these results based on the physicochemical characteristics, it appears that the purified glucocorticoid receptor remains functional in vitro.

PLAN

T A B L E D E S M A T I E R E S

AVANT PROPOS

<u>PREMIERE PARTIE</u> : Revue bibliographique	1
<u>Chapitre 1</u> : Le récepteur des hormones glucocorticoïdes	1
I - Structure du récepteur	3
A) Modèles d'agencement établis à partir des paramètres hydrodynamiques	3
B) Organisation du récepteur transformé	7
II - Aspect fonctionnel	10
A) Activation	10
B) Liaison à l'hormone	14
C) Transformation	16
1) Modification chimique ou perte d'un facteur "associé"	17
2) Changement conformationnel	19
3) Dissociation de sous unités	20
4) Modulateurs de la transformation et site de liaison au DNA	21
5) Schéma global du mécanisme	24
D) Translocation. Interaction avec le DNA	30
E) Recyclage - Phosphorylation du récepteur	33
III - Conclusion	34

<u>Chapitre 2</u> : Purification du récepteur	36
I - Purification du récepteur libre	37
1) Purification par gel filtration	37
2) Purification par chromatographie hydrophobe	37
3) Précipitation par le sulfate de protamine	38
4) Protocole de BERNARD et JOH	38
II - Purification du complexe hormone-récepteur sous forme transformée	38
A) Techniques classiques	38
1) Protocole de HACKNEY et PRATT	38
2) Protocole de LITWACK <u>et al.</u>	39
3) Techniques par précipitation	39
4) Chromatographie sur héparine immobilisée	40
B) Chromatographie d'échange d'ions sur supports polyanioniques	40
1) Protocole de ATGER et MILGROM	41
2) Protocole de EISEN et GLINSMANN	41
3) Protocole de COLMAN et FEIGELSON	42
4) Protocole de BEATO	42
5) Protocole de MOUDGIL <u>et al.</u>	45
6) Protocole de WRANGE <u>et al.</u>	45
7) Protocole de GAMETCHU et HARRISON	46
8) Protocole de GOVINDAN et GRONEMEYER	47
III - Purification du complexe hormone-récepteur sous forme non transformée	48
1) Protocole de WONG <u>et al.</u>	50
2) Protocole de DE KLOET et BURBACH	50
3) Protocole de FAILLA <u>et al.</u>	52
4) Protocole de GRANDICS <u>et al.</u>	54
5) Protocole de GOVINDAN	57
6) Protocole de MANZ <u>et al.</u>	64

<u>DEUXIEME PARTIE</u> : Résultats personnels	67
<u>Chapitre 1</u> : Mise au point d'un gel d'affinité spécifique	69
I - Choix du ligand	69
A) Choix du point d'attache sur le ligand	70
B) Liaison gel-ligand	74
1) Aménagements fonctionnels possibles en C21	74
2) Solution retenue	79
C) Synthèse des dérivés 17 β -carboxamides	79
1) Préparation du dérivé 17 β -carboxylique de la dexaméthasone	79
2) Formation de la liaison amide	79
II - Choix du bras espaceur	81
A) Nature des catégories de bras étudiées	81
B) Mesure de l'affinité vis à vis du récepteur	84
1) Principe des compétitions	84
2) Résultats et discussion	86
C) Evaluation de la dissociation du complexe récepteur 17 β -carboxamide	92
1) Principe des expériences de déplacement	92
2) Résultats et discussion	92
D) Conclusion	94
III - Choix du support	94
A) Activation du support	95
1) Principe de l'activation au bromure de cyanogène	96

2) Résultats et discussion	98
B) Degré de substitution : dosage du bras et du ligand	101
1) Dosage des fonctions activées présentes sur le gel	101
2) Dosage du bras porté par le gel	104
3) Dosage du ligand immobilisé	104
4) Résultats et discussion	106
5) Conclusion : intérêt d'un dosage précis du degré de substitution	114
IV - Conclusion	115
<u>Chapitre 2 : Purification du récepteur des glucocorticoïdes sous forme non transformée</u>	121
I - Choix du matériel biologique	121
1) Matériels biologiques traditionnels	121
2) Obtention de foie de lapin surrénalectomisé	122
3) Caractérisation physicochimique du récepteur cytosolique du foie de lapin	123
II - Prépuration du récepteur libre	123
1) Procédures utilisables	123
2) Résultats et discussion	126
III - Chromatographie d'affinité	129
A) Adsorption du récepteur	129
1) Influence du degré de substitution	130
2) Durée de l'adsorption	130
3) Influence du rapport volume de milieu biologique/volume de gel	130
4) Spécificité de l'adsorption	133
B) Lavage du gel	135

C) Elution du récepteur	135
1) Influence du bras-espaceur	137
2) Influence de la concentration en stéroïde éluant	139
3) Durée de l'éluion	139
4) Influence de la force ionique	139
5) Modifications apportées pour le récepteur de foie de lapin	140
D) Résultats et discussion	140
IV - Purification terminale du récepteur	144
1) Résultats	144
2) Discussion	144
V - Protocole de purification	146
A) Résultats	146
1) Mesure de la liaison spécifique de la $ ^3\text{H} $ dexaméthasone	148
2) Dosage des protéines	148
B) Discussion	150
<u>Chapitre 3 : Caractérisation physicochimique et fonctionnelle du</u>	
récepteur purifié	153
I - Caractérisation physicochimique	153
A) Paramètres moléculaires	153
1) Chromatographie de gel filtration	153
2) Constante de sédimentation	153
3) Poids moléculaire calculé	153
B) Paramètres ioniques	156
1) Chromatographie d'échange d'ions	156
2) Isoélectrofocalisation	158

3) Conclusion	158
C) Paramètres de liaison	161
1) Cinétique de dissociation	161
2) Spécificité de la liaison	163
3) Conclusion	163
D) Analyse électrophorétique	163
II - Transformation du récepteur purifié	167
III - Conclusion	170
<u>CONCLUSION</u>	172
I - Purification du récepteur non transformé	172
A) Etat de la question fin 1985	172
B) Apports du protocole mis au point	173
C) Problèmes rencontrés lors de la purification	177
D) Perspectives	179
II - Le récepteur des glucocorticoïdes purifié stabilisé par le molybdate	179
A) Structure du récepteur	179
B) Aspect fonctionnel	180
C) Perspectives	180

<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	182
<u>APPENDICE TECHNIQUE</u>	197
I - Matériel biologique	197
II - Synthèses chimiques	197
1) Oxydation de la dexaméthasone	197
2) Préparation des 17 β carboxamides	197
III - Préparation du gel d'affinité	198
1) Activation au bromure de cyanogène	198
2) Dosage des amines libres	200
3) Couplage au DXO	200
IV - Mesure de la liaison hormone-récepteur	200
1) Mesure de la capacité de liaison spécifique de la ³ H dexaméthasone	200
2) Mesure de l'affinité des stéroïdes compétiteurs	201
3) Mesure du déplacement	202
V - Purification du récepteur	202
1) Précipitation par le sulfate de protamine	202
2) Chromatographie d'affinité	202
3) Chromatographie d'exclusion haute performance	203
VI - Caractérisation du récepteur	204
1) Analyse par gel filtration	204
2) Chromatographie d'échange d'ions	205
3) Ultracentrifugation analytique	205
4) Isoélectrofocalisation	205
5) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	206

VII - Transformation du récepteur	206
1) Dessalage et transformation	206
2) Caractérisation du récepteur transformé et mesure du taux de transformation	207
VIII - Miscellanées	207
1) Dosage des protéines	207
2) Mesure de la radioactivité	207
3) Tampons	208

A V A N T - P R O P O S

Ce travail a été entrepris dans le Laboratoire de Biochimie Structurale dirigé par le Professeur M. DAUTREVAUX, à l'U.E.R. de Médecine de Lille. Il s'est poursuivi dans le Laboratoire de Biochimie Médicale du Professeur S. BERNARD, à l'U.E.R. de Médecine de Nantes.

Je remercie l'I.N.S.E.R.M. pour l'aide financière qui m'a été allouée (CRL n° 813015 et 844013).

Ce travail a fait l'objet, en totalité ou en partie, des publications citées ci-dessous :

- LUSTENBERGER P., FORMSTECHEP P., DAUTREVAUX M.
Détermination quantitative des ligands couplés à un gel d'agarose.
Colloques de l'INSERM. Affinity chromatography. ed. by J.M. EGLY.
INSERM Paris, vol. 86, 125-134 (1979).
- FORMSTECHEP P., LUSTENBERGER P., DAUTREVAUX M.
Synthesis of steroidal 17 β carboxamide derivatives.
STEROIDS, 35, 265-272 (1980).
- LUSTENBERGER P., FORMSTECHEP P., DAUTREVAUX M.
Quantitative determination of alkylamino side chains coupled to
agarose beads : a comparison of methods.
JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, 193, 451-457 (1980).
- LUSTENBERGER P., FORMSTECHEP P., DAUTREVAUX M.
Purification of rat liver glucocorticoid receptor by affinity
chromatography : design of a suitable adsorbent.
JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY, 14, 697-703 (1981).
- BLANCHARDIE P., LUSTENBERGER P., ORSONNEAU J.L., BERNARD S.
Physicochemical characterization and transformation of the cytosolic
glucocorticoid receptor from rabbit liver
JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY, 18, 789-799 (1983).

- LUSTENBERGER P., BLANCHARDIE P., DENIS M., FORMSTECHEP P.,
ORSONNEAU J.L., BERNARD S.

Nontransformed rabbit liver glucocorticoid receptor : purification,
characterization and transformation.

BIOCHIMIE, 67, 1267-1278 (1985).

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE 1

LE RECEPTEUR DES HORMONES GLUCOCORTICOIDES

Le modèle général du mode d'action des hormones glucocorticoïdes au niveau cellulaire, représenté sur la figure 1, a été élaboré dans le courant des années 1970. Bien que certains aspects demeurent à ce jour méconnus, ce mécanisme en deux étapes reste toujours d'actualité. Après son transport jusqu'à la cellule cible, grâce à une protéine spécifique la transcortine ou corticosteroid binding globulin, le cortisol libre pénètre dans la cellule par un processus encore non totalement élucidé. A l'intérieur de ces cellules cibles, se trouvent des protéines solubles : les récepteurs dont certains sont spécifiques des hormones glucocorticoïdes. La liaison de l'hormone au récepteur est réversible et à haute affinité (K_D de l'ordre de 10^{-9} M). Cette étape initiale est suivie par la "transformation" du complexe hormone-récepteur. Il s'agit d'un phénomène observé in vitro, qui peut être induit par des modifications physicochimiques du milieu. Il n'est pas impossible que cette étape ne soit pas individualisée in vivo, mais qu'elle soit concomitante à la liaison. Il en résulte une stabilisation de la liaison à l'hormone, la capacité de migrer dans le noyau et l'apparition d'un site de liaison au DNA. Après translocation nucléaire, le complexe hormone-récepteur va pouvoir interagir au niveau de la chromatine, et ainsi modifier l'expression génétique.

De nombreux travaux, notamment sur des modèles cellulaires, ont apporté la preuve de l'intervention de ce récepteur dans le mécanisme d'action des glucocorticoïdes (voir revues 1 - 5). Cependant, la localisation intracellulaire exacte du récepteur n'est pas clairement établie. Récemment, l'existence de ce récepteur cytoplasmique a été remise en cause. La localisation primitive du récepteur serait nucléaire et le passage dans le cytoplasme serait un artefact apparaissant lors de la préparation du cytosol (6-7). Ces résultats rapportés pour le récepteur des estrogènes bouleversent le schéma classique, posent de nombreux problèmes (8-9) et ouvrent de nouvelles perspectives de recherche. Néanmoins, des travaux récents confirment la localisation cytoplasmique du récepteur des glucocorticoïdes dans les lymphocytes humains (10). En l'absence d'argument formel quant à la localisation nucléaire du récepteur, nous examinerons sa structure et l'aspect fonctionnel en tant que protéine cytosolique.

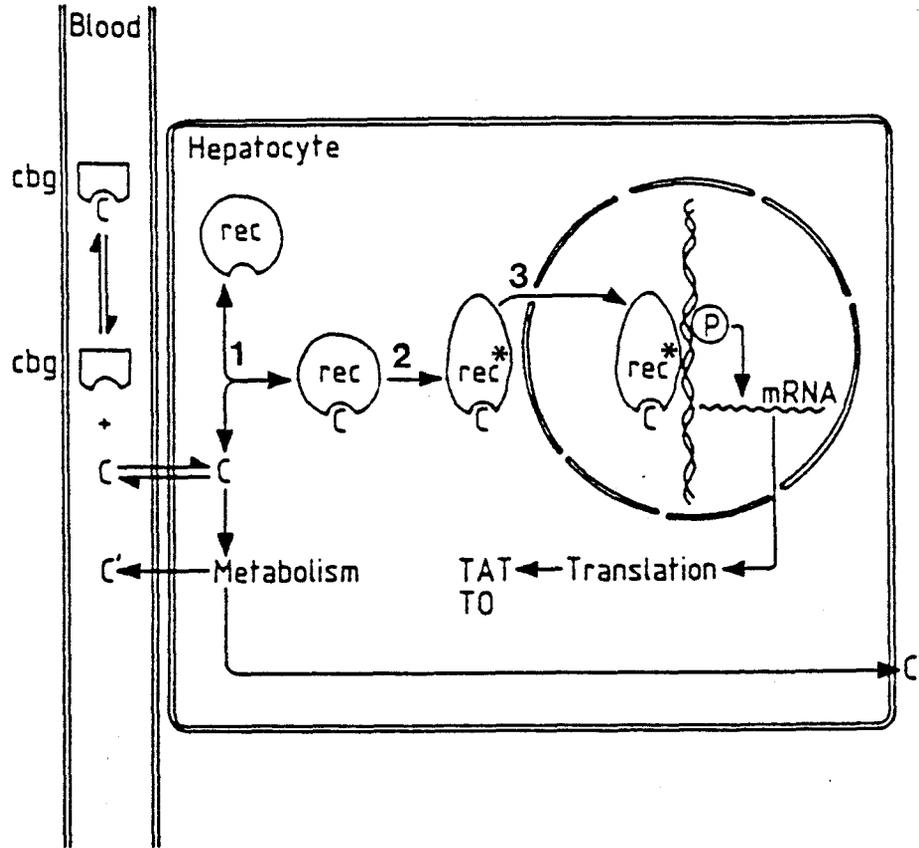


FIGURE 1

Modèle du mécanisme d'action des hormones glucocorticoïdes

1. liaison à l'hormone
2. transformation
3. translocation nucléaire

Abréviations : C, corticostéroïdes ; cbg, transcortine ; rec, récepteur des glucocorticoïdes ; rec* récepteur des glucocorticoïdes transformé ; P, RNA polymérase DNA dépendante ; TO, tryptophane oxygénase ; TAT, tyrosine aminotransférase , C', métabolites des corticostéroïdes (inactifs).
D'après CARLSTEDT-DUKE et al. (27).

I - STRUCTURE DU RECEPTEUR

La purification du récepteur sous forme transformée et non transformée (cf chapitre II) a permis d'entreprendre un début d'étude structurale de la protéine. Parallèlement, d'autres groupes ont abordé cette même étude directement sur le cytosol. La confrontation des résultats de ces deux approches, a abouti à plusieurs schémas hypothétiques de l'organisation du récepteur.

A) MODELES D'AGENCEMENT ETABLIS A PARTIR DES PARAMETRES HYDRODYNAMIQUES.

La transformation in vitro peut être totalement inhibée par addition de molybdate dans le tampon (11). L'étude séparée des paramètres hydrodynamiques des différentes formes est donc réalisable. Dans ces conditions, à partir des mesures des rayons de Stokes et des coefficients de sédimentation, SHERMAN a établi un modèle schématique (12) présenté sur la figure 2.

En présence de molybdate, le récepteur se présente comme un complexe 9-10 S de R_s 7-8 nm. Le poids moléculaire calculé est de 330000 environ. La formation de ce complexe ne dépend pas de la présence de molybdate. D'autre part, à l'aide d'un test Elisa, RADOJCIC et al. (13) ont établi que le récepteur non lié à l'hormone présentait les mêmes caractéristiques hydrodynamiques. L'hypothèse d'un homomère comportant ou non un site de liaison sur chacune des sous-unités est aussi plausible qu'une structure hétéromérique associant un nombre indéterminé de sous-unités liantes à des sous-unités différentes non liantes. La forme dimérique 6 S apparaît comme instable. La forme monomérique (3-4 S et 6,0 nm) est la seule dont le poids moléculaire a pu être estimé en électrophorèse PAGE/SDS entre 90 et 100000 par la majorité des auteurs. De nombreux fragments de poids moléculaire inférieur ont été mis en évidence. Leur caractérisation est rendue délicate du fait de leur instabilité. Ils semblent résulter de l'action des enzymes protéolytiques endogènes et la question se pose de la réalité in vivo de ces complexes et de leur signification physiologique.

Un schéma semblable a été proposé par VEDECKIS (14-15) qui est

Receptor Form	Schematic Model	S _{20,w} S	R _s Å	M _r x10 ⁻³
Tetramer		9-10	80-85	320-350
Dimer		5-7		
Monomer		4-5	50-60	90-110
Aggregate		>20	>105	>900
Intermediate Fragment (s)		3-4	25-40	40-60
Mero-receptor		2-3	19-24	20-25

FIGURE 2

Modèle structural du récepteur des glucocorticoïdes des tissus de mammifères

- schématise la région du site de liaison.
- fait référence à la présence ou à l'absence de sites de liaison supplémentaires.
- représente la partie asymétrique de la protéine, l'étranglement rappelle la présence de régions très sensibles aux protéases.
- Ribonucléoprotéine ou fragment ribosomal qui peut se combiner à un nombre indéterminé de monomères pour former des agrégats.

Les diverses formes ont été caractérisées du point de vue physicochimique.
D'après SHERMAN et al. (12, 25).



représenté sur la figure 3. Les deux hypothèses, structure homomérique ou hétéromérique, sont évoquées. Dans le second cas, les éléments associés pourraient être de nature soit protéique, soit ribonucléique. Des résultats décisifs dans ce domaine ont été récemment publiés par le même groupe (16). Il apparaît clairement que la forme intermédiaire 5,2 S peut générer le complexe 3,8 S par traitement par la ribonucléase, alors que celle-ci est sans effet sur la forme 9-10 S. La réaction est réversible, l'addition de RNA permet de régénérer le complexe 5,2 S à partir de la forme 3,8 S. La présence d'un RNA associé au niveau de la forme intermédiaire est donc vraisemblable, elle reste à démontrer au niveau de la forme native 9-10 S.

* Structure hétéromérique du récepteur non transformé.

La réalité in vivo de la forme stabilisée par le molybdate apparaît comme probable. RAAKA et al. (17) ont démontré la présence de complexes 9-10 S dans les cellules intactes GH₁ traitées par le molybdate. D'autre part, la forme 9-10 S a pu être mise en évidence en l'absence de molybdate (18). La structure du complexe lui-même est encore inconnue. Par analyse à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-récepteur transformé (monomère), il a été montré que le complexe 9-10 S ne comporte qu'une sous-unité de 90-100000 et qu'il s'agirait donc d'un hétéro-oligomère (19). L'étude comparative du récepteur de souches sauvages et mutantes de lymphome S 49, a amené GEHRING et ARNDT (20) à une conclusion identique en faveur d'une structure hétéromérique ne comportant qu'une sous-unité liant l'hormone. La nature exacte des autres sous-unités demeure inconnue. Récemment, JOAB et al. (21) ont démontré la présence d'une sous-unité non liante de poids moléculaire 90000 associée à la forme 9-10 S du récepteur des glucocorticoïdes et des autres récepteurs. Le même groupe vient récemment d'identifier de façon convaincante cette protéine comme une "heat shock" protéine qui est relativement abondante dans le cytoplasme (22). Par une approche différente, reposant sur des techniques de purification, HOUSLEY et al. (23) ont mis en évidence dans la forme stabilisée par le molybdate, deux sous-unités de M_r 92000 et 98000 qui sont phosphorylées mais dont seule la seconde lie le stéroïde. SANCHEZ et al. (24) ont très récemment apporté des éléments complémentaires sur la nature de la sous-unité 92000. Elle réagit à la fois avec l'anticorps préparé par JOAB et al. et avec un anticorps anti "heat shock" protéine. Cette sous-unité 92000 n'est associée au récepteur dans le cytosol qu'en présence de molybdate,

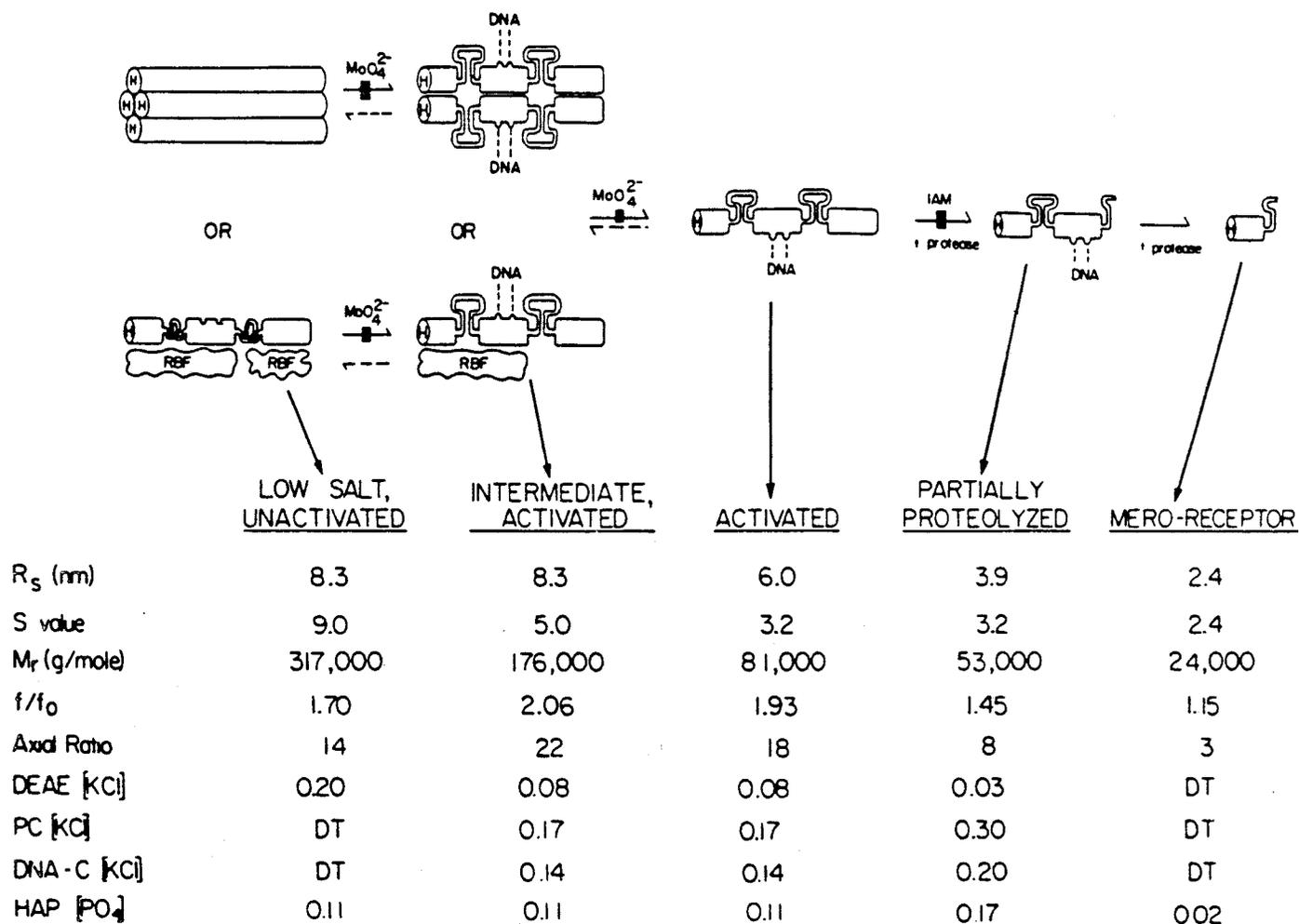


FIGURE 3

Structure hypothétique du récepteur des glucocorticoïdes du foie de souris et des cellules AtT-20

Le récepteur non transformé est présent sous forme d'un homotétramère ou d'un hétéromère associant à 1 sous-unité liante d'autres protéines (RBF: receptor binding factor). La région qui se lie au DNA est masquée et n'est dévoilée que dans les deux formes intermédiaire et transformée. Le monomère peut être résolu en fragment de taille variable sous l'action des protéases. Le plus petit de ces fragments comportant le site de liaison représente le méro-récepteur.

Le tableau rassemble les propriétés physicochimiques des diverses formes.

Abréviations : H, hormone glucocorticoïde . DT, volume exclu ; IAM, iodoacétamide, D'après VEDECKIS (14).

et se dissocie du complexe lors de la transformation.

La réalité d'une structure hétéromérique de la forme non transformée 9-10 S apparaît donc comme évidente. La signification physiologique de ces sous-unités ainsi que leur rôle au cours du mécanisme d'action, restent cependant totalement ignorés.

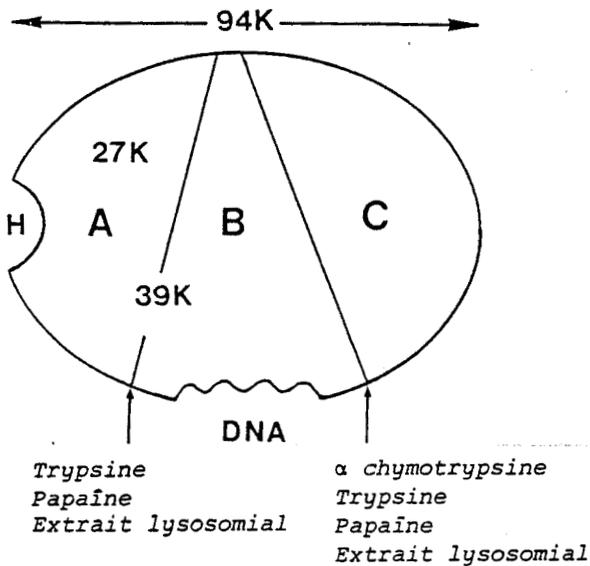
B) ORGANISATION DU RECEPTEUR TRANSFORME.

Elle a été abordée par plusieurs groupes selon un protocole identique faisant appel à l'étude des coupures protéolytiques, soit par les enzymes lysosomiaux endogènes, soit par les protéases exogènes (trypsine, α chymotrypsine, protéase V_8). Plusieurs stratégies ont été appliquées pour mettre en évidence et caractériser les fragments obtenus :

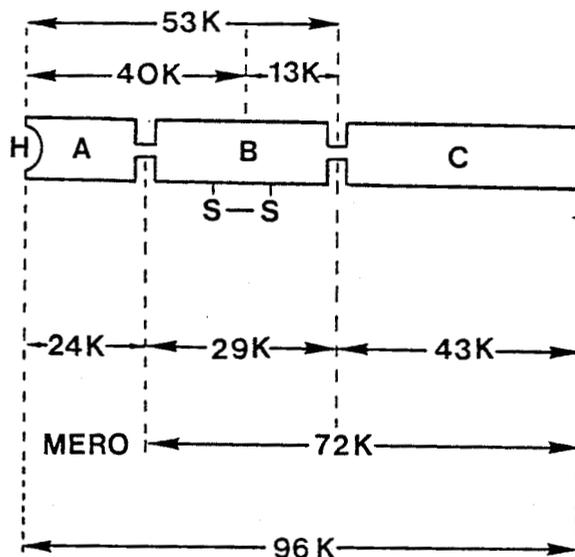
- mesure des paramètres hydrodynamiques : rayon de Stokes et coefficient de sédimentation (25).
- mesure des paramètres hydrodynamiques et étude des fonctions biologiques telles que liaison au DNA et réactivité immunologique (26-28).
- mesure du poids moléculaire par électrophorèse PAGE/SDS des fragments obtenus à partir du récepteur natif (9-10 S) ou transformé. L'utilisation de conditions dénaturantes ne peut se concevoir que dans l'éventualité d'une liaison covalentielle récepteur-hormone tritiée. Dans cette intention, des marqueurs électrophiles, tels que le mésylate de dexaméthasone (29-30) ou le photomarquage du complexe récepteur-acétonide de triamcinolone (31), ont été employés avec succès.

Les résultats concordants retrouvés par ces différents groupes peuvent être résumés de la manière suivante (figure 4) :

- le monomère (4-5 S et R_g : 6,0 nm) constitué d'une chaîne polypeptidique unique a un poids moléculaire compris entre 90 et 100000. Il comporte trois domaines fonctionnels distincts, les sites de liaison au stéroïde et au DNA (domaines A et B), et la partie immunoréactive (domaine C).
- la chymotrypsine permet de discerner un fragment de poids



Modèle de GUSTAFSSON (27)



Modèle de VEDECKIS (15)



FIGURE 4

Structure du monomère 90 - 100 000 correspondant au récepteur sous forme transformée

Les deux modèles proposés font apparaître une structure en trois domaines distincts :

- A. Domaine du site de liaison au stéroïde (H)
- B. Domaine du site de liaison au DNA
- C. Domaine immunogène modulateur

Les coupures par les protéases se font dans des zones privilégiées et permettent de mettre en évidence les différents fragments mentionnés. Le plus petit fragment comportant le site de liaison à l'hormone a été dénommé méro-récepteur.

(Le pont disulfure intrachaîne au niveau du domaine B est hypothétique).

- moléculaire 40 à 53000 selon les auteurs (R_S : 3,3 - 3,6 nm) qui est composé des deux domaines comportant les sites de liaison au stéroïde et au DNA respectivement. Le comportement de ce fragment vis à vis du DNA, comparé à celui du monomère intact, est particulier. Il y a augmentation des interactions non spécifiques, mais par contre diminution des interactions spécifiques au niveau des sites de régulation propres aux glucocorticoïdes (32).
- par action de la trypsine sur le fragment précédent, un fragment (R_S : 1,9 nm et M_r 24 à 27000) comportant le site de liaison à l'hormone, peut être isolé. Ce fragment a été identifié au méro-récepteur.
 - le troisième domaine (C) responsable du caractère immunogène du monomère (R_S : 2,6 nm et M_r 43 à 49000) a été appelé domaine "modulateur". Bien que son rôle exact demeure inconnu, il apparaît que sa présence est indispensable aux modalités de fonctionnement du récepteur et à la régulation au niveau des gènes (32).

* Structure hétéromérique du complexe hormone-récepteur sous forme transformée.

Ce concept provient des résultats récents concernant d'une part l'interaction avec un RNA et d'autre part l'association avec la protéine 72000. L'interaction avec le RNA (voir § I,A) qui a été décrite pour la forme transformée intermédiaire a été montrée pour le récepteur purifié par GRANDICS et al. (33). Ces auteurs mettent en évidence, à côté du monomère de M_r 90000, un fragment plus petit (M_r 24000) fortement phosphorylé et dont le comportement vis à vis des colorants des protéines est particulier. Ce fragment pourrait être de nature ribonucléique.

La présence d'un fragment de M_r 72000 a été reconnue par GUSTAFSSON et al. dans les préparations purifiées de récepteur sous forme transformée (26, 32). Elle semble résulter d'une copurification ; le rapport des deux espèces est de 1,6 monomère 94000 pour 1 fragment 72000. Des analyses de la stoechiométrie de l'interaction récepteur purifié-DNA en présence ou en l'absence de cette protéine 72000 montrent que l'association se fait selon un rapport 1/1 et que cette protéine agit en augmentant l'interaction spécifique avec le DNA. La présence du domaine modulateur C est indispensable à cette action.

La structure générale du monomère, ou récepteur transformé a pu être précisée ; cependant, de nombreuses inconnues subsistent dans la compréhension des interactions avec d'autres macromolécules.

II - ASPECT FONCTIONNEL

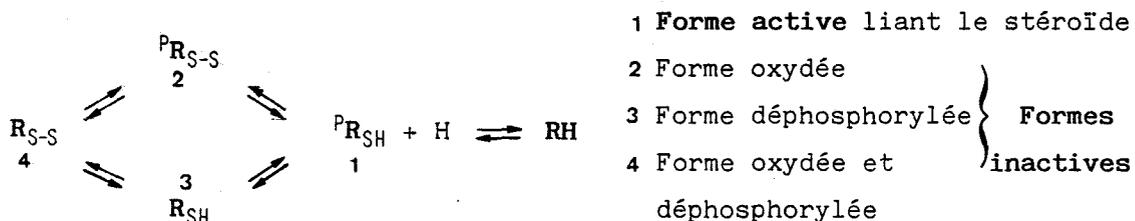
Le modèle général rappelé au début de ce chapitre a été complété en de nombreux points. Un schéma plus récent, proposé par SCHMIDT et LITWACK (34) en 1982 se réfère aux mêmes étapes en précisant le mécanisme de chacune.

A) ACTIVATION $R_i \rightleftharpoons R_a$

Le passage de la forme inactive du récepteur à la forme apte à lier le stéroïde représente la première étape de ce mécanisme, encore appelée "activation". Les hypothèses actuellement admises quant à son déroulement, ont été proposées essentiellement par le groupe de PRATT (35-36). Le modèle initial tient compte des exigences suivantes :

- la thermodépendance du phénomène est en faveur d'un mécanisme enzymatique qui, cependant, n'est pas une protéolyse en raison de l'inefficacité des antiprotéases.
- le molybdate agit sur cette réaction comme un inhibiteur des phosphatases, de façon analogue aux ions fluorure.
- en l'absence de dithiothréitol, les inhibiteurs des phosphatases sont inefficaces.

Il existe donc deux processus, l'un d'oxydation et l'autre de déphosphorylation qui inactivent le récepteur, selon le schéma :



Les travaux ultérieurs menés par le même groupe ont permis de compléter ce schéma.

L'identification du mécanisme réducteur, au système thiorédoxine-thiorédoxine réductase NADPH dépendant (37) d'une part et la mise en évidence de l'inactivation par une phosphatase en présence de molybdate, suivie de la réactivation du récepteur par réduction d'autre part, ont conduit au modèle de la figure 5. Les formes 1 et 2 sont aptes à lier l'hormone, les formes 3 et 4 ne sont pas liantes mais réversibles par réduction, et la forme 5 est dite inactive et non réversible. Les composés comme les ions fluorure, le facteur f thermostable de petit poids moléculaire et les composés phosphorylés qui ralentissent l'inactivation, agiraient en tant qu'inhibiteurs des phosphatases. Le molybdate interviendrait par interaction directe, peut-être au niveau d'une cystéine, empêchant un changement conformationnel qui conduirait à une oxydation irréversible. La phosphorylation du récepteur n'apparaît pas comme indispensable à la liaison, mais semble stabiliser une conformation qui empêche l'oxydation d'un ou plusieurs groupement(s) thiol(s). Aucune démonstration directe (incorporation de ^{32}P) de la phosphorylation par l'ATP du récepteur cytosolique inactif n'a été réalisée, cependant l'existence d'un mécanisme de phosphorylation in vivo (38) a été démontrée de façon indiscutable.

De nombreux composés agissent sur cette première étape en favorisant ou en inhibant l'activation ou l'inactivation, ce qui se traduit expérimentalement par une augmentation ou une diminution de la capacité de liaison. Le tableau I présente la liste de ces "modulateurs" de l'activation. Il convient de remarquer que tous ces effets ont été mesurés sur des préparations brutes de cytosol et que malgré les multiples contrôles, il est impossible d'exclure un effet indirect de ces réactifs. D'autre part, il est difficile de faire la part entre un effet modulateur de l'activation et un effet direct sur la liaison. En effet dans la plupart des cas, les études de liaison ne sont faites qu'à une seule concentration en hormone. Dans ces conditions, pour un système à l'équilibre, il est impossible de trancher entre une diminution du nombre de sites et une modification de l'affinité. Enfin, parmi ces modulateurs, le facteur f stabilisant de petit poids moléculaire n'a toujours pas été identifié malgré une caractérisation physicochimique importante et une purification partielle (39). Ce facteur intervient également dans la suite du mécanisme d'action au niveau de la transformation.

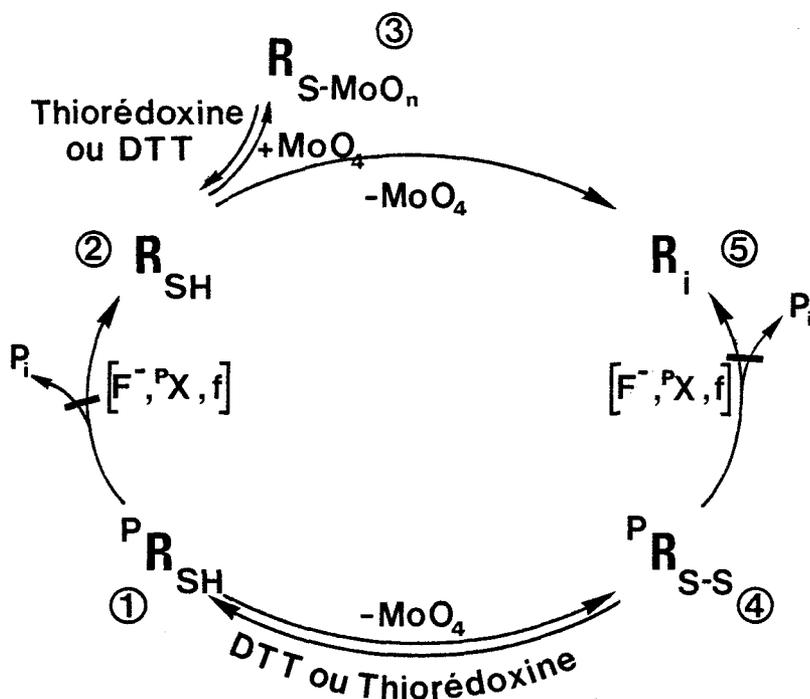


FIGURE 5

Modèle hypothétique décrivant les divers états du récepteur présent dans le cytosol

Les formes 1 et 2 sont liantes ; les formes 3 et 4 ne sont pas liantes, mais réactivables par réduction ; enfin, la forme 5 est inactive. Les ions fluorures (F^-), les composés phosphorylés (P^X) et le facteur f stabilisant agissent comme inhibiteurs des phosphatases. Le molybdate interagit directement avec le récepteur. D'après HOUSLEY et al. (36).

Caractères physicochimiques du facteur stabilisant f .

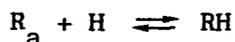
- $M_r \approx 700$
- Thermostable
- Lié à des macromolécules de $M_r \approx 30\ 000$
- Résistant aux enzymes hydrolytiques : protéases, nucléases, glycohydrolases, phospholipases, lipase et phosphatase alcaline
- Chargé négativement
- Différent du phosphate inorganique, des nucléotides, nucléotides cycliques et du phosphate de pyridoxal
- Inhibiteur des phosphatases et des phosphoprotéines phosphatases.

<u>PRODUIT</u>		<u>EFFET SUR L'ACTIVATION</u>	<u>REFERENCES</u>
	Effet	Mécanisme proposé	
ATP	↗	Phosphorylation ATP dépendante	SANDO J <u>et al</u> , J.B.C. (1979) <u>254</u> , 4772-4778
ADP	↗	Action directe sur le récepteur	BARNETT C <u>et al</u> , Endocrinology (1983) <u>112</u> , 2059-206
DTT	↗	Réduction d'un thiol	GRIPPO J <u>et al</u> , J.B.C. (1983) <u>258</u> , 13658-13664 HOUSLEY P <u>et al</u> , J.B.C. (1982) <u>257</u> , 8615-8618
Molybdate	↗	Maintien d'un thiol sous forme réduite ou apte à être réduit	NIELSEN C <u>et al</u> , J.B.C. (1977) <u>252</u> , 7568-7578
Fluorure	}	Inhibiteurs de phosphatases	NIELSEN C <u>et al</u> , J.B.C. (1977) <u>252</u> , 7568-7578
Glucose 1 P			
Tungstate			
Glycérol	↗	Modification de l'environnement hydrophile du récepteur	SCHAUMBURG B <u>et al</u> , B.B.A. (1972) <u>261</u> , 219-235
Citrate	↗	Aucun mécanisme proposé	HUBBARD J <u>et al</u> , Biochem. J. (1983) <u>210</u> , 259-263
Calpastatine	↗	Inhibiteur de protéases Ca dépendantes	BODWELL J <u>et al</u> , J.B.C. (1985) <u>260</u> , 2601-2604
Ions métalliques	+/-	Effet de la force ionique	DENSMORE C <u>et al</u> , Life Sci. (1984) <u>35</u> , 2237-2246 KALIMI M <u>et al</u> , J. Ster. B., (1983) <u>18</u> , 665-671
Chélateurs	+/-	Effet sur une métalloprotéine de régulation associée ou sur le récepteur	DENSMORE C <u>et al</u> , Life Sci. (1984) <u>35</u> , 2237-2246 HUBBARD J <u>et al</u> , B.B.A. (1983) <u>755</u> , 178-185
N maléimides	↘	Fixation au niveau d'un thiol	FORMSTECHEP P <u>et al</u> , B.B.A. (1984) <u>802</u> , 306-313
Thiocyanate	↘	Effet chaotropique	KALIMI M <u>et al</u> , B.B.A. (1982) <u>719</u> , 488-494
Phospholipase A ₂	↘	Libère des lysophosphatides qui ont une action détergente	LEACH K <u>et al</u> , J. Ster. B. (1983) <u>18</u> , 105-107
Héparine	↘	Interaction directe avec le récepteur au niveau d'une région chargée positivement	HUBBARD J <u>et al</u> , B.B.A. (1983) <u>755</u> , 363-368 Mc BLAIN W <u>et al</u> , J. Ster. B. (1984) <u>20</u> , 1211-1220
Phosphatase alcaline	↘	Déphosphorylation	NIELSEN C <u>et al</u> , P.N.A.S. (1977) <u>74</u> , 1392-1402

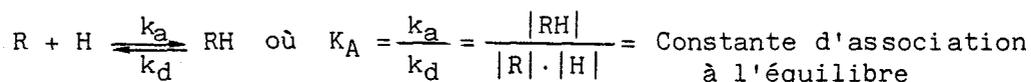
TABLEAU I

Composés agissant au niveau de l'étape d'activation

B) LIAISON A L'HORMONE



Initialement mise en évidence avec la découverte des récepteurs, l'étape de liaison a fait l'objet de nombreuses études et de revues bien documentées (40-41). Elle répond à l'expression :



qui rend compte d'une réaction réversible où le complexe hormone-récepteur est non covalent.

L'étude à l'équilibre met en évidence une seule classe de sites de liaison à haute affinité, saturables et spécifiques. La linéarité des diagrammes de Scatchard suggère qu'il n'existe pas de coopérativité. Les études cinétiques confirment l'hypothèse d'un modèle bimoléculaire, en effet, la cinétique d'association est d'ordre 2 et la cinétique de dissociation d'ordre 1. Les travaux récents, par simulation de courbes et comparaison avec les résultats expérimentaux, menés par YEAKLEY et al. (42) corroborent l'hypothèse d'un modèle bimoléculaire.

Le récepteur des glucocorticoïdes lie un grand nombre de stéroïdes naturels ou synthétiques, dont certains sont des hormones actives dans d'autres systèmes biologiques (par exemple la progestérone). Ces stéroïdes peuvent être agonistes ou antagonistes au niveau de la réponse biologique induite par la liaison. Parmi les exigences structurales nécessaires à la reconnaissance du stéroïde au niveau du site de liaison, seules la structure 4-ène et la substitution 11 β-OH apparaissent essentielles (43). La modulation de l'affinité en fonction des divers substituants introduits sur le noyau prégnane a fait l'objet d'études structure-activité (44, 45) dont l'intérêt principal réside dans l'application au "drug design".

La liaison est modifiée par un certain nombre de paramètres physicochimiques. Le pH optimum est voisin de 7,2 et l'affinité augmente avec la force ionique par renforcement des interactions hydrophobes (46). De nombreux composés, soit exogènes, soit endogènes, peuvent également inhiber ou stimuler la liaison par des mécanismes très différents. Les principaux sont regroupés dans le tableau II. L'utilisation des réactifs

<u>COMPOSES</u>	<u>EFFET</u>	<u>MECANISME PROPOSE</u>	<u>REFERENCES</u>
Pyrioxodal 5'P	↘ K _A	Interaction avec une lysine	DI SORBO D <u>et al</u> , Endocrinology (1980) <u>106</u> , 922-929
Phénylglyoxal	↘ K _A	} Interaction avec une arginine	{ SHYAMALA G <u>et al</u> , J.B.C. (1982) <u>257</u> , 11976-11981 DI SORBO D <u>et al</u> , Endocrinology (1980) <u>106</u> , 922-929
1-2 cyclohexane dione	↘ K _A		
N maléimide	} ↘	Interaction avec une cystéine	YOUNG H <u>et al</u> , P.N.A.S. (1975) <u>72</u> , 3060-3064
Iodoacétamide			
p chloromercuri phénylsulfonate	↘ K _A	Interaction avec une cystéine	HARRISON R <u>et al</u> , B.B.A. (1983) <u>759</u> , 1-6
Calcium	↘ K _A ↘ R _O	Interaction avec le récepteur	ROUSSEAU G <u>et al</u> , B.B.R.C. (1982) <u>106</u> , 16-22 KALIMI M <u>et al</u> , J. Ster. B. (1983) <u>18</u> , 665-671
Molybdate	+/- K _A	Interaction avec le récepteur	CARDO P <u>et al</u> , Eur.J.Biochem. (1983) <u>137</u> , 173-178 BLANCHARDIE P <u>et al</u> , Steroids (1984) <u>44</u> , 159-174
Tungstate	?	Interaction directe avec le récepteur	MURAKAMI N <u>et al</u> , Biochem. J. (1982) <u>204</u> , 777-786
ATP	?	Interaction directe avec le récepteur	MOUDGIL V <u>et al</u> , Biochem. J. (1980) <u>190</u> , 799-808
B lapachone	↘ K _A	Interaction avec le récepteur au niveau d'une cystéine	SCHMIDT T <u>et al</u> , J.B.C. (1984) <u>259</u> , 9536-9543
Ester méthylique du tryptophane	↘ K _A	Inhibiteur compétitif de la liaison	BAKER M <u>et al</u> , FEBS Lett. (1982) <u>143</u> , 21-25
Antagoniste de la calmoduline	↘ K _A	Interaction directe peut-être au niveau d'un site hydrophobe	VAN BOHEMEN C <u>et al</u> , FEBS Lett. (1982) <u>143</u> , 21-25
Na/K ATPase	↘ R _O	Dissociation d'un complexe ATP/récepteur nécessaire à la liaison	TOWLE A <u>et al</u> , Mol Cell Biochem. (1983) <u>52</u> , 145-151
Inhibiteurs des protéases	?	Interaction avec une cystéine	HUBBARD J. <u>et al</u> , B.B.A. (1984) <u>798</u> , 187-191
Lectines (Ulex ; LCA)	↘ K _A	Interaction directe avec le récepteur par un reste osidique	BLANCHARDIE P <u>et al</u> , J. Ster. B (1986) <u>24</u> , 263-267
Théophylline	↗ K _A	Interaction directe avec le récepteur	CAKE M <u>et al</u> , Eur. J. Biochem. (1978) <u>82</u> , 97-103

TABLEAU II

Composés agissant sur la liaison hormone-récepteur

spécifiques des acides aminés a permis de reconnaître la présence au niveau ou à proximité du site de liaison, de résidus lysine, arginine et cystéine. Il a été également suggéré l'existence de domaines structuraux particuliers, un domaine analogue au site actif des protéases à sérine et une zone hydrophobe encadrée par des régions hydrophiles à proximité du site actif (47). Enfin, il existerait un second site de nature hydrophobe qui pourrait être impliqué dans la liaison de certains stéroïdes ou de composés hydrophobes non stéroïdiens (phénothiazines) et affecter de façon allostérique le site de liaison "véritable" (48).

De nouvelles perspectives dans l'étude du site de liaison de l'hormone sont apparues avec les travaux du groupe de SIMONS (30, 49), orientés vers le marquage d'affinité (50). Parmi les stéroïdes alkylants, le mésylate de dexaméthasone s'est révélé comme un marqueur covalentiel du récepteur des glucocorticoïdes. L'interaction au niveau du site semble impliquer une cystéine (30). Largement utilisé par de nombreux groupes, ce composé permet de s'affranchir de l'étape de dissociation et donc d'utiliser de nombreuses techniques telles que digestion enzymatique ou électrophorèse dénaturante PAGE/SDS par exemple. D'autres approches ont été suggérées par le même groupe, notamment la possibilité de marquage fluorescent par chimioaffinité en faisant réagir l'o.phtalaldéhyde in situ entre un résidu thiol de la protéine et un stéroïde aminé (51). Une autre alternative repose sur la synthèse de stéroïdes fluorescents (complexe dexaméthasone-rhodamine par exemple) proposée par PONS et al. (52). Le développement technologique devrait permettre dans un proche avenir d'utiliser avec succès ce type de composés fluorescents dont les potentialités sont plus attrayantes que celles des classiques dérivés tritiés.

C) TRANSFORMATION $RH \rightleftharpoons R^*H$

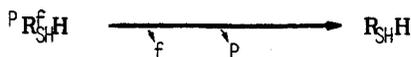
Après la liaison à l'hormone, le complexe hormone-récepteur va interagir au niveau de la chromatine. Cependant, la translocation nucléaire et l'interaction avec le DNA ne sont possibles que si ce complexe acquiert des propriétés nouvelles. Cette suite de modifications structurales et fonctionnelles a été définie comme l'étape de transformation.

Les modifications physicochimiques du milieu acellulaire à l'origine de ce phénomène et la mise en évidence du complexe hormone-récepteur sous forme transformée ont été développées dans plusieurs revues générales récentes (34, 53-57). La diversité des facteurs induisant la transformation ainsi que l'étendue des modifications physicochimiques du complexe hormone-récepteur, rendent délicate l'interprétation du phénomène (voir encadré 1) Plusieurs hypothèses ont été proposées qui tentent d'apporter une interprétation du mécanisme moléculaire. Ces hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives mais vraisemblablement associées dans un modèle complexe qui reste à établir.

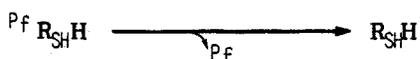
1) Modification chimique ou perte d'un facteur "associé".

La variation de la charge globale du complexe hormone-récepteur au cours de la transformation, qui se traduit par un comportement différent vis à vis des échangeurs d'ions, peut être due à des modifications discrètes au niveau d'un ou de quelques acides aminés. La phosphorylation ou la déphosphorylation peuvent affecter ainsi la charge globale de la protéine, soit directement, soit en remaniant la structure second-tertiaire, et modifier de cette façon son affinité vis à vis des polyanions et du DNA. Le groupe de PRATT (35) et BARNETT et al. (58) ont montré qu'en présence de phosphatase alcaline, le taux de transformation était augmenté et que la réaction était inhibée par les inhibiteurs des phosphatases tels que le molybdate ou le vanadate. SCHMIDT et LITWACK (34) à partir de données concordantes entre inactivation et transformation, envisagent que les deux processus relèvent d'un mécanisme biochimique analogue et proposent deux modèles faisant intervenir une déphosphorylation :

- soit la déphosphorylation du complexe hormone-récepteur, associée à la dissociation du facteur f de petit poids moléculaire.



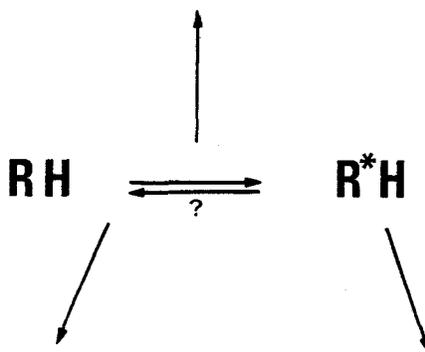
- soit la dissociation du facteur f qui est lui même phosphorylé, la déphosphorylation induisant cette dissociation.



CONDITIONS PROVOQUANT IN VITRO
LA TRANSFORMATION

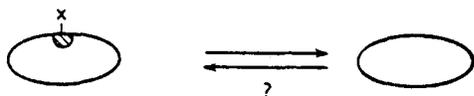
ENCADRE 1

- Elévation de température
- Augmentation du pH
- Augmentation de la force ionique
- Dilution du cytosol
- Gel filtration

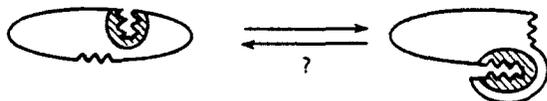


MECANISMES MOLECULAIRES PROPOSES

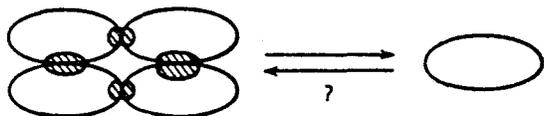
- Modification chimique



- Changement conformationnel



- Dissociation de sous-unités



- Protéolyse

- Artefact

PROPRIETES DIFFERENTIELLES DE R*H/RH

- Liaison aux noyaux isolés
- Changement d'affinité vis à vis des échangeurs d'ions

Augmentation de liaison à

- ATP Sépharose
- DNA Cellulose
- Phosphocellulose
- Héparine agarose

Diminution de liaison à

- DEAE cellulose
- QEAE cellulose

- Diminution de la constante de sédimentation
- Diminution de la taille apparente en gel filtration
- Diminution de la vitesse de dissociation de l'hormone



Modifications physicochimiques induisant la transformation et leurs conséquences au niveau des propriétés du complexe hormone-récepteur

Les résultats ultérieurs rapportés par le même groupe suggèrent que cette hypothèse ne convient pas parfaitement. En effet, MILLER-DIENER et al. (59) montrent que le récepteur purifié est phosphorylé in vitro, après transformation, par un mécanisme ATP et calcium dépendant. L'activité kinase semble faire partie intégrante du récepteur. Cette phosphorylation ne se produit pas en présence de récepteur non transformé ou après addition d'inhibiteur de la transformation. HOUSLEY et PRATT (38) par une approche différente, démontrent également que le monomère 98000 ou récepteur transformé est phosphorylé.

De façon similaire, l'implication d'un facteur modulateur f déjà évoqué dans le mécanisme d'activation apparaît plausible. De nombreux résultats étayent cette hypothèse :

- plusieurs auteurs ont mis en évidence un inhibiteur endogène (34) dont les caractères physicochimiques et les propriétés ont été décrites.
- la dissociation de ce facteur f associé par abaissement de sa concentration explique l'apparition de complexes transformés à la suite d'une dialyse ou d'une gel filtration. Celle-ci pourrait s'accompagner du dévoilement d'une région de la protéine chargée positivement.

Touffefois, la perte de ce facteur ou élément modulateur, qu'il soit ou non phosphorylé, de même que la simple déphosphorylation, ne peuvent pas expliquer la diminution du rayon de Stokes et du coefficient de sédimentation.

2) Changement conformationnel.

Le changement de conformation représente l'hypothèse primitive. Les arguments en faveur de ce mécanisme sont :

- d'une part, l'apparition d'une affinité vis à vis des polyanions qui peut s'expliquer par l'exposition de charges positives à la surface de la protéine à la suite d'une modification de structure. L'augmentation du point isoélectrique après transformation, de 6,5 à 7,6 rapportée par BEN OR et CHRAMBACH (60) concorde avec cette interprétation.

- d'autre part, l'étude cinétique du phénomène montre que la réaction est d'ordre 1, dans la mesure où l'expérience est réalisée en présence de cytosol dilué pour supprimer l'interaction avec le composé inhibiteur (53).

Cette hypothèse d'une transconformation apparaît séduisante, mais elle ne permet pas, comme la précédente, de rendre compte de la variation des paramètres moléculaires.

3) Dissociation de sous-unités.

Trois alternatives ont été suggérées : formation du monomère à partir de l'hétéromère, dissociation d'un RNA associé ou encore protéolyse. L'étude structurale des différentes formes du récepteur démontre clairement qu'à l'état natif, il s'agit d'un hétéromère dont le site de liaison au DNA n'est pas accessible. Après transformation, la caractérisation physicochimique, sur cytosol ou après purification, du récepteur établit qu'il s'agit d'un monomère dont le site de liaison au DNA est accessible. Plusieurs groupes ont confirmé ces résultats (12, 14, 15, 61) et l'hypothèse d'un mécanisme de transformation basé sur une dissociation de la forme hétéromérique a été formulée. ARANYI (62) a récemment démontré la réalité de cette hypothèse en utilisant des diimidates qui par "cross-linking" (pontage) des sous-unités empêchent la transformation et stabilisent le récepteur sous forme oligomérique.

Les éléments qui ont conduit à la mise en cause d'un fragment de RNA, proviennent des observations concernant l'action de la RNase rapportées par TYMOCZKO et al. (63,64) et par CHONG et LIPPMAN (65). L'addition de RNase exogène stimule la transformation (apparition de la forme 4 S et liaison à la DNA-cellulose) ; l'addition de RNA cytosolique ou de molybdate produit l'effet inverse. HUTCHENS et al. (66) ont également signalé que l'addition de RNA à des préparations partiellement purifiées de récepteur transformé permettait de rétablir le complexe dans sa forme native de coefficient de sédimentation égal à 9 S. Récemment, ECONOMIDIS et ROUSSEAU (67) en appliquant des techniques de "cross-linking", ont démontré la présence de RNA associé au récepteur sous forme non transformée. Ce RNA maintiendrait le récepteur sous forme non transformée en masquant (ou non) le site de liaison au DNA. La transformation résulterait alors de la dissociation de ce RNA.

L'hypothèse d'un mécanisme protéolytique conduisant à la transformation a été avancée sur la base de la similitude des fragments obtenus sous l'action de certaines protéases exogènes avec le récepteur transformé. Pour répondre à cette hypothèse, VEDECKIS (68) a comparé les diverses formes de récepteur au cours de la transformation dans deux matériels biologiques différents, le foie de souris qui renferme des protéases et les cellules pituitaires AtT-20 qui en sont dépourvues. En fait, cette absence d'activité protéolytique n'empêche pas la transformation, ce qui exclut donc cette hypothèse.

Un mécanisme reposant sur la dissociation de sous-unités, qu'elles soient de nature protéique ou ribonucléique, est compatible avec la plupart des modifications physicochimiques induites par la transformation. Cependant, les effets de certains facteurs modulateurs sont difficiles à envisager dans un modèle par dissociation.

4) Modulateurs de la transformation et site de liaison au DNA.

Parmi les nombreux composés chimiques, qui agissent au niveau de cette étape de transformation, il convient de distinguer deux groupes, d'une part ceux qui affectent le phénomène de transformation lui-même, d'autre part ceux qui agissent au niveau du site de liaison au DNA et inhibent donc la liaison.

Les premiers (Tableau III) ont permis de compléter les hypothèses formulées quant au mécanisme d'action et certains de ces composés ont été mentionnés à ce titre dans le paragraphe précédent. Pour les autres, les résultats sont contradictoires et aucune conclusion précise n'a pu être formulée. L'interprétation est rendue délicate par la complexité du milieu biologique et par la diversité des méthodes de mise en évidence. L'utilisation de préparations purifiées de récepteur pourrait être bénéfique à ce titre, dans la suite de cette étude.

Les seconds (Tableau IV) agissent en se fixant sur le récepteur au niveau du site de liaison au DNA ou à proximité, empêchant ainsi l'interaction avec ce dernier. C'est ainsi que la nature de certains acides aminés a pu être précisée (histidine, lysine, arginine) en utilisant les réactifs spécifiques de ces derniers. D'autre part, il a été suggéré l'intervention d'un ion métallique et enfin il a été proposé

<u>COMPOSES</u>	<u>EFFET</u>	<u>MECANISME PROPOSE</u>	<u>REFERENCES</u>
Phosphatase alcaline	}	Stimulation de la déphosphorylation	BARNETT C <u>et al</u> , Biochemistry (1980) <u>19</u> , 5445-5455
Composés phosphorylés			
Molybdate	}	Inhibition de la déphosphorylation	
Tungstate			
Vanadate			
Ribonucléase	↗	Stimulation de la dissociation d'un RNA associé	TIMOCZKO J <u>et al</u> , Endocrinology (1983) <u>112</u> , 142-14 KOVACIC B <u>et al</u> , Biochemistry (1985) <u>24</u> , 7357-7366
ATP	↗	Interaction avec le récepteur qui provoquerait la dissociation	MOUDGIL V <u>et al</u> , Biochem.J. (1980) <u>190</u> , 799-808
Amines	↗	Favorise la dissociation de l'inhibiteur de faible poids moléculaire	PARCHMAN L <u>et al</u> , FEBS Lett. (1977) <u>79</u> , 25-28
Bases xanthiques	↗	Favorise la dissociation de l'inhibiteur ou interagit avec pour le rendre inefficace	CAKE M <u>et al</u> , Eur.J.Biochem. (1978) <u>82</u> , 97-103
Facteur macromoléculaire	↗	(serait la ribonucléase ?)	SCHMIDT T <u>et al</u> (1985) J.B.C. (1985) <u>260</u> , 16255-262
N maléimide	}	Blocage d'un SH indispensable	YOUNG H <u>et al</u> , P.N.A.S. (1975) <u>72</u> , 3060-3064 KALIMI M <u>et al</u> , J.B.C. (1980) <u>255</u> , 4687-4690
Acide iodo-acétique			
Diimidate de l'ac.sébacique	↘	"Cross linking" des sous-unités empêchant la dissociation	ARANYI P, B.B.R.C. (1984) <u>20</u> , 19-22
Lithium	↘	Interaction directe au niveau du récepteur	ANDREASEN P, J.Ster .B.(1982) <u>17</u> , 577-579
Inhibiteur endogène	↘		LEACH K <u>et al</u> , J.B.C. (1982) <u>257</u> , 381-388
RNA	↘	Réassociation avec le récepteur complexe intermédiaire	HUTCHENS W <u>et al</u> , B.B.R.C. (1982) <u>105</u> , 20-27
Ions divalents	+/-	Peut-être par l'intermédiaire de protéases calcium dépendantes	MILGROM E <u>et al</u> , Biochemistry (1973) <u>12</u> , 5198-5205 KALIMI M <u>et al</u> , J.B.C. (1975) <u>150</u> , 1080-1086 HUBBARD J <u>et al</u> , B.B.A. (1983) <u>755</u> , 178-185

TABLEAU III

Composés agissant sur l'étape de transformation

<u>COMPOSES</u>	<u>MECANISME PROPOSE</u>	<u>REFERENCES</u>
Pyridoxal 5' phosphate	Formation d'une base de Schiff avec l' ϵ NH ₂ des lysines au niveau du site de liaison au DNA.	CAKE M <u>et al</u> , J.B.C. (1978) <u>253</u> , 4886-4891
Rose bengale	Modification chimique des résidus histidine au niveau du site de liaison au DNA	DI SORBO D <u>et al</u> , Endocrinology (1980) <u>106</u> , 922-929
Pyrocarbonate d'éthyle		
1,2-cyclohexane dione	Modification chimique des résidus arginine au niveau du site de liaison au DNA	
Méthylméthane thiosulfonate	Modification chimique des groupements SH par alkylation au niveau du site de liaison au DNA	BODWELL J <u>et al</u> , Biochemistry (1984) <u>23</u> , 1392-1398 KALIMI M <u>et al</u> , J.B.C.(1980) <u>255</u> , 4687-4690
5,5' DTNB		
N Maléimide		
Ac.iodoacétique		
1,10 phénanthroline	Agent chélatant des métaux, se fixe-rait sur le récepteur (= métalloprotéine)	SCHMIDT T <u>et al</u> , Endocrinology (1981) <u>109</u> , 803-812
Rifamycine AF/013	Fixation sur le site DNA du récepteur (communauté antigénique entre récepteur et DNA polymérase)	SCHMIDT T <u>et al</u> , P.N.A.S. (1982), <u>79</u> , 4555-4449
Anticorps anti-DNA polymérase		
Acide aurine-tricarboxylique	Interaction au niveau du site de liaison au DNA	MOUDGIL V <u>et al</u> , J. Ster. B (1982) <u>17</u> , 585-589
Bromure d'éthidium	Agent intercalant destabilisant le DNA	CAKE M <u>et al</u> , J.B.C. (1977) <u>253</u> , 4886-4891
Ions Mg ⁺⁺	Interaction au niveau du DNA	CARLSTEDT DUKE J <u>et al</u> , Biochem. Pharmacol. (1984) <u>33</u> , 913-916.

TABLEAU IV

Composés inhibant la liaison du complexe hormone-récepteur au DNA

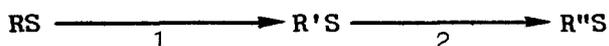
la participation d'un résidu cystéine. Ce dernier résultat a été confirmé par une étude chromatographique menée par BODWELL et al. (69), mettant en oeuvre des gels d'affinité à groupement thiol. Le récepteur sous forme transformée interagit avec l'un des gels, cette interaction est inhibée en présence de DNA soluble. Le comportement différent du récepteur non transformé vis à vis des mêmes gels permet de distinguer le groupement thiol impliqué dans la liaison à l'hormone, du groupement impliqué dans la liaison au DNA.

Parallèlement à ces études structurales, d'autres auteurs ont cherché à établir un schéma global du mécanisme de transformation.

5) Schéma global du mécanisme.

- Etude in vitro.

VEDECKIS (15) a proposé un modèle hypothétique représenté sur la figure 6. La transformation se déroule en deux temps. La première étape associe déphosphorylation, perte du facteur f inhibiteur de petit poids moléculaire et dissociation du complexe non transformé 9-10 S. L'exposition de charges positives à la surface de la protéine rend possible l'interaction avec le DNA. La deuxième étape induite par augmentation de la force ionique fait intervenir la dissociation d'un dimère ou d'un élément ribonucléoprotéique associé et conduit au récepteur monomérique transformé. Ce modèle est en bon accord avec les derniers résultats de SCHMIDT et al. (70-71) obtenus à partir de préparations purifiées de récepteur, qui répond au mécanisme suivant :



A partir de ces résultats in vitro, les mêmes auteurs ont très récemment proposé le schéma hypothétique reproduit sur la figure 7 (72). Le récepteur non transformé serait constitué symétriquement de deux sous-unités liantes 90000, deux polypeptides 40000, un modulateur et deux RNA 24000. La première étape irréversible fait intervenir la dissociation du modulateur qui provoque une désagrégation partielle du complexe et la déphosphorylation. La forme intermédiaire dimérique, de poids moléculaire 230000, comporte les deux RNA associés aux sous-unités 90000. Dans la deuxième étape, réversible, il y a élimination du RNA stimulée par un facteur cytosolique. Le monomère 90000 peut alors interagir avec le DNA. Ce modèle en deux étapes est parfaitement compatible avec le précédent.

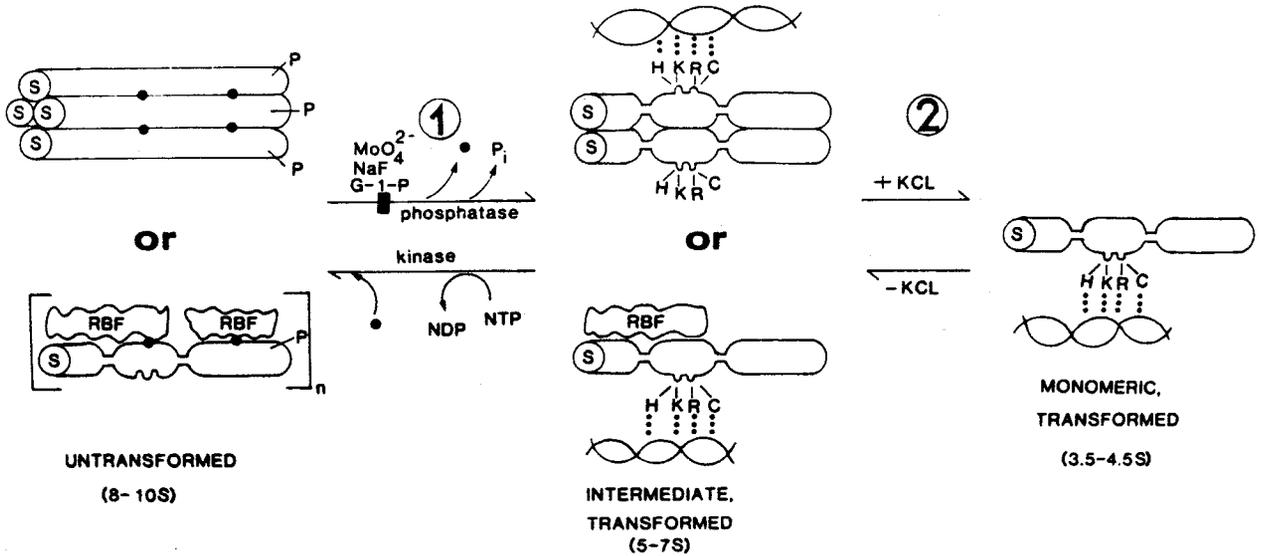


FIGURE 6

Schéma hypothétique du mécanisme de la transformation proposé par VEDECKIS (15)

Sur la base des résultats concernant la structure, deux arrangements du récepteur non transformé sont présentés : soit homomérique, soit hétéromérique. La réaction se fait en deux temps :

① Il y a déphosphorylation, départ du facteur f stabilisant de petit poids moléculaire et dissociation de la molécule conduisant à un dimère où le site spécifique du DNA se trouve exposé. Cette étape est inhibée par les inhibiteurs de phosphatases (molybdate, fluorure et composés phosphorylés). Elle serait réversible sous l'action d'une kinase et après réassociation avec le facteur f.

② Cette étape, favorisée par la force ionique, permet par dissociation d'aboutir au monomère, qui représente la forme transformée fonctionnelle.

Abréviations : H, Histidine ; K, lysine ; R, arginine ; C, cystéine (acides aminés mis en évidence au niveau du site de liaison au DNA); S, stéroïde ; NTP-NDP, nucléoside tri et diphosphate ; ● facteur f de petit poids moléculaire.

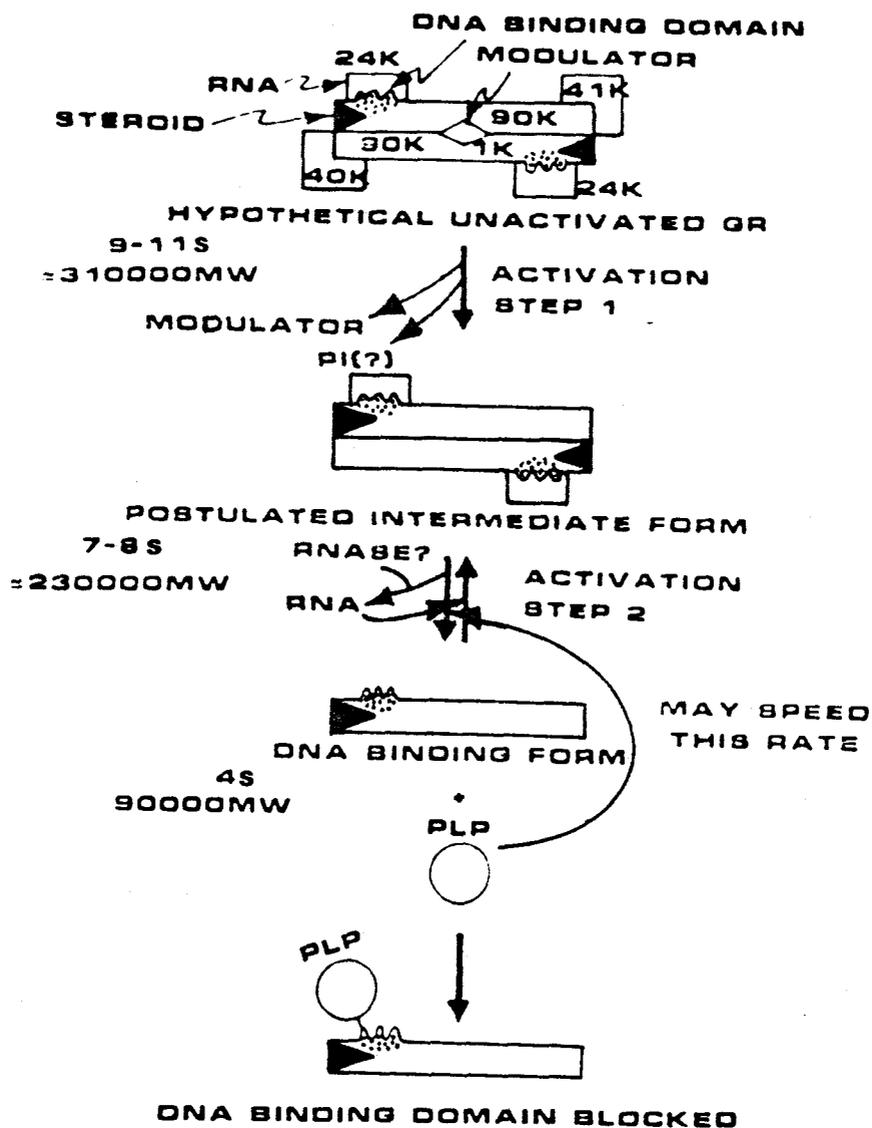


FIGURE 7

Schéma hypothétique du mécanisme de transformation proposé par LITWACK et al. (72)
 (la transformation est ici définie par le terme d'activation)

Le complexe hormone-récepteur sous forme non transformée a une structure tétramérique associant à deux sous-unités monomériques, deux polypeptides de 40 000, deux RNA et le modulateur f.

Etape 1 : il y a dissociation du complexe avec départ des sous-unités 40 000, du modulateur f et peut-être déphosphorylation . Le site de liaison au DNA reste masqué.

Etape 2 : la forme intermédiaire sous l'action de la RNase se dissocie en forme monomérique ou le site DNA apparaît accessible. Cette étape serait stimulée par le PLP.

Abréviation : PLP, phosphate de pyridoxal.

MODELE de SCHMIDT

MODELE de VEDECKIS

1ère étape	thermodépendante inhibée par MoO_4 indépendante de facteurs cytosoliques	action enzymatique déphosphorylation dissociation de sous-unités
2ème étape	indépendante de la température nécessite un facteur cytosolique thermostable	sous effet KCl action de la RNase

La seule incertitude persiste au niveau de l'identification du facteur cytosolique thermostable. Le rapprochement avec la RNase n'apparaît pas spéculatif en raison de la propriété remarquable de la RNase d'être thermostable (73). Le groupe de SCHMIDT continue actuellement les recherches dans le but de confirmer cette hypothèse (71). Les deux formes R'S et R''S postulées par SCHMIDT et al. présentent un comportement identique vis à vis des échangeurs d'ions (DEAE) mais se différencient par leur affinité vis à vis du DNA, la forme R'' S ayant une plus grande affinité.

Ce modèle in vitro est compatible avec la plupart des faits expérimentaux observés. D'autre part, il est parfaitement en accord avec les modèles d'action proposés à la suite d'études in vivo sur cellules isolées.

- Etude in vivo.

Deux modèles ont été proposés, concernant l'aspect cellulaire global du mécanisme d'action.

Le modèle cyclique (figure 8 a) établi par MUNCK et HOLBROOK (74) fait intervenir des données cinétiques et impose que des étapes limitantes du système existent au niveau des réactions de dissociation de l'hormone, dont les constantes de vitesse sont identiques. L'étape de transformation est irréversible tandis que la liaison au DNA est réversible. Le récepteur est recyclé selon un processus différent indépendant de la transformation. Ce modèle hypothétique est compatible avec les résultats expérimentaux concernant les proportions de complexes

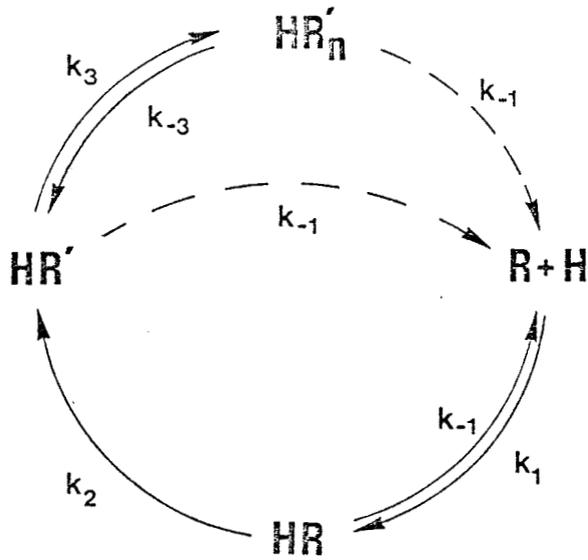


FIGURE 8 a

Modèle cyclique de MUNCK et HOLBROOK (74)

L'étape de transformation est irréversible. La dissociation du stéroïde à partir des différents complexes se fait toujours à la même vitesse. L'étape de translocation est réversible.

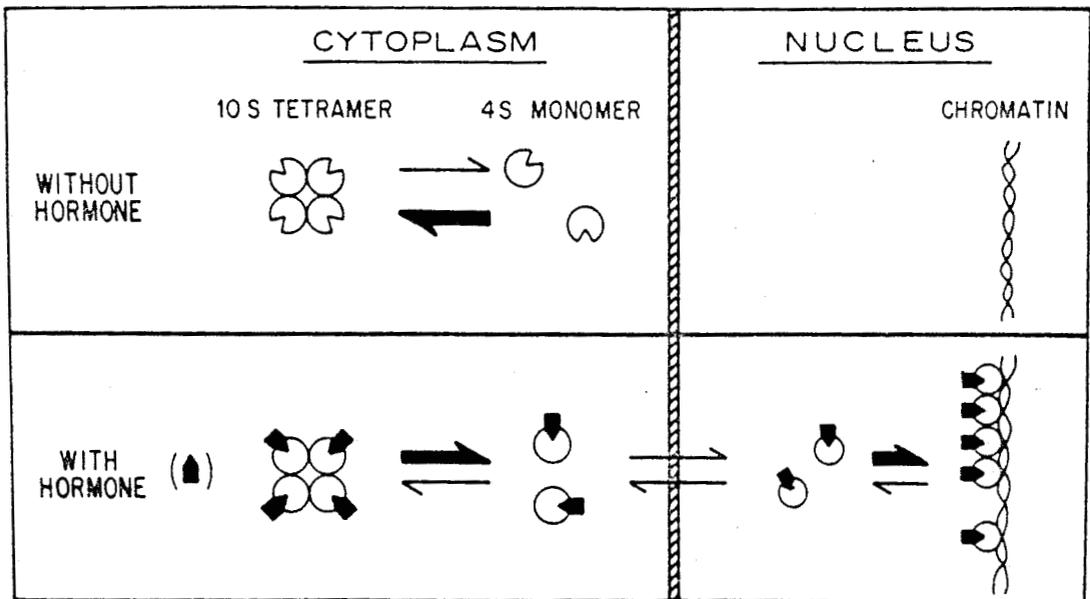


FIGURE 8 b

Modèle à l'équilibre de RAAKA et SAMUELS (75)

L'équilibre entre forme non transformée 10 S et forme transformée 4 S est déplacé dans un sens ou dans l'autre, selon l'état d'imprégnation hormonale. La translocation nucléaire de la forme 4 S se fait selon un équilibre qui est déplacé vers l'accumulation nucléaire et la liaison au DNA en présence d'hormone.

transformé et non transformé qui apparaissent dans les thymocytes à diverses températures et en présence de glucocorticoïdes naturels ou synthétiques.

L'utilisation d'acides aminés lourds (marqués par des isotopes stables) dans un protocole d'étude de la transformation du récepteur de cellules GH₁ et HTC, a permis à RAAKA et SAMUELS (75) de proposer un modèle dit à l'équilibre (figure 8 b). Chaque étape est réversible et l'équilibre est rapide à 37°C. Cet équilibre concerne à la fois les formes 10 S et 4 S et la répartition entre compartiment cytoplasmique et compartiment nucléaire. En l'absence d'hormone, l'équilibre est déplacé vers la forme 10 S ; l'addition d'hormone provoque une accumulation rapide de la forme 4 S aux dépens de la précédente et son passage vers le noyau. Ceci ne peut s'interpréter que dans l'hypothèse d'une réversibilité bien qu'un mécanisme associant deux réactions opposées différentes ne puisse pas être écarté.

Ces deux modèles s'opposent totalement sur le seul point de la réversibilité de la réaction de transformation. Le sujet reste donc ouvert et l'apport de nouveaux résultats permettra peut-être d'aboutir à un schéma définitif.

Enfin, il faut évoquer la possibilité que l'absence d'un modèle totalement satisfaisant puisse être due à l'inexistence du phénomène in vivo. La transformation serait un phénomène purement artefactuel apparaissant à la suite du broyage cellulaire et de la préparation du cytosol, qui provoquent des associations entre récepteur et d'autres composants. De ce fait, in vitro, il devient nécessaire d'introduire une étape qui dissocie ces agrégats et rétablit le récepteur dans son état natif où il est pleinement fonctionnel. Une autre éventualité existe, dans la mesure où le critère définissant la transformation, à savoir l'acquisition de la capacité de liaison au DNA, serait un point final arbitraire du mécanisme d'action. En fait, seul un critère biologique, tel que la stimulation de la transcription de gènes spécifiques, peut définir réellement la transformation du récepteur en une forme nucléaire. Malheureusement, un tel critère in vitro n'a jamais pu être utilisé.

D) TRANSLOCATION. INTERACTION AVEC LE DNA.

Dans l'hypothèse d'une localisation cytoplasmique du récepteur, il se pose le problème du passage dans le noyau. La réalité de la localisation ultime au niveau nucléaire a été démontrée par des expériences sur cellules en culture. L'incorporation nucléaire s'accompagne d'une déplétion au niveau cytoplasmique (56). Des résultats analogues ont été obtenus in vitro dans des milieux acellulaires en présence de noyaux isolés. Les conclusions sont en faveur d'un mécanisme de diffusion passive à travers les pores nucléaires qui ne requiert pas d'énergie. Cependant, ce type d'expériences ne permet pas de distinguer un mécanisme par translocation du récepteur, d'un mécanisme par activation de sites nucléaires spécifiques du stéroïde.

A l'aide de techniques immunocytochimiques appliquées à des cellules intactes, PAPAMICHAIL et al. (76) puis GOVINDAN (77) ont montré que le récepteur marqué par un anticorps migre effectivement du cytoplasme vers le compartiment nucléaire après imprégnation hormonale des cellules par la dexaméthasone. ANTAKLY et EISEN (78) ont réalisé un travail analogue sur des hépatocytes de rat. Ils démontrent que le taux de récepteur nucléaire décroît chez les animaux surrénalectomisés, l'administration de glucocorticoïdes provoque alors la réapparition d'un taux normal de récepteur nucléaire. Ce même type d'étude a été effectué sur des cellules d'origine nerveuse par le groupe de GUSTAFSSON (79). Dans certains cas, les résultats indiquent clairement qu'il y a translocation ; toutefois, les expériences ne sont pas reproductibles. L'observation d'une fluorescence en rapport avec l'anticorps antirécepteur dans différents compartiments cellulaires est en faveur de la nature mobile du récepteur. Le facteur *f* (ou les facteurs) qui provoque ces échanges n'est pas connu. L'hypothèse classique, liaison à l'hormone puis translocation du complexe hormone-récepteur, peut être évoquée aussi bien que l'hypothèse d'un complexe hormone-récepteur primitivement nucléaire avec recyclage cytoplasmique ultérieur de la protéine.

Il apparaît prématuré de conclure en faveur de l'une ou l'autre possibilité. La distribution des différentes formes de récepteur dans les divers compartiments cellulaires peut en effet être déterminée par les besoins du cycle cellulaire. Ainsi, peut-être est-il nécessaire

d'envisager cette distribution et le mécanisme d'action du récepteur selon un schéma plus dynamique ?

L'interaction avec le DNA a fait l'objet de nombreux travaux qui d'abord se sont surtout attachés à étudier le phénomène d'un point de vue physicochimique (cf paragraphe précédent), et qui depuis quelques années se sont orientés vers l'étude du mécanisme de régulation au niveau des gènes. Le développement de la biologie moléculaire est à l'origine des progrès considérables dans ce dernier domaine (80-83).

Les premiers résultats concernant l'interaction avec le DNA avaient abouti à la conclusion que les sites accepteurs se trouvaient au niveau des protéines non histones ; le DNA apparaissait comme important dans la liaison, mais il n'avait pas été mis en évidence de sites spécifiques à son niveau (56).

Les techniques de recombinaison ont permis d'aborder le problème de deux manières :

- d'une part, en étudiant la sensibilité des gènes glucocorticoïdes dépendants en présence ou en l'absence de leur environnement génomique normal.
- d'autre part, en essayant de conférer la sensibilité aux glucocorticoïdes à des gènes non régulés par ces hormones, en les recombinant à des séquences définies de certains gènes glucocorticoïdes dépendants.

Pour ces études, le modèle le plus employé a été le DNA viral MMTV (mouse mammary tumor virus) dont la transcription est régulée par les glucocorticoïdes ; cependant, d'autres gènes ont également été étudiés. Il ressort des travaux effectués que :

- certaines séquences spécifiques du DNA sont indispensables à l'induction hormonale de la transcription.
- la sensibilité hormonale peut être conférée par incorporation du fragment LTR (long terminal repeat) du DNA viral.
- la régulation s'exerce au niveau du site d'initiation de la transcription.
- le site d'interaction se trouve à proximité (200-50 pb) des gènes

régulés.

- l'induction de gènes par les glucocorticoïdes s'accompagne de l'apparition d'un site sensible à la DNase I à proximité du site de liaison du récepteur, indiquant un changement structural de l'ensemble DNA/chromatine à ce niveau (80, 81). Une hypothèse propose que la modification de structure, induite par le récepteur, rend possible l'accès de la RNA polymérase (84).

Ces effets au niveau du DNA déclenchent une réponse transcriptionnelle. L'ensemble des gènes dont la transcription est modulée par les hormones glucocorticoïdes est déterminé par la différenciation du tissu et est donc différent pour chaque type de cellule. Parmi ces gènes, certains codent pour des enzymes (TAT ou tyrosine amino transférase), d'autres pour des protéines de structure (collagène) ou des récepteurs hormonaux membranaires (récepteur à insuline), d'autres encore peuvent coder certaines hormones protéiques (hormone de croissance) ou des rétrovirus (MMTV).

A côté de cet effet direct sur la transcription, il peut y avoir des effets post-transcriptionnels modulant le turn-over et la structure des mRNA (80, 83). Cependant, ces deux actions ne permettent pas d'expliquer la totalité des phénomènes observés. Deux questions importantes demeurent :

- les hormones glucocorticoïdes contrôlent-elles directement la transcription de ces gènes ou au contraire, le mécanisme d'action fait-il intervenir des gènes de régulation ?
- la liaison du récepteur au DNA apparaît nécessaire mais n'est pas suffisante ; quelles sont alors les interactions avec la chromatine ? par quels mécanismes modulent-elles la transcription ?

La mise au point de systèmes de transcription acellulaire, bien définis et sensibles, devrait permettre de préciser les mécanismes moléculaires déterminant cette suite d'évènements.

E) RECYCLAGE - PHOSPHORYLATION DU RECEPTEUR.

Dans l'hypothèse d'un modèle cyclique, le complexe hormone-récepteur ou le récepteur seul quitte le noyau et repasse dans le compartiment cytoplasmique. Cette étape, ainsi que les événements ultérieurs présidant au recyclage du récepteur sont totalement ignorés. Selon l'hypothèse du modèle à l'équilibre de RAAKA et SAMUELS (70), la répartition du récepteur 4 S est en équilibre entre le cytosol, le noyau et la liaison à la chromatine (figure 8 b). Les complexes 4 S qui ont agi au niveau nucléaire, peuvent réapparaître dans le cytosol et se réassocier en forme 10 S. Le passage du noyau vers le cytoplasme se fait de façon passive selon un mécanisme ne nécessitant pas d'énergie.

Avant de conclure, il convient d'examiner le problème de la phosphorylation du récepteur qui semble impliquée au niveau des diverses étapes du mécanisme d'action (activation, transformation). Les travaux dans ce domaine sont relativement récents et ont cependant fait l'objet de revues détaillées (71, 85, 86). L'impulsion est venue des résultats concernant les effets de l'ATP sur cellules isolées. MUNCK et BRINK-JOHNSEN (81) ont montré dès 1968 que la capacité de liaison des thymocytes variait dans le même sens que le contenu cellulaire en ATP. Les études in vitro menées par les groupes de PRATT (85) et de MOUDGIL (88) ont permis de reconnaître deux effets des trinuécléotides : d'une part, l'ATP mais également l'ADP, inhibent l'inactivation du récepteur, et d'autre part ils stimulent la transformation. L'hypothèse d'une interaction directe au niveau d'un site spécifique de l'ATP, a été suggérée.

Depuis, l'évidence d'une phosphorylation a été apportée par plusieurs groupes (24, 33, 38, 59, 89-91). L'utilisation de ^{32}P orthophosphate et de $|\gamma^{32}\text{P}|$ ATP in vivo (par injection à l'animal ou addition au milieu de culture cellulaire) a permis de mettre en évidence la présence de ^{32}P au niveau des fractions contenant le récepteur au cours des étapes chromatographiques de purification et au niveau des bandes visualisées après électrophorèse du matériel purifié. Une autre approche, par des techniques in vitro, a été employée en présence $|\gamma^{32}\text{P}|$ ATP et de préparations purifiées de récepteur, transformé ou non transformé. Les conclusions suivantes peuvent être dégagées :

- le monomère 96-98000 comportant le site de liaison à l'hormone est phosphorylé.
- les sous-unités non liantes (92000 pour PRATT et 24000 pour LITWACK) sont également phosphorylées. Il faut noter que pour LITWACK cette sous-unité est un RNA.
- le récepteur, sous forme transformée, présente une activité kinase qui permet de phosphoryler in vitro des histones par exemple (les résultats divergent sur l'autophosphorylation ou non du récepteur). Cette activité protéine-kinase ne s'exprime que dans le cas du récepteur lié à un stéroïde agoniste, et est inhibée par le molybdate. Elle ferait partie intégrante du récepteur.
- la phosphorylation s'opère au niveau des résidus thréonine et sérine avec environ 10 sites par monomère 98000, ce qui explique certaines observations d'hétérogénéité de charge.

La signification biologique de cette activité protéine-kinase n'est pas connue à ce jour. De même, l'intégration de ces données dans le mécanisme global pose des problèmes. Cependant, cette fonction enzymatique peut être d'une grande importance. La phosphorylation des protéines chromatiniennes pourrait être un des éléments de régulation de la transcription des gènes. Les autres étapes, telles que l'activation, la liaison ou la transformation qui sont ATP dépendantes, pourraient également être influencées par la phosphorylation du récepteur ou d'autres protéines.

III - CONCLUSION

De nombreuses hypothèses persistent et beaucoup de travaux seront nécessaires pour élucider précisément la structure et le fonctionnement du récepteur des glucocorticoïdes.

L'élément déterminant réside dans la nécessité de pouvoir disposer de préparations purifiées de récepteur. Seules les études sur ce matériel pourront apporter sans ambiguïté des réponses concernant le nombre et la nature des sous-unités, la phosphorylation ou les facteurs cytosoliques indispensables. D'autre part, la purification est le préliminaire à la préparation d'anticorps qui sont essentiels pour aborder ces études.

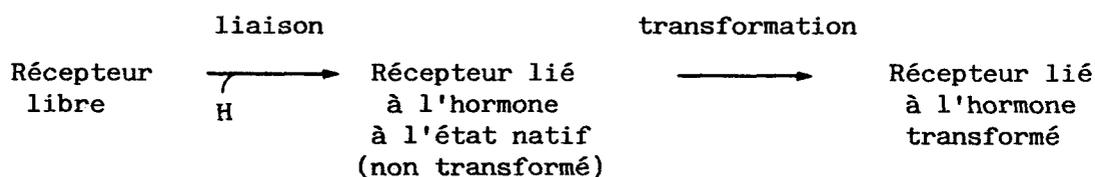
Dans un deuxième temps, il sera possible d'identifier et de caractériser la forme native vraie du récepteur, à savoir l'état du récepteur et sa localisation au moment où il lie l'hormone. Seules, ces notions permettront d'établir les changements induits par la liaison du stéroïde et de déterminer si d'autres changements sont nécessaires pour que le complexe hormone-récepteur puisse induire l'expression des gènes. Il n'est peut être pas inutile de répondre à ces questions avant d'envisager des expérimentations in vitro sophistiquées, telles que les expériences de transcription. Dans le même esprit, il est indispensable de connaître avec précision la nature du récepteur mis en oeuvre dans de tels protocoles.

Dans cette perspective, et avec des objectifs plus modestes, nous nous sommes attachés à mettre au point un protocole de purification du récepteur des glucocorticoïdes.

CHAPITRE 2

PURIFICATION DU RECEPTEUR

Le schéma global du mode d'action des glucocorticoïdes (figure 1) fait apparaître les différentes formes du récepteur qui sont présentes et peuvent être caractérisées. Dans le milieu acellulaire, tel que le cytosol, le récepteur se trouve sous trois formes :



Cette diversité du récepteur et le type d'études envisagées avec le récepteur purifié entraînent un choix préalable :

- soit la purification du récepteur libre qui ouvre la voie à l'étude de tout le mécanisme réactionnel.
- soit la purification du récepteur non transformé qui permet d'aborder l'étude de l'étape de transformation et de liaison dans la mesure où un protocole permet de libérer le site de liaison.
- soit la purification du complexe transformé qui est le préliminaire à l'étude de l'interaction avec le DNA.

Quel que soit ce choix, trois difficultés générales sont présentes. La concentration relative en récepteur parmi les autres protéines est très faible, de l'ordre de 0,005% (49) ce qui se traduit par la nécessité d'un haut degré de purification. Le récepteur est très labile, cependant la liaison à l'hormone stabilise la protéine. Ainsi, il apparaît plus judicieux d'envisager la purification du complexe hormone-récepteur. Enfin, le but consiste à obtenir le récepteur purifié sous une forme unique, soit en le maintenant sous une forme pendant toute la purification, soit en sélectionnant l'une des formes lors de l'étape finale de la procédure de purification.

De nombreuses purifications partielles ou totales ont été décrites, dont les protocoles sont examinés dans ce chapitre. Dans tous les cas, l'étape préliminaire consiste à homogénéiser un tissu animal ou des cellules isolées dans un tampon. Cet homogénat est soumis à une ultracentrifugation, la fraction limpide ou surnageant représente le cytosol de départ.

I - PURIFICATION DU RECEPTEUR LIBRE

Peu de travaux ont été consacrés à ce type de purification. Ceci se comprend aisément du fait de l'extrême labilité du récepteur non lié dans le milieu acellulaire.

1) Purification par gel filtration (92)

La chromatographie de gel filtration sur Biogel A 0,5 m a permis à SANTI et al. de purifier 5 à 8 fois le récepteur avec un rendement de 80 à 90%. Il s'agit plus d'une chromatographie d'exclusion, le récepteur étant récupéré dans le volume exclu.

2) Purification par chromatographie hydrophobe (92).

Les supports, type n-alkyl agarose, permettent de purifier le récepteur. L'éthyl- et le n-butylagarose retiennent la totalité du récepteur, et seulement 20 à 30% des protéines cytosoliques. L'augmentation de la longueur du bras hydrophobe accentue la rétention des protéines non spécifiques. Le récepteur est retenu en tampon de faible force ionique. L'élution est réalisée par augmentation de la force ionique. Les taux de purification varient entre 7 et 10 fois avec un rendement de l'ordre de 60 à 75%.

Ces deux méthodes, peu efficaces sur le plan du taux de purification, permettent cependant d'éliminer 90% des protéines étrangères. Elles démontrent que la stabilité du récepteur est suffisante, même sous forme non liée à l'hormone pour envisager sa purification. D'autre part, ces travaux ont été réalisés en l'absence de molybdate. Il est donc possible d'améliorer les performances pour en faire des méthodes efficaces de prépurification.

3) Précipitation par le sulfate de protamine.

Le fractionnement du cytosol par précipitation peut s'appliquer pour prépurifier le récepteur sous forme libre. Initialement décrite pour le complexe hormone-récepteur (93), la précipitation par le sulfate de protamine a été utilisée par GOVINDAN et SEKERIS (94) pour purifier le récepteur non lié. Dans un premier temps, les acides nucléiques sont éliminés par précipitation par le sulfate de streptomycine. Le précipité obtenu après addition de sulfate de protamine est solubilisé en tampon phosphate 0,16 M. La purification varie entre 7 et 10 fois avec un rendement de 60 à 80%.

4) Récemment, BERNARD et JOH (95) ont associé à la précipitation par le sulfate de protamine, une étape de chromatographie de gel filtration sur Sepharose CL 6B. Après ces deux étapes, le taux de purification est de 53 fois avec un rendement de 48%.

L'avantage de ces différents protocoles est de pouvoir éliminer rapidement la majeure partie des protéines étrangères et de réduire ainsi les complications ultérieures souvent attribuées aux protéines non spécifiques.

II - PURIFICATION DU COMPLEXE HORMONE-RECEPTEUR SOUS FORME TRANSFORMEE

De nombreuses purifications du complexe sous forme transformée ont été publiées. En effet, en l'absence de molybdate, cette forme est prédominante dans les conditions de force ionique élevée et de dilution qui sont fréquentes dans les techniques de chromatographie. Historiquement, les premiers protocoles ont été développés à partir des schémas classiques de purification des protéines. Secondairement, toutes les méthodes ont été établies sur le principe des propriétés différentielles du complexe hormone-récepteur selon son état, vis à vis des échangeurs polyanioniques.

A) TECHNIQUES CLASSIQUES

1) Dès 1971, HACKNEY et PRATT (96) décrivent un protocole en quatre étapes pour la purification du complexe hormone-récepteur de

fibroblastes de souris :

- gel filtration du cytosol incubé sur Agarose 6%.
- précipitation du pic radioactif récupéré par le sulfate d'ammonium à 25% : précipité repris et solubilisé.
- gel filtration sur Sephadex G 25 (dessalage).
- chromatographie sur DEAE cellulose et élution par gradient de KCl. Le complexe hormone-récepteur est élué entre 0,1 et 0,15 M KCl.

Le taux de purification global est de 800 fois avec un rendement très faible, inférieur à 1%. Les auteurs discutent de ces résultats et attribuent cet échec à deux causes, d'une part la dissociation continuelle du complexe ^3H TA-récepteur, et d'autre part à des phénomènes d'agrégation irréversible induits par la précipitation par le sulfate d'ammonium.

2) Un protocole identique dans son principe, mais ne comportant que deux étapes, a été publié par LITWACK et al. à partir de cytosol de foie de rat (97) :

- chromatographie sur DEAE Sephadex A 50 et élution par gradient KCl pour une concentration de 0,05 M.
- gel filtration sur Sephadex G 100.

Le complexe hormone-récepteur est purifié 300 fois environ avec un rendement de 65%. Les caractères physicochimiques de la préparation purifiée correspondent au récepteur sous forme transformée :

- . coefficient de sédimentation 4,6 S.
- . liaison aux noyaux isolés.
- . élution de la DEAE cellulose en présence de 0,05 M KCl.

3) La précipitation par le sulfate d'ammonium, associée ou non à une étape chromatographique a été utilisée assez largement par différentes équipes pour aboutir à des préparations très partiellement purifiées. Un protocole associant précipitation par le sulfate de protamine puis le sulfate d'ammonium a été proposé par ROUSSEAU et al. (93). Dans tous ces protocoles, le taux de purification s'échelonne entre 10 et 40 fois avec des rendements très variables.

4) La chromatographie sur héparine immobilisée a été utilisée comme étape préliminaire dans les protocoles de purification du récepteur des estrogènes. Dans le cas du récepteur des glucocorticoïdes, des résultats identiques ont été rapportés par BLANCHARDIE et al. (98) et WEISZ et al. (99). Le complexe hormone-récepteur est retenu sur une colonne d'héparine-agarose, l'élution est réalisée par un gradient de NaCl ou d'héparine. Dans ces conditions, le taux de purification est de 10 à 20 fois, et le rendement de 55 à 90%. De plus, il est possible de purifier séparément les deux formes de récepteur, transformée et non transformée. Les performances et surtout la capacité de ce type de support restent modérées mais ouvrent des perspectives nouvelles par rapport aux techniques classiques.

B) CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS SUR SUPPORTS POLYANIONIQUES.

Le principe général réside dans les propriétés différentielles du complexe hormone-récepteur vis à vis des polyanions selon son état, transformé ou non transformé. KALIMI et al. (100) ont étudié les deux formes du récepteur et montré que le complexe hormone-récepteur sous forme transformée présente une affinité très marquée vis à vis des polyanions, tels que phosphocellulose ou DNA cellulose. A l'opposé, sous forme non transformée, le complexe hormone-récepteur n'interagit pas avec ces supports chromatographiques.

Le protocole habituel comporte deux étapes : le cytosol incubé en présence de l'hormone est chromatographié sur phosphocellulose ou DNA cellulose en tampon de faible force ionique, avec un débit assez rapide. Au cours de cette étape, seules les protéines basiques ayant une affinité pour les groupements anioniques sont retenues et éliminées. Le volume exclu renfermant le récepteur est alors exposé à 25°C, ce qui permet la conversion du complexe hormone-récepteur sous la forme transformée. Le complexe acquiert alors une forte affinité pour la DNA ou la phosphocellulose. Une seconde chromatographie sur le même support avec un débit plus lent permet l'adsorption du récepteur (en principe, il ne reste pas de protéines étrangères ayant une affinité vis à vis du support). Après lavage, l'élution est obtenue par un gradient de force ionique.

Cette méthode, avec de nombreuses variantes, a permis à

plusieurs groupes de publier des schémas de purification, dont les plus récents font état d'un degré de pureté important.

1) ATGER et MILGROM, dès 1976, (101) décrivent un protocole en cinq étapes à partir du cytosol de foie de rat :

- chromatographie sur phosphocellulose du cytosol préincubé avec l'hormone. Le débit est assez rapide (2,5 ml/mn) de façon à éviter une transformation du récepteur induite par le support.
- passage du volume exclu sur DEAE cellulose, avec élution par KCl 0,2 M.
- précipitation du pic élué par le sulfate d'ammonium 33%. Le précipité est resolubilisé en tampon phosphate 0,05 M.
- chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite avec élution du complexe hormone-récepteur en phosphate 0,25 M. L'éluat est dialysé contre un tampon Tris en présence de ^3H TA.
- chromatographie sur phosphocellulose (0,5 ml/mn). Après lavage le complexe hormone-récepteur est élué par du KCl 0,4 M. Un dessalage sur Sephadex G 25 permet d'éliminer le chlorure de potassium.

A partir de 190 g de foie (80 ml de cytosol et 1,1 nmole de récepteur) l'éluat final obtenu renferme 0,26 nmole de récepteur pour 11,7 mg de protéines totales. Le taux de purification est de 940 fois et le rendement global de 24%. La transformation du récepteur intervient au cours des étapes de DEAE et de précipitation par le sulfate d'ammonium qui exposent le complexe hormone-récepteur à des concentrations ioniques élevées. Deux éléments de caractérisation sont rapportés qui correspondent à la forme transformée :

- . coefficient de sédimentation 4 S.
- . liaison aux noyaux.

2) Les trois publications consécutives de EISEN et GLINSMANN (102-104) apportent des perfectionnements successifs à un protocole de purification, utilisant la DNA cellulose, dont la version définitive comporte deux étapes.

- chromatographie sur DNA cellulose en présence de 0,1 M NaCl, le complexe hormone-récepteur est récupéré dans le volume exclu.

- après transformation par la chaleur (20°C pendant 30 mn), une seconde chromatographie sur DNA cellulose permet d'adsorber le récepteur. L'élution est obtenue par un palier à 0,45 M NaCl.

Le taux de purification est de 11000 fois, et le rendement de 80%. Une caractérisation plus importante a été faite sur le matériel purifié :

- . coefficient de sédimentation 4 S.
- . liaison aux noyaux 40%.
- . liaison à la DNA cellulose 45%.
- . isoélectrofocalisation pI 5,9-6,1.
- . électrophorèse PAGE/SDS absence de bande.

Le taux de pureté est estimé à 10-30%. Une modification a été apportée par la suite au niveau de l'élution qui est réalisée en présence de 0,01 M phosphate de pyridoxal (105). Aucune précision n'est donnée sur le bénéfice de ce changement de conditions. Des anticorps ont été préparés par immunisation d'un lapin. Les anticorps obtenus reconnaissent le récepteur natif et transformé. Ils semblent spécifiques vis à vis de l'espèce.

3) A la suite de leurs travaux préliminaires (100) COLMAN et FEIGELSON ont également utilisé ce protocole séquentiel (106) en deux temps:

- chromatographie sur phosphocellulose. Le complexe hormone-récepteur est récupéré dans le volume exclu.
- après transformation par la chaleur, une seconde chromatographie est réalisée dans des conditions identiques, avec une élution par un gradient de NaCl.

Le taux de purification et le rendement varient avec les diverses préparations de phosphocellulose, l'ordre de grandeur est 1000 fois et 5%. Le complexe hormone-récepteur purifié interagit avec des noyaux isolés.

4) Un quatrième groupe animé par BEATO a également participé au développement de ce principe de purification. Le support

chromatographique retenu est la phosphocellulose, qui est plus stable que la DNA cellulose en présence du cytosol susceptible de renfermer des DNases. CLIMENT et al. (107, 108) rapportent les résultats concernant la purification partielle et la caractérisation du complexe hormone-récepteur transformé. La procédure comporte quatre étapes :

- deux chromatographies successives sur phosphocellulose du cytosol préincubé en présence de ^3H TA.
- après transformation induite par la chaleur (20°C durant 30mn), une chromatographie dans des conditions identiques en présence de 0,1% sérum albumine permet de retenir le complexe hormone-récepteur. L'élution est obtenue en présence de 0,5 M NaCl.
- la dernière étape permet d'éliminer la sérum albumine par précipitation du complexe hormone-récepteur par le sulfate d'ammonium à 30%.

Le rendement global atteint 25% pour un taux de purification de 3300 fois. Le taux de transformation qui est limité à 50% peut expliquer le faible rendement final. La caractérisation du récepteur purifié a porté sur les points suivants :

- . coefficient de sédimentation 2,9 S.
- . liaison au DNA et à la chromatine.
- . rayon de Stokes (gel filtration Sephadex G 100) 2,65 nm.

ISOHASHI et al. (109) utilisent cette procédure en remplaçant l'étape de précipitation par le sulfate d'ammonium par une concentration dans un appareil à fibres creuses. Aucune indication ne figure quant à l'addition ou non de sérum albumine. Les résultats sont comparables, 28% de rendement pour une purification de 3000 fois.

Plus récemment, WESTPHAL et BEATO, à partir de ces expériences préliminaires, ont proposé un protocole de purification totale (110). Les étapes précédentes se retrouvent mais selon une séquence un peu différente et plus complexe. Le schéma général détaillé est représenté sur la figure 9 empruntée aux auteurs. La séquence initiale est répétée plusieurs fois et les précipités sulfate d'ammonium sont congelés à - 80° C et groupés. La deuxième partie combine à la fois phosphocellulose et DNA cellulose et se termine par une

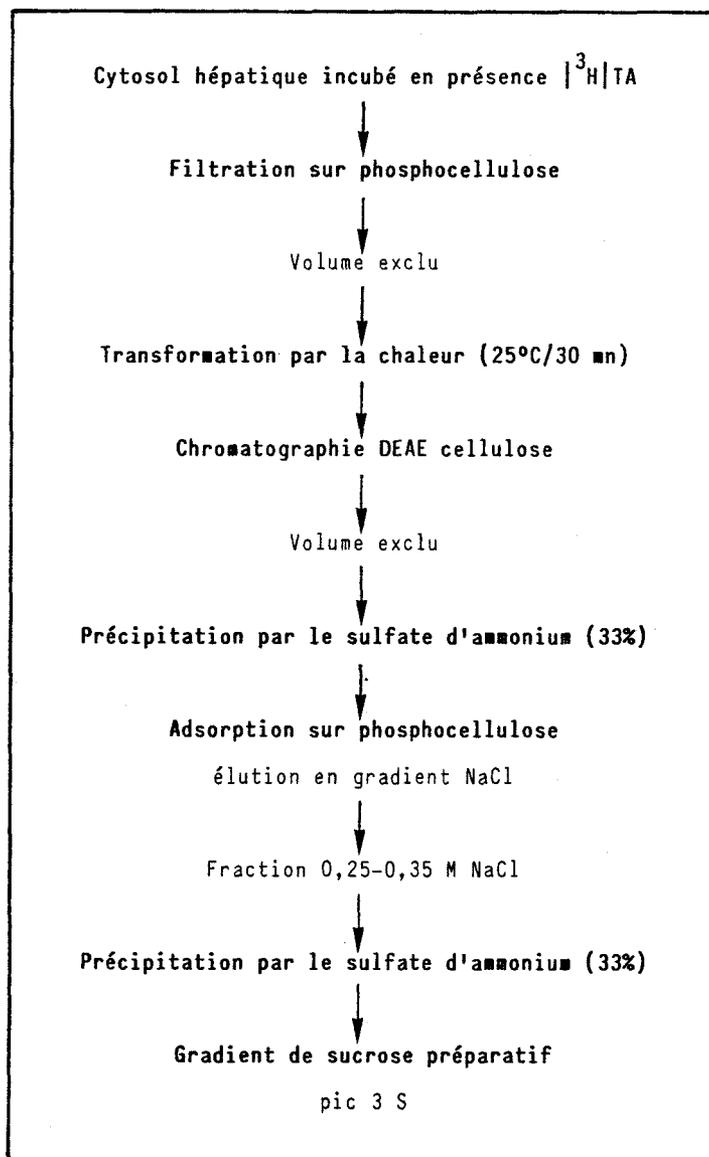


FIGURE 9

Protocole de purification utilisé par WESTPHAL et al.
d'après Fig. 1 (110)

ultracentrifugation préparative en gradient de saccharose.

Au terme des sept étapes, le rendement est de 3% mais avec un taux de purification de 59000 fois. Le matériel biologique mis en oeuvre représente 400 à 600 g de foie. L'analyse par électrophorèse avec ou sans dénaturation établit l'homogénéité de la préparation. Les paramètres physicochimiques ont été mesurés :

- . coefficient de sédimentation 3,0 S.
- . rayon de Stokes (gel filtration AcA 44) 2,7 nm.
- . poids moléculaire (PAGE SDS) 40000.

5) Une technique en trois étapes, associant phosphocellulose et DNA cellulose, a été décrite également par MOUDGIL et al. (111) :

- chromatographie sur phosphocellulose et récupération du volume exclu.
- après incubation en présence de ^3H dexaméthasone, fractionnement par le sulfate d'ammonium à 45%. Le précipité repris est dialysé à 23°C, ce qui permet la transformation.
- chromatographie sur DNA cellulose avec élution par le tungstate de sodium 0,01 M

Les performances sont plus modestes : purification de 520 fois avec un rendement de 30%, mais le choix de l'agent d'élution est intéressant.

6) WRANGE et al. ont apporté des améliorations importantes qui ont permis d'obtenir de façon reproductible des préparations pures à 75%. La technique décrite (112-113) comporte quatre étapes :

- chromatographie sur phosphocellulose, à débit rapide, du cytosol préincubé en présence de ^3H TA.
- chromatographie du pic exclu précédent sur DNA cellulose.
- après transformation par exposition à 25°C pendant 30 mn, le pic exclu renfermant le complexe hormone-récepteur est purifié sur une colonne de DNA cellulose. L'élution est réalisée par addition de 0,01 M de phosphate de pyridoxal.

- chromatographie sur DEAE sepharose à pH 7,8. Le complexe hormone-récepteur est élué avec 0,16 M NaCl au cours du gradient.

La préparation obtenue a été enrichie 8500 fois, le rendement global est de 20%. Le phosphate de pyridoxal permet de stabiliser le récepteur au cours de la purification. La caractérisation physicochimique porte sur les paramètres suivants :

- . coefficient de sédimentation 3,4-3,6 S.
- . rayon de Stokes (gel filtration Sephadex G 200) 6,0 nm.
- . poids moléculaire (PAGE SDS) 89000.
- . point isoélectrique (IEF polyacrylamide) 5,8.

Un antisérum polyclonal a été préparé (113) qui reconnaît le récepteur des glucocorticoïdes sous forme native et transformée. L'anticorps n'est pas spécifique de l'espèce, ni du tissu. Par contre, il ne reconnaît ni la CBG, ni les autres récepteurs à hormone stéroïdes.

Ce protocole a été modifié par les mêmes auteurs (114) afin d'améliorer la pureté de la préparation. Les différences portent sur le débit de la seconde chromatographie sur DNA cellulose qui a été diminué. L'éluion est faite en présence de 0,025 M $MgCl_2$. Des essais avec NaCl conduisent à des résultats moins intéressants, aussi bien en rendement qu'en qualité. Enfin, les conditions de l'étape de DEAE sepharose sont modifiées ; le débit est considérablement augmenté, la molarité d'éluion est de 0,1 M NaCl. La pureté est estimée à 80% minimum, et le rendement entre 25 et 30%.

La caractérisation a été complétée (114-115) par l'étude de l'interaction avec les séquences de DNA, par marquage par photoaffinité et par des expériences de digestions protéolytiques limitées. Une correction est apportée pour la mesure du poids moléculaire en électrophorèse PAGE/SDS.

- . poids moléculaire (PAGE SDS) 94000 avec 2 bandes mineures
79000 et 72000.

7) D'autres protocoles ont été mis au point pour obtenir une préparation suffisamment purifiée, destinée à préparer des anticorps

monoclonaux. Dans ces conditions, la purification du récepteur apparaît essentiellement comme une étape technique dont l'optimisation n'est pas indispensable.

GAMETCHU et HARRISSON (116) utilisent un protocole en trois temps :

- chromatographie sur un mélange phosphocellulose/DNA cellulose du cytosol préincubé.
- précipitation par le sulfate d'ammonium à 20% du complexe hormone-récepteur présent dans le pic exclu.
- chromatographie sur DNA cellulose avec élution par le phosphate de pyridoxal 0,01 M.

Le rendement varie entre 45 et 73%, et le taux de purification entre 1300 et 3200 fois. Le degré de pureté est estimé à 20-35%. Il n'y a pas d'étape de transformation, celle-ci doit intervenir lors de la précipitation par le sulfate d'ammonium.

La purification décrite par BERNARD et JOH (95) comporte deux parties. Dans un premier temps, le récepteur est purifié sous forme libre en présence de molybdate, selon le schéma suivant :

- précipitation par le sulfate de protamine.
- chromatographie de gel filtration sur Sepharose CL 6B.
- chromatographie sur DNA cellulose.

Dans la seconde partie, après incubation avec l'hormone, le molybdate est éliminé par dessalage sur Sephadex G 25 et la transformation est induite par chauffage à 20°C pendant 40 minutes. La dernière étape est réalisée par chromatographie sur DNA cellulose avec élution en présence de 0,2 M NaCl.

La purification globale est de 3640 fois avec un rendement de 14%. La préparation utilisée pour l'immunisation est repurifiée par électrophorèse.

8) Très récemment, GOVINDAN et GRONEMEYER (117) ont publié un protocole identique à celui de WRANGE et al. (112-114). Le seul point

distinct réside dans l'introduction d'une seconde étape de transformation du volume exclu récupéré après la deuxième chromatographie sur DNA cellulose (figure 10). Par ce biais, le rendement global est de 66% (38% pour DNA cellulose II et 28% pour DNA cellulose III), mais le taux de purification n'est pas amélioré (2700 fois et 400 fois respectivement). L'étape finale par chromatographie sur DEAE, qui n'est pas décrite, permet d'obtenir une préparation purifiée 6500 fois, soit un taux de pureté de 60%. Le rendement final n'est que de 15%.

La caractérisation physicochimique n'était pas le but du travail ; seul le poids moléculaire a été mesuré par électrophorèse et révélation des bandes par photomarquage, marquage covalentiel et colorations traditionnelles. Une seule bande apparaît qui correspond à un poids moléculaire de 92000.

Il apparaît que la purification du récepteur lié à l'hormone, sous forme transformée est possible. Cependant, une mise au point soigneuse des diverses étapes est nécessaire. Le schéma proposé par WRANGE et al. (112-114) semble être le plus efficace. Cependant, certains problèmes ne sont pas résolus. D'une part, la transformation par la chaleur n'est pas totale, seuls 50 à 60% maximum des complexes hormone-récepteur sont sous la forme transformée (52). Il est possible de répéter la séquence transformation-adsorption sur DNA cellulose (117) mais cela se fait au détriment de la pureté de la préparation. D'autre part, les études de caractérisation montrent que seuls les paramètres physicochimiques peuvent être mesurés. Les études de la liaison du stéroïde et du mécanisme de transformation ne peuvent être abordées. Grâce à la rapidité et au rendement, ces techniques sont intéressantes lorsqu'il s'agit de préparer ensuite un anticorps anti-récepteur.

III - PURIFICATION DU COMPLEXE HORMONE-RECEPTEUR SOUS FORME NON TRANSFORMEE.

Elle ne peut s'envisager que dans la mesure où :

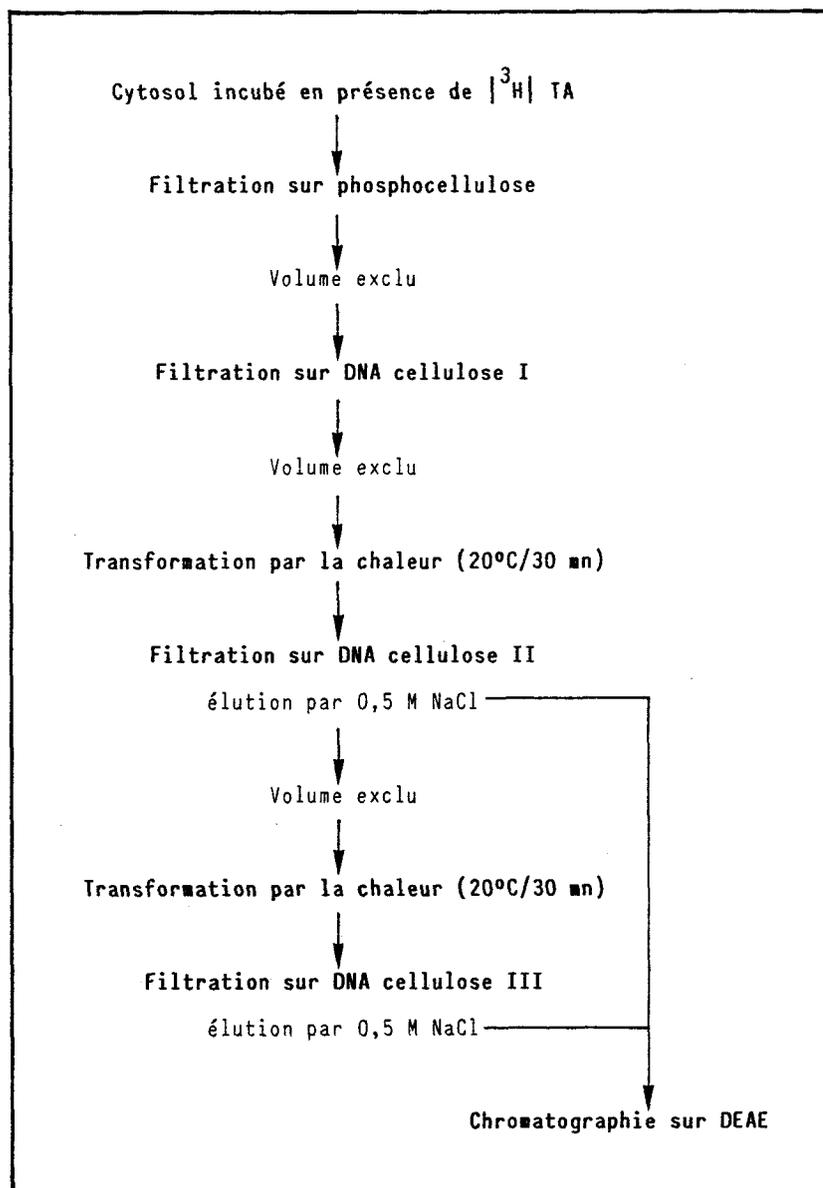


FIGURE 10

Protocole de purification utilisé par GOVINDAN et al.
d'après Fig. 1 (117)

- d'une part, le récepteur peut être maintenu sous sa forme native non transformée tout au long de la purification.
- d'autre part, il existe des techniques de purification très performantes.

Ces deux conditions se trouvent remplies avec l'utilisation du molybdate qui inhibe de façon complète la transformation et avec l'emploi de la chromatographie d'affinité. La réversibilité de la liaison de l'hormone au récepteur et l'affinité importante de cette liaison permettent d'envisager l'utilisation de la chromatographie d'affinité comme méthode de purification.

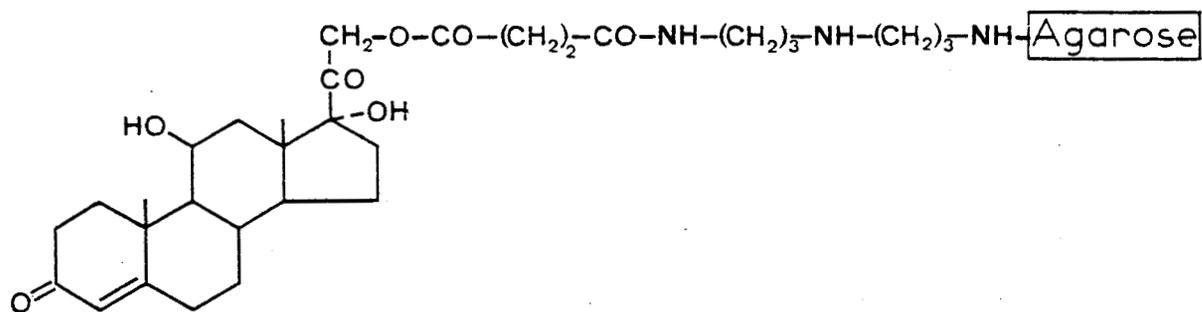
1) En 1973, WONG et al. (118) publie la première tentative de purification par chromatographie d'affinité. Sur un gel de Sepharose 4B activé au BrCN est couplée la diaminodipropylamine. L'hémisuccinate de cortisol est alors greffé sur le bras (figure 11). La concentration en ligand immobilisée est de 2 $\mu\text{M}/\text{ml}$ de gel pour un taux de substitution en bras aminé égal à 10 μM . Le protocole comporte :

- une étape d'adsorption en batch (100 ml de gel dilué au 1/3 pour 120-150 ml de cytosol de foie de rat) durant 2 heures.
- un lavage en colonne par 20 volumes de tampon.
- une élution par 2,5 volumes de tampon en présence de 0,35 M KCl.

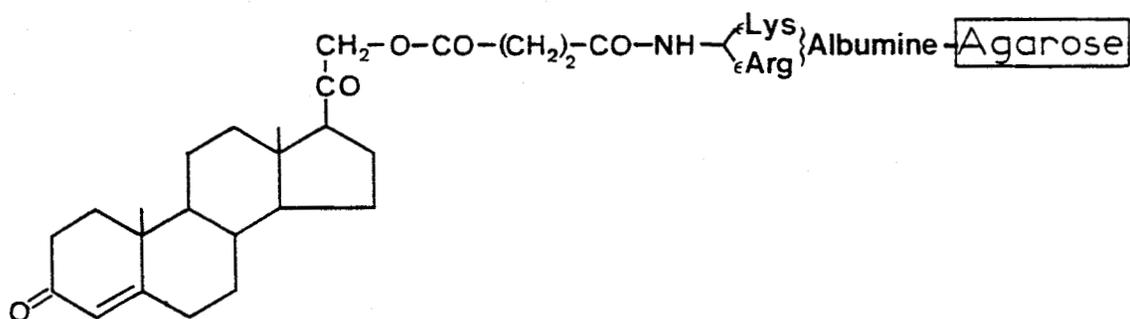
Il n'est pas fait mention du rendement et du taux de purification. Les travaux ultérieurs s'accordent à dire que la protéine isolée n'est pas le récepteur, mais la CBG.

2) DE KLOET et BURBACH ont utilisé un gel d'affinité similaire pour purifier le récepteur des glucocorticoïdes du cerveau de rat (119). Le gel activé au BrCN est substitué par de la sérum albumine (3,5 mg BSA/ml de gel) qui sert de "bras espaceur". Le ligand, hémisuccinate de désoxycorticostérone, est couplé en présence d'une carbodiimide soluble (figure 11). Seulement 10 pM de stéroïde apparaissent accessibles, alors que le taux de greffage est de 66 $\mu\text{M}/\text{ml}$ de gel. Le schéma de purification est le suivant :

- adsorption en batch pendant 2 heures (1 ml de gel pour 1 ml de cytosol).



Gel préparé par WONG et al. (118) à partir de l'hémisuccinate de cortisol



Gel utilisé par DE KLOET et BURBACH (119) préparé à partir de l'hémisuccinate de désoxycorticostérone

FIGURE 11

- lavage en colonne par 10 volumes de tampon.
- élution en batch en présence de 10^{-6} M $|^3\text{H}|$ corticostérone pendant 16 heures.

A partir de cytosol brut, le taux de purification est de 200 fois avec un rendement global de 20%. L'élimination des estérases cytosoliques par une étape initiale de précipitation par le sulfate d'ammonium, n'apporte pas d'amélioration. Le récepteur forme des agrégats, ce qui limite la purification à 24 fois.

3) Une matrice d'affinité originale a été synthétisée par FAILLA et al. (120) et utilisée pour purifier le récepteur à partir des cellules HTC. Ce type de gel, à la différence des précédents, ne comporte pas de liaison ester. L'aminohexylagarose est préparé à partir de Biogel A 0,6 m activé par le BrCN. La synthèse du gel est réalisée à partir de la 21-chloroprogesterone (figure 12). La concentration en ligand immobilisé est de $1 \mu\text{M}/\text{ml}$ de gel, les fonctions amine libres résiduelles sont acétylées. L'affinité du ligand a été mesurée, par rapport à la désoxycorticostérone, la perte d'affinité est d'environ 60 fois (K_D DOC : 4.10^{-9} M ; K_D ligand : $0,25.10^{-6}$ M).

- l'adsorption est réalisée en batch pendant 3 heures. Le rapport des volumes cytosol/gel utilisé est déterminé par des expériences préalables. Un rapport égal à 3 permet d'adsorber 80% du récepteur présent de façon spécifique. En effet, dans les mêmes conditions, il n'y a pas de rétention du récepteur par le Sepharose 4 B ou par un gel d'affinité traité au borohydrure (réduction de la fonction 3 céto).
- lavage en batch avec 30 volumes de tampon.
- élution en batch en présence de 10^{-6} M $|^3\text{H}|$ TA. Le volume de solution éluante est double de celui du gel. L'élution est poursuivie pendant 18 heures à 4°C .

A titre d'exemple, au cours d'une expérience, l'étape de chromatographie d'affinité a permis de purifier 265 fois le récepteur avec un rendement global de 44%. Une étape ultérieure de gel filtration sur Biogel A 0,5 m aboutit à une purification de 1730 fois avec un rendement de 37%. Par la suite, les mêmes auteurs, en modifiant les conditions de la chromatographie de gel filtration, ont obtenu des

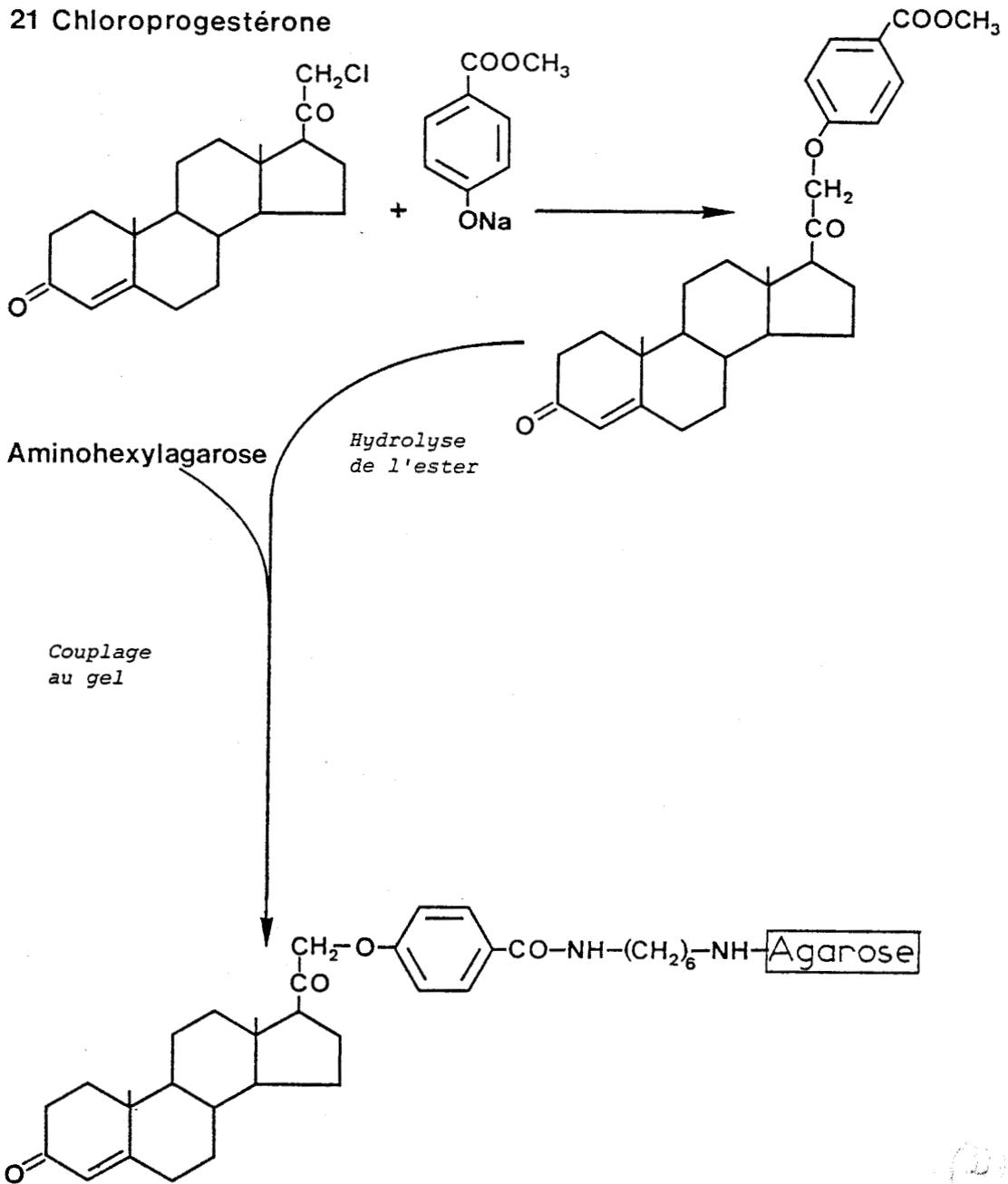


FIGURE 12

Préparation du gel à désoxycorticostérone proposé par FAILLA et al. (120)

préparations plus pures (92). Plusieurs difficultés ont été rencontrées au cours de la purification. Malgré les lavages répétés, des protéines restent adsorbées de façon non spécifique sur le gel et sont relarguées lentement pendant l'élution. D'autre part, le rendement d'élution ne dépasse jamais 50% du récepteur adsorbé. Enfin, les gels, bien que préparés de façon identique, ne fournissent pas des résultats reproductibles. Les taux de purification obtenus varient entre 80 et 300 fois. Le récepteur obtenu a été caractérisé :

- . coefficient de sédimentation 9 S.
- . liaison aux noyaux après transformation.

A l'aide d'un gel identique au précédent, WEISZ et al. ont purifié le récepteur du foie de rat (121). Les résultats présentés dans cette publication portent sur l'étude de l'interaction récepteur-molybdate. Aucun détail technique précis n'est exposé concernant le protocole de purification (manuscrit en préparation). Au terme de trois étapes :

- chromatographie d'affinité sur DOC aminohexylagarose.
- chromatographie de gel filtration sur Biogel A 0,5 m.
- chromatographie sur DEAE cellulose avec élution en palier (0,29 M phosphate).

Le récepteur est purifié 5100 fois avec 46% de rendement, ce qui correspond à un taux de pureté de 10%. L'étape d'affinité n'est guère plus performante que la précédente décrite par SANTI et al., 55% de rendement pour une purification de 114 fois. La caractérisation physicochimique en présence de molybdate a fourni les résultats suivants:

- . coefficient de sédimentation 5,0 S
- . rayon de Stokes (gel filtration Sephadex G 150) pic A 6 nm
pic B > 6 nm
- . stabilité à 20°C $t_{1/2} = 6$ heures.

4) Des modifications concernant la nature du bras espaceur et la synthèse du gel, ont été apportées par GRANDICS et al. (122, 123). Ce

gel est commercialisé depuis 1982 sous le nom déposé de **STEROGEL A** TM . (G.K. BIOCHEMICALS, 150 Home Street, SOMERSET, NJ 08873, USA). Deux protocoles sont possibles pour la synthèse du gel. Ils diffèrent par la préparation du ligand, le gel demeure le Sepharose 2B activé par un bisépoxyrane. La figure 13 rassemble les étapes de synthèse du gel d'affinité. La concentration en sites NH₂ du gel est de 2,9 µmol/ml, ce qui permet un taux greffage du stéroïde égal à 2,5 µmol/ml. Les sites NH₂ libres sont bloqués par acétylation. Le gel commercial, Sterogel A, possède des spécifications identiques (124), mais peut être substitué différemment sur demande.

Le protocole de purification suggéré par GRANDICS et al. (123, 125) comporte trois étapes :

- chromatographie d'affinité : 20 ml de cytosol sont traités par 8 ml de gel pendant 2 heures en batch. Après lavage extensif, l'élution est poursuivie pendant 16 heures à 0-4°C en présence de $2 \cdot 10^{-6}$ M [³H] TA. A ce stade, le rendement varie entre 50 et 70% pour un taux de purification de 100 à 200 fois
- gel filtration sur Biogel A 1,5 m : le complexe hormone-récepteur est élué juste après le volume exclu.
- chromatographie sur DEAE cellulose. L'élution en gradient phosphate permet d'obtenir le récepteur pour une concentration de 0,23 à 0,26 M phosphate.

La purification globale est de 4000 fois environ avec un rendement proche de 35%. Les éléments suivants de caractérisation sont rapportés :

- . coefficient de sédimentation 4 S.
- . rayon de Stokes (gel filtration Biogel A 1,5 m) 7,3 nm.
- . poids moléculaire (PAGE/SDS) 90000 avec 2 bandes mineures 40000 et 41000.
- . transformation par chauffage en présence de cytosol avec liaison à la DNA cellulose.

Ce protocole a été mis en oeuvre par le même groupe pour purifier le récepteur des glucocorticoïdes du cortex de rein de rat (126). L'étape de chromatographie d'affinité est réalisée dans les mêmes

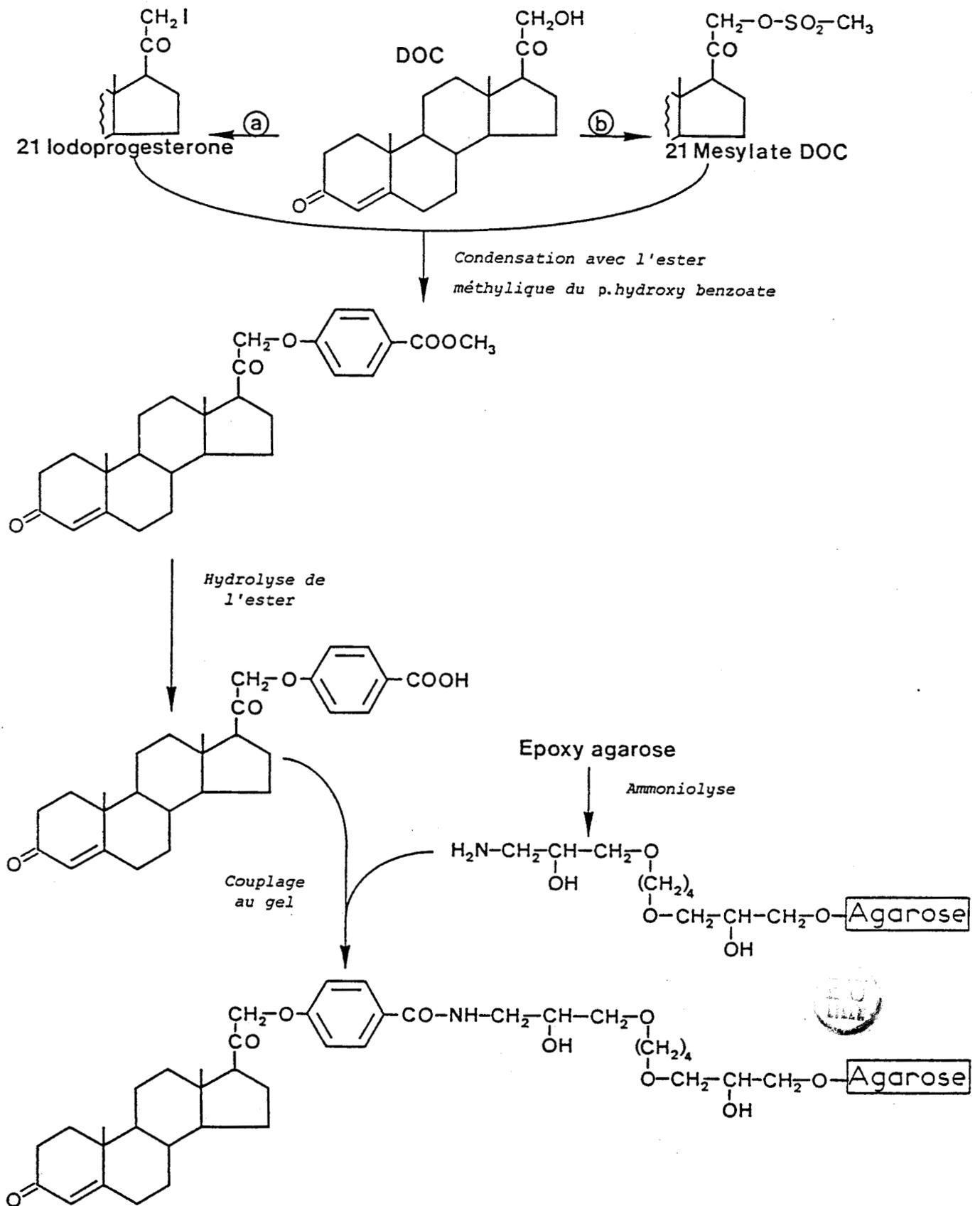


FIGURE 13

Synthèses du gel à désoxycorticostérone proposées par GRANDICS et al
alternative (a) : référence 122
alternative (b) : référence 123

conditions de même que les étapes ultérieures, gel filtration et DEAE cellulose. Les résultats sont nettement moins intéressants, le rendement n'est que de 5 à 10% pour un taux de purification de 1000 fois environ. Il semble que ce sont surtout les dernières étapes qui affectent le rendement à cause de la dissociation du stéroïde ou du récepteur. La caractérisation physicochimique du matériel purifié a pu être réalisée :

- . coefficient de sédimentation 10,5 S.
- . rayon de Stokes (gel filtration sur Biogel 1 1,5 m) 6,8 nm.
- . poids moléculaire (PAGE/SDS) 90000.
- . transformation par chauffage en présence de cytosol avec liaison à la DNA cellulose.

L'éventualité de la présence de récepteur des minéralocorticoïdes n'est pas abordée, ni avant, ni après purification.

Ce même gel a été utilisé par HOUSLEY et PRATT (38) selon un protocole peu différent. Il n'est pas fait mention des résultats de purification, le but du travail concernant la caractérisation des formes phosphorylées.

Dans une étude analogue, SINGH et MOUDGIL (90) font appel au même gel d'affinité. Une étape préliminaire d'échange d'ions sur phosphocellulose permet d'éliminer des composés qui dégradent le récepteur. Après chromatographie d'affinité, le récepteur est purifié 114 fois avec un rendement de 60%. Après les deux étapes ultérieures, la purification est de 9000 fois et le rendement de 45%.

5) Depuis 1976, GOVINDAN a été l'origine de nombreuses publications consacrées à la purification du récepteur des glucocorticoïdes.

a) La méthode mise au point a été développée à partir de l'idée de SWEET et ADAIR qui suggèrent l'utilisation d'un bras chimiquement clivable comportant une liaison disulfure (127). Il convient évidemment de supprimer les réducteurs de thiols de tous les tampons avant l'étape de chromatographie d'affinité.

Les résultats concernant la mise au point font l'objet de deux

communications et d'une publication (128-130). Le gel, carboxyhexyl Sepharose 4B est couplé au ligand (^3H DOC hémisuccinate cystamide) en présence de carbodiimide soluble. La synthèse du ligand et du gel est représentée sur la figure 14. La capacité du gel est de $0,03 \mu\text{M/ml}$ de gel. Le protocole de purification comporte :

- une chromatographie de gel filtration du cytosol sur Sephadex G 200.
- le volume exclu est débarrassé du β -mercaptoéthanol par dessalage sur Sephadex G 25.
- le volume exclu précédent (100 ml) est passé sur une colonne de 8 ml de gel d'affinité. Après lavage, l'élution est obtenue par addition de $0,1 \text{ M}$ β -mercaptoéthanol. La mesure de la liaison spécifique de l'éluat est faite après échange de la ^3H DOC hémisuccinate cystéamide par de la ^3H dexaméthasone. La purification est de 6500 fois avec un rendement de 36%.

Afin de supprimer la liaison ester du ligand DOC hémisuccinate, une modification de la synthèse du gel est apportée (94, 131). En effet, les auteurs ont constaté la libération du stéroïde sous l'action des estérases présentes dans le cytosol. Pour cette nouvelle matrice d'affinité, une liaison C-N est introduite. La ^{14}C DOC est transformée en dérivé 21-chloro, et ce dernier est greffé sur le Sepharose CH cystamine (figure 15) La capacité du gel est nettement supérieure, $0,25 \mu\text{M}$ stéroïde/ml de gel.

- dans un premier temps, le récepteur est prépurifié par précipitation par le sulfate de protamine. Le β mercaptoéthanol et le sulfate de protamine sont éliminés par chromatographie sur CM Sephadex.
- l'étape d'adsorption de la chromatographie d'affinité se déroule en batch à $0-4^\circ\text{C}$ pendant 12 heures (rapport cytosol/gel égal à 17,5). Après un lavage important, l'élution est réalisée par addition de $0,1 \text{ M}$ β -mercaptoéthanol. L'éluat est dessalé sur Sephadex G 25, et le ligand échangé contre de la ^3H dexaméthasone pendant 90 minutes à 0°C .
- une dernière chromatographie sur DEAE cellulose permet de séparer deux composants, l'un de poids moléculaire 90000, l'autre 45000.

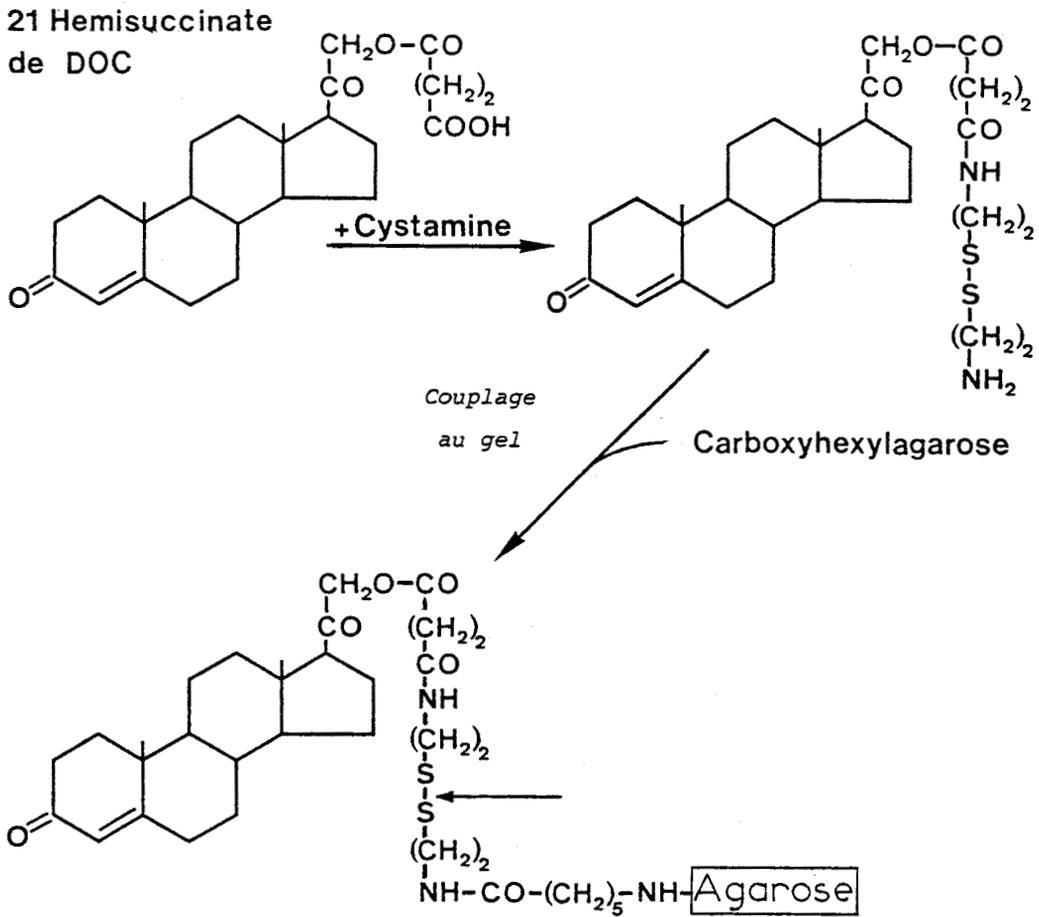


FIGURE 14

Gel d'affinité à bras clivable proposé primitivement par GOVINDAN et SEKERIS (130)

Lors de l'élution, la coupure se fait au niveau de la flèche.

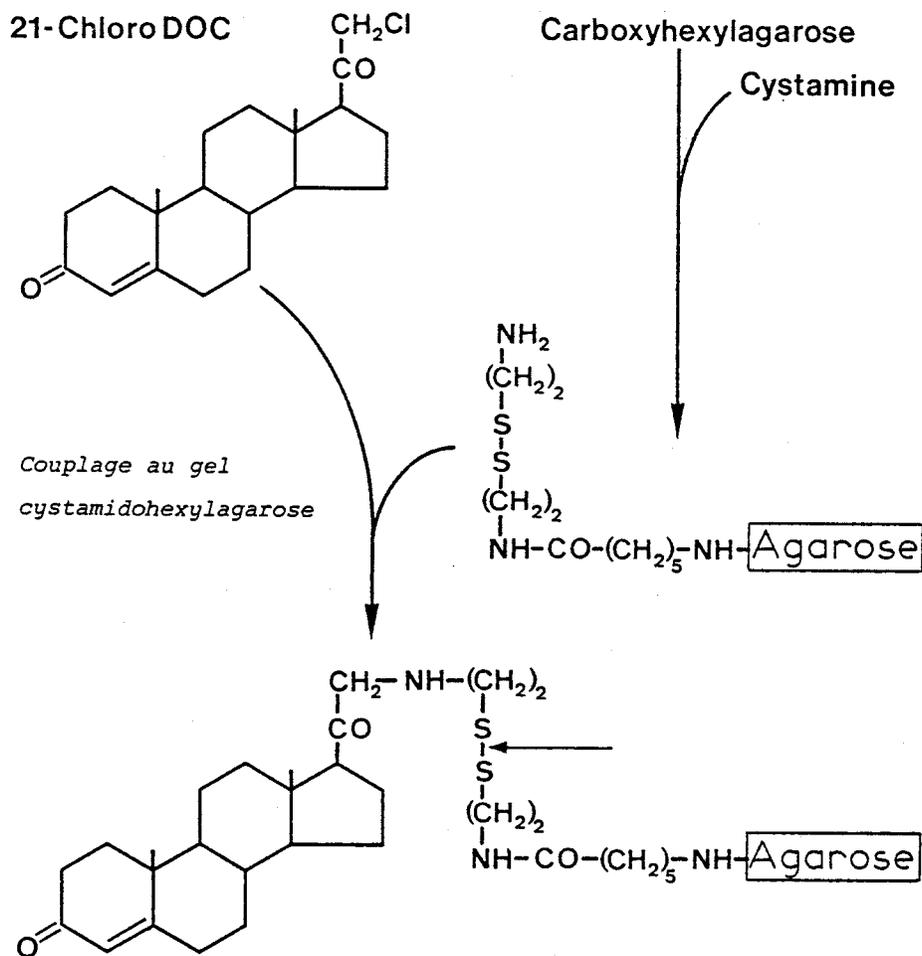


FIGURE 15

Gel à bras clivable préparé par GOVINDAN et al. (94)

La synthèse est réalisée à partir de la 21 chloro DOC marquée au ¹⁴C. L'élution en présence de mercaptoéthanol se fait par coupure de la molécule au niveau de la flèche.

La purification complète est de 12000 fois, l'étape de chromatographie d'affinité apportant un facteur 1500. Le rendement global est de 46%, l'étape d'affinité seule a un rendement de 75%.

Il n'y a pas d'autres éléments de caractérisation que l'électrophorèse PAGE/SDS. L'anticorps polyclonal préparé reconnaît le récepteur du cytosol de foie de rat et de cellules HTC.

Cependant, ce gel a été à nouveau modifié. Le principe reste le même, mais le ligand immobilisé est la dexaméthasone (76). Les auteurs ne précisent pas la préparation ni les résultats obtenus.

Tous ces éléments apparaissent dans la publication suivante (132) de GOVINDAN et MANZ. L'utilisation de la dexaméthasone est apparue nécessaire pour deux raisons : la DOC n'est pas suffisamment spécifique et lie d'autres protéines ; d'autre part, elle peut être modifiée par des réactions métaboliques. Deux techniques d'immobilisation sont proposées (figure 16). Les gels obtenus renferment 0,35-0,40 μ M stéroïde/ml gel sous forme tritié.

- avant la chromatographie d'affinité, le cytosol est traité par échange d'ions sur une colonne de phosphocellulose. L'étape d'affinité se déroule en batch pendant 16 heures ; le rapport cytosol/gel est égal à 25. Après lavage, l'élution se fait en présence de 0,1 M β -mercaptoéthanol pendant 2 heures. Le rendement est de 90% et le taux de purification de 8800 fois.
- après transformation par exposition à la chaleur (25°C pendant 30 mn), l'éluat est purifié sur DNA cellulose avec élution par le phosphate de pyridoxal (0,01 M).

Le rendement global est de 68% et le récepteur est purifié 10500 fois sous forme transformée. Seul élément de caractérisation, l'électrophorèse PAGE/SDS montre une bande de 90000.

Ce gel (variante B) a été utilisé par TSAWDAROGLOU (123) La préparation et les caractéristiques du gel sont différentes. L'étape de succinylation est remplacée par une bromoacétylation. Le taux de greffage en cystamine est de 0,8-1 μ M/ml de gel. Le gel d'affinité comporte 86 nmol stéroïde/ml gel, soit un rendement de couplage très

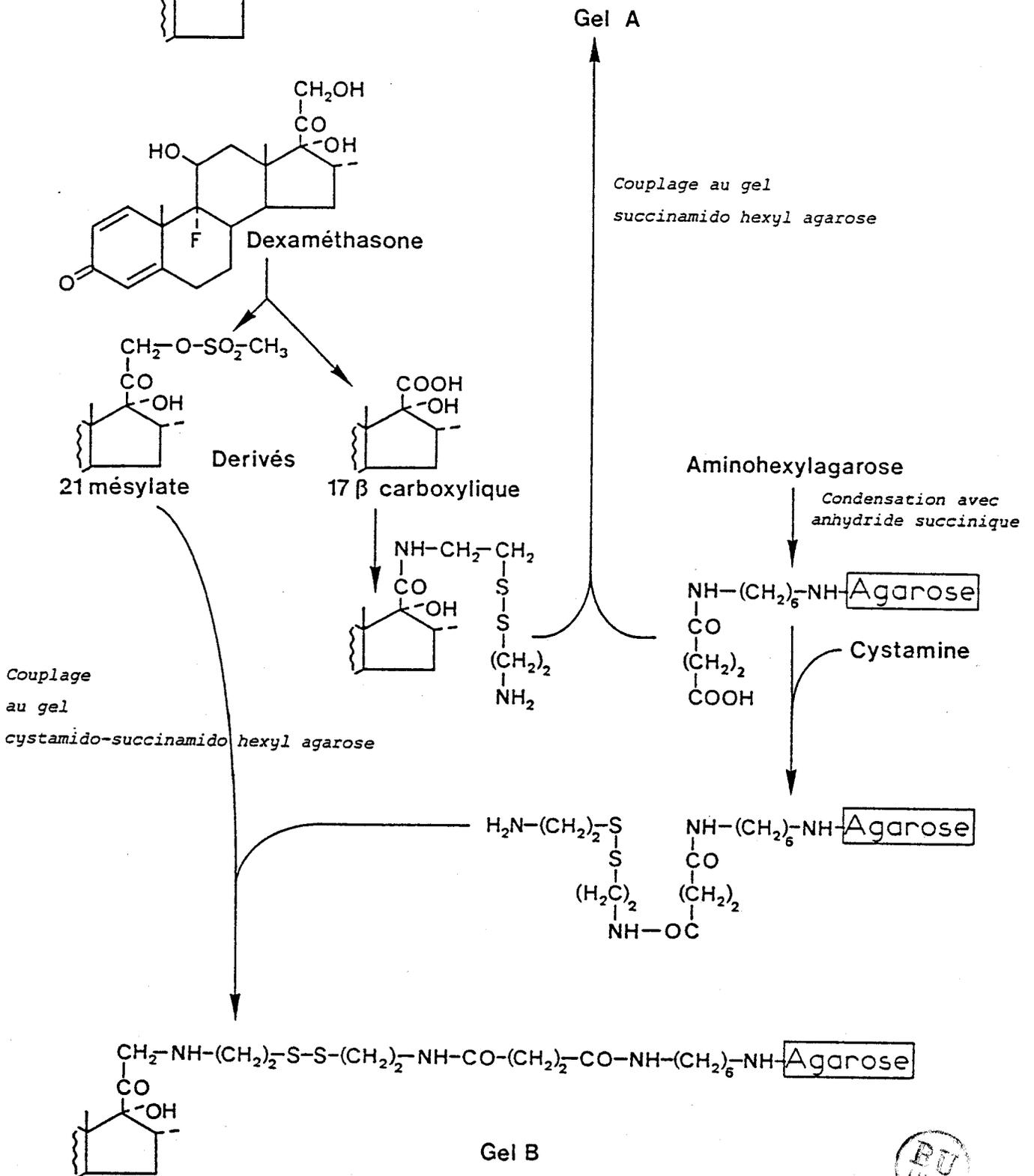


FIGURE 16

Synthèse du gel à dexaméthasone proposé par GOVINDAN et MANZ (132)

Schéma établi selon la description du paragraphe "Matériel et Méthodes". Les deux gels diffèrent par u groupement CH₂ en 21.



faible. Comme dans les cas précédents, il n'est pas précisé si les sites NH_2 résiduels sont bloqués. Le protocole de purification est identique, la dernière étape recommandée est une chromatographie sur DEAE cellulose à pH 8,5 (sans transformation préalable du complexe hormone-récepteur). Le rendement et le taux de purification après cette étape ne sont pas mentionnés.

Après chromatographie d'affinité, le rendement est de 44% pour une purification de 8300 fois ; ces valeurs sont comparables aux précédentes obtenues par GOVINDAN. Ce dernier reprend ce protocole (134) en incluant une étape d'échange entre $|\text{}^3\text{H}|$ dexaméthasone et le ligand de chromatographie d'affinité, suivie de l'étape de DEAE cellulose.

b) Malgré ces résultats, GOVINDAN et GRONEMEYER (117) délaissent ces supports à bras clivable pour une technique classique empruntée en grande partie aux résultats que nous avons publiés. La synthèse du gel fait intervenir le dérivé 17 β -carboxylique de la dexaméthasone qui est couplé sur l'Affigel 102 par la technique des esters activés. Le taux de greffage de l'Affigel est de 15 $\mu\text{M}/\text{ml}$ de gel et sa structure est la suivante : $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$. Le gel préparé comporte 5 μM de stéroïde/ml gel, et il n'est pas précisé si les sites NH_2 libres sont bloqués. Le protocole de purification comporte trois étapes :

- chromatographie sur phosphocellulose : récupération du volume exclu.
- chromatographie d'affinité avec adsorption en colonne sur le gel d'affinité dilué au 1/4 avec du Sepharose (débit 1,5 ml/mn). Le lavage est réalisé en colonne. L'élution se fait en présence de 10^{-6} M $|\text{}^3\text{H}|$ TA et 0,05 M thiocyanate de sodium ; elle est poursuivie pendant 5 heures à 0°C.
- l'éluat de chromatographie d'affinité est dilué au 1/3 et laissé 30 mn à 20°C. Il est alors purifié par chromatographie sur DNA cellulose avec élution par 0,5 M NaCl.

L'étape de chromatographie d'affinité apparaît très performante (90% de rendement et 6000 fois de taux de purification). Au terme de l'étape suivante, le rendement est de 63% pour une purification de 7800 fois. Il n'y a pas de caractérisation physicochimique du récepteur mis

à part une étude électrophorétique.

6) Récemment, MANZ et al. (135) ont publié un protocole dit de "chromatographie d'affinité sandwich" à l'aide du système avidine-biotine. L'utilisation de ce système repose sur l'affinité très élevée ($K_A = 10^{15} M^{-1}$) entre l'avidine, protéine du blanc d'oeuf, et une vitamine hydrosoluble, la biotine. Le ligand spécifique, dérivé 17 β -carboxylique de la dexaméthasone, est couplé à la biotine par l'intermédiaire d'un bras espaceur diamino-pentane (figure 17). Le cytosol, préparé à partir de tumeur splénique humaine, est incubé en présence du dérivé bifonctionnel. Le gel, avidine-Sépharose, est alors ajouté et l'incubation poursuivie pendant 1 heure. Après lavage du gel, l'élution du récepteur est réalisée par incubation en batch en présence de $3,2 \cdot 10^{-6} M$ 3H dexaméthasone. Le taux de purification obtenu est d'environ 19500 fois avec un rendement de 60% en une étape. Cependant, le taux de pureté n'est que de 8,7%. Par passage sur DEAE cellulose, deux pics de radioactivité liée sont récupérés dont les poids moléculaires sont de 43000 et 90000.

La purification de la forme non transformée du complexe hormone-récepteur a pu être accomplie par plusieurs groupes. Cependant, certains auteurs, notamment GOVINDAN terminent toujours par une étape de transformation associée à une chromatographie d'échange d'ions sur support anionique. Deux principes généraux de chromatographie d'affinité sont mis en oeuvre, soit la technique classique, soit la technique comportant un bras clivable par des agents chimiques. Une autre remarque concerne le ligand immobilisé qui est, soit la DOC, soit un dérivé de la dexaméthasone.

Enfin, un dernier commentaire général mérite d'être fait. Il existe dans tous les travaux publiés à ce jour, une grande différence entre les taux de purification et les taux de pureté obtenus (Tableau V) Cette discordance pose en fait le problème du dosage des protéines après purification, de la mesure de l'activité de liaison et du poids moléculaire retenu pour faire le calcul. Ces divers aspects ont été abordés et discutés en détail par IDZIOREK (136).

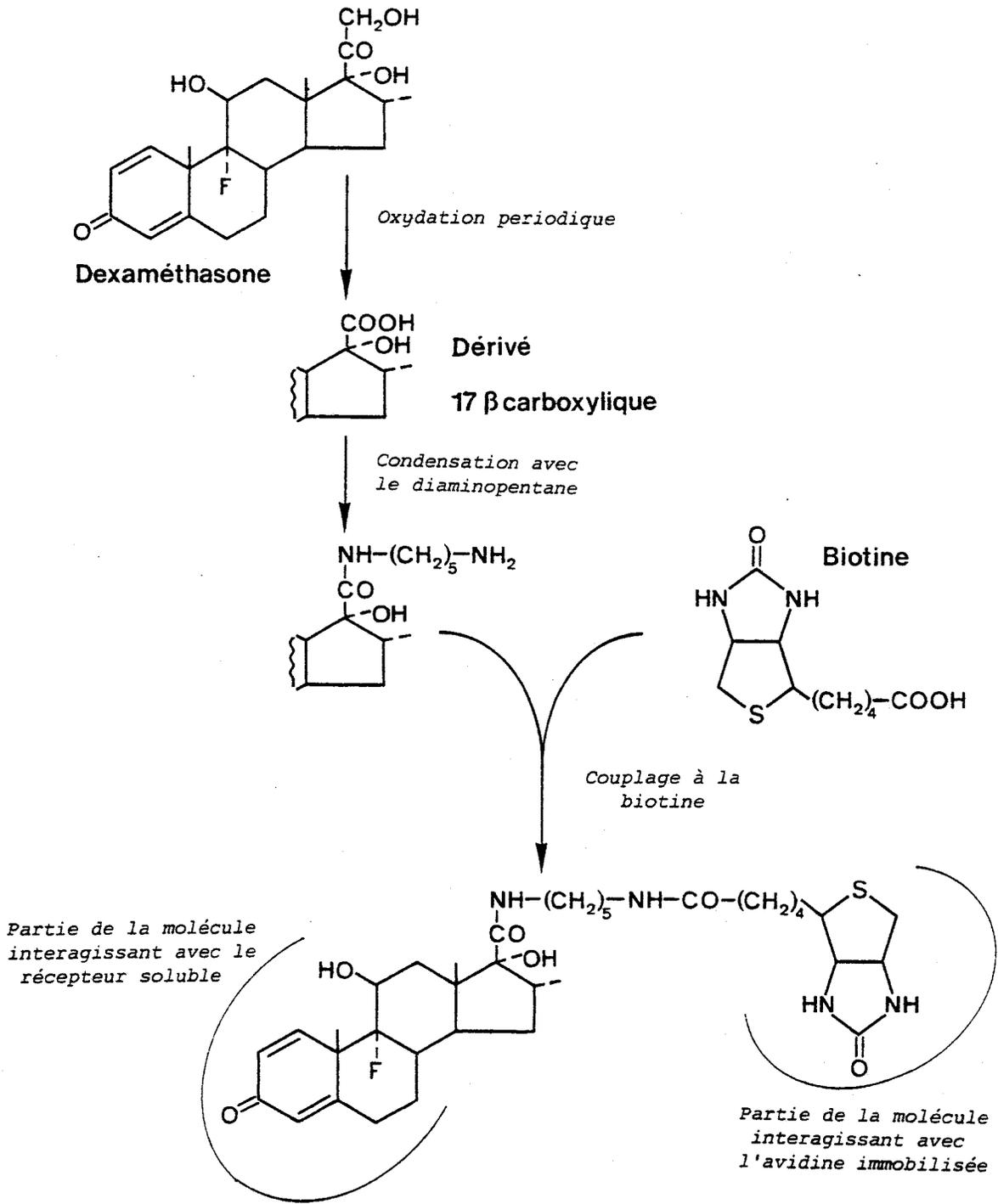


FIGURE 17

Synthèse du dérivé bifonctionnel biotine-dexaméthasone décrit par MANZ et al. (135)

Cette molécule est utilisée pour la purification du récepteur par "chromatographie d'affinité sandwich" l'aide du système avidine-biotine



	AUTEURS (ref)	TISSU	METHODE	RESULTATS			CARACTERISATION					
				TAUX x	REND %	A.S.	S	pHi	M.W. G.F. nm	PAGE kD	L.N.	H %
Récepteur transformé	LITWACK (97)	Foie de rat	DEAE Sephadex Sephadex G 100	300			4,5	6,7	6,7		+	
	HACKNEY (96)	Fibroblastes souris	↓sulf. d'NH ₄ Sephadex DEAE Sephadex	800	1							
	MILGROM (101)	Foie de rat	Phosphocellulose ↓sulf. d'NH ₄ DEAE Sephadex	940	24	0,4	4,0					
	EISEN (104)	Foie de rat	DNA Cellulose	11 000	80	6,5	4,0	6,0			+	
	BEATO (110)	Foie de rat	Phosphocellulose ↓sulf. d'NH ₄ gradient	59 000	2		3,0		2,7	40		
	WRANGE (112)	Foie de rat	DNA cellulose	8 500	25-30	8,6	3,5	5,8	6,0	94	+	80%
	GOVINDAN (117)	Foie de rat	DNA cellulose DEAE cellulose Xto affinité DNA cellulose	6 500 7 800	15 63	6,6 6,7				92		 62%
Récepteur non transformé	FAILLA (120)	Cellules HTC	Xto affinité gel filtration	1 700	37	0,7	9,0				+	4%
	GRANDICS (125)	Foie de rat	Xto affinité gel filtration DEAE cellulose	4 000	35	5,4	9,4		7,3	90	+	96%
	WEISZ (121)	Foie de rat	Xto affinité gel filtration DEAE cellulose	5 100	46	1,2	5,0		6,0			26%
	IDZIOREK (189)	Foie de rat	↓sulf. protamine Xto affinité HPSEC	11 500	18	3,9	8,2	5,1	7,0	90	+	57%

TABLEAU V

Comparaison des diverses méthodes de purification du récepteur des glucocorticoïdes

TAUX de purification

REND : Rendement de purification

A.S. : Activité spécifique en nmol/mg protéines

S : Constante de sédimentation en gradient de saccharose

M.W. : Poids moléculaire G. F. Rayon de Stokes mesuré en gel filtration en nm

PAGE M_r mesuré en électrophorèse dénaturante en kD

L.N. : Liaison aux noyaux

H. : Homogénéité de la préparation exprimée en pourcentage

DEUXIEME PARTIE

Ce travail a été entrepris, avec comme but la purification du récepteur des glucocorticoïdes. Ce sujet s'inscrivait dans le cadre très général des recherches sur les protéines de transport des hormones glucocorticoïdes et de l'étude du mécanisme moléculaire de transmission du message hormonal.

Au moment où nous avons abordé ce sujet, l'hypothèse d'un mécanisme en deux temps, cytoplasmique puis nucléaire, était bien établie. Il nous est apparu intéressant d'essayer de purifier le récepteur sous sa forme non transformée, ce qui nous permettait d'élargir nos possibilités d'études ultérieures sur ce matériel purifié. L'expérience acquise par LE GAILLARD en chromatographie d'affinité, nous a incité à choisir cette méthodologie, particulièrement bien adaptée à la purification des enzymes et des protéines de transport. L'application de la chromatographie d'affinité à la purification des récepteurs des hormones stéroïdes venait tout juste de débiter. Le protocole décrit par FAILLA et al. (120) avait abouti à l'isolement de très petites quantités de récepteur, très partiellement purifié. Parallèlement, GOVINDAN avait simplement pris date pour son projet de gel d'affinité comportant un bras espaceur clivable (128, 129).

Concernant les autres récepteurs des hormones stéroïdes, les travaux de purification en étaient également à leurs débuts. Pour le récepteur de progestérone, KUHN et al. (137) avaient préparé un gel désoxycorticostérone-albumine-agarose par couplage de l'ester 21 hémisuccinique sur les ϵNH_2 des lysines. Une synthèse analogue à partir des dérivés 17 β hémisuccinique de l'estriol et de l'estradiol avait été employée par SICA et al. (138) pour préparer des gels spécifiques du récepteur des estrogènes. D'autres supports, comme la cellulose couplée à l'acide p.aminobenzoïque, avaient été proposés pour immobiliser l'estradiol (139). Une démarche et un schéma de préparation de gels radicalement différents avaient été suggérés par TRUONG et al. (140). La synthèse de dérivés en 7 α de l'estradiol comportant une fonction carboxylique permettait la préparation de gels stables chimiquement. D'autre part, la purification elle-même était abordée par une mise au point minutieuse des divers paramètres de l'étape de chromatographie d'affinité (141).

Les connaissances dans ce domaine de la purification des récepteurs des hormones stéroïdes par chromatographie d'affinité étaient donc restreintes.

Notre travail expérimental a été réalisé en suivant une démarche méthodique dont les objectifs étaient les suivants :

1) préparer un gel d'affinité original en étudiant les divers paramètres de chaque étape de cette mise au point.

2) définir un protocole de purification du récepteur des glucocorticoïdes en veillant particulièrement à sa reproductibilité et à son efficacité, et au terme de cette étape, envisager la caractérisation physicochimique et fonctionnelle du récepteur cytosolique purifié.

Les résultats obtenus au cours de ce travail sont rapportés dans cette deuxième partie et discutés en fonction des conclusions publiées dans le même temps des autres équipes.

CHAPITRE 1

MISE AU POINT D'UN GEL D'AFFINITE SPECIFIQUE

L'intérêt de la chromatographie d'affinité réside dans la possibilité qu'elle offre de pouvoir séparer de façon sélective une protéine particulière d'un mélange complexe de plusieurs centaines de biomolécules. Cette technique, introduite par CUATRECASAS et al. (142) est basée sur la spécificité fonctionnelle des protéines. La plupart des macromolécules biologiques possèdent une région hautement spécialisée, destinée à une fonction unique : le site actif. La fixation covalente sur un support insoluble de la molécule complémentaire de ce site ou ligand, permettra de retenir la protéine à purifier par adsorption spécifique sur le gel d'affinité. Après un lavage extensif, qui élimine les protéines qui ne présentent pas d'affinité pour le ligand, l'élution est accomplie généralement par compétition en présence d'une concentration élevée du ligand ou d'un analogue soluble. Les performances de la chromatographie d'affinité sont en grande partie fonction du gel d'affinité lui-même.

La mise au point, ou plutôt le "design" d'un gel d'affinité comporte plusieurs étapes :

- . choix du ligand.
- . choix du bras espaceur.
- . choix du support chromatographique.

I - CHOIX DU LIGAND

L'hormone naturelle, c'est-à-dire la corticostérone chez le rat et le cortisol chez les autres espèces animales et chez l'homme, semble logiquement être le ligand de choix. Cependant, les stéroïdes synthétiques primitivement introduits et développés dans un but thérapeutique, ont rapidement été adoptés comme ligands de référence pour les études in vitro. Parmi ceux-ci, les dérivés 9 α -fluoro, dont la dexaméthasone et l'acétonide de triamcinolone, présentent trois avantages importants par rapport aux dérivés naturels : (i) une affinité plus élevée vis à vis du récepteur (40) ; (ii) une spécificité plus grande; (iii) enfin ils sont peu métabolisés in vitro dans un milieu acellulaire et ils ne sont pas liés spécifiquement par la transcortine.

Nous avons étudié ces dérivés synthétiques et naturels du point de vue de leur affinité vis à vis du récepteur et de leur stabilité dans le cytosol. Les résultats regroupés dans le tableau I montrent que :

- l'affinité des dérivés fluorés est toujours supérieure au minimum d'un facteur 10 à celle des glucocorticoïdes naturels. Dans le cas du foie de lapin, le temps d'incubation plus long (16 heures) majore l'affinité relative des dérivés synthétiques du fait de la dégradation métabolique des hormones naturelles.
- les dérivés fluorés ne sont pas métabolisés au niveau du cytosol.
- la transcortine ne présente pas d'affinité vis à vis des dérivés synthétiques.

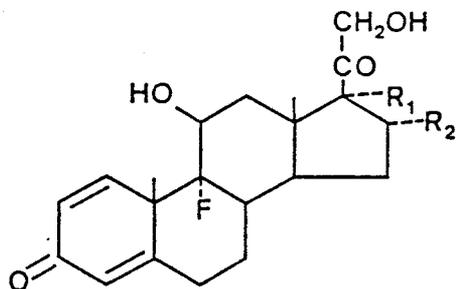
Nous avons également effectué des essais de purification avec le HCAC-Sépharose, gel d'affinité à corticostérone préparé par LE GAILLARD et al. (143) pour isoler la transcortine. En présence de cytosol, il n'y a pas rétention spécifique du récepteur par le gel. Ces résultats ont été confirmés par ATGER et MILGROM (101).

Parmi les dérivés synthétiques, nous avons préféré la dexaméthasone pour deux raisons : (i) la dexaméthasone est disponible sous forme tritiée, à la différence de son dérivé 17-désoxy ; (ii) la structure chimique est compatible avec les modifications envisagées (cf ce chapitre, § I B).

A) CHOIX DU POINT D'ATTACHE SUR LE LIGAND

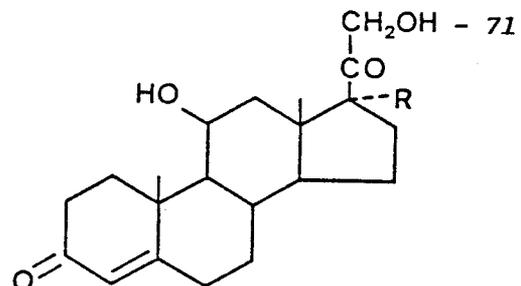
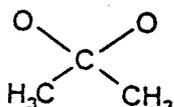
L'examen de la formule chimique de la dexaméthasone (9 α -fluoro-16 α -méthyl-11 β , 17 α , 21-trihydroxy-1,4-pregnadiène-3,20-dione) fait apparaître deux possibilités :

- soit utiliser l'un des groupements chimiques présents sur le noyau directement ou après modification. Cette alternative a été adoptée par LE GAILLARD et al. (143) pour préparer le HCAC-Sépharose. C'est également cette voie qui a été suivie par FAILLA et al. (120) et par GOVINDAN (94) pour la synthèse des gels d'affinité destinés au récepteur des glucocorticoïdes. (cf première partie, chap. II, § III).



Analogues de synthèse

	R ₁	R ₂
Dexaméthasone	OH	CH ₃
Désoxymétasone	H	CH ₃
Triamcinolone	OH	OH
Acétonide de triamcinolone		



Dérivés naturels

	R
Corticostérone	H
Cortisol	OH

STEROÏDE	AFFINITÉ RELATIVE VIS À VIS				METABOLISME FOIE DE LAPIN 16 H (b)
	C B G		R E C E P T E U R		
	Rat (a)	Lapin (b)	Foie de rat (b)	Foie de lapin (b)	
Corticostérone	100	n.d.	100	100	n.d.
Cortisol	106	100	120	500	11 %
Dexaméthasone	< 1	< 1	650	20 000	0 %
Désoxymétasone	< 1	n.d.	1 400	3 000	n.d.
Acétonide de triamcinolone	n.d.	< 1	500	6 200	n.d.

TABLEAU I

Comparaison des affinités relatives des glucocorticoïdes naturels et synthétiques vis à vis de la CBG et du récepteur cytosolique

L'affinité est exprimée arbitrairement sur la base d'une valeur égale à 100 pour le stéroïde naturel de référence.

(a) d'après WESTPHAL U, in Steroid-protein interactions. Monographs on Endocrinology, vol. IV, eds F. GROSS, AL LABHART, T. MANN, L.T. SAMUELS, J. ZANDER.

(b) résultats personnels déterminés par compétition sur sérum de lapin ou cytosol de foie de rat et de lapin. L'appréciation du métabolisme est réalisée en incubant 0,5 ml de cytosol 16 h à 0-4°C 10⁻⁸ M de stéroïde tritié. Le stéroïde est extrait par 3 x 1 ml d'acétate d'éthyle en présence de 5 µg de stéroïde froid dans le premier extrait. Après cumulation et évaporation, la répartition de la radioactivité est étudiée en chromatographie couche mince, extraction par le méthanol et comptage.

- soit greffer un groupement fonctionnel sur un atome de carbone appartenant au noyau polycyclique. Cette possibilité a été retenue par TRUONG et al. (141, 144) qui ont introduit une chaîne hydrocarbonée ω - carboxylique en position 7α de l'estradiol.

Cette dernière solution réclame une étude chimique approfondie, l'introduction d'un substituant sur le noyau stéroïde nécessite souvent plusieurs étapes et représente un problème de synthèse organique relativement complexe.

Nous avons préféré rechercher parmi les substituants de la dexaméthasone, celui qui serait le plus favorable au couplage avec le support. Les résultats de ROUSSEAU et SCHMIT (44) sur les relations structure-activité des glucocorticoïdes étudiées sur cytosol de cellules d'hépatome HTC, permettent de mesurer l'impact de l'un ou l'autre des substituants vis à vis de l'affinité pour le récepteur. Le tableau II regroupe une partie de ces résultats et amène certains commentaires :

- la suppression de l'hydroxyle en 11β fait chuter l'affinité d'un facteur 10 pour les dérivés 17α hydroxylés, mais modifie à un degré moindre la liaison des dérivés 17 desoxy.

- le remplacement de l'hydroxyle en 11β par une fonction cétone est très défavorable.

- les substituants en 17α n'apparaissent pas être d'une importance aussi cruciale.

- la disparition de la fonction cétone en 20 se traduit par une chute dramatique de l'affinité.

- la suppression de l'hydroxyle en 21 fait baisser l'affinité modérément d'un facteur 1,5 à 5.

Les modifications en 21 ne semblent donc pas affecter significativement l'affinité ; par contre, la cétone en 20 doit être préservée. Les travaux de MUNCK et al. (145) indiquent d'autre part que le groupement hydroxyle en 21 ne serait pas profondément enfoui dans le site de liaison ; en effet, l'ester 21 hémisuccinique du cortisol est un bon compétiteur vis à vis de la liaison du cortisol au récepteur. Enfin, les premières tentatives de chromatographie d'affinité ont été réalisées avec des gels sur lesquels le stéroïde était immobilisé par l'intermédiaire du $C21$ (94, 120).

POSITION MODIFIEE	SUBSTITUTION		A F F I N I T E			
	AVANT	APRES	A V A N T	K_D nM	A P R E S	K_D nM
11	β-OH	β-H	Cortisol	10,5	Cortexolone	128
			Corticostérone	7,0	D O C	9,1
			11 βOH progestérone	10,3	Progestérone	51,6
	β-OH	=O	Cortisol	10,5	Cortisone	631
			Corticostérone	7,0	11 déhydrocortisone	919
			Prédnisolone	12,4	Prédnisone	1 019
17	α-OH	α-H	Dexaméthasone	5,6	Désoxymétasone	0,8
			Cortisol	10,5	Corticostérone	7,0
			Cortexolone	128	D O C	9,1
			17 αOH progestérone	192	Progestérone	51,6
			Progestérone	51,6	20 αOH progestérone	> 10 000
21	-OH	-H	Corticostérone	7,0	11 βOH progestérone	10,3
			D O C	9,1	Progestérone	51,6
			Cortexolone	128	17 αOH progestérone	192

TABLEAU II

Effet de diverses modifications chimiques des glucocorticoïdes sur l'affinité vis à vis du récepteur des cellules HTC d'après ROUSSEAU et SCHMIT (44)

L'affinité des composés est déterminée par des expériences de compétition sur du cytosol de cellules HTC.

B) LIAISON GEL-LIGAND

Le stéroïde, du fait de sa petite taille, doit être écarté du support au moyen d'un élément bifonctionnel : le bras espaceur. Cependant, ce bras peut modifier l'interaction récepteur-ligand et avoir un effet défavorable. Dans le but d'étudier cette interaction et de choisir le bras-espaceur le plus favorable, nous avons envisagé le protocole suivant (figure 1) :

-(1)- aménagement fonctionnel en C21 de la dexaméthasone de façon à respecter la cétone en 20 indispensable, et à faire apparaître un groupement chimique susceptible d'être engagé dans une liaison covalente avec l'extrémité du bras espaceur.

-(2)- synthèse de composés "dexaméthasone-bras", en utilisant des analogues monofonctionnels, qui seront testés in vitro sur le plan de leur affinité vis à vis du récepteur et de leur dissociation.

-(3)- à partir des résultats précédents, préparation des gels d'affinité correspondants.

Parmi les composés bifonctionnels susceptibles de servir de bras espaceurs, les plus courants sont les dérivés ω -aminoalkyl de type $^2\text{HN}-(\text{CH}_2)_n-\text{R}$ où R peut être, soit un groupement carboxylique, soit une fonction amine. Toutes les longueurs sont envisageables pour n compris entre 2 et 12. L'allongement supplémentaire peut également être obtenu par succinylation si nécessaire (146). D'autre part, les analogues monofonctionnels alkylamine et acide sont des produits de synthèse usuels.

1) Aménagements fonctionnels possibles en C21. Le groupement terminal hydroxyméthyl en C21 de la dexaméthasone peut être modifié de différentes façons en vue de son immobilisation (figure 2).

a) couplage direct sans modification.

Ce type d'immobilisation peut s'envisager avec des supports activés selon une technique moins courante qui met en oeuvre les bisépoxyranes (147). Le groupement époxyde à l'extrémité du bras espaceur peut réagir avec une fonction alcool primaire en milieu alcalin pour former une liaison éther. Cette solution n'a pas été retenue : (i) en raison des conditions de couplage, les stéroïdes ne sont généralement pas stables en milieu alcalin (148, 149) ; (ii) du fait

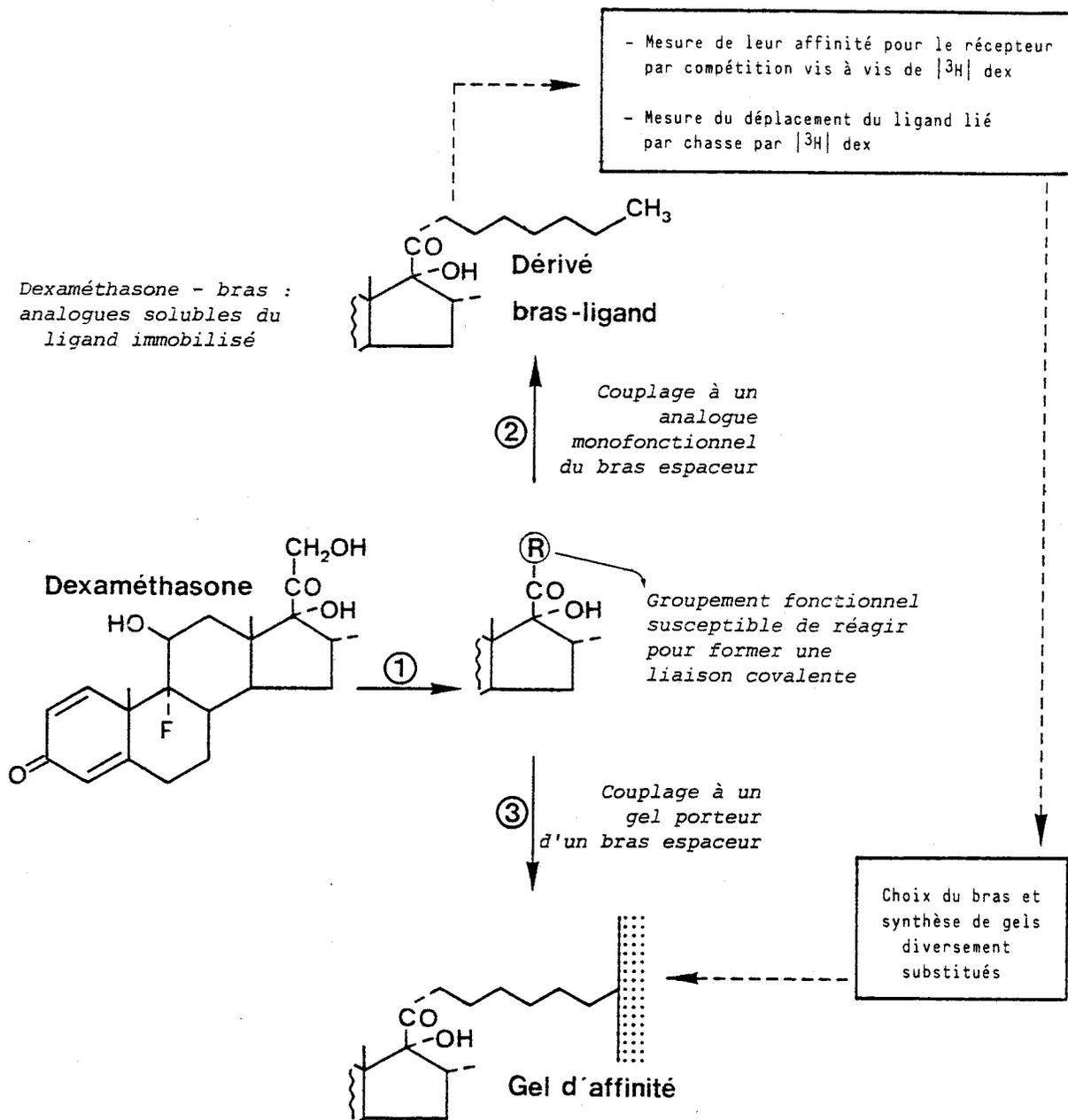


FIGURE 1

Schéma de la stratégie envisagée pour l'élaboration d'un gel d'affinité

- ① Une première étape amène à introduire en 21 une fonction réactive R nécessaire pour coupler le ligand au support chromatographique.
- ② Des composés bras-ligand sont synthétisés afin de tester leur affinité et de choisir le type de bras le mieux adapté.
- ③ Sur la base des résultats précédents, les gels d'affinité correspondants sont synthétisés.

sans modification chimique préalable du ligand

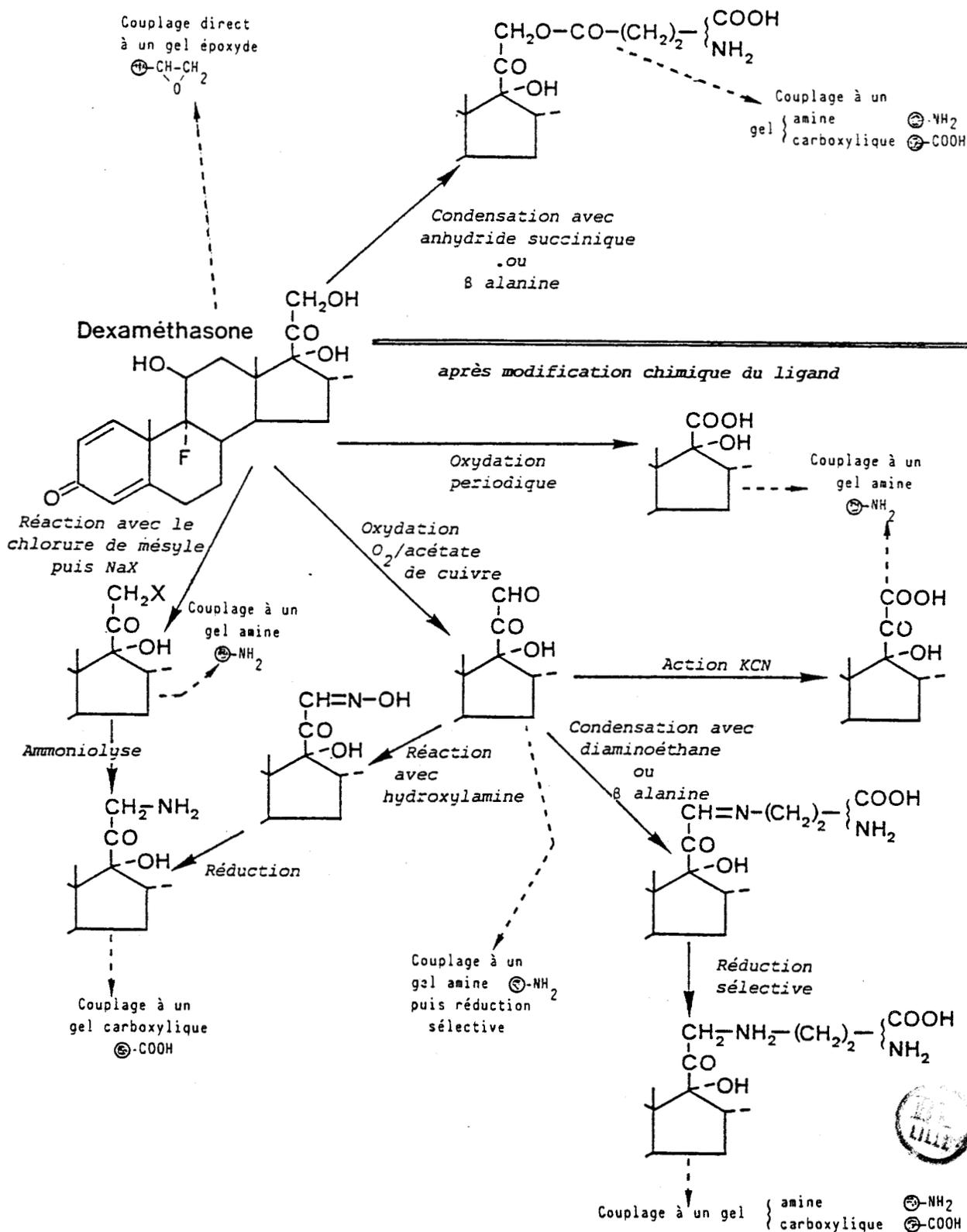


FIGURE 2

Modifications chimiques de la dexaméthasone envisageables pour introduire une fonction susceptible de réagir avec un gel porteur d'un bras espaceur

qu'il n'existe qu'un nombre limité de dérivés bisépoxydes.

b) couplage après greffage d'un composé sur la fonction alcool.

Cette éventualité représente la solution la plus classique. La fonction alcool primaire est estérifiée par un diacide (malonique, succinique ou glutarique) ou par un ω -aminoacide (glycine, β -alanine ou homologues supérieurs). La fonction libre sera ensuite couplée sur le gel substitué. Ce type de liaison a été employé par ROSNER et al. (150) pour immobiliser du cortisol, par KUHN et al. (137) pour préparer un gel à désoxycorticostérone et par SICA et al. (138) pour fixer de l'estradiol. Ces gels ont tous été utilisés dans des protocoles de purification, mais ils présentent l'inconvénient majeur d'être instables et de perdre des sites ligands par hydrolyse (151, 152). La coupure des liaisons ester par les estérases sériques et d'origine hépatique a été mise en évidence pour les dérivés stéroïdes par HUBENER et SCHMIDT (153). LE GAILLARD (154) a établi que le gel préparé par ROSNER et al. perdait du cortisol au cours de la conservation et également en présence de sérum. D'autres résultats (44) confirment la labilité des liaisons ester en C21 dans un milieu tampon à pH 7,4, ce qui explique la perte du ligand pendant la conservation du gel et la nécessité d'un lavage abondant avant son utilisation (137). Pour prévenir l'action des estérases cytosoliques, certains auteurs introduisent une étape de prépurification avant la chromatographie d'affinité. Ainsi, la précipitation par le sulfate d'ammonium (137) ou la chromatographie sur héparine-agarose (152) permettent d'éliminer les estérases et d'éviter le relargage du ligand au cours de l'étape ultérieure.

Cependant, afin d'éviter tout risque de coupure de la liaison gel-ligand, nous avons d'emblée écarté ce type de gel d'affinité comportant une liaison ester.

c) couplage après modification chimique de la fonction alcool primaire.

Trois fonctions chimiques qui peuvent être synthétisées à partir d'un alcool primaire, sont susceptibles de pouvoir réagir avec l'extrémité aminée ou carboxylique du bras espaceur.

* Introduction d'une fonction amine en C21.

La synthèse du dérivé 21-amino-dexaméthasone est réalisable selon un protocole en plusieurs étapes (155) : formation du dérivé 21-mésylate, transformation en 21-halo et enfin remplacement de l'halogène par une fonction amine primaire.

Une autre voie a été décrite (156), qui fait intervenir les dérivés 21-aldéhyde puis 21-oxime qui est transformé en dérivé 21-amino-dexaméthasone. Comparée aux autres possibilités (cf ci-après), celle-ci apparaît plus contraignante par le nombre de produits intermédiaires qui multiplie les problèmes de purification et abaisse le rendement.

* L'oxydation ménagée de la fonction alcool primaire conduit au dérivé 21-aldéhyde (156, 157). Celui-ci peut être couplé directement à un gel ω -aminoalkyl. La base de Schiff est ensuite réduite de façon à éviter son hydrolyse. Un schéma analogue peut être envisagé avec l'introduction d'un ω -aminoacide ou d'une diamine, ce qui permet d'effectuer la réduction en phase liquide homogène, avant le couplage au gel. Dans les deux cas, la nécessité d'une étape de réduction est embarrassante, compte tenu de la structure de la dexaméthasone qui comporte des doubles liaisons et des fonctions cétone indispensables.

La poursuite de l'oxydation du dérivé 21-aldéhyde permet d'obtenir l'acide 21-oïque (157) qui peut être couplé directement à un gel ω -aminoalkyl. L'introduction d'une fonction acide peut également s'envisager selon un protocole plus simple.

* L'oxydation périodique du maillon dicarboné 20-céto 21-hydroxyméthyl en 17 β aboutit à la formation du dérivé 17 β -carboxylique à la suite de l'oxydation de la cétone en 20 et de l'élimination du groupement hydroxyméthyl sous forme de formaldéhyde (158). Le couplage à un gel aminé fait apparaître une liaison amide qui est stable dans les milieux biologiques et permet de ménager la fonction C=O en 20, indispensable. Cette approche a été retenue par LE GAILLARD et al. (143) pour coupler le dérivé d'oxydation de la corticostérone à un gel diamino-dipropylamine. La liaison amide formée n'est pas hydrolysée dans les conditions de conservation et d'utilisation du gel d'affinité.

2) Solution retenue

Plusieurs raisons nous ont amené à choisir cette dernière solution. Le protocole de modification chimique est simple et ne comporte qu'une seule étape. La formation de la liaison amide peut être réalisée dans des conditions douces à température ordinaire. Parmi les autres possibilités, certaines n'ont pas été testées (celles impliquant un couplage direct) pour les raisons évoquées ci-dessus. Parmi les protocoles impliquant la modification du ligand, la synthèse de certains composés, notamment les dérivés 21-halo, 21-aldéhyde et 21-acide, a été réalisée. Les résultats ne seront pas rapportés, aucun d'entre eux n'ayant été utilisé pour préparer un gel d'affinité.

C) SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS 17 B-CARBOXAMIDES

1) Préparation du dérivé 17B-carboxylique de la dexaméthasone.

La méthode d'oxydation périodique initialement décrite par MASON et al. (158) pour les glucocorticoïdes naturels, a été adaptée aux dérivés fluorés de synthèse, dexaméthasone et désoxymétasone notamment, selon une variante plus rapide (159). Elle ne s'applique pas aux stéroïdes comportant un diol 16 α 17 α tels que la triamcinolone. La présence de ce diol entraîne son oxydation préférentielle et l'ouverture du cycle D. La protection du diol sous forme d'un acétal double ne permet pas davantage l'oxydation selon ce protocole.

Nous avons utilisé la technique décrite sans modification. Les rendements sont supérieurs à 85%. L'acide obtenu (DXO) est homogène en chromatographie et conforme du point de vue analytique au produit décrit ($P_f > 260^\circ\text{C}$; spectre IR en KBr : 1600, 1670 et 1700 cm^{-1}).

2) Formation de la liaison amide.

Le couplage du dérivé oxydé de la corticostérone sur l'aminosépharose est réalisé en présence de dicyclohexylcarbodiimide par LE GAILLARD et al. (143). Le rendement de la réaction est suffisant pour bloquer tous les sites aminés. Cette méthode s'est révélée inefficace dans le cas du dérivé de la dexaméthasone et ne nous a pas permis

d'obtenir les 17B-carboxamides en quantités significatives. Quelles que soient les conditions expérimentales (solvant, concentration des réactants), la réaction s'orientait préférentiellement vers la formation de produits secondaires type N-acylurée. Cet échec nous a amené à rechercher parmi les autres méthodes de formation de la liaison amide (annexe I), un protocole efficace. Nous avons choisi la méthode aux esters activés qui pour la synthèse peptidique est largement répandue et s'est révélée souvent plus efficace que les méthodes traditionnelles

- Protocole expérimental.

Il se déroule en deux temps, selon le schéma proposé par KONIG et GEIGER (160) :

* activation du DXO en présence d'un léger excès de N-hydroxybenzotriazole et de dicyclohexylcarbodiimide comme agent de couplage. La réaction se déroule en milieu dichlorométhane ou tétrahydrofurane à 4°C, et est complète en quelques heures. Le précipité de dicyclohexylurée est éliminé par filtration, l'ester activé formé n'est pas isolé du filtrat.

* couplage de l'amine par addition d'une quantité stoechiométrique. La réaction est poursuivie 12 à 24 heures. Le produit de couplage est isolé par extractions successives et purifié par chromatographie si nécessaire. La pureté des produits est contrôlée par chromatographie couche mince ou par HPLC. Les caractères analytiques usuels : point de fusion, R_f chromatographique, spectre infra-rouge et analyse élémentaire, ont été établis.

- Résultats et discussion

Le rendement de la réaction est de l'ordre de 60 à 75% selon les dérivés. L'évolution du milieu réactionnel, appréciée en chromatographie couche mince, révèle qu'il n'y a pas formation de produits secondaires, dans la mesure où tout chauffage et tout contact prolongé avec un excès important d'amine sont évités.

Cette procédure a été utilisée depuis par GOVINDAN et al. (131) en utilisant la N-hydroxysuccinimide au lieu du N-hydroxybenzotriazole.

Toute une série de dérivés 17B-carboxamides a été synthétisée,

dont certains en tant qu'analogues des composés "bras-dexaméthasone", destinés à choisir le bras-espaceur le plus approprié. Les formules et les caractères physicochimiques de ces derniers dérivés sont regroupés sur la figure 3 et dans le tableau III.

II - CHOIX DU BRAS ESPACEUR

L'immobilisation du DXO au moyen d'une liaison amide nécessite de coupler sur le gel un bras diaminé. Ceux-ci sont très différents tant par leur longueur que par leur nature (146). Cependant, le bras espaceur conditionne pour une large part le succès ou l'échec de la chromatographie d'affinité. La synthèse des analogues "bras-stéroïdes" permet d'envisager deux sortes d'expériences qui aideront dans l'appréciation du comportement du récepteur vis à vis du ligand :

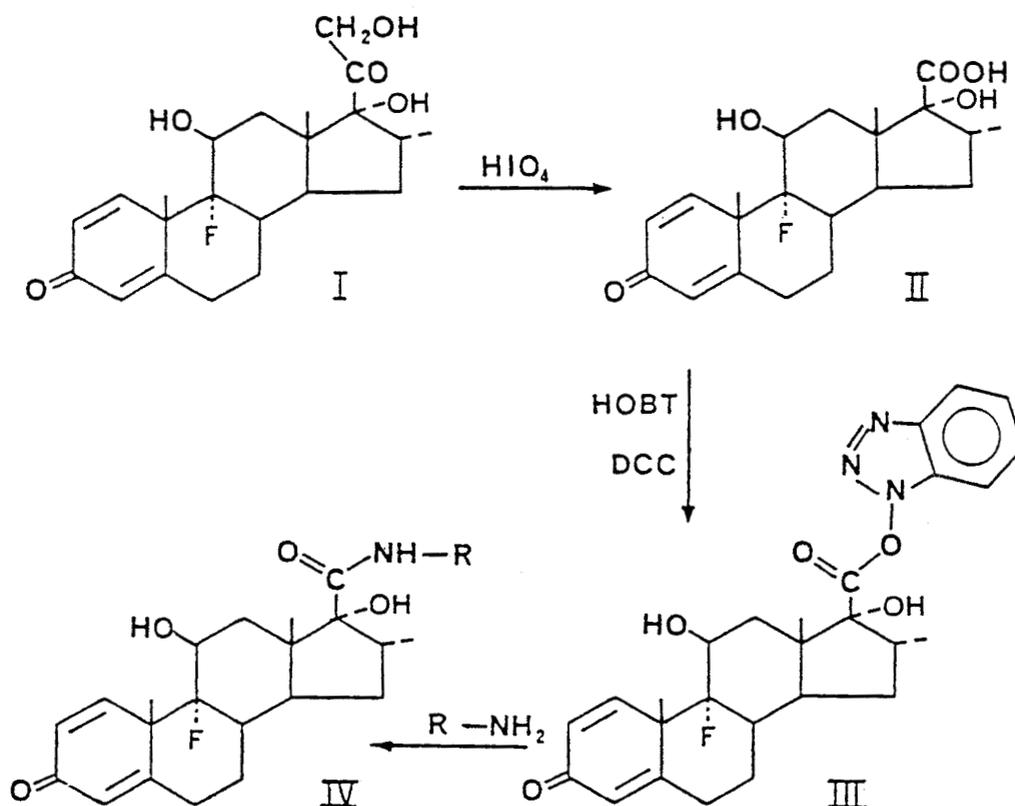
- des expériences de compétition qui évaluent l'affinité du récepteur vis à vis du ligand et qui permettent de prévoir l'efficacité de l'étape d'adsorption sur le gel d'affinité.

- des expériences de déplacement qui apprécient la réversibilité de la liaison ligand-récepteur et la vitesse de dissociation, ces deux paramètres conditionnant en partie l'étape d'élution biospécifique.

Plusieurs dérivés ont été testés afin de choisir la nature du bras et sa longueur optimale.

A) NATURE DES CATEGORIES DE BRAS ETUDIES

L'inventaire des différents gels destinés à la purification des récepteurs des hormones stéroïdes préparés par diverses équipes, fait apparaître la diversité des bras-espaceurs. TRUONG et al. (141, 144) utilisent des bras aliphatiques, de longueur variable, l'optimum étant de 10 atomes de carbone. Un enchaînement de 12 atomes comportant un cycle benzénique constitue le bras-espaceur du gel préparé par FAILLA et al. (120) pour la purification du récepteur des glucocorticoïdes. Des bras à points d'attache multiples, tels que la sérum albumine ou des



Composé	R
DXP	(CH ₂) ₂ -CH ₃
DXH	(CH ₂) ₅ -CH ₃
DXNo	(CH ₂) ₈ -CH ₃
DXN	(CH ₂) ₂ -NH-(CH ₂) ₂ -CH ₃
DXB	CH ₂ -C ₆ H ₅

FIGURE 3

Synthèse des dérivés 17 β-carboxamide de la dexaméthasone (I)

L'oxydation périodique conduit au DXO (II) ou acide 17 β-carboxylique. En présence de N-hydroxybenzotriazole et de NN' dicyclohexylcarbodiimide, l'ester activé (III) se forme in situ et réagit avec une amine primaire pour aboutir au dérivé 17 β-carboxamide (IV).

Composé	Point de fusion °C	R		Spectre infra-rouge cm ⁻¹	Formule brute	Analyse élémentaire					
		E ₁	E ₂			Théorie			Trouvé		
						C	H	N	C	H	N
DXP	260	0,11	0,79	1670,1650,1530	C ₂₄ H ₃₄ FNO ₄	68,71	8,17	3,34	68,88	8,28	3,18
DXH	229	0,25	0,84	1670,1630,1530	C ₂₇ H ₄₀ FNO ₄	70,25	8,73	3,03	70,24	8,75	3,24
DXNo	199	0,28	0,86	1670,1630,1525	C ₃₀ H ₄₆ FNO ₄	71,53	9,21	2,78	71,25	9,01	2,79
DXN	206	0,00	0,64	1670,1620,1520	C ₂₆ H ₃₉ FNO ₄	67,51	8,50	6,06	67,81	8,92	5,85
DXB	260	0,21	0,83	1670,1620,1520	C ₂₈ H ₃₄ FNO ₄	71,92	7,33	3,00	72,23	7,53	3,08

TABLEAU III

Caractères analytiques des 17B carboxamides

Les spectres infra-rouges ont été réalisés en pastille de K Br sur un spectrophotomètre BECKMAN Acculab 1. Les chromatographies en couche mince sont faites sur des plaques de silice F₂₅₄ 0,25 mm (Merck). Elles sont développées dans deux systèmes solvants ; E₁ : dichlorométhane - acétone (8 : 1) et E₂ : chloroforme - méthanol (4 : 1) en atmosphère saturée en ammoniac. Les points de fusion ont été déterminés sur un banc de Kofler et ne sont pas corrigés. L'analyse élémentaire a été faite par le service de microanalyse du C.N.R.S. - Villeurbanne.

polypeptides de synthèse (poly Lys ou poly Gly) ont également été utilisés (137, 138). Enfin, l'isolement de la transcortine est réalisé au moyen d'un gel dont le bras espaceur est la diaminodipropylamine (143).

Ces diverses possibilités ont été retenues et étudiées, à savoir :

- des chaînes hydrocarbonées de longueur variable (6 à 9 carbones).
- une chaîne comportant une fonction amine secondaire destinée à diminuer le caractère hydrophobe.
- une chaîne avec un noyau aromatique.

La synthèse des 17 β -carboxamides analogues à l'aide des monoamines homologues a été réalisée. La figure 4 illustre l'analogie entre ces composés et les gels d'affinité correspondants.

B) MESURE DE L'AFFINITE VIS A VIS DU RECEPTEUR

1) Principe des compétitions

Deux procédures sont envisageables qui apportent des résultats complémentaires :

- d'une part, des quantités croissantes de composés à tester sont ajoutées à des aliquotes de cytosol, en présence d'une concentration constante du ligand de référence radioactif ($|^3\text{H}|$ dex ou $|^3\text{H}|$ TA). L'incubation est poursuivie jusqu'à l'équilibre. La mesure de la liaison spécifique du ligand radioactif en l'absence (B_0) et en présence (B) de compétiteur permet d'évaluer le degré de compétition. La représentation graphique B/B_0 en fonction du logarithme de la concentration en compétiteur qui est une sigmoïde, permet de déterminer la valeur I_{50} , concentration en compétiteur entraînant 50% d'inhibition de liaison. Une relation mathématique conduit à K_i , constante d'inhibition, dont la valeur ainsi calculée n'est pas rigoureuse (161). Cependant, ce type d'expérience est utile et positif dans la mesure où il permet de comparer dans des conditions identiques des produits entre

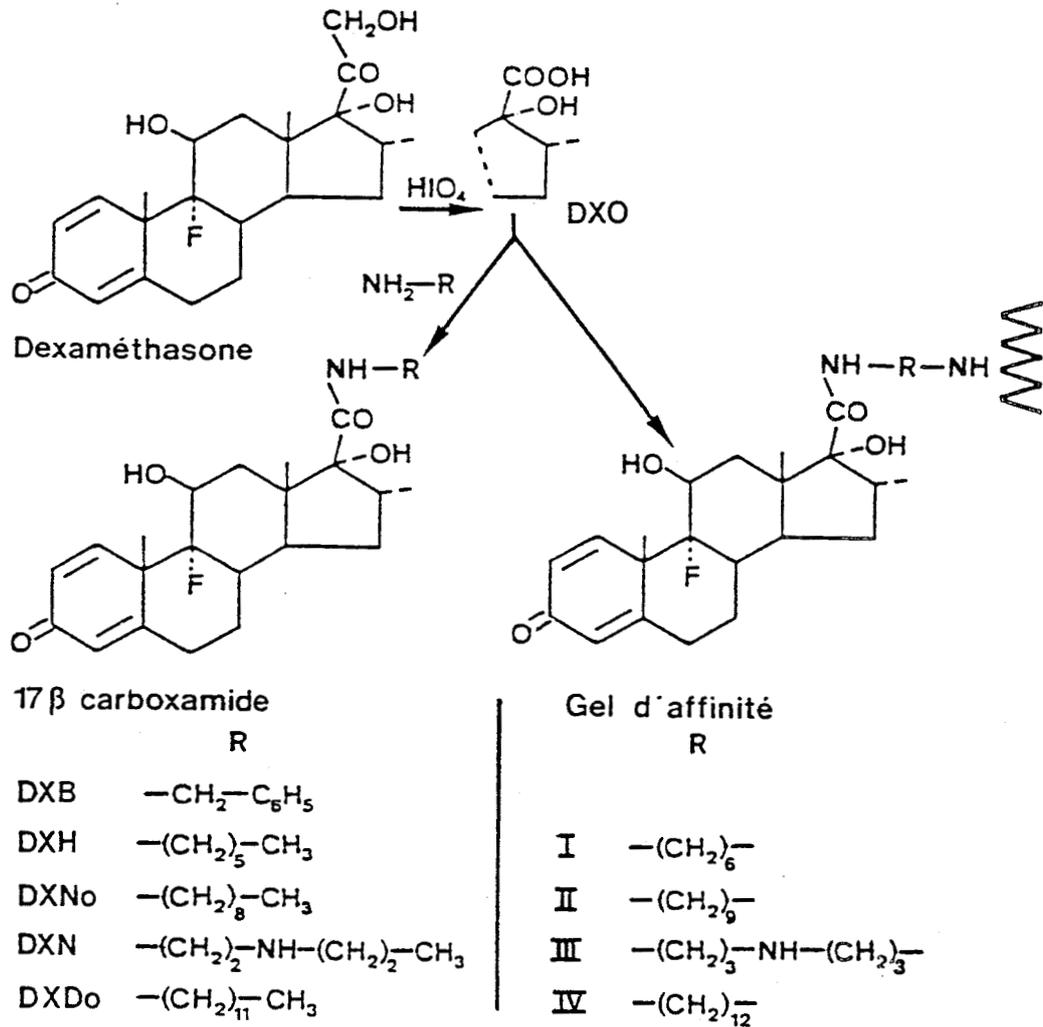


FIGURE 4

Analogie entre les dérivés 17 β-carboxamide et les gels d'affinité

eux. C'est dans cette intention que nous avons réalisé ces mesures.

- d'autre part, la compétition peut être étudiée en présence de concentrations variables en ligand de référence et d'une concentration constante en compétiteur. La représentation en double inverse, $1/B$ en fonction de $1/F$, permet de distinguer entre une inhibition qui affecte l'affinité (dite compétitive) et une inhibition qui s'exprime au niveau du nombre de sites (dite non compétitive).

2) Résultats et discussion.

a) Effet de la modification chimique du ligand.

Au cours d'une première série d'expériences, nous avons comparé entre eux, la dexaméthasone, son dérivé d'oxydation (DXO) et le dérivé carboxamide obtenu avec la n-propylamine (DXP). La figure 5 illustre les résultats des compétitions. L'oxydation de la chaîne latérale entraîne une chute dramatique de l'affinité, un excès 1000 fois de DXO inhibe seulement 25% de la liaison du ligand de référence tritié. Le couplage à une amine restaure en grande partie l'affinité, un excès 40 fois de DXP inhibant 50% de la liaison du stéroïde de référence.

L'effet défavorable sur l'affinité du groupement carboxyle a été mis en évidence par plusieurs auteurs. TRUONG et al. (144) rapportent des résultats similaires pour les dérivés en 7α de l'estradiol comportant une fonction acide terminale. L'affinité des spirolactones vis à vis du récepteur des minéralocorticoïdes chute de façon considérable après ouverture du cycle lactone si la fonction carboxylique est libre (162). Pour le récepteur des glucocorticoïdes, LEE et al. (163) retrouvent des résultats identiques dans une étude comparative entre le cortisol, la prédnisolone et leurs dérivés 21-carboxylique. De façon analogue, l'affinité est restaurée en grande partie après estérification.

Cet effet défavorable est dû à la présence d'un groupement ionisable sur le noyau stéroïde, alors que le site de liaison au niveau de la protéine réceptrice est de nature hydrophobe. L'introduction d'une liaison amide qui fait disparaître le groupement ionisé, permet de conserver le groupement carbonyle en C20 et ainsi d'avoir un effet

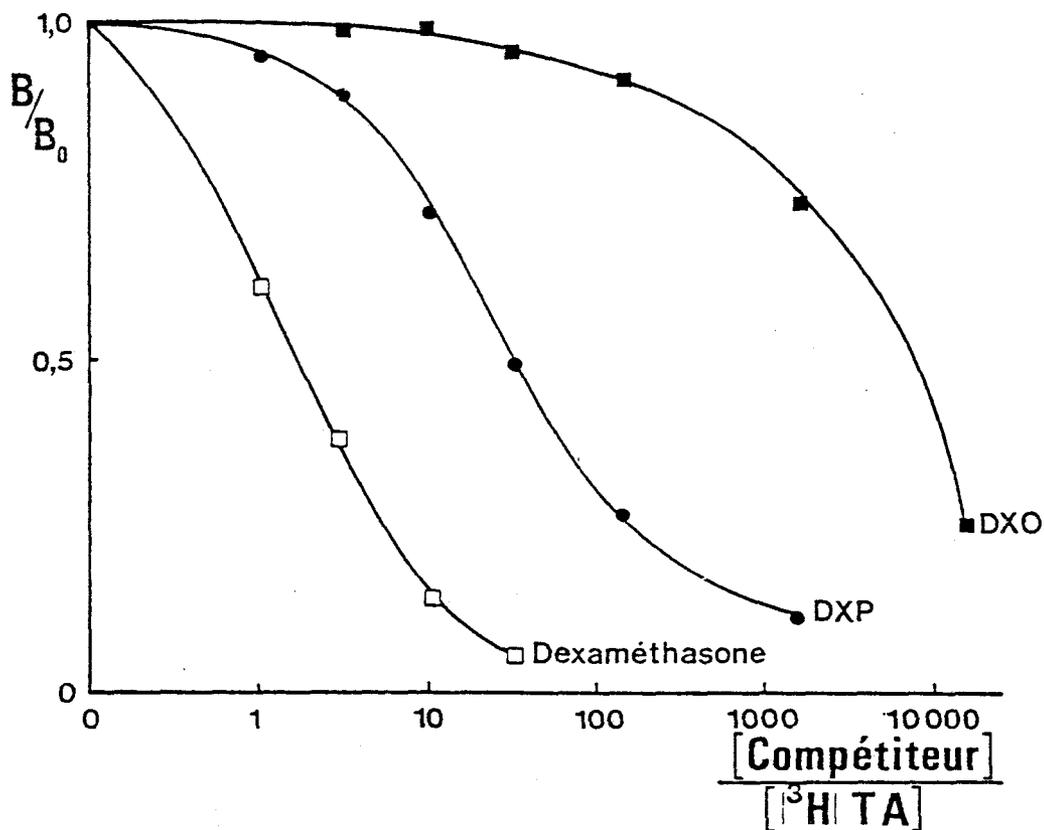


FIGURE 5

Etude de la liaison du récepteur des glucocorticoïdes aux dérivés modifiés de la dexaméthasone

Courbes de compétition vis à vis de la liaison de l' $[^3H]$ acétonide de triamcinolone, des dérivés d'oxydation (DXO) et 17 β -carboxamide (DXP), et du composé de départ (dexaméthasone).

Ordonnée : B/B_0 représente le rapport de la liaison mesurée en présence de compétiteur à la liaison mesurée en l'absence de compétiteur ($B_0 \approx 15\ 000$ cpm).

Abscisse : rapport des concentrations en échelle logarithmique.

Conditions expérimentales : - température : 0-4°C.

- durée d'incubation : 2 heures.

- concentration en $[^3H] TA$: $3,5 \cdot 10^{-8}$ M

- mesure en quadruplicate pour chaque point.

favorable sur la liaison. Les études cristallographiques comparatives de la dexaméthasone et du DXP (étude réalisée par M. DEVOS, UER Sciences, LILLE) confirment l'orientation identique de la cétone en 20 dans les deux composés.

b) Effet de la nature du substituant greffé.

Le même type d'expériences de compétition a été réalisé avec les différents 17 β -carboxamides. Les résultats sont représentés sur la figure 6. Selon la nature de l'amine couplée, l'affinité varie. L'introduction d'une chaîne latérale ayant un caractère polaire (DXN) a un effet défavorable, la concentration I_{50} est égale à $12,0 \cdot 10^{-6}$ M. La suppression de la fonction amine secondaire, et donc le renforcement du caractère hydrophobe détermine une augmentation de l'affinité qui n'est pas affectée notablement par la longueur de la chaîne hydrocarbonée. Les valeurs de I_{50} sont respectivement de $1,2$, $1,0$ et $2,0 \cdot 10^{-6}$ M pour les composés à 3 (DXP), 6 (DXH) et 9 (DXNo) atomes de carbone. La présence d'un noyau aromatique permet d'atteindre une affinité égale à celle de la corticostérone ($I_{50} = 0,6 \cdot 10^{-6}$ M), soit d'un facteur 10 inférieure au ligand de référence.

Les résultats des compétitions à concentration constante de compétiteur sont rapportés sur la figure 7. L'équation des droites établie par régression linéaire permet de vérifier l'unicité des ordonnées à l'origine (R_0 constant) et de calculer les constantes d'inhibition. L'aspect des courbes est en faveur d'une inhibition de type compétitif. Les valeurs K_i calculées dans cette seconde série d'expériences, sont proches des premières et l'ordre d'affinité des composés est le même : DXB > DXH > DXNo > DXN.

c) Spécificité des 17- β carboxamides.

Il nous est apparu important de vérifier que la modification chimique introduite n'altérerait pas la spécificité.

L'éventualité d'une liaison à la transcortine a été étudiée par des expériences de compétition vis à vis de la liaison spécifique du $|^3\text{H}|$ cortisol et/ou de la $|^3\text{H}|$ corticostérone. Dans le cas du plasma de rats surrénalectomisés, en présence d'un excès 1250 fois, les dérivés

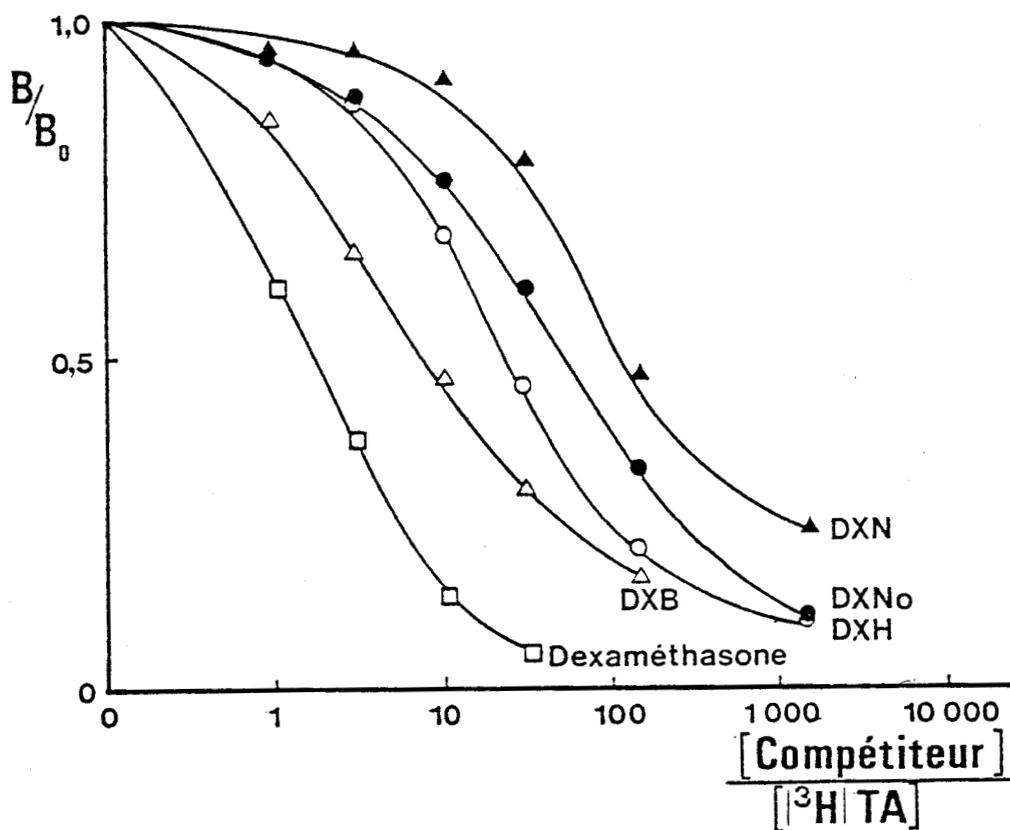


FIGURE 6

Etude de la liaison au récepteur des composés 17 β -carboxamides analogues "bras-ligand"

Courbes de compétition des différents 17 β -carboxamides correspondant à des bras de nature différente.

Conditions expérimentales et légende des axes identiques à la figure 5.

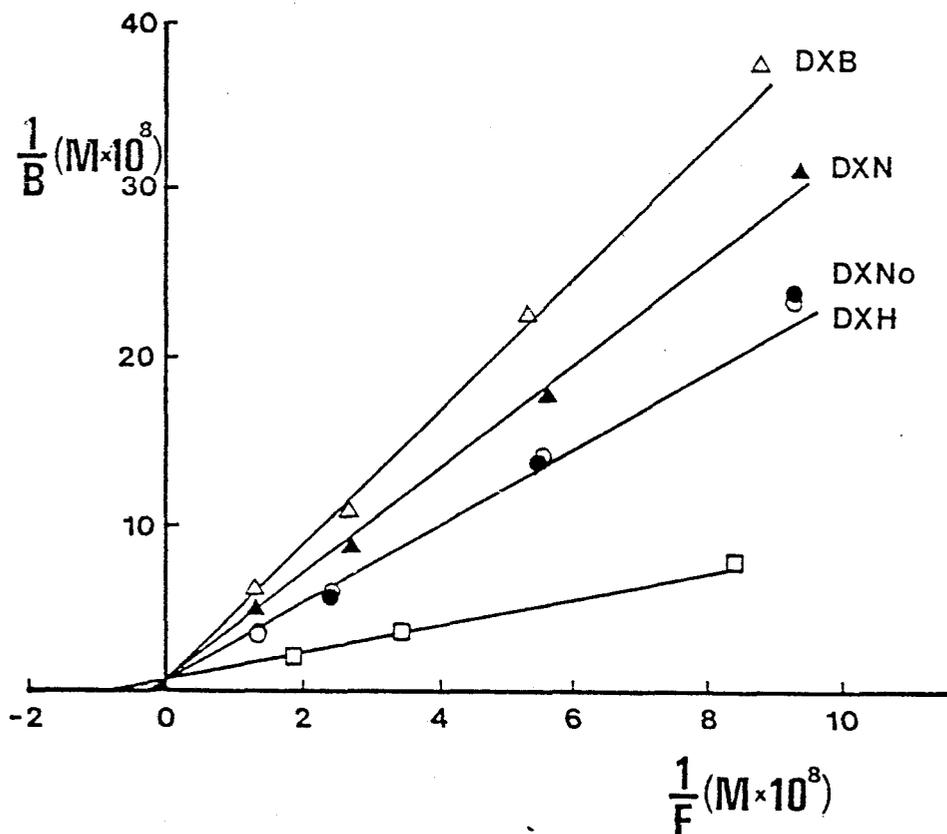


FIGURE 7

Etude de la liaison au récepteur des dérivés 17 β -carboxamides analogues "bras-ligand"

Inhibition compétitive de la liaison au récepteur cytosolique de l' [^3H] acétonide de triamcinolone par les 17 β -carboxamides

Ordonnée : $1/B$ représente l'inverse de la fraction liée spécifique de [^3H] TA. Abscisse : $1/F$ représente l'inverse de la fraction libre du ligand de référence tritié.

Conditions expérimentales : - température : 0-4°C.

- durée d'incubation : 2 heures.

- concentration en [^3H] TA : $1,5 \cdot 10^{-9}$, $2,5 \cdot 10^{-9}$, $5 \cdot 10^{-9}$ et 10^{-8} M.

- concentration en compétiteurs : DXH $0,5 \cdot 10^{-6}$ M

DXNo $0,5 \cdot 10^{-6}$ M

DXN $1 \cdot 10^{-6}$ M

DXB $0,25 \cdot 10^{-6}$ M

- mesure en quadruplicate pour chaque point.

DXP et DXH n'inhibent pas la liaison de la corticostérone, pour le DXB et le DXN, l'inhibition est de 6-9% (164). Le même résultat négatif a été obtenu avec du plasma de lapin surrénalectomisé, un excès 5000 fois des 17 β -carboxamides ne provoque aucune inhibition de la liaison du cortisol.

La spécificité vis à vis du récepteur de la progestérone a été étudiée par RENOIR M. (communication personnelle), selon le même protocole de compétition vis à vis de la liaison spécifique de la [^3H] promégestone sur du cytosol d'oviducte de poule. Le dérivé DXH présente la même affinité que la dexaméthasone, la concentration I_{50} est 500 fois supérieure à celle de la promégestone. La liaison aux récepteurs des minéralocorticoïdes de types I et II du rein de lapin a également été mesurée. Pour le récepteur de type I, assimilé au minéralocorticoïde pur, il n'y a pas déplacement de la liaison de la [^3H] aldostérone par un excès 1000 fois de 17 β -carboxamide (DXB ou DXNo). Par contre, pour le type II, dit glucocorticoïde de par son spectre d'affinité, la compétition vis à vis de la liaison [^3H] dexaméthasone permet de calculer une concentration I_{50} à $1,5 \cdot 10^{-7}$ M pour ces deux composés, soit une affinité inférieure d'un facteur 10 à celle du ligand de référence (165).

d) Conclusion

La modification chimique envisagée pour l'immobilisation sur le gel, remplacement du $-\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$ par $-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}$, ne se traduit pas par une perte importante d'affinité. En effet, il y a conservation des éléments structuraux indispensables ($\Delta 4-5$; 3,20-dione ; 11 β -hydroxy), et des substituants qui confèrent à la dexaméthasone sa haute affinité ($\Delta 1-2$, 9 α -fluoro). La nature du radical R exprimée en terme d'hydrophilie/hydrophobie module l'affinité. Logiquement, les dérivés immobilisés sur le gel devraient conserver une affinité suffisante pour permettre l'adsorption spécifique du récepteur des glucocorticoïdes. D'autre part, la spécificité du ligand est conservée, il n'y a pas de liaison à la transcortine, ni de façon appréciable aux autres récepteurs des hormones stéroïdes, en particulier ceux dont le ligand naturel présente des analogies structurales avec les glucocorticoïdes.

C) EVALUATION DE LA DISSOCIATION DU COMPLEXE RECEPTEUR-17 β -CARBOXAMIDE

L'élution biospécifique n'est conditionnée que par la vitesse de dissociation du complexe récepteur-ligand immobilisé. Il est donc important de pouvoir apprécier d'un point de vue cinétique, la dissociation du complexe récepteur-17 β -carboxamide.

1) Principe des expériences de déplacement.

Dans un premier temps, l'incubation du cytosol en présence d'une concentration élevée en dérivés 17 β -carboxamides (10^{-6} - 10^{-4} M), concentration de l'ordre de celle du ligand immobilisé sur le gel, permet de saturer les sites récepteurs. A l'équilibre, le ligand radioactif est ajouté à une concentration identique à celle utilisée pour l'élution (10^{-6} M). La liaison spécifique du ligand de référence est mesurée à des intervalles de temps réguliers. Cette liaison ne pourra se faire que dans la mesure où auparavant, il y a dissociation du complexe 17 β -carboxamide-récepteur et si la compétition pour la liaison se fait de façon favorable avec le ligand de référence.

2) Résultats et discussion.

Les quatre dérivés stéroïdes-bras espaceur (DXH, DXNo, DXB et DXN) ont été étudiés selon ce protocole. L'interprétation graphique des résultats apparaît sur la figure 8 et amène les commentaires suivants. Dans le cas du DXB, qui comporte un noyau benzénique, le déplacement ne dépasse pas 50% après 17 heures. Cette valeur est en accord avec les résultats de FAILLA et al. (120) qui avec un gel d'affinité comportant un bras espaceur de ce type, ne dépassent pas 50% d'élution. Le DXN qui présente l'affinité la plus faible, semble ne pas se dissocier de façon appréciable. La raison de ce comportement paradoxal nous échappe. Aucune fonction du DXN, ne peut réagir avec un acide aminé du site de liaison pour former une liaison covalente. Seule l'hypothèse d'une liaison ionique entre la fonction amine secondaire du DXN et un groupement anionique de la protéine, peut être évoquée. Cette liaison stabiliserait le complexe récepteur-DXN. La faible affinité s'expliquerait par un effet défavorable de cette même fonction amine secondaire au moment de la reconnaissance au niveau du site de liaison. En effet, le stéroïde

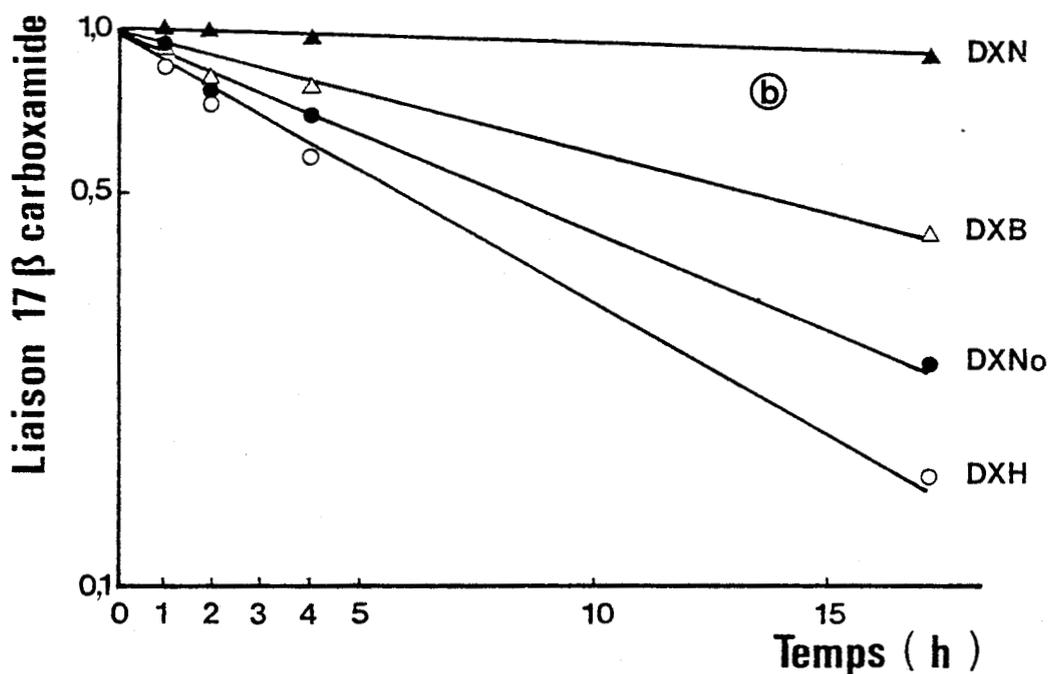
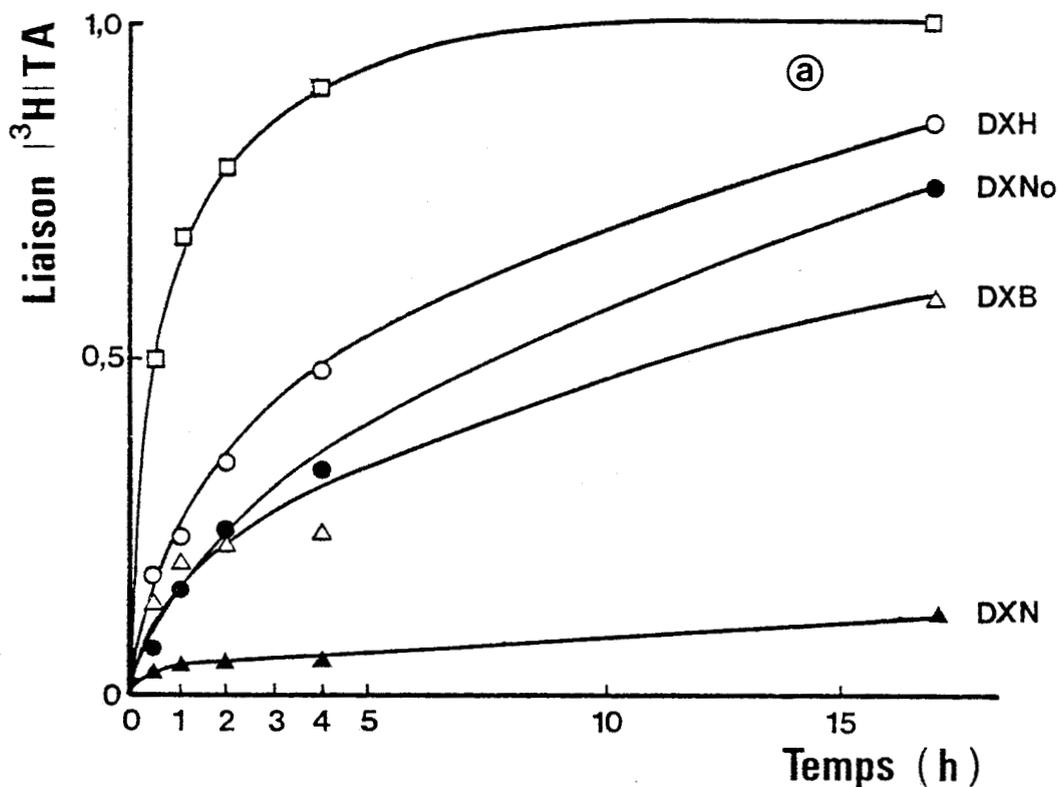


FIGURE 8

Etude du déplacement de la liaison récepteur 17 β-carboxamide par 1' ^3H acétonide de triamcinolone

- Figure (a) ; Ordonnée : liaison spécifique de ^3H TA exprimée par rapport à la liaison maximale observée à l'équilibre ($B_{\text{max}} \approx 12\ 000$ CPM). Abscisse : durée de l'échange exprimée en heures.

- Figure (b) ; Ordonnée : liaison spécifique des dérivés 17 β-carboxamide calculée comme le rapport de la fraction déplacée sur la liaison spécifique du témoin.

Conditions expérimentales : - température : 0-4°C.

- pré-incubation avec les 17 β-carboxamides : 17 h.

- concentration en 17 β-carboxamides : DXH 10^{-4} M

DXN 10^{-5} M

DXNo $3 \cdot 10^{-4}$ M

DXB 10^{-6} M

- concentration en ^3H TA : 10^{-7} M .

- mesure en quadruplicate pour chaque point.

interagit d'abord par un mécanisme hydrophobe avant d'être maintenu par des liaisons faibles entre certains groupements du stéroïde et de la protéine qui sont suffisamment proches. Enfin, pour les dérivés aliphatiques DXH et DXNo, 70 à 80% de la liaison est déplacée. La durée de l'échange est relativement longue et même après 17 heures, il ne semble pas que la réaction soit terminée. La différence entre DXH et DXNo paraît plus imputable à la différence de concentration qu'à la nature du bras. La représentation en coordonnées semi-logarithmiques qui est linéaire, est en faveur d'une réaction d'ordre 1, ce qui suggère que le phénomène appréhendé correspond effectivement à la dissociation du complexe récepteur-17 β -carboxamide.

En conclusion, le déplacement de la liaison des 17 β -carboxamides par le ligand de référence n'est pas fonction de leur affinité vis à vis du récepteur. Le dérivé ayant la plus faible affinité ne peut être déplacé. Les dérivés qui semblent avoir le meilleur comportement, tant du point de vue affinité que possibilité d'échange, sont ceux dont le bras espaceur est une chaîne hydrocarbonée simple.

D) CONCLUSION

Cette étude à l'aide d'analogues stéroïde-bras espaceur en solution apporte des renseignements utiles pour la conception du gel d'affinité. Un bras espaceur de type aliphatique apparaît ainsi comme le choix le plus judicieux. Cependant, ces résultats obtenus en phase homogène liquide, ne peuvent être qu'indicatifs pour l'étape de chromatographie d'affinité qui sera réalisée en phase hétérogène solide/liquide, avec tous les problèmes d'environnement et d'accessibilité que cela suppose. Aussi, il nous est apparu intéressant de synthétiser plusieurs matrices d'affinité pour vérifier la validité de ces conclusions provisoires.

III - CHOIX DU SUPPORT

Le support idéal pour la chromatographie d'affinité doit être hydrophile, poreux, rigide, stable chimiquement, biologiquement inerte

et facile à fonctionnaliser. Autant de caractères que les supports habituels ne présentent pas en totalité (165, 166). Les supports les plus couramment utilisés sont l'agarose et les gels de polyacrylamide. Les autres supports, cellulose, gels de dextran, Trisacryl et billes de verre poreux ont été beaucoup moins étudiés. La comparaison entre l'agarose et le polyacrylamide a été faite par TRUONG et al. (144) à partir de gels préparés pour la purification du récepteur à estradiol. L'agarose sous forme de billes s'est révélé supérieur par son comportement et ses propriétés d'écoulement.

Notre choix s'est porté sur l'agarose disponible commercialement sous forme de billes : le Sepharose. Du point de vue chimique, l'agarose est un polymère de D-galactose et de 3,6 anhydro-L-galactose unis par une liaison β 1-4. La structure macroréticulée rend l'intérieur de la matrice accessible. La taille des pores dépend du pourcentage d'agarose, pour le Sepharose 4B, soit 4% d'agarose, les pores sont de 30 nm, ce qui correspond à une exclusion de $20 \cdot 10^6$. De par sa nature hydrophile et l'absence de charges, le Sepharose présente très peu d'adsorption non spécifique. Le seul inconvénient réside dans le comportement médiocre dans les solvants organiques. La réticulation par le 2,3-dibromopropanol (Sepharose CL) améliore la résistance mécanique et chimique.

Nous avons comparé par examen microscopique en contraste de phase, l'aspect du Sepharose 4B après un séjour de quelques heures dans le dioxanne. Replacé en milieu aqueux, le gel a perdu sa forme de billes régulières, et présente un aspect rétracté. Le même traitement appliqué au Sepharose CL 4B, n'altère pas sa structure, le gel reste sous forme de billes régulières. La nécessité d'opérer le couplage du stéroïde en milieu organique, nous a donc orientés vers le choix du Sepharose CL 4B.

A) ACTIVATION DU SUPPORT

L'objectif est de préparer des gels d'affinité stables avec une répartition homogène du ligand. Ces deux paramètres dépendent essentiellement de la procédure d'activation. Parmi les nombreuses techniques décrites (168) de fonctionnalisation de l'agarose (cf annexe II), toutes se prêtent au couplage ultérieur de bras espaceur de

type ω -amino-alkylamine. La méthode la plus courante est celle au bromure de cyanogène. Nous avons donc entrepris l'étude de cette technique avec comme objectif principal le souci de disposer d'un protocole reproductible, commode et permettant de choisir le degré de substitution ultérieur du gel. Cette étude a été poursuivie en tenant compte de l'amélioration de la procédure durant ces dernières années.

1) Principe de l'activation au bromure de cyanogène (169)

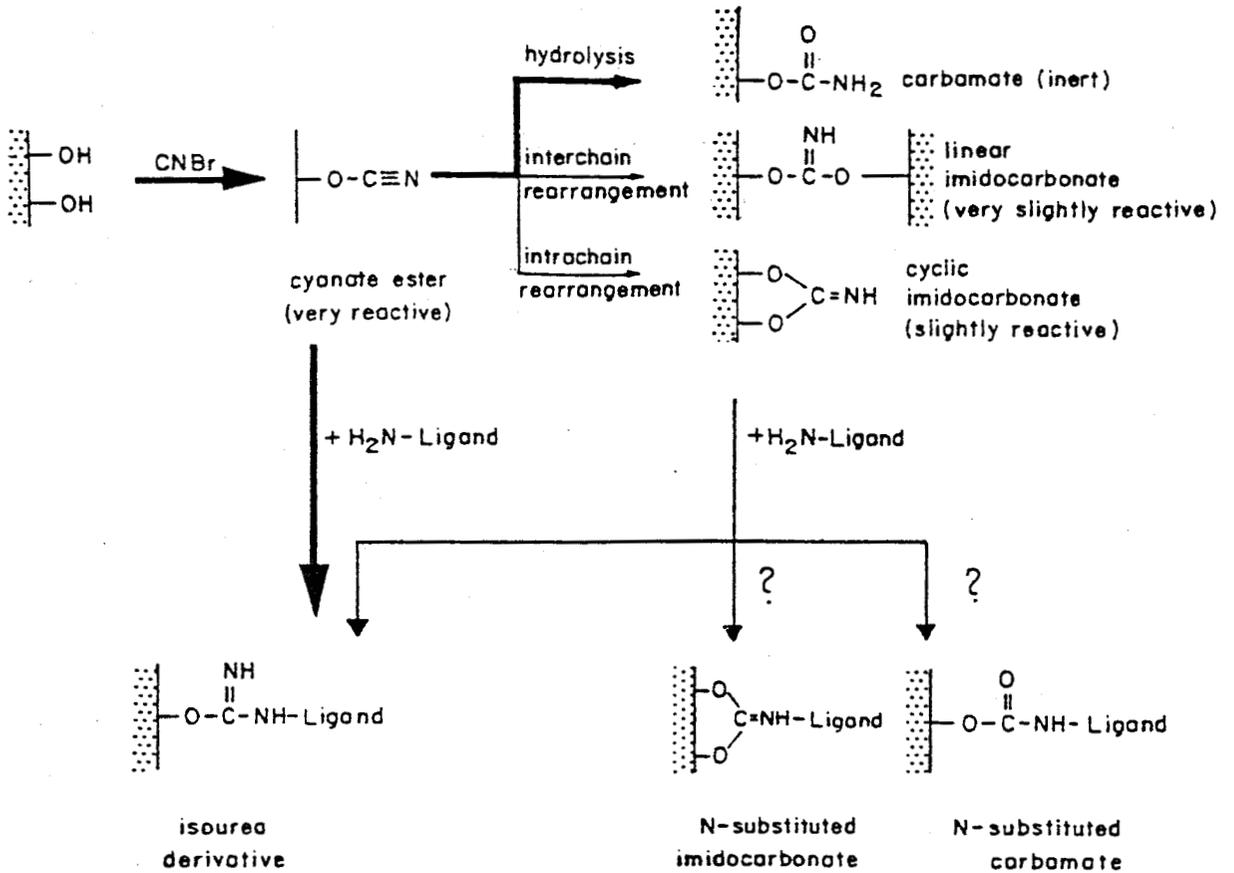
Le bromure de cyanogène réagit en milieu alcalin sur les groupes hydroxyles vicinaux du Sepharose pour former des esters cyaniques (figure 9). Ces esters cyaniques sont pour la plupart rapidement hydrolysés en carbamates non réactifs ou en imidocarbonates peu réactifs. Les groupements réactifs (esters cyaniques et imidocarbonates) réagissent avec les fonctions amines primaires en établissant des liaisons N-carbamate et isourée. Les inconvénients de cette méthode sont :

- le rendement d'activation très faible, ce qui impose d'utiliser des quantités importantes de bromure de cyanogène, potentiellement toxiques.
- la présence simultanée d'espèces réactives différentes qui amène à un gel de structure non homogène.
- la présence de carbamates qui peut conférer au gel des propriétés défavorables.

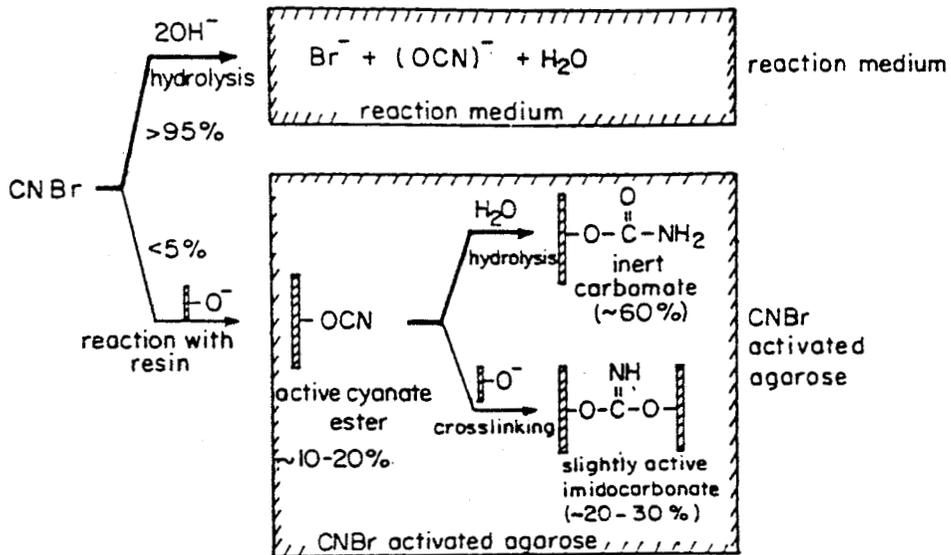
En dépit de ces désavantages, qui n'ont été mis en évidence que dans les années suivantes, le protocole original de AXEN et al. (170, 171) a été largement utilisé et modifié. Ces modifications concernent :

- la dissolution du BrCN dans un solvant organique (172, 173).
- l'utilisation de milieux tamponnés (172, 174).
- le couplage en solvant organique (175).

L'importante étude réalisée par le groupe de WILCHEK sur cette technique d'activation, a conduit ces auteurs à proposer en 1982, une alternative qui est le transfert de groupements cyano. A la différence des conditions précédentes où le milieu très alcalin contribuait à augmenter la nucléophilie du support par formation d'ions alkoxydes, la

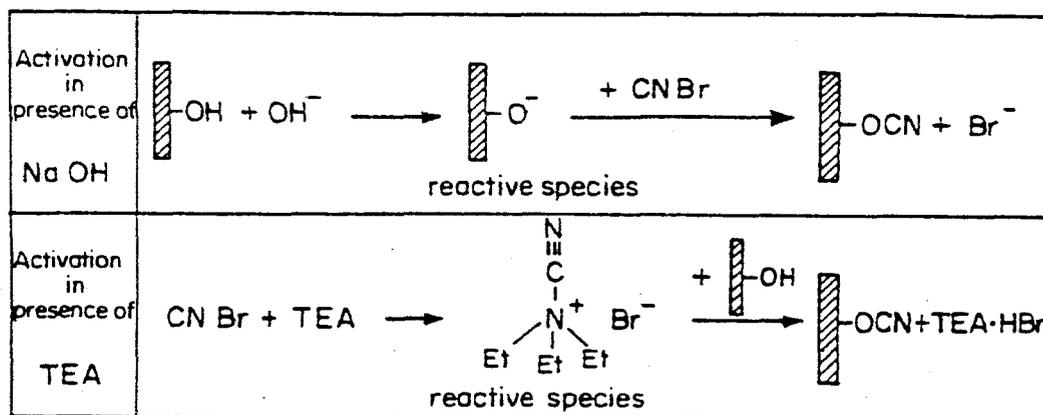


Réactions se produisant au niveau du gel et description des diverses substitutions possibles



Devenir du bromure de cyanogène ajouté

FIGURE 9



Mécanismes réactionnels comparés de l'activation par le bromure de cyanogène, en milieu alcalin et dans la réaction par transfert.

réaction de transfert s'opère en augmentant l'électrophilie du groupement cyan par formation in situ d'un complexe entre le bromure de cyanogène et une amine tertiaire. Dans le protocole conventionnel, les esters cyaniques sont instables et disparaissent alors que dans les conditions de la réaction par transfert (pH 8,0 ; T -15°C et solvant acétone/eau 3/2) ils représentent pratiquement la totalité des espèces réactives formées sur le gel (176).

La poursuite de leurs recherches a permis aux mêmes auteurs de proposer depuis de nouveaux agents de transfert, tels que le tétraborate de N-cyanotriéthylammonium, le tétraborate de 1-cyano-4-(diméthylamino)-pyridine et le p-nitrophénylcyanate, qui sont aussi efficaces, d'un emploi commode et non toxiques à la différence du bromure de cyanogène (169).

2) Résultats et discussion.

a) Activation conventionnelle en milieu alcalin.

Nous avons primitivement utilisé cette procédure, en développant un protocole satisfaisant nos exigences. Trois techniques

décrites ont été essayées :

- protocole de SHARMA et SLAUNWHITE (174) : le bromure de cyanogène est ajouté sous forme d'une solution aqueuse, le pH est maintenu proche de 11 à l'aide d'un tampon phosphate 5 M.
- protocole selon CUATRECASAS (177) : le bromure de cyanogène est ajouté sous forme solide et le pH est maintenu par addition de soude 10 M à la demande.
- protocole selon MARCH et al. (172) : le bromure de cyanogène est ajouté sous forme d'une solution dans l'acétonitrile et la réaction se déroule dans un tampon carbonate 2 M pH 10,9.

De ces trois procédures, nous avons retenu les éléments suivants. La seule technique permettant une manipulation commode du bromure de cyanogène est la solubilisation dans l'acétonitrile. Le maintien du pH réactionnel autour de 11 par addition de soude n'est pas aisé en l'absence de titrateur automatique. L'emploi d'un milieu tamponné permet de résoudre cette difficulté. Le tampon carbonate 2 M n'est pas suffisant ; par contre, le tampon phosphate 5 M assure un pH constant entre 11 et 11,5, et par sa viscosité permet de maintenir le gel en suspension avec une agitation douce.

Les paramètres suivants ont été étudiés : durée de la réaction, quantité de bromure de cyanogène et quantité d'amine utilisées. Les figures 10a et 10b illustrent les résultats. Le degré d'activation augmente avec le temps de réaction ; cependant, l'évolution est surtout importante dans les deux premières minutes. Des résultats similaires avaient déjà été rapportés par MARCH et al. (172). Afin d'éviter des réactions secondaires et la disparition des fonctions activées, nous avons choisi d'utiliser des temps de réaction courts. De manière analogue, le degré d'activation augmente avec la quantité de bromure de cyanogène mise en oeuvre. Ces résultats sont en accord avec ceux de STAGE et al. (178). Enfin, un dernier paramètre influence le degré de substitution. Notre intention étant de préparer des gels faiblement substitués, nous avons étudié les conditions de couplage en présence de concentrations d'amines plus faibles entre 0,02 et 0,5 M, que la concentration habituelle de 2 M. Cette modification était nécessaire pour les diamines C₉ et C₁₂ qui sont peu solubles.

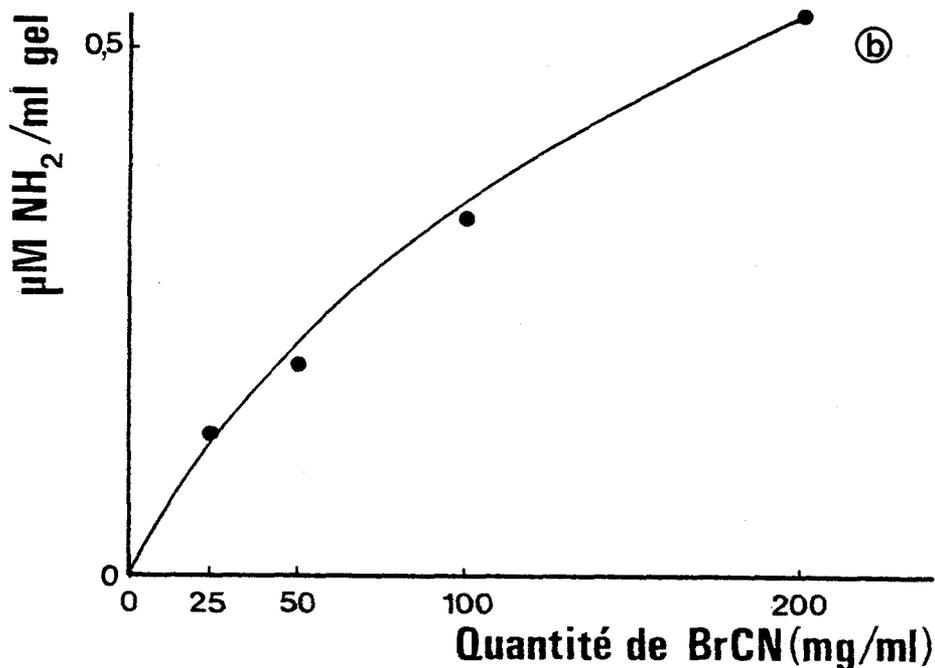
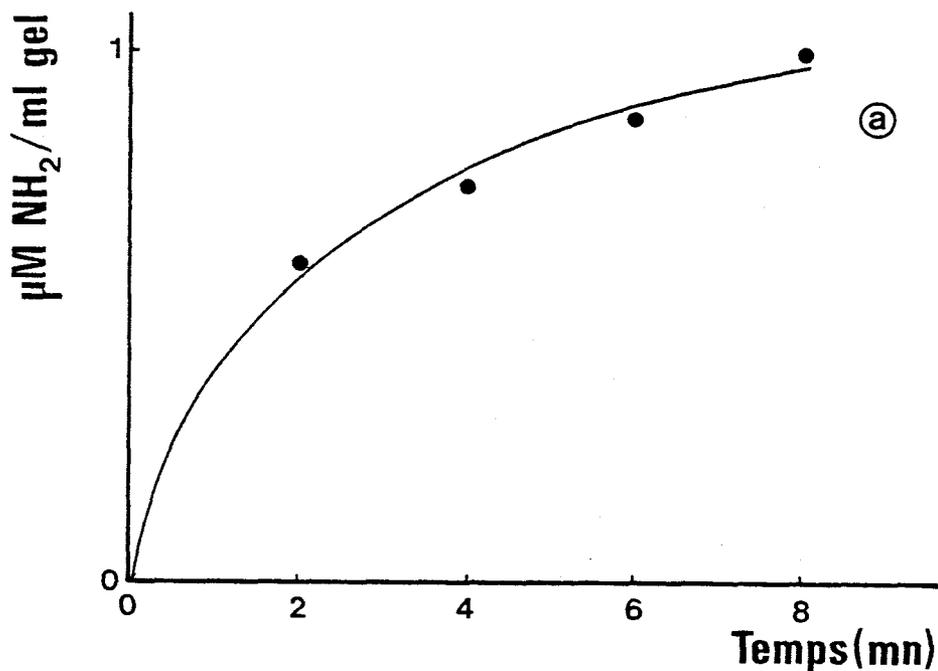


FIGURE 10

Etude de la réaction d'activation par le bromure de cyanogène en milieu alcalin

10a. Cinétique de l'activation par le BrCN en milieu alcalin

Des fractions aliquotes de 10 ml de Sepharose CL 4B sont activées selon le protocole de MARCH et al. (172) modifié (cf Matériel et Méthodes) avec des temps de réaction différents. Le degré de substitution en ordonnée est exprimée en μM de bras aminé fixé sur le gel, dosées par la méthode au 2-hydroxynaphtaldéhyde.

10 b. Influence de la concentration en bromure de cyanogène

Des fractions aliquotes de 10 ml de Sepharose CL 4B sont activées selon le même protocole en présence de quantités croissantes de BrCN. Le degré de substitution en ordonnée est exprimée en μM de bras aminé fixé sur le gel, dosées par la méthode au 2-hydroxynaphtaldéhyde.

Nous avons pu, au terme de cette étude, établir les conditions opératoires permettant d'ajuster les paramètres de la réaction d'activation pour obtenir des gels ayant le degré de substitution souhaité (cf Matériel et Méthodes).

b) Activation par transfert.

Le protocole décrit par KOHN et WILCHEK (1976) a été appliqué sans modification. Dans le souci de préparer des gels peu substitués, nous avons étudié la réaction en présence de faibles concentrations en bromure de cyanogène. La courbe expérimentale de la figure 11 permet de déterminer la quantité de bromure de cyanogène à utiliser en fonction du degré de substitution souhaité. La comparaison des deux techniques sur le plan des conditions opératoires et des performances a été faite par KOHN et WILCHEK (169) et figure dans le tableau IV. Nous insisterons surtout sur la commodité de la procédure par transfert qui représente un avantage décisif par rapport à la technique conventionnelle.

B) DEGRE DE SUBSTITUTION : DOSAGE DU BRAS ET DU LIGAND.

Le schéma de synthèse du gel d'affinité comporte trois étapes : activation du support, couplage du bras espaceur et enfin, immobilisation du ligand. Idéalement, le contrôle de cette synthèse comporte la mesure du degré de substitution après chaque étape qui permet d'apprécier l'efficacité et/ou le rendement des diverses réactions et donc l'homogénéité du gel d'affinité.

1) Dosage des fonctions activées présentes sur le gel.

L'estimation des groupements esters cyaniques a été introduite par KOHN et WILCHEK en 1981 (179). Elle repose sur la formation d'aldéhyde glutaconique à partir de la pyridine en présence d'ester cyanique. Cet aldéhyde est condensé sur l'acide barbiturique pour former un composé coloré. Nous n'avons pu utiliser cette méthode au moment de la mise au point du gel. Elle a été incluse dans le protocole de préparation des gels par IDZIOREK (136) qui a souligné l'intérêt de ce dosage dans la préparation des gels d'affinité.

	METHODE CONVENTIONNELLE	"CYANO" TRANSFERT
pH réactionnel	11	8
Rendement	1 - 2 %	15 - 20 %
Quantité de Br CN/g Sepharose	100 - 200 mg	5 - 10 mg
Espèces activées sur le gel (%)		
esters cyaniques	15	99
imidocarbonate	25	0
carbamate	60	1
Capacité maximum $\mu\text{M/g}$ gel	20 μM	75 μM
Lavage	Présence de Br CN	Absence de Br CN
Risque toxique	Important	Réduit

TABLEAU IV

Comparaison des techniques d'activation du Sepharose par le BrCN
d'après KOHN J. et WILCHEK M. (169)



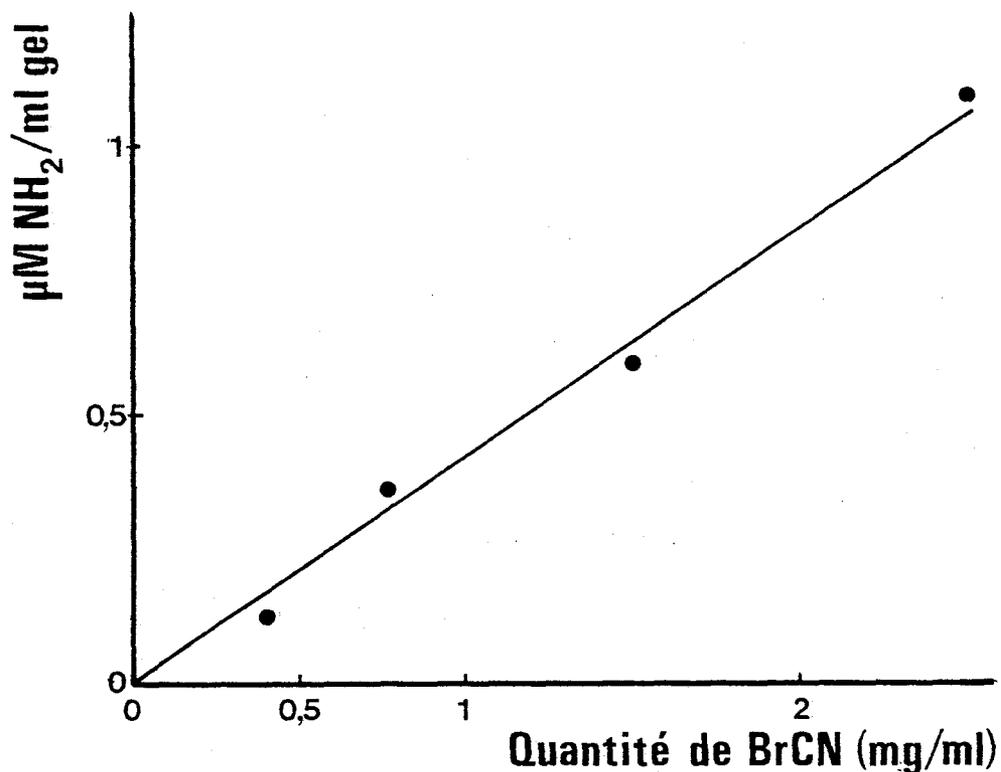


FIGURE 11

Influence de la concentration en bromure de cyanogène dans la réaction d'activation par transfert

Des fractions aliquotes de 10 ml de Sepharose CL 4B sont activées selon le protocole de KOHN et al. (175) en utilisant des quantités différentes de BrCN. Le degré de substitution en ordonnée est exprimé en µM de bras aminé fixé sur le gel, dosées par la méthode de 2-hydroxynaphtaldéhyde.

2) Dosage du bras porté par le gel.

De nombreuses méthodes ont été décrites qui sont générales ou adaptées à un type de bras particulier (voir annexe III). Placés devant le choix d'une méthode de dosage des bras aminés, nous avons dans un premier temps essayé la méthode de FAILLA et SANTI (180). Le complexe trinitrophénylamine, formé entre le bras aminé et le trinitrobenzène-sulfonate (TNBS) est mesuré par spectrophotométrie à 340 nm, après solubilisation du gel en milieu acide et à chaud. Les limitations de cette méthode (voir § résultats et discussion) nous ont amenés à modifier une technique initialement décrite par SCHMITT et WALKER (181) pour le dosage des amines libres présentes sur les résines utilisées en synthèse peptidique en phase solide, afin de l'adapter aux gels d'affinité. Le principe de la réaction (figure 12) repose sur la formation d'une base de Schiff entre les fonctions amines primaires de l'extrémité du bras et le 2-hydroxynaphtaldéhyde. Après lavage, pour éliminer l'excès de réactif, cette base de Schiff est déplacée par la benzylamine qui réagit en formant à son tour une base de Schiff soluble qui est dosée dans le surnageant par spectrophotométrie à 420 nm.

3) Dosage du ligand immobilisé (182).

Il n'existe pas de méthode générale, chaque ligand représente un cas particulier. Pour un gel d'affinité comportant un stéroïde immobilisé, plusieurs procédures sont envisageables pour apprécier la concentration en ligand immobilisé.

a) L'utilisation d'une dilution isotopique du stéroïde greffé constitue la méthode la plus rigoureuse. Elle présente l'intérêt majeur de permettre une vérification facile de la stabilité du gel et d'un éventuel relargage du ligand.

b) Dosage différentiel.

Il peut être pratiqué de deux manières :

- soit dosage différentiel du ligand avant et après couplage dans le surnageant. Cette méthode est peu recommandée ; en effet, la proportion de ligand immobilisé est souvent très faible par rapport à l'excès important de ligand mis en oeuvre (146).
- soit dosage différentiel du bras espaceur. Sous réserve de

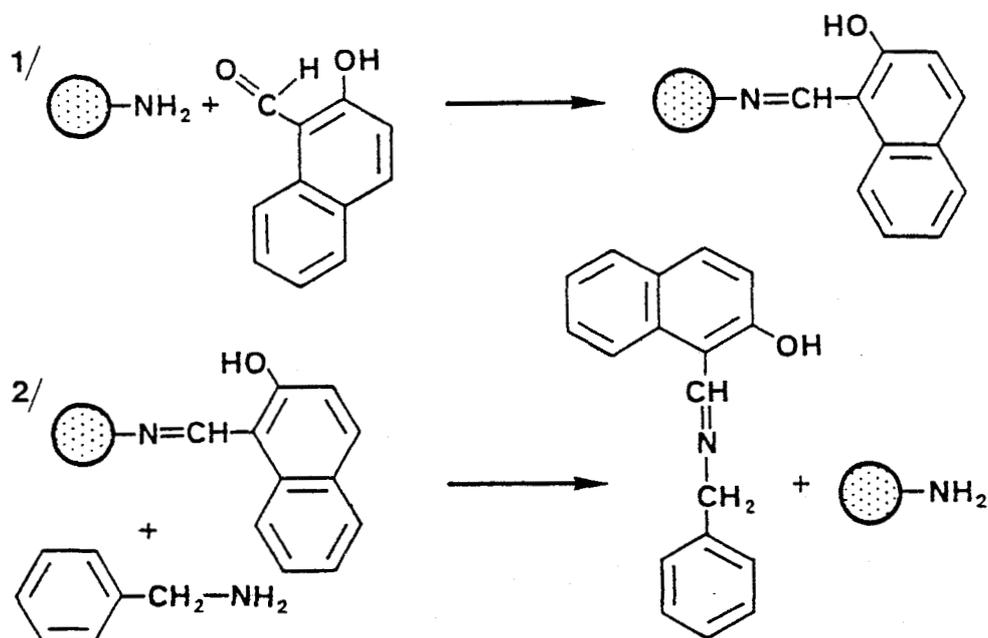


FIGURE 12

Principe du dosage des amines immobilisées sur le gel par la méthode au 2-hydroxynaphtaldéhyde (181)

1) La fonction amine réagit avec le 2-hydroxynaphtaldéhyde en formant une base de Schiff.

2) Après élimination de l'excès de réactif, la base de Schiff immobilisée est déplacée par la benzylamine, qui forme un complexe soluble coloré, dont la concentration, estimée par spectrophotométrie, est proportionnelle aux sites NH₂ présents sur le gel.

disposer d'une très bonne méthode de dosage, cette procédure permet de mesurer à la fois le ligand immobilisé et la capacité résiduelle d'échange d'ions du gel.

c) Dosage spectrophotométrique du ligand.

La dexaméthasone, comme tous les stéroïdes, présente un pic d'absorption maximum dans l'UV à 240 nm. La mesure de l'absorbance à cette longueur d'onde peut être envisagée :

- soit directement sur le gel maintenu en suspension dans du polyéthylène glycol ou du glycérol (183).
- soit après hydrolyse du gel à chaud et en milieu acide ou par voie enzymatique (184). L'apparition d'interférences à la suite de l'hydrolyse nécessite très souvent de recourir à des techniques de séparation, ainsi les stéroïdes peuvent être dosés en chromatographie phase gazeuse (185).

d) L'analyse élémentaire d'un échantillon de gel est également possible. En effet, le dosage du fluor, uniquement présent en 9α sur le stéroïde, permet de calculer la concentration en dexaméthasone immobilisée.

e) Enfin, dans le cas de ligands immobilisés par une liaison amide, WOLPERT et ERNST-FONBERG (186) ont proposé la coupure de la liaison par l'hydroxylamine en milieu alcalin suivie d'un dosage de l'acide hydroxamique généré sous forme d'hydroxamate ferrique.

4) Résultats et discussion.

a) Dosage des bras aminés sur le gel.

La stricte application des conditions décrites par FAILLA et SANTI (180), à savoir hydrolyse du gel en milieu acide acétique à 50% à chaud (75°C) pendant 2 heures, expose à des difficultés de solubilisation. D'autres auteurs rapportent des résultats similaires (187). Dans ces conditions, seuls les gels de Sépharose sont totalement hydrolysés ; le Sepharose CL, du fait de la réticulation, n'est pas solubilisé. L'augmentation de température à 100°C n'est pas suffisante, même après plusieurs heures (figure 13a). En présence d'acide formique à 50%, la solubilisation des gels est complète à 100°C (figure 13b). Cependant, une autre difficulté mérite attention, quel que soit l'acide utilisé, l'hydrolyse s'accompagne d'une oxydation des fragments ou de la

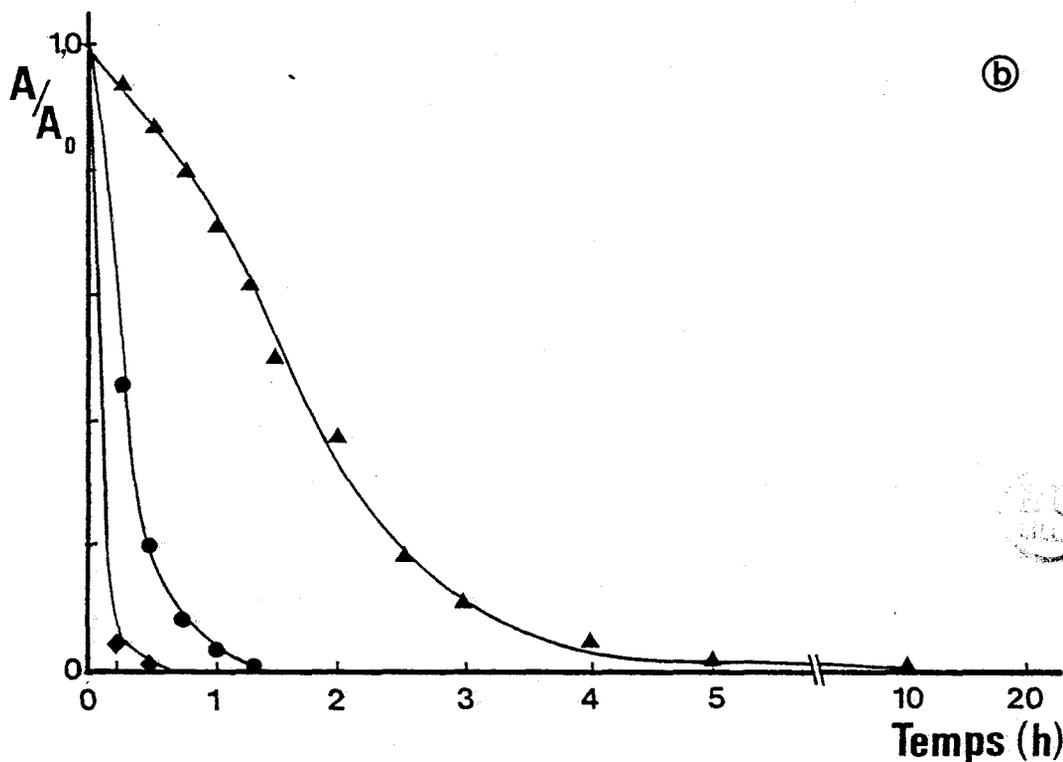
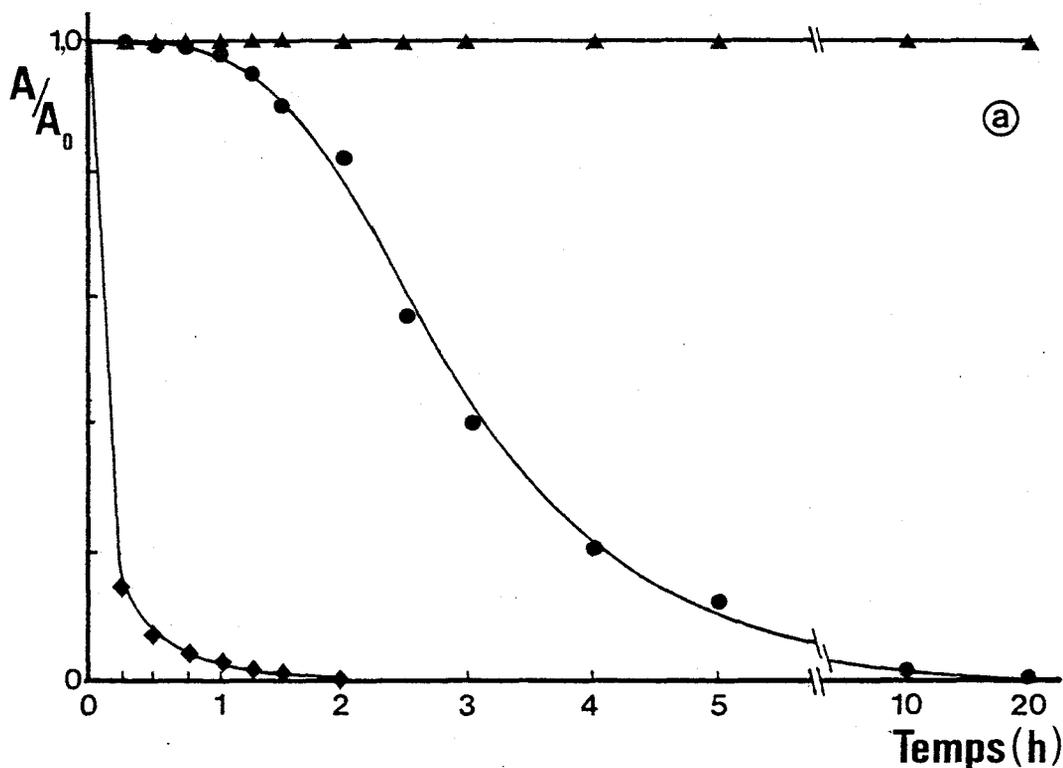


FIGURE 13

Cinétique d'hydrolyse des gels en milieu acide

(a) acide acétique 50% à 100°C.

(b) acide formique 50% à 100°C.

Des fractions aliquotes de 10 ml de gel sont additionnées de 50 ml d'acide acétique ou formique à 50% et placées au bain-marie à 100°C. Après des intervalles de temps réguliers, 1 ml de suspension homogène est prélevé. Après dilution au $\frac{1}{2}$ avec une solution à 5% de PEG 6000, l'absorbance du mélange est mesurée à 650 nm.

Le rapport de l'absorbance mesurée (A) sur l'absorbance initiale (A_0) est proportionnel à la turbidité résiduelle de la solution et donc à la quantité de billes d'agarose en suspension.

Les gels utilisés sont : Δ Sepharose 4B

\bullet Sepharose CL 4B

\blacklozenge Sepharose CL 4B couplé à la diaminodipropylamine.

matrice osidique. Ces composés qui absorbent fortement dans l'ultraviolet (figure 14b) interfèrent dans la mesure spectrophotométrique du complexe trinitrophénylamine. Cette interférence demeure faible, tant que la solubilisation n'est pas complète, mais elle augmente rapidement aussitôt après (figure 14c).

Ainsi, il apparaît que la méthode au trinitrobenzène sulfonate ne peut aboutir à des résultats précis que dans certaines conditions. Premièrement, chaque dosage doit être accompagné d'une mesure témoin effectuée en parallèle sur le même gel en omettant le réactif TNBS. Deuxièmement, la réaction d'hydrolyse doit être surveillée attentivement de façon à arrêter la réaction aussitôt la solubilisation, avant l'apparition des interférences par les produits de dégradation secondaire. Enfin, la valeur du témoin n'est généralement pas négligeable, ce qui limite fortement la précision du dosage, en particulier pour les gels faiblement substitués.

L'application de la méthode au 2-hydroxynaphtaldéhyde décrite par SCHMITT et WALKER (182) a nécessité d'étudier la cinétique du déplacement de la base de Schiff par la benzylamine. Après 1 heure, le déplacement est achevé à 90%, et la réaction est complète après 15 heures (figure 15). Dans des conditions identiques, le Sepharose non substitué ne donne lieu à aucune réaction, il n'est donc pas nécessaire de répéter une mesure témoin. Enfin, l'absence de destruction du gel, permet de recommencer le dosage sur le même échantillon.

b) Comparaison des deux méthodes.

Afin de conclure définitivement, nous avons procédé à la comparaison des résultats des deux dosages directement et indirectement, par rapport à une méthode de référence.

* Méthode directe de comparaison

La préparation d'un gel portant un bras aminé radioactif, tel que la ^{14}C spermidine, permet de faire cette comparaison. Malheureusement, l'expérience nous a montré que la quantité de diamine fixée sur le gel, mesurée par comptage radioactif (11,8 $\mu\text{M}/\text{ml}$ de gel) est supérieure à celles estimées par le dosage d'amines libres (4,1 $\mu\text{M}/\text{ml}$ de gel pour la méthode au trinitrobenzènesulfonate et 4,8 $\mu\text{M}/\text{ml}$ de gel pour la méthode au 2-hydroxynaphtaldéhyde). Cette

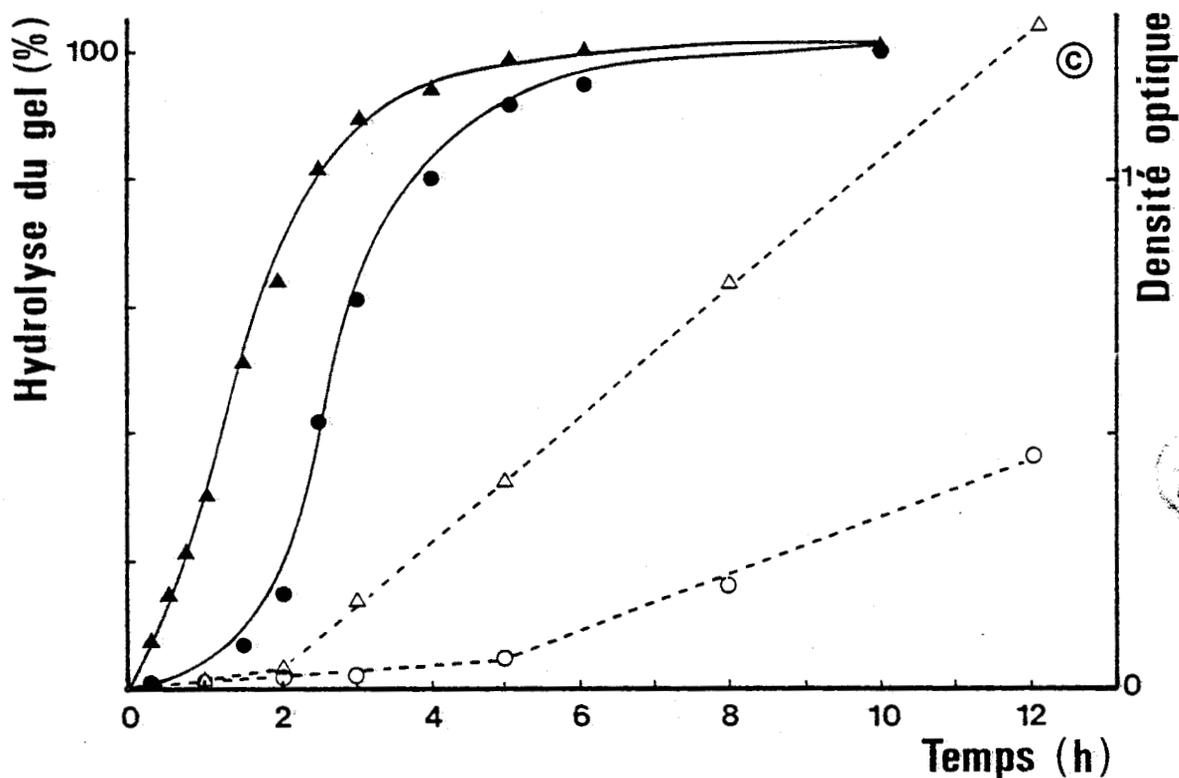
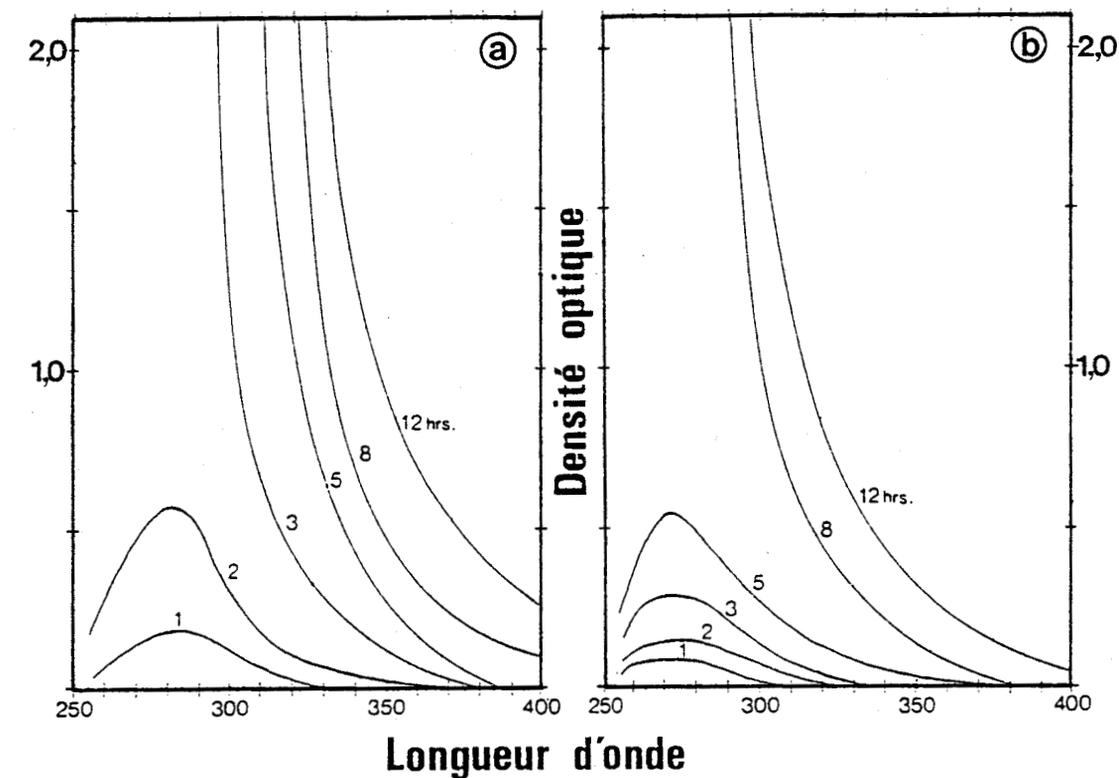


FIGURE 14

Mise en évidence des interférences apparaissant au cours de l'hydrolyse

Au cours de l'étude cinétique (Figure 13), des fractions aliquotes sont prélevées à intervalle de temps réguliers. Après centrifugation, le spectre UV du surnageant est enregistré (figures 14a et 14b).

Figure 14c ; ordonnées traits pleins : pourcentage d'hydrolyse des gels, ordonnées traits discontinus : absorbance du surnageant à 340 nm.

Le pourcentage de gel hydrolysé est calculé comme précédemment à partir du rapport des absorbances à 650 nm (cf légende figure 13)

Les gels utilisés sont :

- ▲ ▲ et 14a Sépharose CL 4B couplé diaminodipropylamine hydrolysé par l'acide formique à 50%.
- ○ et 14b Sépharose CL 4B couplé diaminodipropylamine hydrolysé par l'acide acétique à 50%.

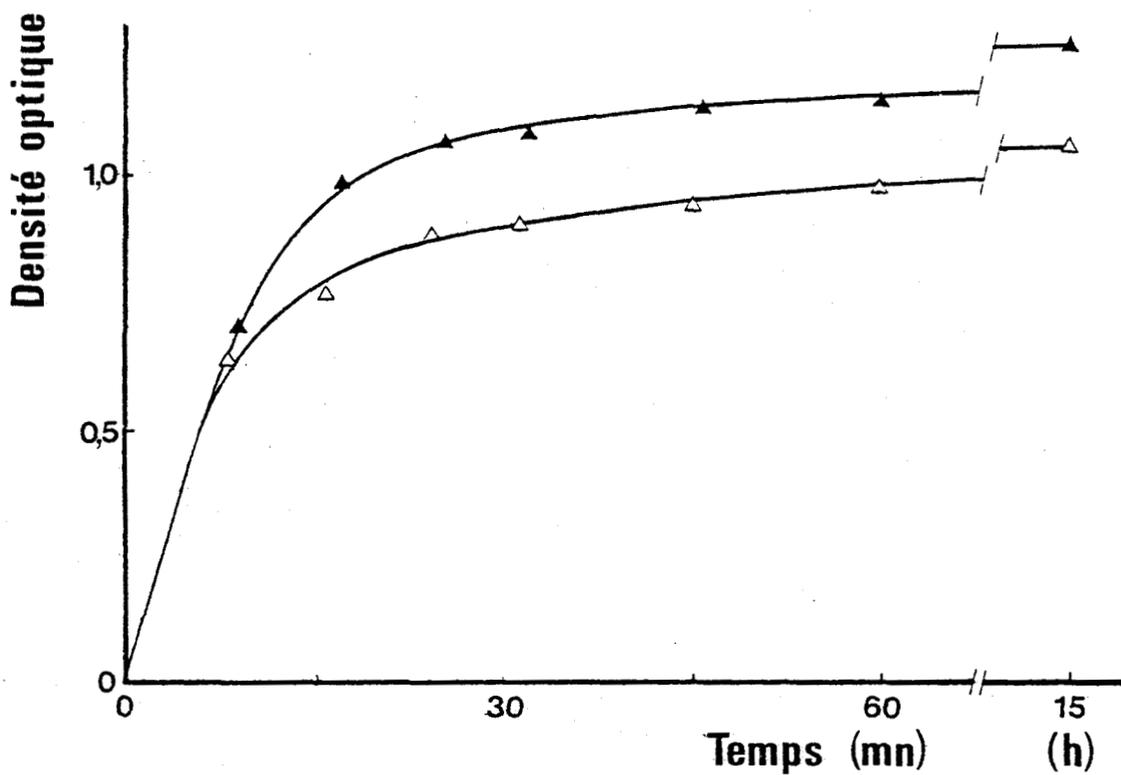


FIGURE 15

Cinétique du déplacement de la base de Schiff par la benzylamine

Deux lots de gels Sepharose CL 4B couplé à la diaminodipropylamine ont été dosés par la méthode au 2-hydroxynaphtaldéhyde.

différence est à rapporter à l'existence d'un phénomène de pontage induit par le bras. En effet, les molécules de spermidine présentes, et qui n'ont plus d'extrémité libre sont engagées par leurs deux extrémités comme agent de réticulation.

* Méthodes indirectes de comparaison

L'échec de la méthode précédente nous a amenés à envisager deux protocoles de comparaison indirecte.

- d'une part, le dosage différentiel des amines par les deux méthodes a été réalisé avant et après couplage du ligand. La concentration de ce dernier a été évaluée par comptage radioactif, qui constitue la méthode de référence. Les résultats sont groupés dans le tableau V. La méthode au 2-hydroxynaphtaldéhyde se révèle beaucoup plus exacte que la méthode au TNBS.
- d'autre part, l'exactitude des dosages d'amine a été évaluée à l'aide de gels porteurs d'un bras cystamine. La figure 16 schématise la principe de l'expérience. La différence entre la concentration en amine avant et après réduction par le borohydrure, doit correspondre à la quantité de résidus thiols libérés. Le tableau VI démontre à nouveau les performances analytiques supérieures de la méthode au 2-hydroxynaphtaldéhyde.

Cette mise au point nous a permis d'établir un protocole commode de contrôle du gel, d'en mesurer précisément les limites et également d'évaluer les performances des protocoles habituellement utilisés.

c) Dosage du ligand immobilisé.

Parmi les méthodes envisageables, nous avons choisi la solution la plus simple et le plus précise. L'emploi de dexaméthasone diluée isotopiquement ($|^3\text{H}|$ dexaméthasone/dexaméthasone = 10^{-6}) permet d'introduire le ligand sous forme radioactive et de doser rapidement et avec précision le stéroïde greffé sur le gel. Le dosage est effectué contre un témoin préparé à partir de gel non substitué, additionné d'une quantité connue de $|^3\text{H}|$ dexaméthasone.

Systématiquement, un dosage différentiel d'amine est réalisé dans le double but de vérifier par différence la concentration en ligand

Méthode au 2 hydroxynaphtaldéhyde		^3H Dex fixé sur le gel	Méthode de FAILLA au TNBS	
avant couplage du ligand	après couplage du ligand		avant couplage du ligand	après couplage du ligand
0,13	0	0,16	0,90	0,10
0,50	0,10	0,41	1,50	0,40
0,85	0,25	0,65	2,20	0,70

TABLEAU V

Résultats comparatifs des dosages d'amines du bras avant et après couplage du ligand
(Les résultats sont exprimés en $\mu\text{M}/\text{ml}$ de gel).

Trois lots différents de Sepharose CL 4B ont été activés au BrCN et couplés à la diaminodipropylamine. Le stéroïde ^3H Dex a été couplé aux gels 4 semaines après l'activation.

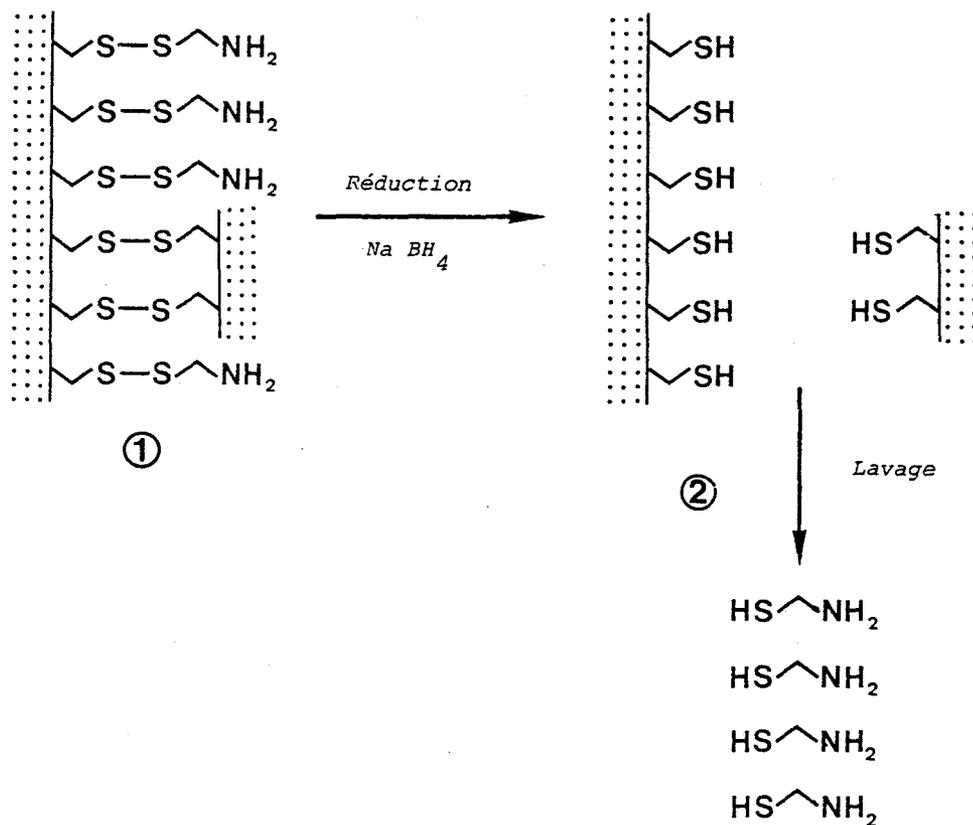


FIGURE 16

Principe de la vérification de l'exactitude du dosage du bras aminé

- 1) Cystamine agarose dont la concentration en bras aminés libres est déterminée par dosage.
- 2) Après réduction par le borohydrure, la quantité de thiols libérés et récupérés par lavage est équivalente à la quantité de bras aminés perdus par le gel.

Expérience N°	Méthode au 2 hydroxynaphtaldéhyde		Quantité de cystamine libérée	Méthode au TNBS	
	avant réduction au borohydrure	après réduction au borohydrure		avant réduction au borohydrure	après réduction au borohydrure
I	6,60	1,04	5,51	9,19	2,36
II	6,43	0,74	5,46	9,85	1,89
III	5,63	0,58	5,29	8,31	0,95

TABLEAU VI

Résultats comparatifs des dosages de bras aminés sur un gel cystamine-Sepharose CL 4B avant et après réduction par le borohydrure de sodium (les résultats sont exprimés en µM/ml de gel)

Trois expériences ont été réalisées, 1 semaine (I), 2 semaines (II) et 4 semaines (III) après activation du gel. Les résultats des dosages d'amines sont la moyenne de 4 déterminations, et le dosage de thiol a été effectué sur 5 aliquotes.

immobilisé et de contrôler l'efficacité du couplage. En effet, s'il persiste des bras aminés libres, le gel se comportera à la fois comme un gel d'affinité et d'échange d'ions, ce qui peut poser des problèmes à la fois pour l'adsorption spécifique et non spécifique.

5) Conclusion : intérêt d'un dosage précis du degré de substitution.

Dans la plupart des protocoles de mise au point de chromatographie d'affinité, les utilisateurs qui préparent eux mêmes leurs gels, se contentent d'un dosage semi-quantitatif du bras greffé sur le gel et s'attachent surtout à déterminer la concentration en ligand immobilisé. Cependant, il convient d'insister sur l'intérêt d'un contrôle précis de toutes les étapes de synthèse du gel, ce qui nous paraît indispensable pour la mise au point de gels à efficacité optimale. De tels gels sont nécessaires pour aborder la purification de protéines présentes en très faibles quantités et ayant une grande affinité pour leur ligand, telles que les récepteurs. En effet, dans ce domaine, l'expérimenteur est placé entre deux exigences contradictoires

- disposer d'un gel d'affinité de capacité élevée pour adsorber le maximum de récepteur. Ceci suppose un taux de greffage élevé en ligand.
- pouvoir éluer efficacement le récepteur. Or, l'efficacité de l'élution est conditionnée largement par la concentration en ligand immobilisé. Une concentration trop élevée peut rendre l'élution impossible : l'équilibre de compétition entre le stéroïde éluant et le ligand greffé est alors déplacé en faveur du dernier.

Il importe donc de pouvoir être à même de choisir avec précision cette concentration en ligand immobilisé. En pratique, deux attitudes sont possibles, soit utiliser des dilutions d'un gel d'affinité concentré avec du gel non activé, soit préparer des gels homogènes comportant des concentrations variées en ligand. Dans le cas d'une adsorption en colonne, la première éventualité est souvent recommandée (188). Par contre, si l'adsorption se déroule en batch, procédé qui est mieux adapté au problème des récepteurs présents à très faible concentration, l'expédient qui consiste à "ajuster la

concentration" en ligand par dilution avec du Sépharose, ne présente pas d'intérêt. Il est donc important de pouvoir préparer des gels homogènes présentant des concentrations différentes en ligand immobilisé. Concrètement, le taux de greffage du ligand est essentiellement déterminé par les conditions d'activation. Une étude précise des paramètres qui modulent cette réaction, permet de préparer des gels "sur mesure". Le dosage des bras immobilisés avant et après couplage du ligand est nécessaire à deux titres : premièrement, il définit le taux de substitution, et, d'autre part, il permet de s'assurer que la réaction de couplage du ligand au bras a un rendement proche ou égal à 100%. Cette dernière contrainte garantit l'homogénéité des gels et l'absence de propriétés d'échangeur d'ions dues à la persistance de bras aminés libres. Enfin, un dernier paramètre important à connaître est représenté par la stabilité du gel d'affinité. Dans ce but, la solution la plus simple et la plus efficace consiste à utiliser un ligand radioactif.

IV - CONCLUSION

Nous nous sommes efforcés au cours de cette mise au point de répondre à toutes ces exigences. Nous avons synthétisé une gamme de gels homogènes, dont la concentration en stéroïde varie de 0,02 à 2 $\mu\text{M}/\text{ml}$ de gel, comportant des bras de nature différente. La figure 17 rassemble les caractéristiques de ces différents gels. L'étape suivante de notre travail a été consacrée à la mise au point du protocole de purification.

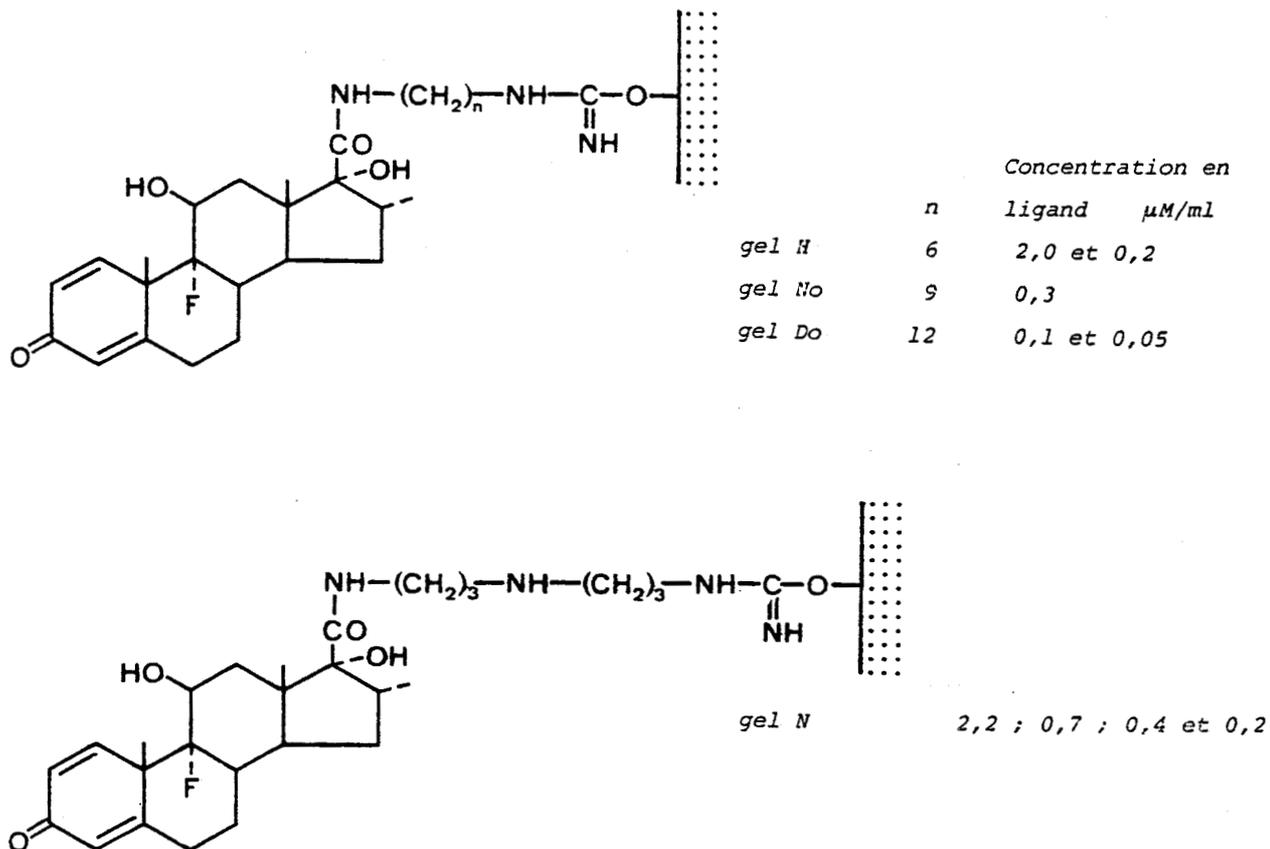


FIGURE 17

Structure des différents gels d'affinité synthétisés



FORMATION DE LA LIAISON AMIDE

La condensation d'une fonction carboxyle sur une fonction amine appelée "synthèse peptidique" est d'une importance considérable. Cette synthèse nécessite que la fonction carboxyle soit activée.

1) Méthode aux azides (CURTIUS)

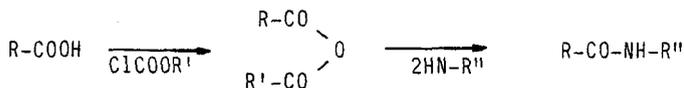
L'azide peut être préparé à partir de l'hydrazide correspondant.

2) Méthode aux anhydrides

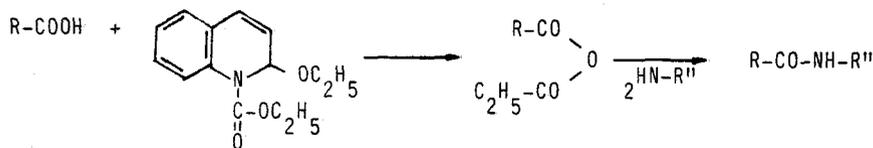
Les anhydrides d'acides réagissent facilement avec les amines pour former des amides.

- Anhydrides mixtes carboniques

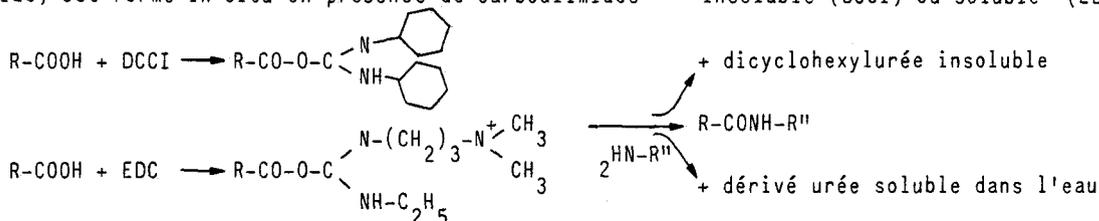
L'anhydride mixte formé in situ en présence de chloroformiate d'acyle n'est pas isolé.

**- Méthode à l'EEDQ**

Ce dérivé de la quinoline permet de former facilement des anhydrides.

**- Méthode aux O-acyl-iso-urée**

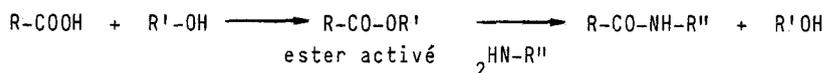
C'est une technique de couplage très employée, le dérivé O-acyl urée (analogue à un anhydride) est formé in situ en présence de carbodiimides insoluble (DCCI) ou soluble (EDC).



Il peut y avoir formation de dérivé N-acylurée.

3) Méthode aux esters

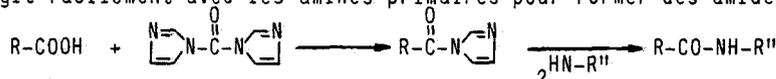
Les amines primaires réagissent facilement avec les esters pour former des amides. L'utilisation de radicaux porteurs de groupements attracteurs facilite la réaction et lui donne son nom de méthode aux esters activés.



Parmi les esters employés : esters p nitrophénol - esters trinitrophénol - esters pentachlorophénol - esters N hydroxysuccinimide - esters N hydroxybenzotriazole.

4) Méthode au carbonyl diimidazole (CDI)

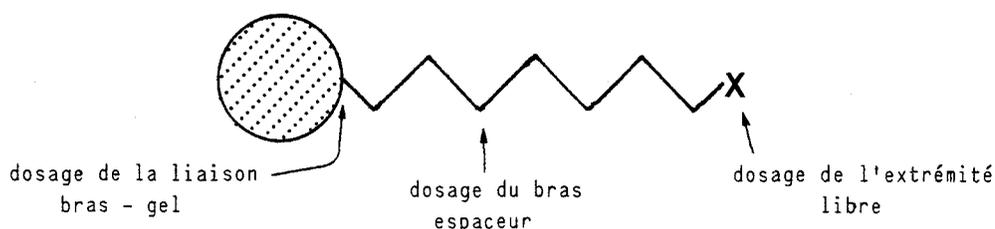
Le CDI est un bon agent acylant qui forme avec les dérivés carboxyle un composé acylimidazole qui réagit facilement avec les amines primaires pour former des amides.



METHODES	ACTIVATION			MECANISMES REACTIONNELS	LIAISON BRAS - GEL				REF.
	Toxicité	Durée (h)	pH		Réactivité du gel activé	Type	Stabilité	Interaction	
Bromure de cyanogène	++	0,5	11		amines	isourée	oui si pH 5	ionique (charge +)	1
Cyanylation	-	0,5			amines	isourée	oui si pH 5	ionique (charge +)	2
Bisépoxy-ranes	+ / -	5 - 20	8 - 12		alcools amines	éther	bonne	0	3
Epichlorhyd.	+ / -	2 - 24	8 - 12		amines alcools	éther	bonne	0	4
Divinyl sulfones	++	0,5 - 2	8 - 10		amines alcools	éther	bonne	0	4
Halogénures sulfonyle	+ / -	0,5-0,8	7 - 10		amines	alkyl	bonne	0	6
Triazine	++	0,5 - 2	7 - 9		amines	triazinyl	bonne	ionique (charge -) et π-π	7
Chloroacét.	+ / -	8 - 10	2 - 3		amines	éther	bonne	0	8
C.D.I.	+ / -	0,2-0,5	8 - 9,5		amines	carbamate N subst.	oui si pH 10	0	9
Benzoquinones	+ / -	1 - 2	7 - 9		amines	éther	bonne	π-π	10
Oxydation periodique	-	14 - 20	7,5-8,5		amines	b. Schiff alky	labile bonne	0	11

Références

1. AXEN, R. et al. (1967) NATURE, 214, 1302-1304.
2. KOHN, J. et al. (1984) APPL. BIOCHEM. BIOTECHNOL., 9, 285-305.
3. SUNDBERG, L. et al. (1974) J. CHROMATOGR., 90, 87-98.
4. PORATH, J. et al. (1970) J. CHROMATOGR., 51, 479-484.
5. FORNSTEDT, N. et al. (1975) FEBS LETT., 67, 187-191.
6. MILLSON, K. et al. (1980) EUR. J. BIOCHEM., 112, 397-402.
7. LANG, E. et al. (1977) J. CHEM. SOC. PERKIN I, 2189-2194.
8. INMAN J.K. (1975) J. IMMUNOL., 114, 704-708.
9. BETHELL, G.S. et al. (1979) J. BIOL. CHEM., 254, 2572-2575.
10. BRANDT, J. et al. (1975) BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 386, 196-205.
11. SANDERSON, C.J. et al. (1971) IMMUNOL., 20, 1061-1068.



1) DOSAGE DE LA LIAISON BRAS-GEL

- Méthode cinétique par hydrolyse d'un ester de p.nitrophénol (provoquée par la nucléophilie du groupement isourée) (1).
- Hydrolyse alcaline et dosage de l'amine libérée (2).

2) DOSAGE DU BRAS ESPACEUR

- bras type amino-acide : hydrolyse et dosage sur analyseur d'acides aminés (3)
- bras avec pont disulfure : réduction par NaBH_4 et dosage des thiols libérés (4).
- bras marqué isotopiquement : incorporation sous forme d'une dilution isotopique et comptage direct (5).
- bras hydrophobe : RMN du proton (6).

3) DOSAGE DE L'EXTREMITE LIBRE

- fonction thiol : dosage par le réactif d'ELLMAN (acide 5,5' dithio-bis-(2 nitro-benzoïque) (7).
- fonction carboxyle : dosage par potentiométrie (8 - 9).
- fonction amine : . dosage par potentiométrie (10 -11).
. dosage par spectrophotométrie.
- directe : mesure turbidimétrique du gel en suspension (12).
mesure colorimétrique après réaction avec le TNBS (13).
(ac. trinitro 2,4,6 benzène sulfonique).
- indirecte : mesure colorimétrique après réaction avec le TNBS et hydrolyse (14).
mesure colorimétrique du TNBS en excès (15).
mesure colorimétrique de la pyridine-2-thione libérée à partir du gel converti en 2-pyridyldithiopropionamide (16).

1. WEBER M.M. (1976) ANAL. BIOCHEM., 76, 177-183.
2. NAOI M., LEE Y.C. (1974) ANAL. BIOCHEM., 57, 640-644.
3. GORDON J.A., BLUMERG G., LIS H., SHARON N. (1972) FEBS LETT., 24, 193-195.
4. HARDING J.J. (1973) J. CHROMATOG., 77, 191-199.
5. SHARMA M., SLAUNWHITE W.R. (1975) ANAL. BIOCHEM., 68, 79-86.
6. ROSENGREN J., PAHLMAN S., GLAD M., HJERTEN S. (1975) BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 412, 51-61.
7. CUATRECASAS P. (1970) J. BIOL. CHEM., 245, 3059-3065.
8. HIXSON H.F., NISHIKAWA A.H. (1973) ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS., 154, 501-509.
9. WICHMAN A., ANDERSON L.O. (1974) BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 177, 218-224.
10. SLAVIK K., RODE W., SLAVIKOVA V. (1976) BIOCHEMISTRY, 15, 4222-4227.
11. KORNBLUTH R.A., OSTRO M.J., RITTMANN L.S., FONDY T.P. (1974) FEBS LETT., 39, 190-194.
12. MIYAGAWA A., OKOYAMA T. (1977) J. BIOCHEM., 81, 1715-1720.
13. INMAN J.K., DINTZIS H.M. (1969) BIOCHEMISTRY, 8, 4074-4082.
14. FAILLA D., SANTI D.V. (1973) ANAL. BIOCHEM., 52, 363-368.
15. ANTONI G., PRESENTINI R., NERI P. (1983) ANAL. BIOCHEM., 129, 60-63.
16. INMAN J.K. (1985) in Affinity chromatography : a practical approach. IRL Press, p 53-58.

CHAPITRE 2

PURIFICATION DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES

SOUS FORME NON TRANSFORMEE

L'élaboration d'un protocole de purification dépend à la fois de la maîtrise des méthodes de séparation des protéines et de la connaissance de la protéine à purifier du point de vue physicochimique, biologique, et de sa stabilité. C'est dans cette optique que nous avons abordé la suite de notre travail.

Le choix d'un matériel biologique original, différent du modèle classique qu'est le foie de rat, nous a incité à étudier au préalable les caractéristiques physicochimiques et fonctionnelles du récepteur cytosolique des glucocorticoïdes de ce modèle.

La stratégie de la purification a été établie en fonction des objectifs suivants :

- obtenir une préparation la plus pure possible, tout en sachant que l'homogénéité complète, dans le cas des récepteurs des hormones stéroïdes, n'est pas envisageable.
- parvenir à un rendement suffisant pour entreprendre une étude de caractérisation complète du matériel purifié. Pratiquement, ceci n'est concevable que si le protocole de purification ne comporte qu'un minimum d'étapes mettant en oeuvre des techniques très sélectives, telles que la chromatographie d'affinité.

La mise au point des différentes étapes du protocole de purification a été réalisée sur des préparations cytosoliques de foie de rat. Le protocole élaboré nous a permis de caractériser partiellement le récepteur purifié. Ces résultats ont été repris et complétés par IDZIOREK et FORMSTECHEK (136, 189). Parallèlement, nous avons adapté ce protocole à un matériel biologique différent.

I - CHOIX DU MATERIEL BIOLOGIQUE

1) Depuis sa découverte, l'étude in vitro du récepteur à glucocorticoïdes a été réalisée sur des préparations cytosoliques obtenues par centrifugation à 100000 g d'un homogénat cellulaire. Ces cellules proviennent, soit de lignées cellulaires en culture (fibroblastes, cellules d'hépatome HTC, cellules pituitaires AtT-20...),

soit de tissus animaux. Afin de faciliter l'étude de l'interaction hormone-récepteur, l'imprégnation hormonale endogène est supprimée. Dans le cas des cultures cellulaires, le milieu de culture est dépourvu de glucocorticoïdes. Chez l'animal, la surrénalectomie chirurgicale aboutit à la privation d'hormones glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes.

Le choix du matériel biologique est donc restreint. La culture cellulaire réclame une technologie particulière. Elle présente l'avantage de pouvoir sélectionner des lignées cellulaires plus riches en récepteur. Ainsi, certaines lignées de cellules HTC renferment trois fois plus de récepteur (1,4 pmol/mg de protéines) que les lignées initiales (0,4 pmol/mg de protéines), ce qui divise d'un facteur trois le taux de purification à obtenir (92). Cependant, la production de grandes quantités de cellules, nécessaires à une purification, demeure très délicate. Parmi les modèles biologiques animaux, le rat a été utilisé par l'immense majorité des groupes. La supplémentation en sel du régime après la surrénalectomie suffit à éviter l'apparition d'une insuffisance surrénale aiguë. De nombreux travaux ont été consacrés à la caractérisation physicochimique et à l'étude de la stabilité du récepteur à glucocorticoïdes du cytosol de foie ou de thymus. Dans l'intention de purifier le récepteur, un minimum de vingt foies de rat est nécessaire, de manière à obtenir des quantités raisonnables de matériel purifié. Il apparaît ainsi que la taille réduite de cet animal peut être un inconvénient. Le lapin, qui ne présente pas ce désavantage, n'a pas été l'objet d'importants travaux. La présence de récepteur des glucocorticoïdes dans différents tissus et organes a été rapportée par BALLARD et al. (190) et GIANNOPOULOUS et al. (191). L'absence de travaux plus approfondis semble relative à la difficulté de la surrénalectomie (190). Cependant, la possibilité d'obtenir à partir d'un seul animal, des quantités appréciables de matériel biologique (100 à 120 g pour un foie) nous a incités à choisir ce modèle biologique.

2) La surrénalectomie du lapin est réalisable, mais se révèle plus complexe que chez le rat pour plusieurs raisons :

- le lapin est extrêmement sensible à l'anesthésie générale. Après de nombreux échecs, nous utilisons un protocole associant **Flunitrazepam** et **Thiopental**, proposé par GUILLAUME et al. (192) avec des résultats fiables sans aucun incident.

- l'acte chirurgical est compliqué par la nécessité de procéder à la ligature des vaisseaux de la surrenale avant leur section.
- la disposition anatomique de la surrenale droite, qui est accolée à la veine cave inférieure, rend son ablation délicate.

La survie de l'animal pendant 48 à 72 heures ne pose pas de problèmes avec une supplémentation en NaCl.

3) La caractérisation physicochimique et fonctionnelle (193) du récepteur cytosolique du foie de lapin nous a conduits aux conclusions suivantes :

- le récepteur du lapin est très proche du récepteur du rat du point de vue des propriétés hydrodynamiques et ioniques.
- la stabilité du récepteur sous forme libre et liée à l'hormone est supérieure à celle du rat (comparée dans les mêmes conditions).
- la spécificité vis à vis des glucocorticoïdes naturels et de synthèse est identique. Le récepteur du foie de lapin se différencie surtout par sa vitesse de dissociation du stéroïde qui est plus faible d'un facteur cinq.
- le mécanisme d'action fait également intervenir deux étapes où le récepteur présente des caractères physicochimiques différents. Cependant, les conditions de transformation ne sont pas identiques chez les deux espèces.

Les résultats de cette étude de caractérisation (Tableau VII) permettent d'une part d'envisager l'adaptation sans difficulté des résultats préliminaires de mise au point de la purification, d'autre part de disposer des éléments rendant possible l'identification physicochimique du matériel purifié.

II - PREPURIFICATION DU RECEPTEUR LIBRE

1) La concentration en récepteur du cytosol natif, ou nombre de sites, est très faible, voisine de $3 \cdot 10^{-9}$ M, soit environ 0,005 à 0,01% des protéines cytosoliques. Afin de favoriser au maximum l'étape de chromatographie d'affinité, il peut être avantageux de pouvoir éliminer

FOIE DE RAT

FOIE DE LAPIN

$R_0 = 0,3 \text{ pmol/mg prot.}$

CONCENTRATION

$R_0 = 0,3 \text{ pmol/mg prot.}$

PARAMETRES DE LIAISON (4°C)

$K_A = 0,27 \cdot 10^{+9} \text{ M}^{-1}$
 $k_{+1} = 0,87 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$
 $k_{-1} = 11,9 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$

$K_A = 0,4 \cdot 10^{+9} \text{ M}^{-1}$
 $k_{+1} = 1,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$
 $k_{-1} = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$

STABILITE

0°C

$t_{1/2} = 9 \text{ h}$
 $t_{1/2} = 75 \text{ h}$

forme libre

lié

$t_{1/2} = 20 \text{ h}$
 $t_{1/2} = 235 \text{ h}$

SPECIFICITE

Triamcinolone acétonique \geq desoxymétasone >
 dexaméthasone > corticostérone >
 cortisol

Dexaméthasone > Triamcinolone
 acétonide \geq desoxymétasone >
 cortisol > corticostérone

PARAMETRES PHYSICOCHIMIQUES

$R_S = 6,6 \text{ nm}$

Gel filtration
 (TSK 3000)

$R_S = 6,2 \text{ nm}$

8,5 S

Ultracentrifugation

9,0 S

$M_r = 237 \text{ 000}$

$M_r = 235 \text{ 000}$

pI = 5,1

Isofocalisation
 (agarose)

pI = 5,3

Echange d'ions
 (molarité d'éluion)

0,125 M phosphate

DEAE

0,160 M phosphate

TABLEAU VIII

Paramètres de caractérisation du récepteur cytosolique du foie de rat et de lapin

une majorité des protéines étrangères. Ceci diminue d'autant les interactions non spécifiques. Dans ce but, diverses méthodes de fractionnement sont envisageables :

- soit la précipitation par les sels (relargage) qui peut être dénaturante.
- soit l'adsorption par chromatographie d'échange d'ions généralement en batch.

Ces deux types de procédures ont été utilisées pour les récepteurs des hormones stéroïdes :

- pour le récepteur d'estradiol, SECCO et al. (194) et SICA et al. (152) ont recours à une étape de chromatographie sur héparine agarose qui permet une purification d'un facteur 10 à 50 fois environ. D'autres techniques, précipitation par le sulfate d'ammonium ou adsorption sur bleu dextran immobilisé ou sur octyl Sepharose, ont été essayées par RATAJCZAK et HAHNEL (195). Elles permettent d'éliminer des protéines étrangères, mais dénaturent le récepteur.
- pour le récepteur de la progestérone, KUHN et al. (137) procèdent à une précipitation par le sulfate d'ammonium qui permet de purifier partiellement le récepteur, mais avec de très mauvais rendements.
- pour le récepteur du 1,25-dihydroxycholecalciférol, la précipitation par 0,08% de polyéthylèneimine se révèle plus efficace que la précipitation par le sulfate d'ammonium (196).
- pour le récepteur des glucocorticoïdes (cf chap. II § I), GOVINDAN et al. (94) font appel à la précipitation par le sulfate de protamine, dans les conditions décrites par ROUSSEAU et al. (93), qui amène à des résultats très satisfaisants. SANTI et al. (92) préfèrent une étape de chromatographie, soit par gel filtration, soit sur alkyl-agarose, qui malheureusement ne sont pas applicables à des volumes importants de matériel biologique.

Le rendement de ces diverses méthodes varie entre 50 et 75%, et le taux de purification entre 2 et 8 fois. Elles présentent cependant deux avantages appréciables, d'une part la réduction du volume de matériel biologique, et d'autre part l'élimination d'une grande partie des protéines étrangères. Les techniques par précipitation apparaissent

plus commodes et largement utilisées.

2) Résultats et discussion

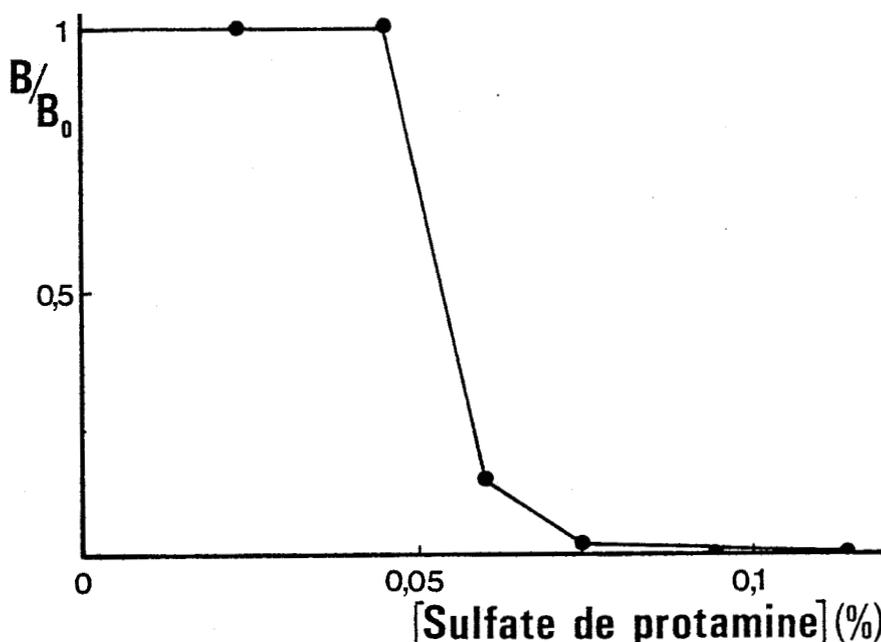
a) Dans un premier temps, nous avons essayé la précipitation par le sulfate de protamine, selon le protocole en deux étapes de GOVINDAN et al. (94). Après élimination des acides nucléiques par traitement par le sulfate de streptomycine, le cytosol est amené à 0,075% en sulfate de protamine. Les protéines précipitées sont récupérées et solubilisées en tampon phosphate 0,16 M (en utilisant 0,2 volumes de tampon par rapport au volume de cytosol de départ). Dans le cas du foie de rat, le rendement varie entre 70 et 90%, et le taux de purification est de 6 à 8 fois environ, ce qui est en accord avec les résultats publiés. Le tampon Tris 0,02 M surchargé ou non par 0,3 M KCl ne permet pas d'extraire le récepteur précipité.

La réaction a été réexaminée pour le récepteur du foie de lapin. La précipitation est complète pour la même concentration en sulfate de protamine (figure 18a). La récupération est maximale pour une concentration 0,16 M en phosphate. L'addition de 0,2 M molybdate au tampon Tris 0,02 M permet également de resolubiliser le récepteur (figure 18b). Le rendement et le taux de purification sont du même ordre que ceux obtenus avec le cytosol de foie de rat. Les caractéristiques physicochimiques du récepteur après cette étape sont similaires à celles obtenues pour le récepteur cytosolique. La simplicité et la rapidité de cette technique qui par ailleurs donne des résultats très satisfaisants, nous ont incités à inclure cette procédure comme étape de prépurification.

b) D'autres procédés ont également été essayés par la suite.

- précipitation par le sulfate d'ammonium : le récepteur libre est précipité par addition de sulfate d'ammonium et resolubilisé en tampon borate 0,05 M. A 50% de saturation en sel, le récepteur est pratiquement entièrement précipité (figure 19). Après solubilisation, le rendement est de 60 à 70% pour un taux de purification qui n'excède pas 2,5 fois.

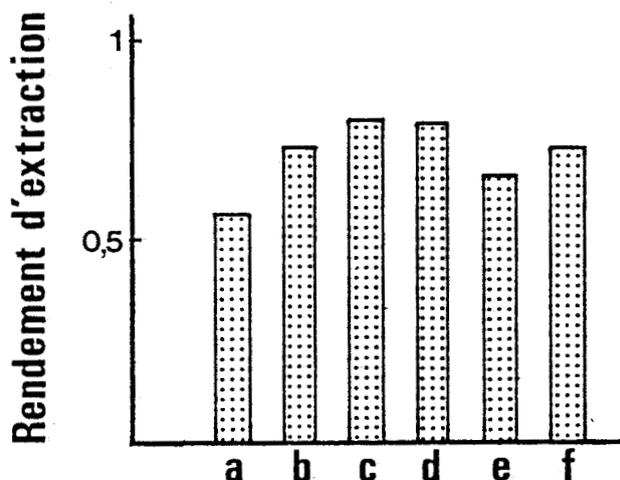
- adsorption sur héparine agarose: le récepteur des glucocorticoïdes



Des fractions aliquotes (2 ml) de cytosol de foie de lapin sont additionnées de quantités croissantes d'une solution de sulfate de protamine 0,5%. Après 40 minutes de contact, le surnageant est récupéré par centrifugation. Une incubation de 16 heures à 0-4°C en présence de 2.10^{-8} |³H| dexaméthasone permet de mesurer la liaison spécifique B

Ordonnée : rapport de la liaison spécifique résiduelle B à la liaison initiale B₀ (B₀ ≈ 15 000 cpm).

Abscisse : concentration finale en sulfate de protamine.



Des fractions aliquotes (2 ml) de cytosol de foie de lapin sont traitées par 0,075% de sulfate de protamine. Après 40 minutes, les précipités sont récupérés et remis en suspension dans 0,4 ml de tampon. Après homogénéisation et centrifugation, les surnageants sont récupérés, dilués au 1/5 et incubés en présence de 2.10^{-8} M |³H| dexaméthasone pendant 16 h à 0-4°C. La liaison spécifique est mesurée par la technique au charbon dextran et rapportée au récepteur initialement présent dans le cytosol (rendement d'extraction).

- Tampons utilisés :
- a - tampon phosphate 0,12 M
 - b - " " 0,14 M
 - c - " " 0,16 M
 - d - " " 0,18 M
 - e - " " 0,20 M
 - f - tampon Tris 0,02 M + 0,2 M molybdate.

FIGURE 18

Précipitation du récepteur des glucocorticoïdes du foie de lapin par le sulfate de protamine

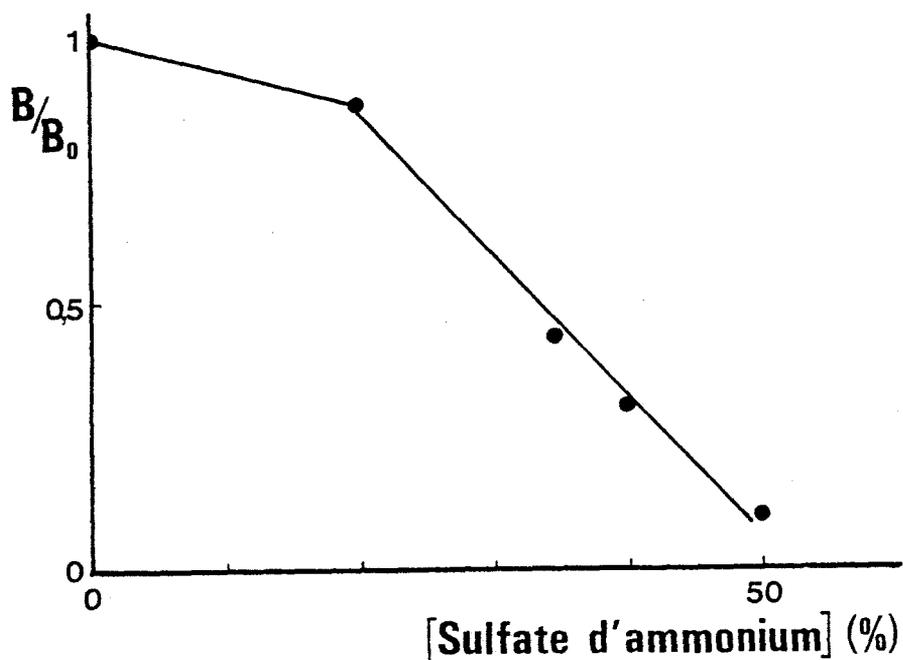


FIGURE 19

Précipitation du récepteur des glucocorticoïdes du foie de lapin par le sulfate d'ammonium

Des fractions aliquotes (2 ml) de cytosol de foie de lapin sont additionnées de quantités croissantes d'une solution à saturation de sulfate d'ammonium. Après 30 minutes de contact, le surnageant est récupéré par centrifugation. Une incubation de 16 h à 0-4°C en présence de $2 \cdot 10^{-8}$ M [3 H] dexaméthasone permet de mesurer la liaison spécifique résiduelle **B**.

Ordonnée : rapport de la liaison spécifique résiduelle **B** à la liaison initiale **B₀** ($B_0 = 15\ 000$ cpm).

Abscisse : concentration finale en sulfate d'ammonium.

sous forme libre est adsorbé sur un gel d'héparine immobilisée. L'éluition par le chlorure de sodium (0,2 M) permet d'obtenir une préparation purifiée 5 fois environ. Cependant, la capacité du gel est beaucoup trop faible (1,2 pmole de récepteur/ml de gel) pour envisager l'application à des volumes de cytosol de l'ordre de 200 ml, comme méthode de prépurification (98).

- adsorption sur DEAE-trisacryl : le cytosol est traité en batch par 0,4 volumes de DEAE-trisacryl durant 10 minutes à 4°C. Après lavage, les protéines adsorbées sont éluées par 1 volume de tampon phosphate 0,16 M. Dans ces conditions, le récepteur est purifié 15 à 25 fois avec un rendement de 60 à 70%.

Cette dernière technique apparaît plus performante que la procédure par précipitation par le sulfate de protamine. Une étude plus approfondie est nécessaire afin d'optimiser les conditions essentiellement pour réduire le volume de tampon d'éluition. Il serait alors envisageable d'inclure cette étape chromatographique dans le protocole de purification à la place de la précipitation.

III - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Les différents gels synthétisés (figure 17) ont été essayés, tant en ce qui concerne l'adsorption que l'éluition, afin de définir les conditions opératoires de l'étape de chromatographie d'affinité. Cette mise au point a été réalisée en choisissant comme matériel biologique des préparations prépurifiées après précipitation par le sulfate de protamine du récepteur de foie de rat. La transposition au récepteur cytosolique de foie de lapin a été faite dans un second temps, en vérifiant la validité des résultats précédents.

A) ADSORPTION DU RECEPTEUR

Cette étape peut se dérouler du point de vue technique selon deux modalités, soit en colonne, soit en batch. Dans le cas des récepteurs, la procédure en batch semble mieux adaptée. En effet, ils présentent une haute affinité vis à vis du ligand, sont présents à très

faible concentration, et sont très peu stables sous forme libre. Par ailleurs, un faible volume de gel d'affinité est difficile à manipuler en colonne ; le débit doit être suffisamment lent pour permettre l'interaction récepteur-ligand ; enfin, le volume de solution à purifier est important et au cours d'une filtration longue, il peut y avoir dégradation du récepteur avant son passage sur le gel. Dans le cas du batch, ces inconvénients n'apparaissent pas, seul se pose le problème de la récupération du gel d'affinité et son lavage.

Plusieurs paramètres ont été étudiés afin de définir les conditions optimales de l'adsorption.

1) Influence du degré de substitution.

Les gels N et H ont été préparés avec diverses concentrations de DXO immobilisé. L'essai comparatif au cours d'une même expérience nous a donné les résultats figurant dans le tableau VIII. Il apparaît que l'adsorption augmente avec le degré de substitution du gel. Cependant, cette augmentation reste modérée et est rapidement limitée.

Il n'y a donc aucun avantage à utiliser des gels fortement substitués. Au contraire, l'augmentation du degré de substitution rend les sites ligands plus proches les uns des autres, ce qui favorisera les phénomènes de réassociation lors de l'élution (144, 197).

2) Durée de l'adsorption.

La cinétique de l'adsorption a été mesurée pour les différents gels. Les courbes obtenues (figure 20) sont superposables. Après 3 heures, l'adsorption est maximale et demeure constante jusqu'à 16 heures. Pour des raisons de commodité, nous avons choisi par la suite une durée de 15 heures, correspondant à la période nocturne.

3) Influence du rapport volume de milieu biologique/volume de gel.

Cette étude a été réalisée avec le gel No. En effet, ce paramètre ne devenait important que lors de l'optimisation des conditions d'adsorption et donc présente moins d'intérêt pour les gels

ADSORBANT	NATURE DU BRAS ESPACEUR	CONCENTRATION EN LIGAND $\mu\text{M}/\text{ml}$ de gel	POURCENTAGE DE RECEPTEUR ADSORBE
Gel H	Diaminohexane	2,0	80
		0,2	38
Gel N	Diaminodipropylamine	2,2	70
		0,7	65
		0,4	48
		0,2	45

TABLEAU VIII

Etude de l'adsorption spécifique en fonction du degré de substitution des gels

L'adsorption a été réalisée dans des conditions identiques pour les 6 expériences : en batch durant 3 heures à 0-4°C, avec un rapport volume de cytosol/volume de gel égal à 100/1.

Le pourcentage d'adsorption est calculé d'après les concentrations en récepteur du cytosol maintenu à 0-4°C pendant 3 heures et du cytosol surnageant du batch.



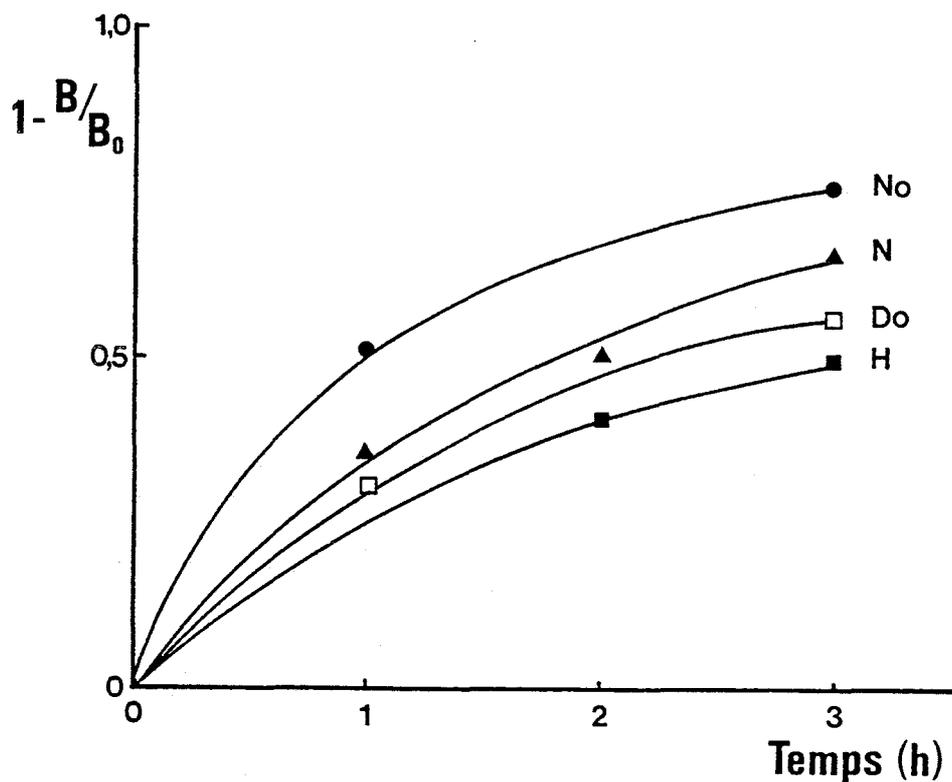


FIGURE 20

Cinétique d'absorption du récepteur des glucocorticoïdes du foie de rat sur les différents gels d'affinité

Des fractions aliquotes (5 ml) de cytosol sont traitées par 0,5 ml des différents gels. A intervalles de temps réguliers, 1 ml de mélange est prélevé, centrifugé et le surnageant est incubé 16 h à 0-4°C en présence de $2 \cdot 10^{-8}$ M ^3H dexaméthasone. La liaison spécifique résiduelle **B** est mesurée ainsi que la liaison initiale **B₀** (**B₀** 20 000 cpm).

Ordonnée : le rapport $B_0 - B / B_0$ représente le pourcentage du récepteur adsorbé.

Abscisse : durée de l'adsorption.

qui ne permettent pas d'éluer le récepteur.

La diminution de ce rapport modifie la cinétique d'absorption essentiellement au niveau des temps précoces (figure 21a) et n'affecte que modérément les pourcentages relatifs de récepteur adsorbés après 15 heures. Ces résultats sont plus intéressants à aborder selon une autre approche : en raisonnant à volume de gel constant, la quantité totale de récepteur retenu par le gel augmente avec l'accroissement du rapport volume de milieu biologique/volume de gel. Cette augmentation de l'adsorption se traduit par l'accroissement de la saturation spécifique du gel (figure 21b). Celle-ci demeure très faible (0,4%), mais ce phénomène est classique en chromatographie d'affinité. Deux conséquences importantes découlent de ces résultats : premièrement, si la quantité totale de récepteur retenu augmente, l'élution étant réalisée toujours dans les mêmes conditions (c'est-à-dire le même volume de solution éluante), la concentration en récepteur dans l'éluat sera plus élevée. Deuxièmement, si la saturation spécifique du gel augmente, le volume de gel restant identique, l'adsorption non spécifique n'augmentera pas et le rapport spécifique/non spécifique augmentera. La préparation obtenue sera donc plus pure et plus concentrée.

Nous avons adopté, pour le protocole définitif, un rapport volume d'extrait sulfate de protamine/volume de gel égal à 50, et une quantité de gel égale à 1 ml.

4) Spécificité de l'adsorption

Deux hypothèses peuvent être évoquées pour l'interaction gel d'affinité-récepteur, soit par un mécanisme spécifique impliquant le ligand, soit par un mécanisme non spécifique mettant en jeu des interactions hydrophobes ou ioniques avec le gel. La distinction entre ces deux hypothèses peut être faite en préparant des gels ne comportant que le bras espaceur aminoalkyl. SANTI et al. (92) ont réalisé ce type d'expérience. Le récepteur est effectivement retenu par des gels type alkyl-agarose, par des interactions hydrophobes. L'élution du récepteur est obtenue en augmentant la force ionique jusqu'à 0,3 M KCl. Nous n'avons pas vérifié ces résultats avec des gels du même type. Cependant, l'absence de récepteur dans des lavages en tampon 0,4 M KCl nous incite à penser que le récepteur est retenu par le gel selon un mécanisme

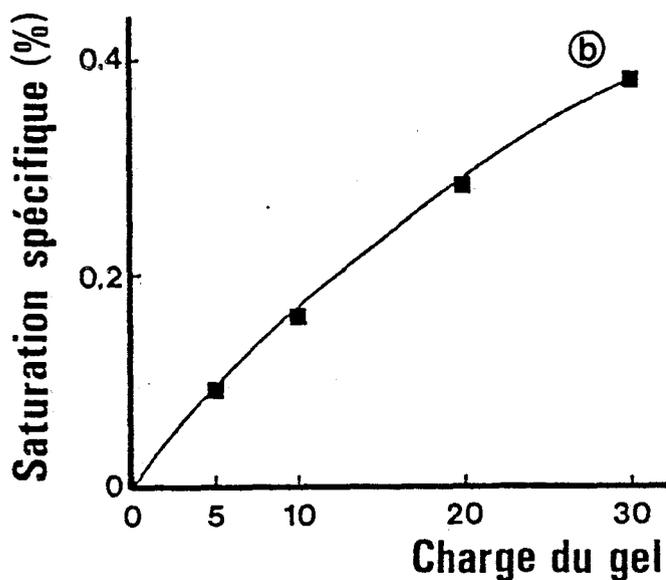
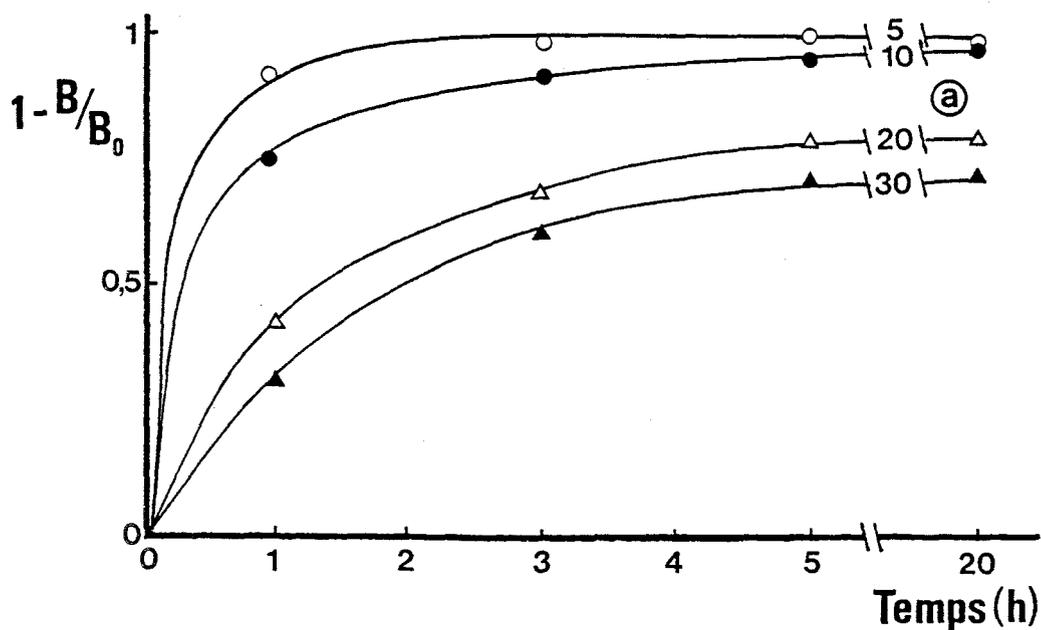


FIGURE 21

Effet de la charge en cytosol sur la cinétique d'adsorption (a) et la saturation du gel (b)

Des aliquotes (0,2 ml) de gels sont mis en contact avec 1,2,4 ou 6 ml d'extrait sulfate de protamine. L'agitation est poursuivie à 0-4°C et 0,2 ml de surnageant sont prélevés à intervalles de temps réguliers. Après dilution au 1/5, la liaison spécifique est mesurée par incubation en présence de $2 \cdot 10^{-8}$ M [3 H] dexaméthasone pendant 16 h à 0-4°C.

Ⓐ Ordonnée : le rapport $B_0 - B/B_0$ représente le pourcentage de récepteur adsorbé.

Abscisse : durée de l'adsorption.

○ rapport milieu biologique/gel (v/v) : 5

● rapport milieu biologique/gel (v/v) : 10

△ rapport milieu biologique/gel (v/v) : 20

▲ rapport milieu biologique/gel (v/v) : 30

Ⓑ Ordonnée : saturation spécifique du gel calculée comme le rapport du récepteur retenu au nombre total de sites ligand disponibles sur 0,2 ml de gel.

Abscisse : charge du gel exprimée d'après le rapport milieu biologique/gel (v/v).

biospécifique.

5) Adaptation au récepteur du foie de lapin.

Nous avons comparé les gels No et Do en complétant les résultats pour ce dernier. Les deux gels ont apporté des résultats comparables. Les courbes de cinétique d'adsorption sont superposables (figure 22) aux précédentes. De ce fait, les conditions d'adsorption n'ont pas été modifiées à savoir :

- . adsorption en batch.
- . durée 15 heures à 4°C sous agitation
- . rapport volume d'extrait sulfate de protamine/volume de gel égal à 50.

B) LAVAGE DU GEL

Les protéines contaminantes présentes dans le gel d'affinité sont éliminées par un lavage extensif. Afin d'améliorer le lavage, le gel est transféré dans une colonne de section importante (2,5 cm). Le débit est rapide afin de réaliser la totalité des lavages en moins de 30 minutes. Initialement, le protocole comprenait trois passages de 25 volumes de tampon phosphate 0,16 M, dont le second était surchargé par 0,4 M KCl. L'incubation en présence de [³H] dexaméthasone des diverses fractions de lavage nous a constamment donné des résultats négatifs quant à la présence de récepteur. Par la suite, cette séquence de lavages a été modifiée en incluant le passage de 25 volumes de tampon phosphate 0,02 M et une étape supplémentaire en tampon phosphate 0,16 M à 20°C. L'alternance de tampons de forces ioniques variées et à des températures différentes permet d'éliminer la majeure partie des protéines retenues de manière non spécifique.

C) ELUTION DU RECEPTEUR

L'étape de chromatographie d'affinité comporte après les phases d'adsorption et de lavage, une étape d'élution. Dans le cas d'une élution biospécifique, le récepteur libre qui apparaît à la suite de la

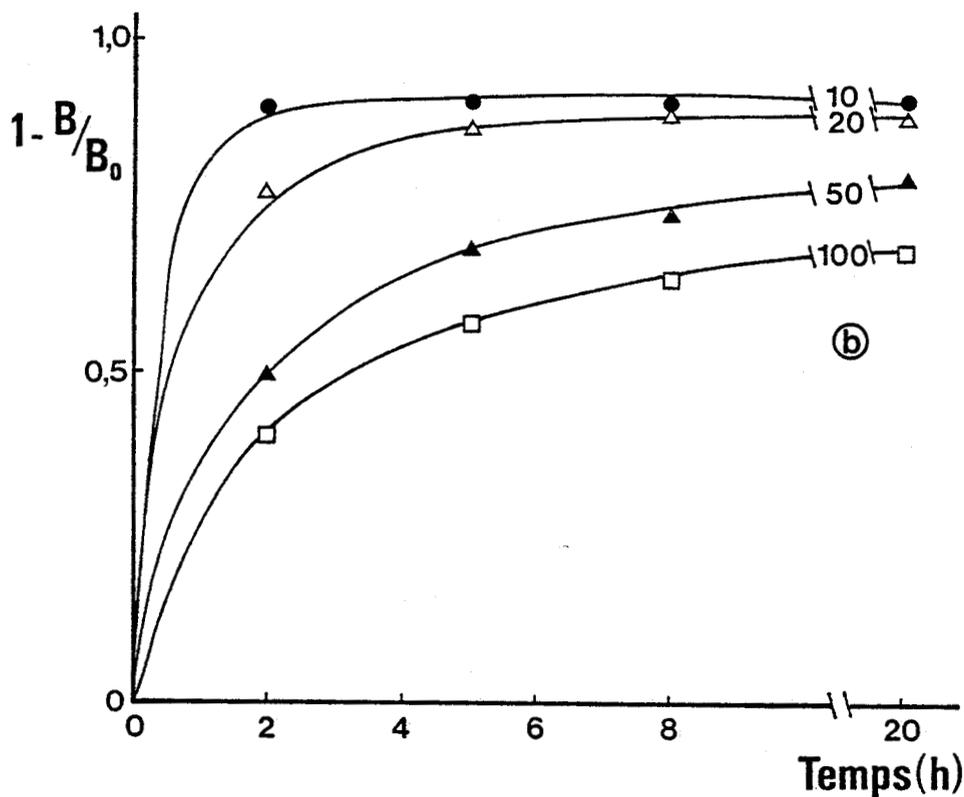
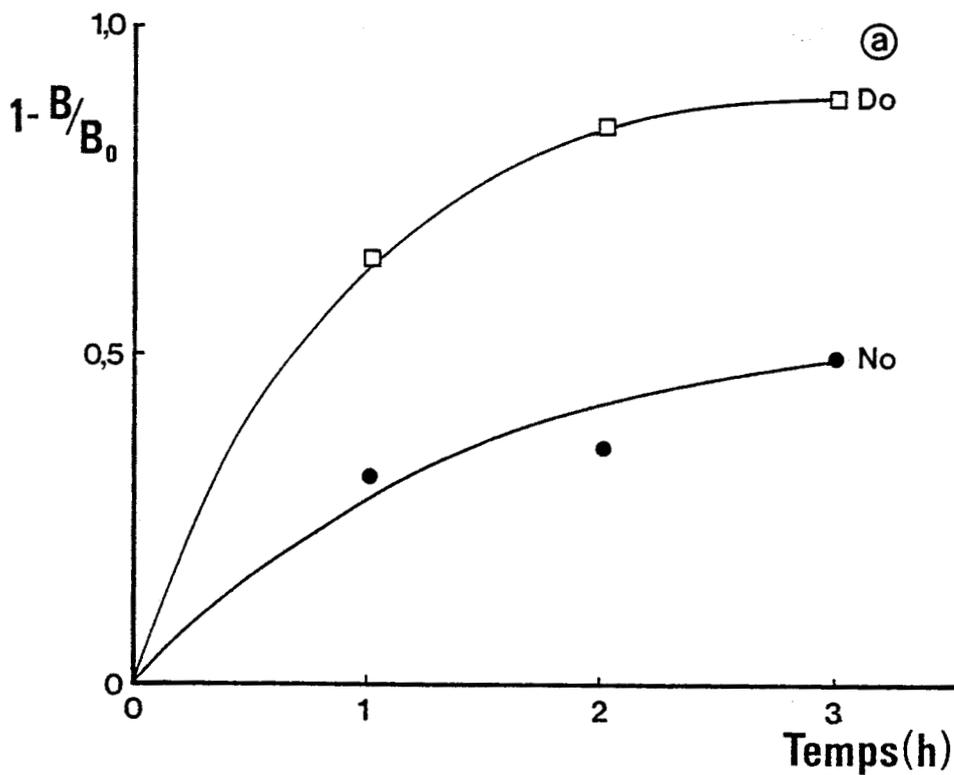


FIGURE 22

Cinétique d'absorption du récepteur du foie de lapin

22 (a) : Essai des différents gels

Conditions opératoires identiques à celles de la figure 20

□ gel à bras diaminododécane

● gel à bras diaminononane

22 (b) : Effet de la charge en cytosol sur la cinétique d'adsorption

Conditions opératoires similaires à celles de la figure 21

● rapport milieu biologique/gel (v/v) : 10

△ rapport milieu biologique/gel (v/v) : 20

▲ rapport milieu biologique/gel (v/v) : 50

□ rapport milieu biologique/gel (v/v) : 100

dissociation du complexe récepteur-hormone immobilisée, interagit avec le ligand spécifique libre présent à une concentration élevée. Cette étape d'éluion est réalisée en batch qui permet un mélange homogène du gel et de la solution éluante pendant un temps suffisamment long.

1) Influence du bras-espaceur.

Les résultats des tentatives d'éluion réalisées avec les différents gels, regroupés dans le tableau IX, font apparaître l'importance de la nature du bras espaceur.

Avec le gel N (bras diaminodipropylamine), l'éluion n'est pas obtenue, ce qui était prévisible d'après les expériences de déplacement (cf chap. III § II, C). De même, avec le gel d'affinité H (bras diaminohexane), il est impossible de parvenir à éluer le récepteur, alors que les complexes récepteur-DXH étaient déplacés en solution. L'éluion biospécifique n'a pu être réalisée avec succès que dans le cas des gels No (bras diaminomonane) et Do (bras diaminododécane). L'explication suivante peut être proposée : dans le cas d'un bras espaceur court (C_6), les complexes récepteur-ligand immobilisés sont stabilisés par des interactions s'établissant entre la protéine et le support ou le groupement isourée présent au niveau du point d'attache du bras. L'allongement du bras (C_9 ou C_{12}) écarte suffisamment le récepteur et empêche ainsi ces interactions. Cette hypothèse est confirmée :

- premièrement, par des résultats similaires obtenus avec des composés bifonctionnels dexaméthasone-biotine. L'interaction simultanée du récepteur et de l'avidine n'est pas possible pour les composés dont les deux ligands sont séparés par une chaîne comportant 8 ou 9 atomes. Par contre, dans le cas d'une chaîne à 16 atomes, les deux protéines peuvent interagir en même temps avec leurs ligands respectifs (198). Il semble donc que le site de liaison au niveau du récepteur serait relativement enfoui dans la protéine, ce qui apparaît logique compte tenu de l'hydrophobie du ligand.
- d'autre part, pour les autres récepteurs des hormones stéroïdes, seuls les gels comportant des bras espaceurs relativement longs : 14 atomes pour TRUONG et al. (144), 13 atomes pour FAILLA et al. (120), structure poly (Ala-Lys) pour SICA et al. (138) se révèlent

Adsorbant	Nature du bras espaceur	Longueur des bras Nbre d'atomes	Concent. en ligand $\mu\text{M}/\text{ml}$	Récepteur adsorbé après 3 heures de batch (4°C) % (a)	Récepteur dans le lavage KCl 0,4 M % (a)	Récepteur élué % (b)
Gel H	Diaminohexane	8	0,2	38 (c)	0,5	0
Gel N	Diaminodipropylamine	9	0,2	45 (c)	N.T.	0
			2,2	70 (c)	N.T.	0
Gel No	Diaminononane	11	0,3	55 (d)	0,1	53 (f)
				67 (d)	0,4	26 (e)
				72 (d)	0,5	50 (f)
Gel Do	Diaminododécane	14	0,05	54 (d)	0,8	12 (e)

TABLEAU IX

Résultats obtenus avec les différents gels lors de la mise au point de l'étape de chromatographie d'affinité

N.T. : non testé.

a : exprimé en pourcentage du récepteur présent dans le cytosol.

b : exprimé en pourcentage du récepteur fixé sur le gel.

c : adsorption à partir du cytosol brut (100 ml de cytosol pour 1 ml de gel).

d : adsorption à partir d'extrait de sulfate de protamine (10 ml pour 1 ml de gel).

e : élution pendant 17 heures avec $3 \cdot 10^{-7}$ M ^3H T.A.

f : élution pendant 17 heures avec 10^{-6} M ^3H T.A.

efficaces au niveau de l'élution biospécifique. Cette similitude de comportement est en accord avec l'identité du caractère hydrophobe des divers stéroïdes, et donc la situation du site de liaison dans le noyau hydrophobe de la protéine réceptrice.

2) Influence de la concentration en stéroïde éluant.

L'augmentation de la concentration en stéroïde éluant de 3.10^{-7} M à 10^{-6} M se traduit par une augmentation du rendement d'élution d'un facteur 2 environ (Tableau IX). Ces concentrations relativement élevées sont habituelles pour l'élution des récepteurs en chromatographie d'affinité. La formation d'aggrégats de stéroïdes a été rapportée par des stéroïdes très hydrophobes tels que l'estradiol et la progestérone (199, 200). Ceux-ci peuvent être la cause d'artefact lors de la détermination de la radioactivité liée. Dans le cas de la dexaméthasone ou de l'acétonide de triamcinolone, nous avons vérifié que dans les techniques de mesures utilisées charbon-dextran ou hydroxyapatite, le stéroïde libre est effectivement adsorbé par le charbon ou éliminé par lavage. D'autre part, même à ces concentrations, le stéroïde est soluble dans le tampon.

3) Durée de l'élution.

La cinétique d'élution est relativement rapide, ainsi que le montrent les résultats suivants : par rapport au récepteur retenu par le gel, le rendement d'élution est de 50,5% et de 57,5% après 4 heures et 21 heures respectivement. Ainsi, après 4 heures à 4°C, l'élution est quasiment complète. La prolongation de l'élution n'apporte pas un gain considérable. Pour des raisons de commodité, dans le cas du récepteur du foie de rat, nous avons choisi une durée d'élution de 5 à 8 heures permettant de terminer cette étape dans la journée.

4) Influence de la force ionique.

Plusieurs tampons de forces ioniques différentes ont été essayés pour préparer la solution éluante : Tris 0,02 M ; phosphate 0,16 M et 0,32 M. Les conditions les plus favorables sont le milieu phosphate 0,16 M. Cependant, cette étude n'a pas été approfondie suffisamment pour tirer des arguments définitifs.

5) Modifications apportées pour le récepteur de foie de lapin.

Du fait de la dissociation très lente du complexe hormone-récepteur cytosolique du foie de lapin (tableau VII), il nous a été impossible d'obtenir une élution à 4°C, même après 24 heures. Afin de faciliter l'échange, l'élution est réalisée à 20°C. En effet, à cette température, la vitesse de dissociation est beaucoup plus rapide (d'un facteur 25 environ) ; les constantes de vitesse de dissociation étant respectivement de $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ et $6,9 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ à 4° et 25°C. A partir de ces résultats, les conditions d'élution ont été fixées comme suit :

- . élution en batch
- . durée 3 heures à 20°C sous agitation
- . rapport volume de solution éluante/volume de gel égal à 5
- . concentration en ^3H dexaméthasone : $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

D) RESULTATS ET DISCUSSION

Le tableau X rassemble les résultats de l'étape de chromatographie d'affinité à partir des cytosols de foie de rat et de lapin, comparés aux résultats obtenus par les autres groupes. Les commentaires suivants peuvent être dégagés :

1) D'après les résultats que nous rapportons, il apparaît que l'étape d'adsorption est reproductible. Par contre, les résultats d'élution sont beaucoup plus dispersés. Le taux de purification est également très variable, mais ceci ne reflète pas exactement la réalité car au fur et à mesure, le protocole de lavage a été modifié, et les valeurs rapportées illustrent en fait l'amélioration des performances.

2) Comparées aux résultats obtenus par les autres groupes, nous pouvons essentiellement aborder le problème de l'élution et des performances des diverses méthodes.

L'élution biospécifique des récepteurs apparaît comme problématique pour de nombreux auteurs (138, 152, 197, 201), et souvent la solution proposée est empirique (152, 201) : addition de solvants organiques, d'ions chaotropiques ou d'urée. Parmi ces possibilités, nous

	RESULTATS PERSONNELS		IDZIOREK (189) rat	FAILLA (120)	S T E R O G E L			G O V I N D A N		
	rat n = 4	lapin n = 8			Weisz (121)	Grandics (125)	Singh (90)	gel-bras S-S (94)	(132)	gel conv (117)
Adsorption	65 ± 13	75 ± 10	70	80	-	85 - 90	-	-	-	-
Rapport cytosol/gel	50	50	50	3	-	2,5	3	17,5	25	20
Elution	31 ± 19	33 ± 20	53	44	55	60 10	60	60	90	90
Taux de Purification (fois)	100 à 900	100 à 450	820	80 à 300	110	100 à 200	110	1500	8800	4500

TABLEAU X

Résultats comparés des performances de l'étape de chromatographie d'affinité pour la purification du récepteur des glucocorticoïdes

Les rendements d'adsorption et d'éluion exprimés en pourcentage sont calculés par rapport au récepteur mis en contact avec le gel.

avons retenu la suggestion de REDEUILH et al. (197) d'utiliser des gels faiblement substitués afin, d'une part que le rapport des concentrations de stéroïde éluant/stéroïde immobilisé soit favorable à l'élution, d'autre part d'éviter les phénomènes de réassociation immédiate sur un site ligand voisin.

Nos résultats d'élution sont moins satisfaisants sur le plan du rendement par rapport aux autres purifications. FAILLA et al. (120) rapportent que dans toutes leurs tentatives, le rendement n'a jamais dépassé 50%. Les utilisateurs du Sterogel obtiennent des résultats très voisins de l'ordre de 60%. Enfin, pour les résultats de GOVINDAN, dans le cas des gels à bras clivable, rien ne s'oppose dans le principe à l'obtention de rendements élevés ; pour le protocole conventionnel, l'élution est réalisée en présence de 0,05 M thiocyanate dans le tampon (117). Ce dernier agit comme un ion chaotropique et peut favoriser l'élution pour certains (152) ou être inefficace selon d'autres auteurs (201). D'autre part, cet anion stimule la transformation. Nous avons essayé les conditions d'élution de GOVINDAN, sans obtenir des résultats aussi considérables, au contraire dans notre expérience, l'addition de 0,05 M thiocyanate a fait chuter le rendement d'élution. Il convient de remarquer également que pour l'élution du récepteur du foie de lapin, nous sommes obligés de travailler à 20°C. Dans ces conditions, la stabilité du récepteur est réduite d'un facteur 15 ; en effet, le $t_{1/2}$ est de 16 heures à 20°C par rapport à 235 heures à 0°C (193). Le phénomène de dégradation du récepteur au cours de l'élution n'est donc pas négligeable et peut expliquer en partie les rendements plus faibles que nous obtenons.

Enfin, il faut considérer que nous comparons une moyenne de nos résultats avec les résultats d'une expérience. Or, parmi nos propres expériences, certaines étaient comparables sur le plan du rendement à celles des autres groupes.

Sur le plan de l'efficacité, appréciée par le taux de purification, le protocole que nous avons mis au point supporte bien la comparaison avec les autres méthodes. Malgré un rendement inférieur, les taux de purification que nous obtenons apparaissent supérieurs. Ce résultat est à rapporter à deux éléments :

- d'une part, au protocole de lavage qui permet d'éliminer une grande partie des protéines étrangères retenues par le gel. Ce problème de l'importance des lavages a été étudié en détail par IDZIOREK (136) qui propose un protocole en 4 étapes similaire à celui que nous proposons, associant des tampons de forces ioniques différentes à 4° et 20°C. Cette qualité des lavages est responsable pour une bonne part des performances obtenues.
- l'autre élément est représenté par le gel d'affinité lui-même particulièrement en raison de la spécificité et de la haute affinité du ligand immobilisé, vis à vis du récepteur à glucocorticoïdes. En effet, la DOC utilisée par les autres groupes, est beaucoup moins spécifique, elle interagit avec les récepteurs des glucocorticoïdes, de la progestérone (202, 203) et des minéralocorticoïdes (204), et également avec la transcortine (124). Afin de minimiser cette dernière interaction, la deuxième version des conseils d'utilisation du Sterogel, recommande et insiste sur la perfusion soigneuse du foie avant la préparation du cytosol. Ce problème de spécificité a également été rapporté par GOVINDAN et al. (132) qui, pour cette raison, préfèrent greffer la dexaméthasone, à la place de la DOC, sur les gels à partir de 1980. Le fait de disposer d'un gel ayant une affinité élevée permet d'autre part de traiter des volumes importants de matériel biologique, ce qui augmente la saturation spécifique du gel par rapport aux interactions non spécifiques.

Il faut cependant noter que, à la différence de FAILLA, WEISZ, GRANDICS et SINGH, nous utilisons un matériel biologique prépurifié. Or, en présence de cytosol, les interactions non spécifiques peuvent être plus importantes.

Enfin, si nous examinons ces résultats sur le plan de la méthodologie elle même, il convient de remarquer que le protocole proposé est très performant du point de vue du taux de purification par rapport aux techniques de chromatographie d'affinité développées dans d'autres domaines.

IV - PURIFICATION TERMINALE DU RECEPTEUR

Après l'étape de chromatographie d'affinité, le récepteur est prépurifié à un degré variant entre 5 et 30% d'homogénéité, selon les expériences. Il est donc nécessaire d'envisager une étape supplémentaire. Cette étude n'a été réalisée que pour la purification du récepteur du foie de lapin.

1) Résultats.

Plusieurs méthodes ont été essayées dans cette intention :

- chromatographie sur hydroxyapatite : le complexe hormone-récepteur est adsorbé et élué en gradient NaCl pour une concentration de 0,1 M.
- chromatographie sur DEAE Trisacryl : le récepteur purifié lié à l'hormone est élué, soit en gradient, soit en palier.
- chromatographie d'exclusion haute performance sur TSK 3000.

Le Tableau XI permet de comparer les trois procédures. Sur le plan tant de l'efficacité que du rendement, la gel filtration sur colonne TSK 3000 apporte les résultats les plus satisfaisants (purification 6 fois avec 80% de rendement). La purification de l'éluat de chromatographie d'affinité reconcentré, par injections itératives est réalisable sans difficulté en raison de la parfaite reproductibilité de la gel filtration haute performance.

2) Discussion.

Tous les protocoles publiés font appel à une étape ultérieure après chromatographie d'affinité. Le choix s'est porté soit vers la chromatographie de gel filtration classique (92, 123) ou HPLC (189), soit vers les techniques d'échange d'ions sur DEAE (121, 125). Certains auteurs ont retenu la solution de transformer par la chaleur le récepteur après cette étape d'affinité et de purifier la forme transformée sur DEAE ou DNA cellulose (117). Généralement, le rendement de cette dernière étape varie entre 80 et 90% avec un facteur de purification de 4 à 10 fois.

	H A P	D E Trisacryl	H P S E C
Rendement			
cpm déposés	204 700	204 700	59 520
cpm récupérés	59 600	112 600	49 960
Rendement moyen	30 - 35 %	50 - 70 %	80 - 90 %
Purification			
cpm/mg avant	$20,8 \cdot 10^6$	$20,8 \cdot 10^6$	$20,8 \cdot 10^6$
cpm/mg après	$50,5 \cdot 10^6$	$64,5 \cdot 10^6$	$121,7 \cdot 10^6$
Taux	2,4 fois	3,1 fois	5,9 fois

TABLEAU XI

Comparaison des protocoles mis au point pour compléter
la purification du récepteur des glucocorticoïdes

L'étude comparative que nous avons menée, nous a amenés à choisir une technique récente qui se révèle très efficace. L'utilisation des échangeurs d'ions et notamment du DEAE Trisacryl s'est montrée très pratique pour concentrer l'éluat de chromatographie d'affinité. Une petite colonne de DEAE Trisacryl est chargée à débit élevé avec l'éluat dilué au 1/5. Un lavage abondant, à faible force ionique, permet d'éliminer la majeure partie de l'excès considérable de stéroïde libre. Le récepteur est alors élué par un faible volume de tampon phosphate 0,16 M. Dans ces conditions, l'éluat est concentré d'un facteur deux avec un rendement supérieur à 90%.

Il ressort de ces résultats que les techniques nouvelles telles que la chromatographie d'exclusion haute performance sont très prometteuses. En effet, l'application de l'HPLC à la séparation des protéines amène une rapidité et une efficacité remarquables par rapport aux techniques conventionnelles.

V - PROTOCOLE DE PURIFICATION

A) RESULTATS

Le protocole définitif comporte les étapes suivantes :

- précipitation par le sulfate de protamine du récepteur libre cytosolique.
- chromatographie d'affinité sur gel N-(12-dodécylamino)9 α -fluoro-16 α -méthyl-11 β ,17 α -dihydroxy-3 oxo-1,4-androstadiène-17 β carboxamide Sepharose, de l'extrait sulfate de protamine.
- concentration sur DEAE Trisacryl de l'éluat de chromatographie d'affinité.
- chromatographie d'exclusion haute performance sur colonne TSK 3000.

Le tableau XII rend compte des résultats d'une expérience de purification. Au terme de la purification, le récepteur est purifié 8600 fois environ avec un rendement global de 15 %. L'homogénéité de la préparation est estimée à 64% compte tenu d'un poids moléculaire de la

	RESULTATS PERSONNELS	IDZIOREK (189)	FAILLA (120)	WEISZ (121)	GRANDICS (125)	GOVINDAN		
						1978 (94)	1980 (132)	1984 (117)
Volume cytosol	220 ml	450 ml	4,5 ml	30 ml	20 ml	3 000 ml	500 ml	250 ml
Protéines	3 250 mg	15 750 mg	15 750 mg	29 mg	520 mg	82 500 mg	12 500 mg	4 025 mg
Taux	8 650 x	11 800 x	1 726 x	5 143 x	4 300 x	11 980 x	10 548 x	7 800 x
Rendement	15,1 %	18,8 %	37 %	46 %	33 %	46 %	68 %	63 %
Act. Spécifique $\times 10^{-6}$ dpm mg	240	212	16,4	98	355			
% pureté calculé pour MW 235 000	64 %	57 %	4 %	26 %	96 %		100 %	62 %
						Récepteur transformé		

TABLEAU XII

**Résultats comparés des divers protocoles de purification
du récepteur des glucocorticoïdes sous forme non transformée**

(pour mémoire les résultats de GOVINDAN et al. ont été ajoutés).



forme non transformée égal à 235000 avec 1 site de liaison par molécule.

Ces valeurs sont calculées à partir de deux mesures expérimentales qui sont la liaison spécifique de la ^3H dexaméthasone d'une part, et la concentration en protéines d'autre part.

1) Mesure de la liaison spécifique de la ^3H dexaméthasone.

La concentration initiale en récepteur est déterminée par incubation d'une fraction aliquote de cytosol et/ou d'extrait sulfate de protamine en présence d'une concentration saturante (10 fois le K_D) en ^3H dexaméthasone.

Après chromatographie d'affinité, la radioactivité liée spécifique est mesurée par la technique à l'hydroxyapatite sur un volume d'éluat, dilué et surchargé en sérum albumine, suffisant pour obtenir un résultat significatif lors du comptage (soit au minimum 2000 cpm). La validité de cette méthode a été examinée en effectuant sur le même échantillon un dosage par hydroxyapatite, une mesure par dessalage sur Ultrogel GF 05 et un contrôle par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE Trisacryl. La liaison non spécifique est appréciée en surchargeant un aliquote de solution éluante avec de la sérum albumine. Les résultats comparatifs (Tableau XIII) montrent que la méthode à l'hydroxyapatite est précise. Nous avons renoncé à la méthode au charbon dextran qui aboutit à des résultats erronés dans le cas de préparations purifiées. Cette sensibilité du récepteur purifié vis à vis du charbon a été rapportée dans le cas du récepteur à progestérone par SCHRADER (205). IDZIOREK (136) arrive à une conclusion identique au terme d'une étude comparative des diverses méthodes de dosage de l'activité de liaison du récepteur purifié.

Après l'étape de gel filtration en HPLC, la radioactivité liée est mesurée par comptage d'un aliquote de chaque fraction collectée et de l'ensemble des fractions regroupées.

2) Dosage des protéines.

La mesure précise de faibles quantités de protéines est

Essai n°	Mesure au Charbon dextran	Mesure par dessalage sur Trisacryl GF 05	Mesure par technique à l'hydroxylapatite	Mesure du pic retenu en DEAE
1	775,5	1179,8	1191	1108
2	857	1307	1287,4	1321,3

TABLEAU XIII

Comparaison des diverses méthodes de mesure de la radioactivité liée
sur des préparations purifiées de récepteur

Les résultats sont exprimés en $\text{cpm} \cdot 10^{-3}$ par ml d'éluat. Les mesures ont été réalisées sur le même échantillon en présence de 2 mg/ml de sérum albumine. Les protocoles sont décrits dans la partie "Matériel et Méthodes".

délicate particulièrement dans le cas où le volume d'échantillon est limité. Nous avons choisi d'utiliser la technique au bleu de Coomassie avec un réactif modifié proposé par MACART et GERBAUT (206). La différence de sensibilité des diverses protéines pose un problème (136) qui se retrouve également avec la technique classique de LOWRY. Selon TAL et al. (207), cette différence est due à une fixation plus importante du colorant sur les protéines basiques et à l'opposé, à une faible réactivité des protéines très acides. Dans le cas des protéines de pH_i moyen (sérum albumine, ovalbumine, aldolase, hémoglobine...) l'écart dû à une différence de réactivité, est beaucoup plus faible. Le facteur varie entre 0,8 et 1,5. Le récepteur, de par son comportement en échange d'ions et son pH_i de 5,3 se situe donc à priori parmi les protéines qui sont susceptibles de réagir de manière normale vis à vis du réactif colorant.

Le choix de cette technique a été dicté premièrement par sa grande sensibilité qui rend possible la détection de quantités de protéines très faibles, de l'ordre de 5 μ g par ml pour une prise d'essai de 0,05 ml d'échantillon. Deuxièmement, l'adaptation à un appareillage automatique très performant permet d'obtenir rapidement et de façon reproductible des résultats précis.

B) DISCUSSION

Le tableau comparatif des différentes purifications de récepteur sous forme non transformée par chromatographie d'affinité (tableau XIII) permet de situer nos résultats par rapport aux autres groupes. Ainsi que nous l'avons déjà noté à propos de l'étape de chromatographie d'affinité, le rendement de la purification est plus faible. Sur le plan de l'homogénéité de la préparation purifiée, nos résultats semblent comparables. Il convient cependant de rester prudent dans cette dernière comparaison car ces résultats dépendent d'un dosage de microquantités de protéines particulièrement dans le cas où la purification est réalisée à partir de faibles quantités de matériel biologique. Réexaminées par rapport aux résultats de caractérisation et d'électrophorèse, les valeurs rapportées sont cohérentes et concernent effectivement une protéine qui est le récepteur des glucocorticoïdes. Les résultats des différentes purifications du groupe de GOVINDAN sont

difficilement comparables à ce stade, car il s'agit de récepteur sous forme transformée, purifié par DNA cellulose après l'étape de chromatographie d'affinité. Cependant, plusieurs remarques peuvent être faites :

- pour les deux premières purifications, l'utilisation d'un gel à bras clivable impose l'absence de composés réducteurs des ponts disulfure, tels que le β mercaptoéthanol ou le dithiothréitol. Le récepteur se trouve alors dans un milieu où il est peu stable et dans des conditions qui ne favorisent pas l'état conformationnel apte à lier l'hormone (cf chapitre I § II, A et B). Le passage sur la colonne d'affinité qui nécessite plusieurs heures en raison de l'importance des volumes du cytosol, s'accompagne certainement d'une inactivation non négligeable. Cet aspect n'a jamais été évoqué par les auteurs.
- la purification rapportée en 1980 (132) se termine par un comptage de 0,4 ml d'éluat de chromatographie d'affinité, ce qui correspond à 80 cpm au maximum. Dans ces conditions, le rendement de 90% pour cette étape et le taux de purification de 10000 fois peuvent apparaître discutables. Dans cette même publication, la synthèse du gel dans le texte ne correspond pas au schéma réactionnel proposé. Si elle est réalisée selon la description technique, le mésylate de dexaméthasone mis en oeuvre pour le couplage, réagit également avec les groupements hydroxyles de l'agarose, conduisant à un gel d'affinité hétérogène. Le même groupe publie en 1981 un protocole identique (133) où le récepteur purifié, présent dans l'éluat de volume total de 15 ml, représente 50 dpm au total avec une concentration en protéines en 4 μ g/ml qui sont dosées par la méthode de Lowry.
- la purification rapportée en 1984 (117) apparaît moins discutable. Cependant, une question mérite d'être posée : pour quelles raisons changer de gel d'affinité alors que d'après les travaux précédents, les gels d'affinité à bras clivable étaient très performants ? La technique proposée est identique au protocole que nous avons publié en 1981 à la seule différence que le degré de substitution du gel est important, 5 μ M de stéroïde/ml de gel, ce qui nécessite de diluer le gel avec du Sépharose. Avec un protocole identique à celui que nous avons proposé (pour les deux premières étapes), GOVINDAN et GRONEMEYER obtiennent pour cette

dernière purification des rendements très supérieurs de l'ordre de 60%.

Afin d'établir sans ambiguïté la réalité de la purification du récepteur des glucocorticoïde sous forme non transformée, nous avons entrepris la caractérisation physicochimique et fonctionnelle de la protéine purifiée.

CHAPITRE 3

CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE ET FONCTIONNELLE DU RECEPTEUR PURIFIE

Les résultats partiels concernant le récepteur du foie de rat ont fait l'objet d'une publication. Cette étude a été complétée par IDZIOREK (136) et ne sera pas détaillée dans ce chapitre. Le récepteur purifié du foie de lapin a également été caractérisé du point de vue physicochimique, et fonctionnel par l'étude de la transformation.

I - CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE

Nous nous sommes attachés à réaliser cette étude selon des protocoles expérimentaux identiques à ceux mis en oeuvre pour la caractérisation du récepteur cytosolique (193).

A) PARAMETRES MOLECULAIRES

1) Chromatographie de gel filtration.

Les rayons de Stokes ont été déterminés par gel filtration classique sur colonne d'Ultrogel AcA 34 et par chromatographie d'exclusion haute performance (HPSEC) sur colonne TSK 3000. Dans les deux cas, le tampon d'éluion présente une force ionique élevée (phosphate 0,16 M ou Tris 0,02 M, KCl 0,4 M) et renferme du molybdate. Les résultats obtenus montrent (figure 23) un pic de radioactivité liée, symétrique et unique. Les courbes de calibration établies à partir de la corrélation linéaire $K_D^{1/3}$ en fonction de R_S (208) permettent de déterminer le rayon de Stokes du récepteur :

- . Ultrogel AcA 34 $R_S = 6,1 \text{ nm}$
- . TSK 3000 $R_S = 6,3 \text{ nm}$

2) Constante de sédimentation.

L'étude en ultracentrifugation sur gradient linéaire de saccharose (5-20%) a été réalisée dans un milieu tampon identique. Le profil obtenu (figure 24) permet d'évaluer le coefficient de sédimentation du récepteur purifié : $9,0 \text{ S} \pm 0,2$ (n = 4).

3) A partir de ces deux valeurs, il est possible de calculer le

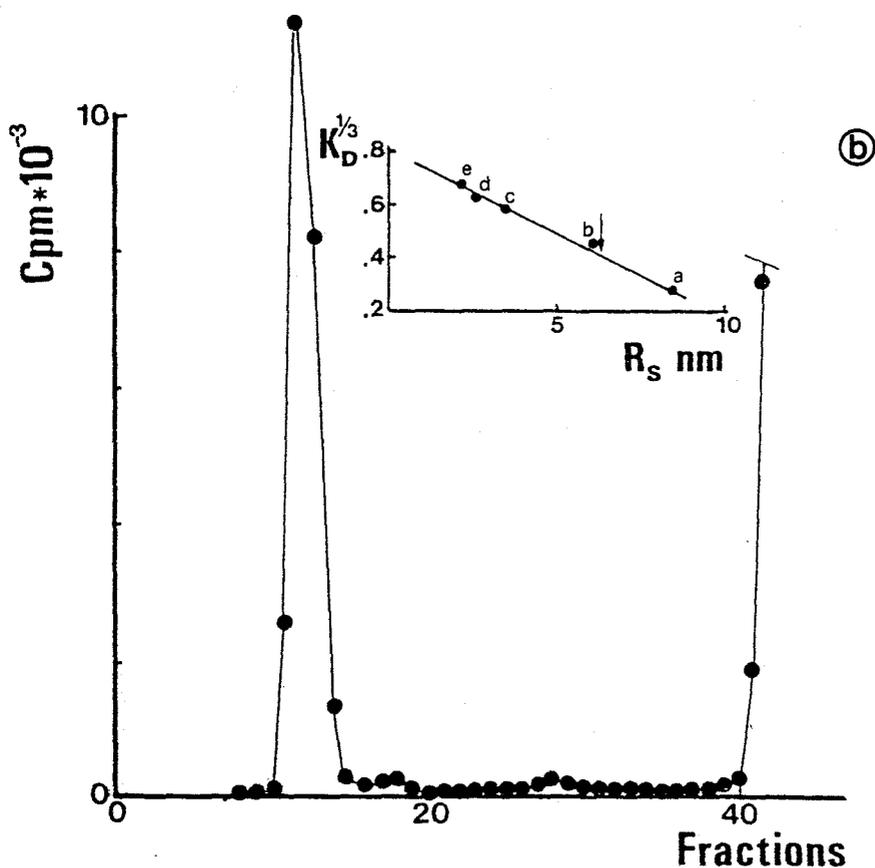
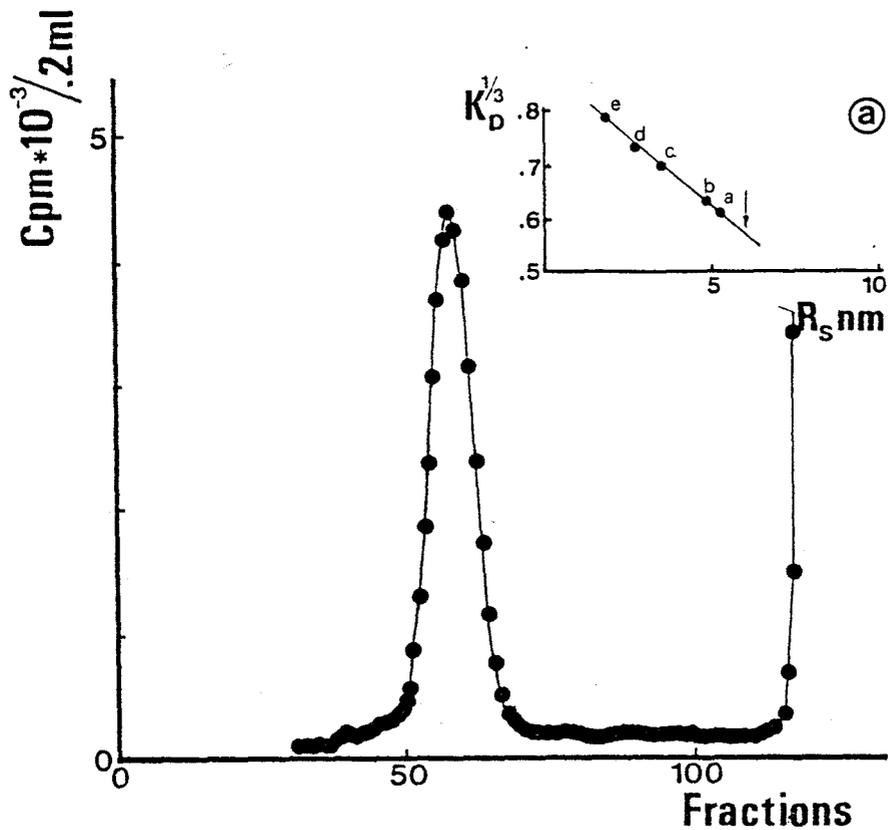


FIGURE 23

Récepteur purifié : mesure du rayon de Stokes

Ⓐ Gel filtration sur AcA 34. 0,5 ml d'éluat purifié sont déposés sur une colonne d'AcA 34 et élués en tampon P 160 (cf Matériels et Méthodes). Des fractions de 1,43 ml sont recueillies et 0,2 ml prélevés pour le comptage de la radioactivité. Les protéines marqueurs sont : a, catalase ; b, aldolase ; c, albumine ; d, ovalbumine et e, chymotrypsinogène A.

Ⓑ Chromatographie d'exclusion sur TSK 3000. Après élimination de l'excès de ³H dexaméthasone libre par chromatographie sur DEAE, un aliquote de 0,2 ml est déposé sur une colonne TSK 3000 et élué en tampon T 20 + 0,4 M KCl (cf Matériel et Méthodes). Des fractions de 1 ml sont recueillies et comptées. Les protéines de référence sont : a, thyroglobuline ; b, ferritine ; c, albumine ; d, ovalbumine et e, inhibiteur trypsique du Soja.

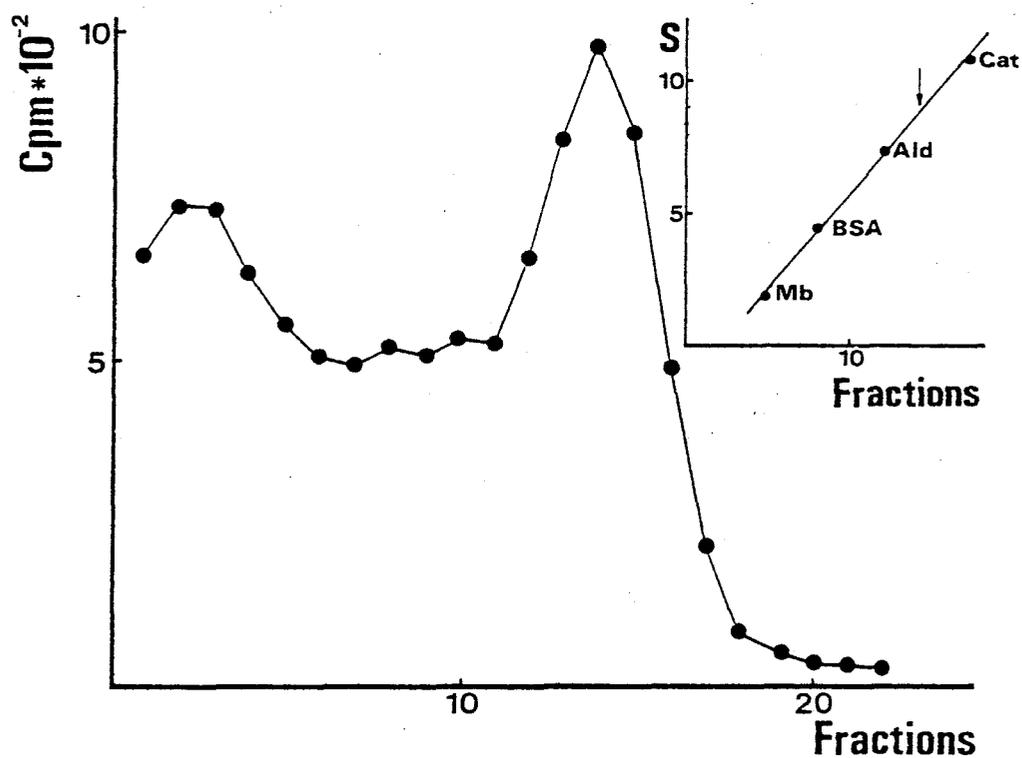


FIGURE 24

Ultracentrifugation en gradient de saccharose du récepteur purifié

0,2 ml d'éluat purifié, débarrassé de l'excès de ^3H dexaméthasone par chromatographie sur DEAE trisacryl, sont déposés sur un gradient 5-20% de saccharose en tampon P 160. Après 24 h à 280 000 g, le gradient est fractionné (7 gouttes/fraction) et les fractions sont comptées. Les protéines de référence sont : Mb, myoglobine ; BSA, albumine ; Ald, aldolase et Cat, catalase.

poids moléculaire apparent en appliquant la relation établie par SIEGEL et MONTY (209) :

$$M = 6 \Pi \eta \quad N.R_S.S/(1 - v\rho)$$

SHERMAN (12) propose une équation simplifiée :

$$M = 4224.R_S.S \quad \text{avec } S \text{ en svedberg}$$

R_S en nm

qui est utilisée par tous les groupes qui s'intéressent au récepteur des stéroïdes. Le poids moléculaire apparent du récepteur purifié est de 232000-240000. Une valeur identique a été rapportée pour le récepteur cytosolique de foie de lapin. Des valeurs plus élevées, 320000 à 350000 (12) et 303000 (125) ou 250000 (189) ont été rapportées respectivement pour le récepteur cytosolique et après purification dans le cas du foie de rat. D'autres auteurs ont retrouvé des résultats différents variant entre 220000 et 235000, selon le tissu étudié (210). Il existe donc une variabilité importante. Pour les résultats que nous obtenons, c'est essentiellement la valeur du R_S qui apparaît plus faible. Cette différence peut s'expliquer par l'emploi de conditions d'analyse différentes ou par un caractère particulier du récepteur du foie de lapin.

B) PARAMETRES IONIQUES

1) Chromatographie d'échange d'ions.

Nous avons étudié le comportement du récepteur purifié vis à vis de trois échangeurs d'ions :

- . DEAE Trisacryl
- . hydroxyapatite
- . phosphoultrogel

Les profils d'élution sont représentés sur la figure 25. Il n'y a pas de rétention sur le support polyanionique, phospho ultrogel, la radioactivité liée est exclue. Par contre, le récepteur est retenu sur DEAE Trisacryl et sur hydroxyapatite. L'élution est obtenue dans les deux cas par un gradient phosphate pour une concentration de 0,125 M. Ce pic de radioactivité spécifique est aboli si l'échantillon est traité

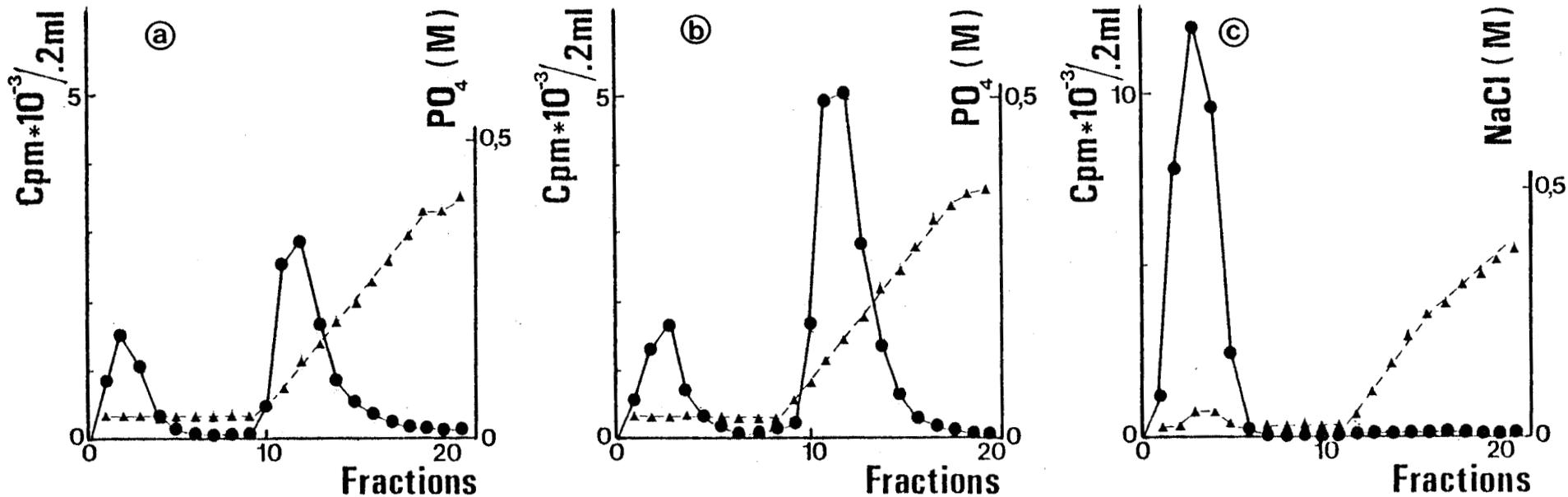


FIGURE 25

Chromatographies d'échange d'ions du récepteur purifié

a) hydroxyapatite (HA) ; b) DEAE trisacryl (DE) ; c) phosphoultrogel (PU).

Des fractions aliquotes diluées au 1/10 (3 ml) de préparation purifiée de récepteur des glucocorticoïdes sont déposées sur des colonnes de 1,5 ml de chacun des gels. L'élution est poursuivie à un débit de 0,6 ml/mn.

Après un lavage avec 10 ml de tampon P20 (HA et DE) ou 10 ml de tampon T20 (PU), l'élution est obtenue en gradient linéaire (20 ml de volume total), soit 0,02 M - 0,4 M phosphate (HA et DE), soit 0 - 0,4 M NaCl (PU).

Des fractions de 1,2 ml sont collectées. Le comptage radioactif et la concentration en sel mesurée par photométrie de flamme sont réalisés sur un aliquote de chaque fraction.

par chauffage (50°C durant 30 minutes) avant chromatographie.

L'analyse du récepteur cytosolique dans des conditions identiques conduit à des profils d'élution semblables, à la différence de la molarité d'élution qui est supérieure, 0,16 M au lieu de 0,125 M phosphate.

2) Isoélectrofocalisation.

L'analyse par isoélectrofocalisation n'est possible que pour des échantillons renfermant peu de sels. En effet, une force ionique élevée perturbe la migration des protéines. Le complexe purifié récepteur- ^3H dexaméthasone est donc dialysé et concentré dans un système sous vide en réduisant au maximum la surface d'échange pour éviter une adsorption de la protéine sur la membrane de cellophane. Cette technique permet d'abaisser rapidement (2 heures) la force ionique. La concentration simultanée du récepteur compense les pertes qui sont de l'ordre de 20 à 30%.

L'isoélectrofocalisation est réalisée en gel d'agarose avec un gradient d'ampholines de pH 3 à pH 10. La figure 26 montre la répartition de la radioactivité dans le gel entre les deux électrodes et le gradient de pH. Le complexe hormone-récepteur est focalisé sous forme d'un pic unique qui permet d'établir la valeur du pH_i égale à $6,1 \pm 0,1$ ($n=4$). La coloration au bleu de Coomassie est négative, ce qui n'apparaît pas anormal compte tenu du faible volume de l'échantillon (10-20 μl). L'analyse du récepteur cytosolique donne un résultat différent, la valeur de pH_i obtenue est de 5,3 (figure 26a). Cette étude a été approfondie en mélangeant avant le dépôt, le récepteur purifié avec du cytosol inactivé par la chaleur. Dans ces conditions, il apparaît un déplacement vers l'anode, de 0,4 unités pH, du pic radioactif (figure 26c).

3) Les caractères ioniques du récepteur montrent qu'il s'agit d'une protéine légèrement acide. Des résultats identiques ont été rapportés pour le récepteur purifié du foie de rat. Le pH_i mesuré en isoélectrofocalisation en agarose est de 5,1 (189). Il est retenu sur DEAE, mais les molarités d'élution sont supérieures, 0,24 M NaCl pour GRANDICS et al. (125) et 0,23 M pour IDZIOREK et al. (189). Cependant,

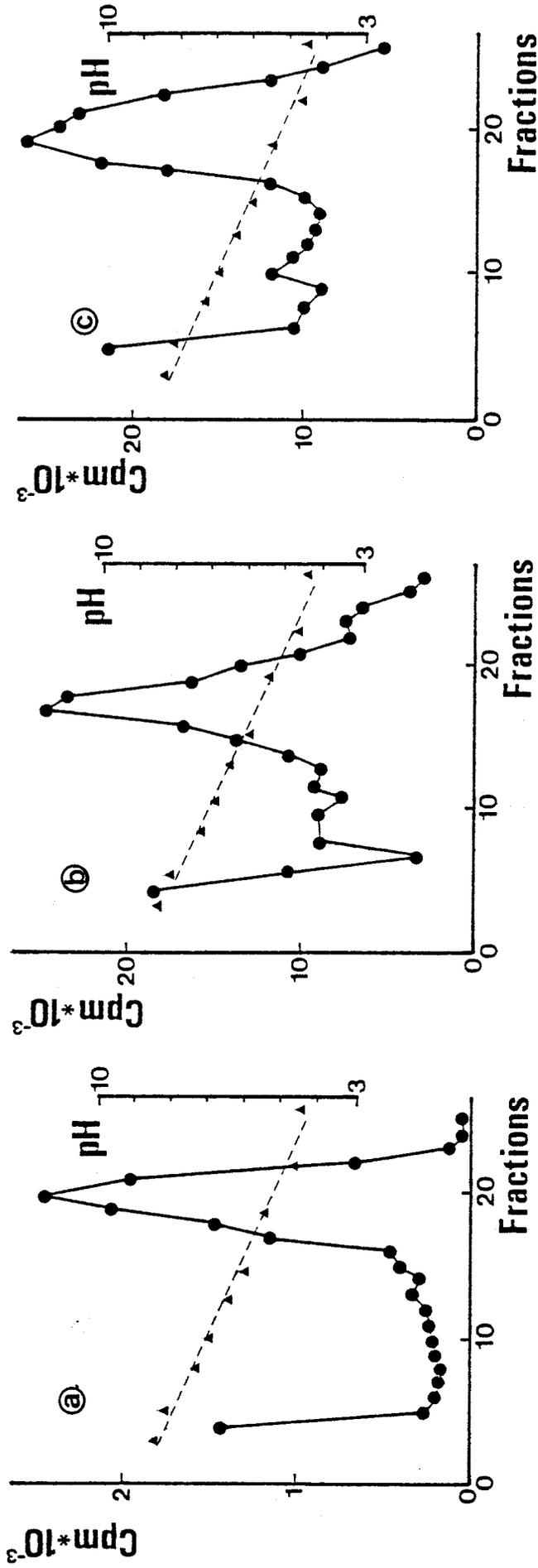


FIGURE 26

Isoélectrofocalisation du récepteur des glucocorticoïdes

a) récepteur cytosolique ; b) récepteur purifié ; c) récepteur purifié réincubé en présence de cytosol inactivé.

La séparation est réalisée sur des plaques d'agarose à 1% renfermant 0,6% d'ampholines (pH 3-10). Chaque échantillon est analysé en triplicate. Après la focalisation, la bande de gel correspondant à trois dépôts contigus est coupée en fractions de 2 mm qui sont analysées par comptage. Les bandes renfermant les protéines marqueurs sont colorées au bleu de coomasie.

il faut tenir compte du fait que les supports chromatographiques utilisés sont différents.

L'analyse des propriétés ioniques du récepteur purifié montre une diminution du caractère acide mise en évidence à la fois par le comportement vis à vis des échangeurs cationiques et par l'isoélectrofo-calisation. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce résultat :

- la possibilité de la transformation au cours de la purification ou pendant la caractérisation peut être évoquée. En effet, le récepteur sous forme transformée acquiert une affinité vis à vis des polyanions et est moins retenu sur DEAE, d'autre part son pH_i augmente (50). A l'encontre de cette hypothèse, il convient de rapporter deux éléments : d'une part, tout au long de la purification et au cours de la caractérisation, tous les tampons renferment du molybdate à une concentration suffisante (0,01 M) pour inhiber totalement la transformation. D'autre part, l'analyse des paramètres hydrodynamiques, après chromatographie sur DEAE Trisacryl du récepteur purifié, a abouti aux mêmes résultats que ceux cités précédemment ($R_s = 6,3$ nm et 9 S) qui sont en accord avec les caractères du récepteur non transformé. Enfin, avant ou après chromatographie sur DEAE, le récepteur purifié en présence de molybdate n'est pas retenu sur phospho ultrogel et n'interagit pas avec des noyaux isolés. Cependant, si l'hypothèse d'une transformation peut être écartée, une modification plus discrète, telle qu'une déphosphorylation ne peut être exclue. En effet, une telle altération sera surtout perceptible au niveau des paramètres ioniques, sans retentissement sur les caractères hydrodynamiques.
- une dégradation par protéolyse peut également être évoquée. Ceci peut s'envisager, si cette coupure n'affecte qu'un petit fragment du récepteur qui ne modifie pas les paramètres moléculaires. D'autre part, la réincubation en présence de cytosol inactivé ne doit pas modifier la valeur du pH_i si un phénomène protéolytique est en cause.
- il semble plus plausible de suggérer l'existence d'interactions du récepteur avec un (ou des) facteur(s) cytosolique(s) qui modifie(nt) ainsi la charge globale du complexe hormone-récepteur. Cette dernière hypothèse est compatible avec les résultats

d'isoélectrofocalisation en présence ou en l'absence du cytosol inactivé. Un tel comportement a été décrit à propos de certaines protéines purifiées, notamment l' α_2 -macroglobuline (211). La confirmation de cette dernière hypothèse ou d'une autre explication demande un travail complémentaire qui mérite d'être envisagé.

C) PARAMETRES DE LIAISON

L'étude complète des paramètres de liaison, cinétiques et à l'équilibre, nécessite des préparations de récepteur sous forme libre. De par son principe, la chromatographie d'affinité permet de purifier le complexe hormone-récepteur. Il est donc nécessaire d'éliminer le stéroïde lié au récepteur. Deux auteurs rapportent des résultats concernant des procédures permettant de se débarrasser de l'hormone liée au récepteur purifié, par traitement au charbon-dextran, (59, 134). En l'absence de détails techniques, nous n'avons pas étudié de façon systématique cette possibilité. La dissociation rapide du complexe hormone-récepteur cytosolique a également été obtenue en présence des réactifs des thiols, tels que le p.hydroxymercuribenzoate ou le p.chloromercuriphénylsulfonate, PCMPS (212, 213). Ces composés induisent une dissociation du complexe hormone-récepteur purifié, mais accompagnée d'une inactivation irréversible du récepteur. Il apparaît pourtant nécessaire de disposer d'un protocole efficace permettant d'obtenir le récepteur purifié sous forme libre. Aussi, cette mise au point est-elle envisagée pour l'avenir.

Dans l'immédiat, nous avons limité notre étude des paramètres de liaison à la cinétique de dissociation et à la spécificité.

1) Cinétique de dissociation.

La vitesse de dissociation est mesurée par dilution isotopique à 0° et 20°C. La figure 27 permet de noter que les cinétiques sont d'ordre 1. Les constantes de vitesse sont respectivement $6,3 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ et $7,8 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ à 0° et 20°C.

La stabilité du complexe hormone-récepteur dans les mêmes

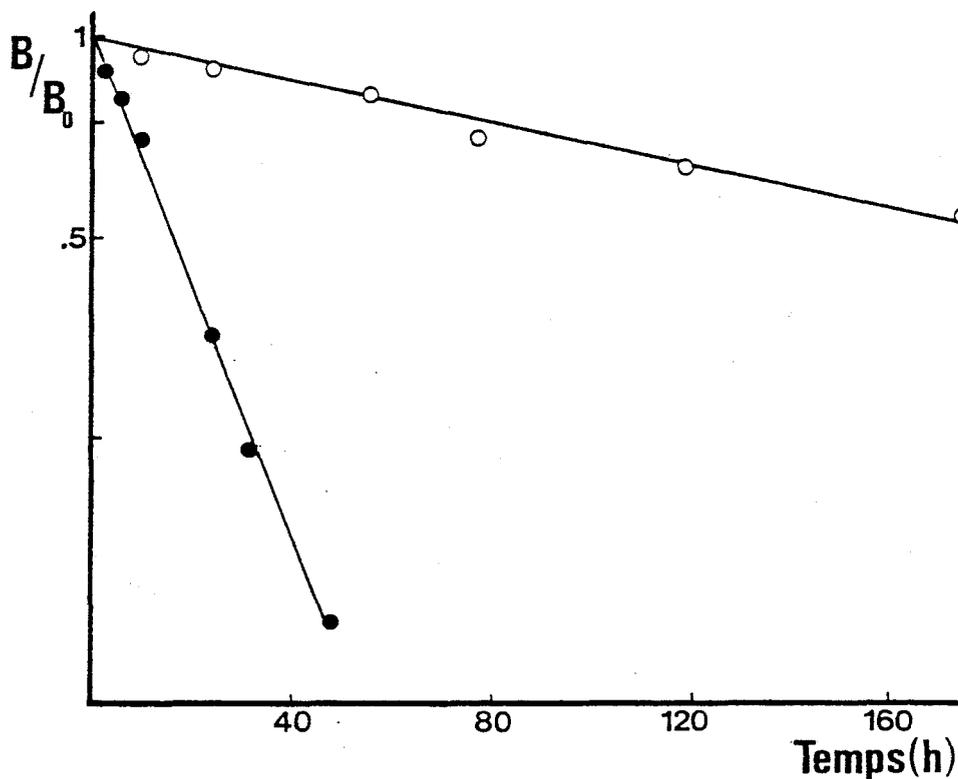


FIGURE 27

Cinétique de dissociation du complexe hormone-récepteur des glucocorticoïdes purifié

Après élimination de l'excès de stéroïde libre par chromatographie sur DEAE, la dissociation est provoquée par addition de $5 \cdot 10^{-6}$ M dexaméthasone. Un témoin maintenu dans les mêmes conditions sans surcharge en stéroïde, permet de mesurer la liaison totale B_0 . A intervalles de temps réguliers, la liaison résiduelle spécifique B est également mesurée en double par la technique de l'hydroxyapatite.

La cinétique a été étudiée à 0-4°C (○) et 20°C (●). L'estimation de la constante de vitesse est faite à partir du graphe semilogarithmique du rapport B/B_0 en fonction du temps. La liaison initiale au temps zéro est environ 1000 cpm/0,1 ml.

conditions de température a été mesurée. A 0°, la demi-vie est de 200 heures, à 20° elle n'est que de 20 heures.

2) Spécificité de la liaison.

En raison de la dissociation très lente du complexe hormone-récepteur à 0°, nous avons choisi de réaliser les expériences d'échange à 20°C. L'excès de stéroïde libre éluant est éliminé par chromatographie sur DEAE Trisacryl (cf § I, B). Le complexe ^3H dexaméthasone-récepteur purifié est alors incubé à 20°C en présence d'une concentration fixe de ^3H dexaméthasone et de concentrations croissantes en stéroïdes compétiteurs. Après 15 heures d'incubation, la radioactivité spécifiquement liée mesurée est fonction du déplacement et de la compétition entre les deux ligands pour la réassociation. La figure 28 regroupe les différentes courbes de compétition. Les stéroïdes synthétiques fluorés, dexaméthasone, bétaméthasone et acétonide de triamcinolone présentent une affinité comparable, importante. Les hormones naturelles, cortisol et corticostérone, compétitionnent à un degré moindre, d'un facteur 10 environ. Parmi les autres hormones stéroïdes, seuls les composés présentant une analogie structurale tels que la progestérone et l'aldostérone, provoquent un déplacement de la liaison du ligand de référence. A l'opposé, l'estradiol et la testostérone ne montrent aucun caractère compétiteur.

3) Les caractéristiques de la liaison à l'hormone ne sont pas modifiées après purification, tout au moins en ce qui concerne la vitesse de dissociation. La spécificité de la liaison apparaît identique avant ou après purification quant au classement des stéroïdes selon leur affinité. Il convient de noter que l'affinité apparente des glucocorticostéroïdes naturels vis à vis du récepteur purifié est supérieure aux valeurs obtenues en présence de récepteur cytosolique. Ceci confirme l'existence d'un métabolisme important de ces composés dans le cytosol qui fausse les expériences de compétition en diminuant de façon artefactuelle les constantes d'affinité apparentes (193).

D) ANALYSE ELECTROPHORETIQUE

L'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en

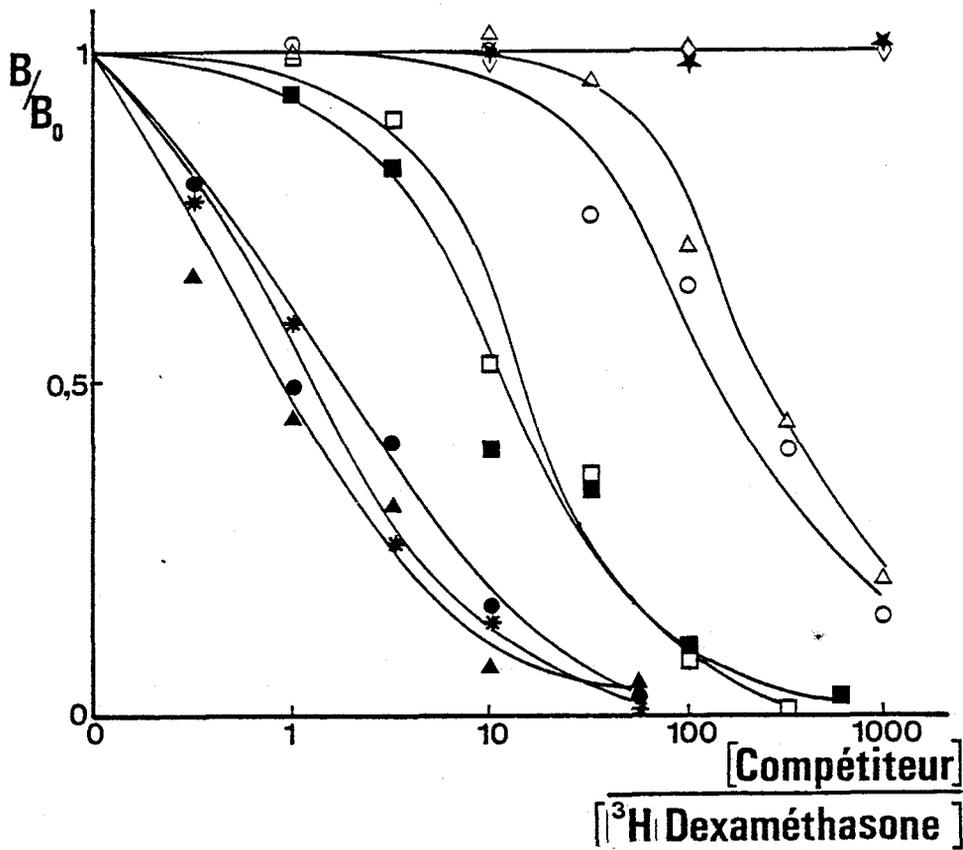


FIGURE 28

Spécificité de la liaison au récepteur purifié

Après élimination de l'excès de $[^3\text{H}]$ dexaméthasone libre par chromatographie sur DEAE trisacryl, des fractions aliquotes (0,5 ml) sont incubées à 20°C en présence de 10^{-8} M $[^3\text{H}]$ dexaméthasone et de concentrations croissantes de compétiteurs ($3 \cdot 10^{-9}$ - 10^{-5} M). La liaison spécifique résiduelle B est mesurée après 16 h d'incubation.

Ordonnée : rapport de la liaison résiduelle en présence de compétiteur (B) à la liaison en l'absence de compétiteur (B_0). La liaison spécifique maximale est de l'ordre de 3000 cpm/0,1 ml.

Abscisse : rapport des concentrations.

Compétiteurs : \blacktriangle acétonide de triamcinolone ; \bullet dexaméthasone ; \ast betaméthasone ; \blacksquare cortisol ; \square corticostérone ; \circ progestérone ; \triangle aldostérone ; \star 17 β estradiol et \diamond 5 α -dihydrotestostérone.

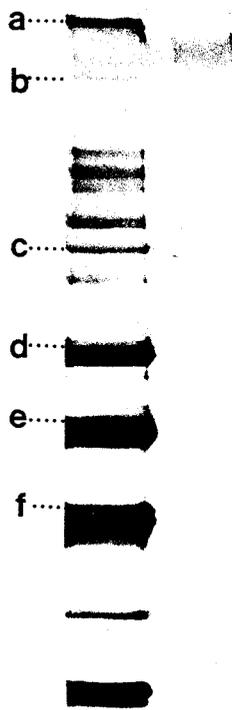
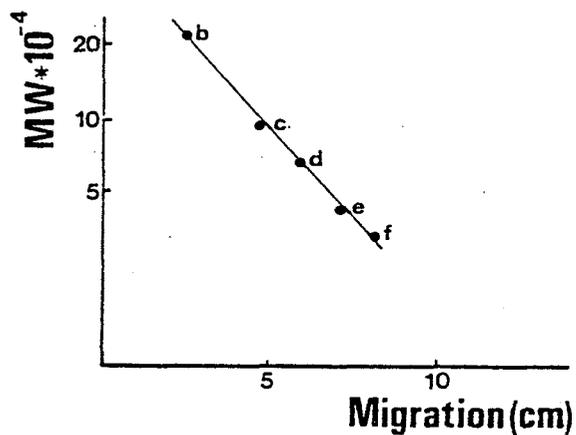


FIGURE 29

Electrophorèse PAGE/SDS du récepteur purifié

0,5 ml d'échantillon purifié sont traités et déposés sur un gel d'acrylamide 5-20%. Les protéines standards sont : **a**) thyroglobulin (330 000) ; **b**) ferritin sous-unité (220 000) ; **c**) phosphorylase b (97 000) ; **d**) albumine (67 000) ; **e**) ovalbumine (43 000) et **f**) lactate deshydrogénase (36 000). Le graphe semi-logarithmique du poids moléculaire en fonction de la distance de migration permet de calculer le M_r du récepteur.

présence d'agents dénaturants a été réalisée sur le matériel purifié obtenu après chromatographie d'exclusion haute performance. Après coloration au nitrate d'argent, une bande majeure correspondant à un M_r de 94000 est visualisée. Deux bandes mineures de M_r 70000 et 50000 sont également présentes (figure 29).

Ce résultat est en accord avec ceux rapportés par différents groupes pour le récepteur purifié de foie de rat, 89000 (94), 90000 (112, 117) et 94000 (114). Ces valeurs correspondent à la forme monomérique du récepteur (12, 15, 18). La présence de bandes mineures peut être due soit à des contaminants, soit à une dégradation protéolytique, soit à une dissociation d'un complexe hétéromérique. L'hypothèse de la présence de protéines contaminantes sous forme de deux espèces majeures, ne peut pas être exclue, cependant il apparaît plus plausible que la répartition soit plus dispersée et concerne plus de deux protéines. Les études par dégradation protéolytique (cf chap. I §) du récepteur ont permis de mettre en évidence de nombreux fragments de poids moléculaire très variable entre 30000 et 70000. En l'absence d'inhibiteurs des protéases dans les tampons au cours de la purification, cette éventualité ne peut pas être écartée. La possibilité d'une dissociation d'un hétéromère apparaît beaucoup plus séduisante. La réalité de la structure hétéromérique semble acquise (cf chap. I §) et certains éléments constitutifs ont pu être mis en évidence : associés au récepteur monomérique, figurent une phosphoprotéine de 90000 qui comigre avec le récepteur en électrophorèse, un fragment de 72000 qui est copurifié avec le récepteur transformé et un RNA de M_r 24 à 36000. Le profil électrophorétique que nous avons obtenu pourrait correspondre à une fragmentation de ce type, la bande 94000 apparaît majeure en raison de la comigration de deux protéines.

La détermination de la structure exacte du récepteur non transformé purifié nécessite la poursuite de ce travail, notamment à l'aide de stéroïdes alkylants et également d'anticorps anti-récepteur. L'utilisation conjointe de ces deux approches devrait permettre d'identifier les protéines révélées au cours de l'électrophorèse.

II - TRANSFORMATION DU RECEPTEUR PURIFIE

Le molybdate présent dans le tampon au terme de la purification est éliminé par dessalage sur Trisacryl GF 05. Le tampon d'élution renferme 2 mg/ml de sérum albumine qui permet d'éviter une adsorption du récepteur sur le support (112, 125). La transformation a été étudiée d'un point de vue expérimental selon le protocole suivant.

Après exposition à la chaleur et à la force ionique, l'analyse par gel filtration et sur phospho ultrogel permet de mettre en évidence une forme moléculaire différente (figure 30). Sur échangeur anionique, une fraction de ^3H dexaméthasone liée est retenue et éluée à une concentration de 0,125 M NaCl. La mesure du rayon de Stokes par chromatographie d'exclusion haute performance montre une diminution du pic de $R_S = 6,3$ nm, et un second pic de radioactivité liée de $R_S = 3,5$ nm (figure 30). D'autre part, une fraction du récepteur acquiert la capacité d'interagir avec des noyaux isolés. Pour chaque critère, nous avons mesuré le taux de transformation exprimé en pourcentage du récepteur total (Tableau XIV). L'addition de 0,01 M molybdate prévient l'apparition de cette nouvelle forme. Les caractéristiques physicochimiques de cette dernière sont identiques à celles obtenues pour le récepteur cytosolique sous forme transformée (193).

Après l'étape de dessalage, une petite partie du récepteur se trouve déjà sous forme transformée, ce qui n'apparaît pas anormal en raison des conditions de force ionique (tampon phosphate 0,16 M). L'exposition à la chaleur en présence d'ions est nécessaire dans le cas du récepteur du foie de lapin, pour atteindre rapidement un taux de transformation important (193). Après purification, dans des conditions physicochimiques identiques du milieu ambiant, des taux de transformation similaires sont obtenus. La présence d'un ou de facteur(s) cytosolique(s) n'apparaît pas indispensable. Ce résultat rapporté également par IDZIOREK et al. (136) pour le récepteur purifié de foie de rat est en contradiction avec les conclusions de GRANDICS et al. (125). Ce dernier point mérite d'être discuté en fonction du schéma récemment proposé par SCHMIDT et al. (70) (chap. I § II) qui suggère un mécanisme de transformation en deux temps, dont le second fait intervenir un facteur cytosolique : la RNase. Les complexes hormone-récepteur partiellement et totalement transformés ne diffèrent

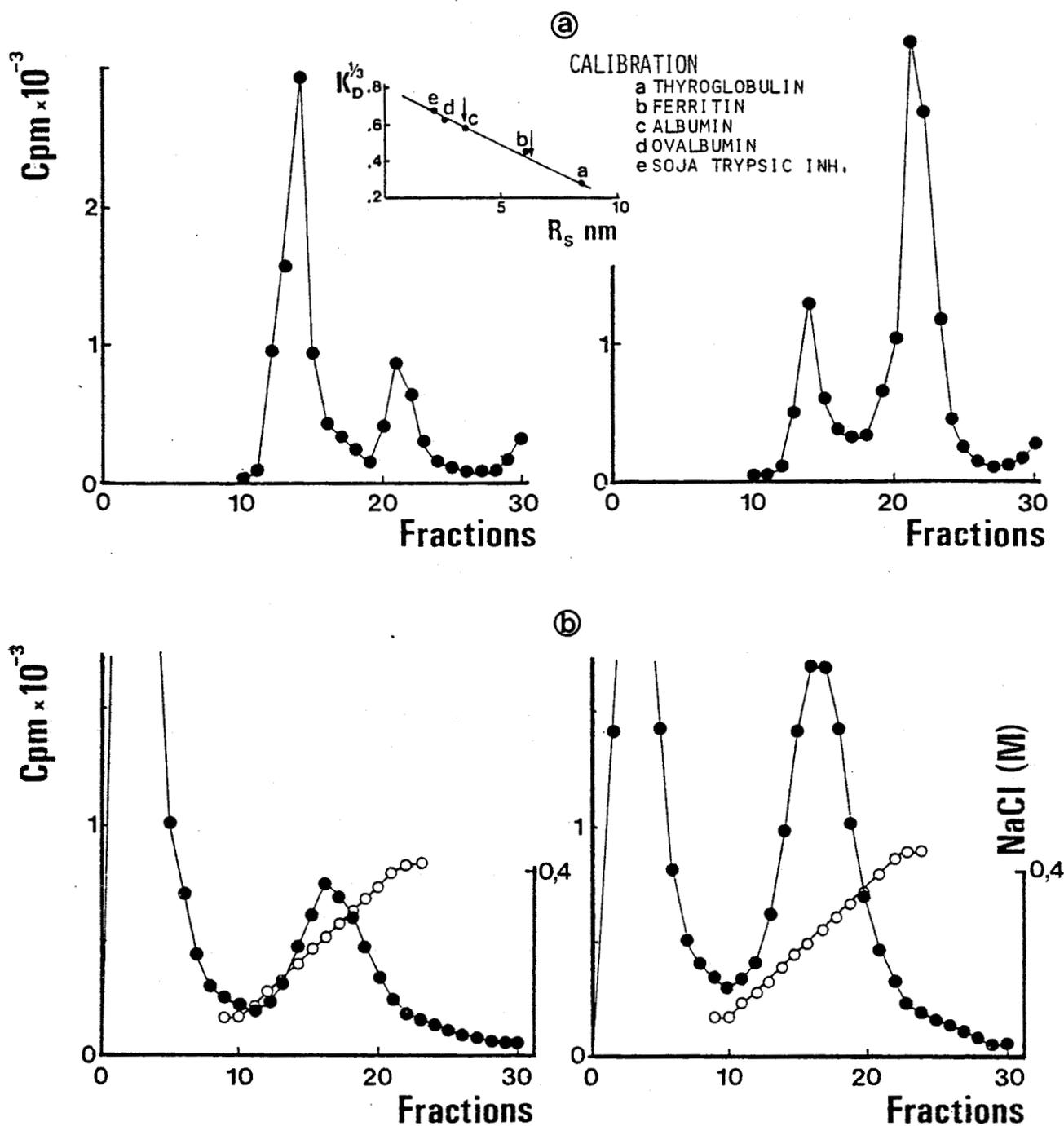


FIGURE 30

Caractérisation du récepteur purifié transformé en présence (partie gauche)
 et en l'absence de molybdate (partie droite)
 (a) Chromatographie d'exclusion sur TSK 3000
 (b) Chromatographie sur Phospho ultrogel

La préparation purifiée est dessalée sur Trisacryl GF 05 et divisée en deux fractions aliquotes. Une partie est additionnée de 0,01 M molybdate. Après addition de 0,4 M KCl, les tubes sont incubés 30 mn à 25°C. Après addition de 0,01 M molybdate, chaque aliquote est analysé en HPLC sur TSK 3000 et par échange d'ions sur phosphoultrogel dans les conditions décrites précédemment (cf figures 23 et 25).



T R A I T E M E N T	Liaison aux noyaux % (a)	Rétention sur phosphoultrogel % (b)	Forme moléculaire en HPSEC R _S = 3,5 nm R _S = 6,3nm (c)	
Récepteur purifié en présence de 0,01 M molybdate	0	0	0	100
Récepteur purifié traité en présence de 0,01 M molybdate + chauffage et force ionique (0,4 M KCl ; 25°C ; 30 min)	0	0	0	100
Récepteur purifié débarrassé du molybdate (dessalage) + chauffage et force ionique (0,4 M KCl ; 25°C ; 30 min) en présence 0,01 M molybdate	5-9	8-12	20	80
Récepteur purifié débarrassé du molybdate (dessalage) + chauffage et force ionique (0,4 M KCl ; 25°C ; 30 min) en l'absence de molybdate	35-45	18-30	40	60

TABLEAU XIV

Caractérisation du récepteur purifié au cours de la transformation.

Des fractions aliquotes de récepteur purifié sont traitées de manière différente et analysées selon les critères suivants : liaison aux noyaux, rétention sur échangeur polyanionique et mesure du rayon de Stokes (voir conditions figures 23, 25 et dans "Matériel et Méthodes").

- a - la liaison aux noyaux est exprimée en pourcentage des complexes liés aux noyaux par rapport au récepteur total (environ 3000 cpm).
- b - la rétention sur phosphoultrogel est exprimée en pourcentage par rapport aux complexes déposés sur la colonne (environ 10 000 cpm).
- c - pourcentage respectif des formes moléculaires caractérisées en HPSEC (10 000 cpm spécifiques sont analysés)

L'estimation de la liaison spécifique est réalisée par la technique de l'hydroxyapatite.

(les valeurs figurant dans le tableau représentent les valeurs extrêmes obtenues dans 3 expériences différentes).

que dans l'interaction avec le DNA, le comportement vis à vis des échangeurs d'ions est identique pour les deux formes. Dans les résultats que nous rapportons, il existe une divergence entre le taux de transformation mesuré par échange d'ions et par incorporation aux noyaux. En conséquence, l'hypothèse peut être envisagée que la forme que nous avons caractérisée correspond au récepteur transformé intermédiaire. La possibilité d'une dysactivation du récepteur transformé peut également être envisagée. Cette réaction aboutit à un état dysactivé, décrit par MILGROM (52), qui se caractérise par la perte de la capacité d'interagir avec les noyaux. Des expériences complémentaires sont indispensables pour répondre à ce point.

Enfin, il apparaît clairement que le molybdate inhibe le phénomène de transformation aussi bien pour le récepteur cytosolique (193) que pour le récepteur purifié (Tableau XIV). Ceci ne peut s'interpréter que dans l'hypothèse d'une interaction directe de l'oxyanion avec le récepteur, stabilisant une structure hétéromérique. Ce résultat confirme l'étude que nous avons faite à propos du mode d'action du molybdate. L'ensemble des données cinétiques nous avait amené à formuler l'hypothèse d'une interaction directe du molybdate au niveau du récepteur (46).

III - CONCLUSION

Le tableau XV résume les caractéristiques physicochimiques du récepteur cytosolique et après purification. Ces données sont concordantes avec les résultats obtenus par d'autres groupes pour le récepteur du foie de rat. La purification de la forme non transformée permet d'envisager l'étude plus détaillée de certaines étapes et de compléter la caractérisation sur les points qui sont apparus hypothétiques.

CYTOSOL

RECEPTEUR PURIFIE

PARAMETRES DE LIAISON (4°C)

$$K_D = 2,5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$$

$$k_{+1} = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$$

$$k_{-1} = 6,3 \cdot 10^{-5} \text{ min}^{-1}$$

STABILITE

$$t_{\frac{1}{2}} = 235 \text{ h}$$

$$t_{\frac{1}{2}} = 16 \text{ h}$$

0-4°C

20°C

$$t_{\frac{1}{2}} = 200 \text{ h}$$

$$t_{\frac{1}{2}} = 15 \text{ h}$$

SPECIFICITE

Dexaméthasone > triamcinolone acétonide > cortisol > corticostérone > progestérone > aldostérone

17 β estradiol, 5 α dihydrotestostérone = 0

PARAMETRES PHYSICOCHIMIQUES

Gel filtration

$$R_S = 6,3 \text{ nm}$$

AcA 34

$$R_S = 6,1 \text{ nm}$$

$$R_S = 6,2 \text{ nm}$$

TSK 3000

$$R_S = 6,3 \text{ nm}$$

9,0 S

Ultracentrifugation

9,0 S

$$M_r = 244 \text{ 000}$$

$$M_r = 240 \text{ 000}$$

pI = 5,3

Isofocalisation

pI = 5,9

(agarose)

Echange d'ions

(molarité d'élution)

0,16 M phosphate

DEAE

0,125 M phosphate

0,16 M phosphate

hydroxyapatite

0,125 M phosphate

TABLEAU XI

Comparaison des caractéristiques du récepteur cytosolique et après purification en présence de 0,01 M molybdate

CONCLUSION

L'ensemble des résultats que nous avons présenté dans ce travail, concerne la purification du récepteur des glucocorticoïdes. Ces données peuvent être regroupées et envisagées dans une optique différente qui nous servira de conclusion. Nous envisageons d'une part l'aspect méthodologique sur le plan critique et conceptuel, et d'autre part l'intégration des résultats obtenus, à propos du récepteur purifié, dans le schéma général d'organisation et de fonctionnement du récepteur des glucocorticoïdes.

I - PURIFICATION DU RECEPTEUR NON TRANSFORME

A) ETAT DE LA QUESTION FIN 1985

La revue bibliographique sur la purification (cf chapitre II) et les résultats décrits font apparaître une évolution selon trois tendances depuis 1978.

1) Le protocole décrit par FAILLA et al (120) utilisant un gel à désoxycorticostérone a été développé depuis la commercialisation du Sterogel. Il a abouti à des résultats satisfaisants et reproductibles qui ont permis des développements très novateurs dans l'étude de la transformation, de la phosphorylation et de la structure hétéromérique du récepteur (23, 33, 59, 90). D'autre part, ce gel, mais est-ce une qualité, peut servir à purifier le récepteur de la progestérone (203) et des minéralocorticoïdes (204).

2) Les gels à bras clivable chimiquement, ont été abandonnés, y compris par GOVINDAN qui en avait réalisé la mise au point, malgré des résultats publiés très encourageants. Deux raisons expliquent ce changement. D'une part, ce type de gel présente l'inconvénient majeur de n'être pas réutilisable. D'autre part, en l'absence de technique d'échange, l'hormone sous forme radioactive est immobilisée sur le gel mais la dilution isotopique obligatoirement utilisée est importante et pose le problème de la validité de la mesure de la radioactivité liée au terme de la purification.

3) La technique que nous avons mise au point a permis de purifier le récepteur des glucocorticoïdes chez deux espèces animales,

avec des résultats très proches. Ce succès est à mettre sur le compte du gel d'affinité synthétisé. D'autre part, les techniques chromatographiques nouvelles sous moyenne pression, adaptées aux protéines ont été introduites dans ce protocole. La chromatographie de gel perméation dans ces conditions, apparaît comme un progrès décisif, tant par son efficacité que par sa rapidité et sa reproductibilité.

Il convient de remarquer que la purification du récepteur sous la forme non transformée n'a été abordée que par deux groupes, GOVINDAN dans tous ses protocoles termine par une étape de transformation suivie d'une chromatographie d'échange d'ions.

Parallèlement, la purification de la forme transformée a été réalisée par de nombreuses équipes, selon un protocole qui n'a pas changé fondamentalement depuis sa mise au point par WRANGE et al (112).

Ainsi, ce qui apparaissait encore comme un projet en 1978 pour tous les groupes s'intéressant aux récepteurs des glucocorticoïdes, est devenu pratiquement une technique de routine aujourd'hui.

B) APPORTS DU PROTOCOLE MIS AU POINT.

Plusieurs aspects peuvent être envisagés pour exposer les conclusions de cette mise au point d'un gel d'affinité et les applications.

1) Les résultats que nous avons obtenus, nous incitent à penser que la mise au point d'un gel d'affinité peut être entreprise favorablement à partir d'expériences réalisées avec des ligands modifiés (analogues ligand - bras espaceur) en solution, et ensuite avec divers gels d'affinité. Il ressort de ces études un certain nombre de critères qui nous apparaissent utiles sinon indispensables à un gel d'affinité spécifique du récepteur des glucocorticoïdes.

- le point d'attache en 17 β du ligand permet de conserver la presque totalité des substituants et des spécificités structurales qui confèrent à la dexaméthasone son affinité élevée et sa spécificité. Ces deux qualités sont nécessaires pour pouvoir utiliser de faibles volumes de gel, ce qui limite les interactions

non spécifiques.

- le bras espaceur doit être suffisamment long (9 à 12 atomes) et supérieur à 6 atomes pour permettre l'élution.
- le degré de substitution du gel doit être faible (0,2 à 0,5 μ M ligand/ml de gel). Ceci ne peut se concevoir que pour un ligand ayant une bonne affinité. D'autre part, il est indispensable de pouvoir contrôler l'activation du gel et le couplage du ligand avec précision, de façon à ajuster ces deux étapes au taux de substitution choisi.
- enfin, les liaisons bras-ligand et gel-bras doivent être stables, afin d'éviter un relargage du ligand qui, même minime, aura un effet délétère.

L'application de cette démarche a été envisagée pour différents récepteurs des hormones stéroïdes.

2) Dans le domaine des récepteurs des glucocorticoïdes, le protocole de purification développé, ou tout au moins le gel d'affinité proposé, ont permis d'obtenir des résultats comparables à ceux des autres groupes. Les résultats partiels que nous avons publiés depuis 1979 ont amené certains groupes à modifier leurs procédures. C'est en particulier le cas du groupe de GOVINDAN, qui dans un premier temps, a utilisé comme ligand le dérivé d'oxydation de la dexaméthasone (DXO), et la technique de couplage par un ester activé. Enfin, dans les derniers travaux de ce groupe, le gel d'affinité employé est identique à celui que nous utilisons, à la différence du bras espaceur (enchaînement de 7 atomes au lieu d'une structure en C₉ ou C₁₂) et du degré de substitution du gel.

3) Cette stratégie de mise au point du gel d'affinité a été appliquée au récepteur de la progestérone dans un travail en collaboration avec M. RENOIR (INSERM U 33). Le ligand choisi, la désoxycorticostérone (DOC) a été modifiée de façon identique par oxydation périodique. Les composés DOC-bras espaceur synthétisés ont montré dans des expériences de compétition une bonne affinité vis à vis du récepteur de la progestérone. La préparation d'un gel de Sepharose CL4B-DOC avec un bras diaminododécane a été réalisée selon le protocole décrit précédemment. Ce gel d'affinité a été utilisé dans un protocole en trois étapes :

- chromatographie d'affinité en colonne (rapport cytosol gel égal à 10) avec une élution en batch à 0°C pendant 20 heures en présence de [³H] progestérone.
- chromatographie sur DEAE cellulose avec élution par un gradient de KCl 0 - 0,5 M.
- chromatographie de gel filtration sur AcA 34.

Ce protocole a permis de purifier le récepteur de la progestérone sous forme non transformée et de caractériser la protéine isolée (203).

4) Enfin, nous collaborons également avec M.E. OBLIN (INSERM U 36) à la mise au point de gels d'affinité destinés à la séparation des récepteurs des minéralocorticoïdes type I et type II. Le cytosol de rein de rat ou de lapin renferme deux classes de sites minéralocorticoïdes, à savoir le type I de spécificité marquée pour l'aldostérone et le type II qui lie avec une plus grande affinité les glucocorticoïdes.

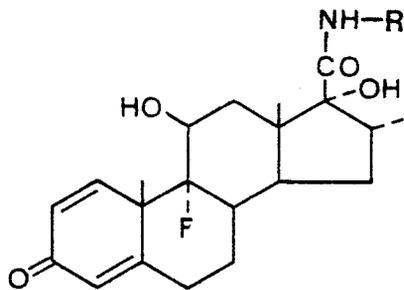
Pour les récepteurs de type I, diverses modifications chimiques des ligands ont été envisagées et testées (figure 31) :

- soit en 7 α à partir du SC 26304, antialdostérone de synthèse, et du RU 38134 en couplant une amine primaire sur la fonction carboxylique.
- soit en 17 β à partir de la désoxycorticostérone après oxydation périodique et couplage à une amine.
- soit en 3 en préparant le dérivé 3-O-carboxyméthylloxime de la désoxycorticostérone qui peut également réagir avec une amine primaire.

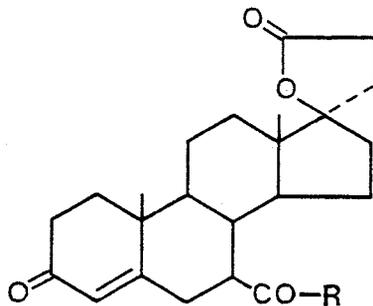
Seul, ce dernier composé conserve une affinité pour le récepteur de type I. Les modifications en 7 α ou 17 β conduisent à des composés dépourvus d'affinité. Pour les récepteurs de type II, nous avons examiné les effets de la transformation de la dexaméthasone en dérivés 17 β carboxamide. Ces derniers conservent une bonne affinité et présentent une meilleure spécificité que la dexaméthasone (165).

Les gels correspondants ont été préparés et essayés. Le passage du cytosol sur l'un des gels permet d'adsorber la totalité du récepteur

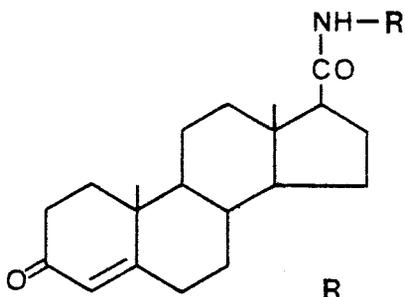
Ⓐ



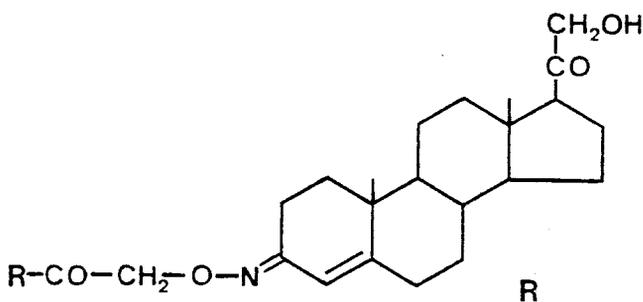
R
(17)DXM1 : NH-(CH₂)₈-CH₃



R
SC 26304 : O-CH(CH₃)₂
(7)SC1 : NH-CH(CH₃)₂
(7)SC2 : O-(CH₂)₆-CH₃



R
(17)DOC1 : NH-(CH₂)₈-CH₃



R
CMO-DOC : OH

Ⓑ

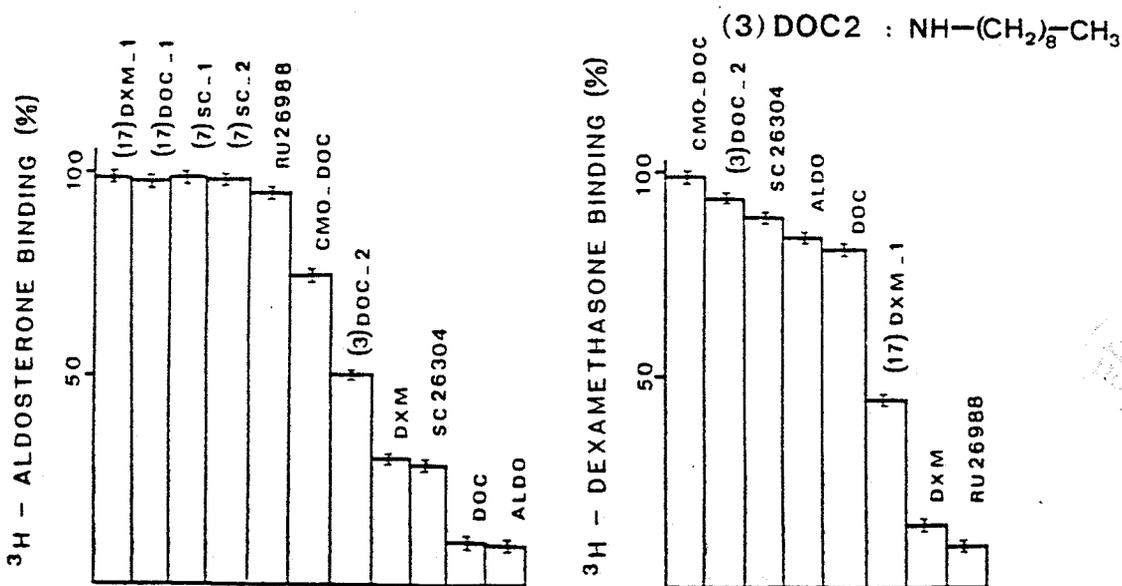


FIGURE 31

Mise au point de ligands spécifiques pour la purification des récepteurs des minéralocorticoïdes

Ⓐ Structure chimique des composés "bras-ligand" dérivés :

- de la dexaméthasone
- du SC 26 304
- de la désocorticostérone

Ⓑ Affinité des divers composés vis à vis de la liaison au récepteur des minéralocorticoïdes (partie gauche) et au récepteur des glucocorticoïdes (partie droite) d'après RAFESTIN-OBLIN et al. (165).

Des fractions aliquotées de cytosol sont incubées à 4°C pendant 24 h en présence de 5.10⁻⁹ M [³H] aldostérone ou de 2.10⁻⁸ M [³H] dexaméthasone en l'absence ou en présence d'un excès 10 fois des stéroïdes compétiteurs. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la liaison spécifique résiduelle rapportée à la liaison maximale.

(type I sur le gel à désoxycorticostérone et type II sur le gel à dexaméthasone) et ainsi de récupérer une préparation biologique ne renfermant plus qu'une seule classe de sites. Cette chromatographie en négatif se révèle très intéressante pour caractériser séparément les deux types de récepteur qui, du fait de leurs spectres d'affinité voisins, n'ont jamais pu être parfaitement étudiés. La suite de ce travail sera plus conventionnelle, quant à l'utilisation des gels d'affinité, avec la purification des deux classes de récepteur séparément.

La démarche que nous avons proposée à l'origine pour la mise au point d'un gel d'affinité spécifique du récepteur des glucocorticoïdes, s'est révélée efficace et profitable pour aborder la purification des autres récepteurs des hormones stéroïdes. Cependant, cette mise au point, qui aboutit à la synthèse d'un gel d'affinité qui à priori doit être efficace, ne permet pas de résoudre les problèmes qui apparaissent lors de la purification.

C) PROBLEMES RENCONTRES LORS DE LA PURIFICATION

Deux difficultés persistent qui méritent d'être résolues :

- d'une part, le rendement global de la purification reste médiocre essentiellement à cause de l'étape de chromatographie d'affinité.
- d'autre part, est-il possible d'augmenter les performances, à savoir le taux de purification de cette même étape ?

Pour le premier point, il faut noter que le rendement d'élution calculé par rapport au récepteur adsorbé sur le gel peut être erroné. En effet, la rétention sur le gel est mesurée par différence entre le récepteur présent dans le surnageant au début et à la fin de l'étape d'adsorption. Tout le récepteur disparu est considéré comme adsorbé spécifiquement. Or, de nombreux travaux récents (168) font état de la stabilité médiocre des liaisons isourée introduites par l'activation au bromure de cyanogène. Le calcul montre qu'il suffit d'un relargage d'une faible quantité de ligand immobilisé pour saturer de nombreux sites récepteurs qui, de ce fait, ne pourront pas être adsorbés (10% de relargage du gel à $0,2 \mu M$ stéroïde/ml de gel amène à une concentration de $5.10^{-7} M$ de dérivé DXNo dont le K_i est de $5.10^{-8} M$. Ceci nous

apparaît d'autant plus crédible que l'expérience montre que les rendements diminuent au fur et à mesure du vieillissement du gel d'affinité. D'autre part, la dilution isotopique du ligand immobilisé est trop importante pour pouvoir mesurer avec précision un relargage de 10 à 20% (un tel relargage amène au maximum 30 cpm/ml de surnageant).

Afin de vérifier cette hypothèse, plusieurs expériences peuvent être envisagées :

- utiliser une dilution isotopique du ligand immobilisé inférieure.
- vérifier, dans le surnageant après chromatographie d'affinité, l'absence de récepteur lié au ligand relargué par des expériences de déplacement.
- enfin, préparer des gels à l'aide d'une autre technique d'activation, soit par les bisépoxydes, soit par les halogénures de sulfonyles (cf chapitre I, annexe 2) qui forment des liaisons gel-bras stables (168).

Ces diverses approches vont être essayées pour éclairer ce point. En effet, s'il s'agit d'un problème de ce type, les résultats concernant le rendement de l'élution ne peuvent pas être pris en compte. Dans l'hypothèse où il n'y a pas relargage du ligand, il sera nécessaire de réexaminer les conditions d'élution.

Le problème du taux de purification, s'il dépend du rendement, dépend également de la fraction de protéines retenue de façon non spécifique par le gel. Les matrices d'affinité que nous utilisons comportent un bras espaceur hydrocarboné en C₉ ou C₁₂ qui favorise les interactions hydrophobes. Afin d'éviter ce problème, il convient d'envisager :

- l'utilisation de bras plus hydrophiles. Cependant, l'expérience prouve que l'introduction d'une fonction amine secondaire au niveau du bras espaceur, a un effet très défavorable. Nous avons récemment essayé un gel comportant un bras diaminodioxaoctane de structure $(\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2)$. Ce gel s'est également révélé inefficace au moment de l'élution.
- des conditions de lavage différentes associant des solvants moins polaires, à faible concentration, tels que le diméthylformamide ou l'acétonitrile qui jusqu'à 2% ne modifient pas la liaison hormone-récepteur.

D) PERSPECTIVES

Le protocole que nous avons mis au point se termine par une étape de chromatographie d'exclusion haute performance. Les avantages de cette nouvelle approche de la chromatographie sont nombreux et nous avons commencé des travaux dans le domaine de l'échange d'ions HPLC en tant qu'outil de caractérisation et de purification du récepteur transformé. D'autre part, l'apparition de supports adaptés à la chromatographie d'affinité ouvre de nouveaux horizons. Des essais sont actuellement en cours afin de maîtriser cette technique et de l'adapter au système d'affinité avidine - biotine.

II - LE RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES PURIFIE STABILISE PAR LE MOLYBDATE

A) STRUCTURE DU RECEPTEUR

La caractérisation physicochimique du récepteur purifié en présence de molybdate montre qu'il s'agit d'une macromolécule de poids moléculaire 240000. L'électrophorèse en conditions dénaturantes révèle une bande majeure de M_r 94000 et des bandes mineures 70000 et 50000. L'abondance de la bande 94000 peut correspondre à la présence de deux sous-unités différentes qui comigrent ainsi que de récents travaux l'ont proposé. Nos résultats sont compatibles avec l'hypothèse d'une structure hétéromérique du récepteur stabilisé par le molybdate.

La confirmation de cette hypothèse en utilisant des techniques de cross-linking et de marquage covalent du récepteur purifié, est envisagée dans la suite de ce travail.

Un autre élément important concerne l'interaction avec le molybdate. La stabilisation du complexe hormone-récepteur sous forme 9-10 S par l'oxyanion persiste après purification. A ce stade, seule peut être évoquée une interaction directe du molybdate avec le récepteur. Ce résultat vient confirmer des travaux que nous avons effectués sur cytosol. Sur la base des effets du molybdate sur les paramètres de liaison et sur le pH optimum, nous avons émis l'hypothèse d'une interaction directe (46). Concernant la nature de cette interaction, le groupe de PRATT a proposé l'intervention d'un résidu

cystéine. D'autres groupes chimiques sont également susceptibles de se complexer au molybdate, notamment les groupements NH_2 et OH (214). La mise en évidence de cette interaction peut être envisagée à partir du récepteur purifié.

B) ASPECT FONCTIONNEL

Seul le mécanisme de transformation a été abordé. Les résultats obtenus en présence de récepteur purifié sont en accord avec le modèle en deux étapes qui fait intervenir une modulation de la réponse vis à vis des accepteurs spécifiques (70). La transformation du récepteur purifié est obtenue en l'absence de facteurs cytosoliques. Cependant, si du point de vue des caractères ioniques et hydrodynamiques, il semble établi qu'il s'agit bien du récepteur transformé, l'interaction avec des noyaux isolés paraît plus limitée. Il est donc important de confirmer la forme du récepteur, soit transformée intermédiaire, soit transformée totalement, à l'aide d'autres critères (isoélectrofocalisation...). De même à la lumière de travaux récents de SCHMIDT et al. (70) et de VEDECKIS et al. (16), il peut être intéressant d'étudier les effets de la RNase.

L'interaction avec des éléments cytosoliques qui peut être envisagée du fait de la modification des paramètres ioniques après purification, mérite également d'être approfondie.

C) PERSPECTIVES

L'étude de la liaison hormone-récepteur purifié présente également beaucoup d'intérêt. Il convient en priorité de mettre au point une technique de dissociation rapide qui laisse la protéine intacte. Dans la mesure où un tel protocole est effectif, de nombreux développements peuvent être envisagés :

- sur le plan structural à l'aide de marqueurs d'affinité spécifiques ou de réactifs des acides aminés.
- sur le plan fonctionnel en étudiant essentiellement le rôle de la phosphorylation.

Par ailleurs, la purification du récepteur des glucocorticoïdes du foie de lapin permet d'envisager la préparation d'anticorps monoclonaux. D'autre part, la reconnaissance des sites d'interaction au niveau des gènes régulés notamment l'utéroglobine, doit être abordée par le groupe de E. MILGROM (INSERM U 135) en complément d'un travail identique réalisé avec le récepteur de la progestérone.

De nombreux axes de recherche peuvent être dégagés à partir des résultats présentés dans ce travail. Certains destinés à améliorer la qualité de la purification sont en cours d'investigation. D'autres orientés vers l'étude du récepteur et de son mécanisme d'action sont actuellement développés en collaboration ou au sein de notre laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

1. **BAXTER J.D.** et **ROUSSEAU G.G.** : Glucocorticoid hormone action : an overview. in Monographs on Endocrinology : glucocorticoid hormone action, eds J.D. BAXTER, G.G. ROUSSEAU, vol XII (1979) SPRINGER Heidelberg, pp 1-24.
- 2; **ARONOW L.** : Effects of glucocorticoid on fibroblasts. in Monographs on Endocrinology : glucocorticoid hormone action, eds J.D. BAXTER, G.G. ROUSSEAU, vol. XII (1979) SPRINGER Heidelberg, pp 327-340.
3. **PRATT W.B.** : The mechanism of glucocorticoid effects in fibroblasts. J. INVEST. DERMATOL. (1978), 71, 24-35.
4. **MUNCK A.**, **CRABTREE G.R.** et **SMITH K.A.** : Glucocorticoid receptors and actions in rat thymocytes and immunologically stimulated human peripheral lymphocytes. in Monographs on Endocrinology : glucocorticoid hormone action, eds J.D. BAXTER, G.G. ROUSSEAU, vol XII (1979) SPRINGER Heidelberg, pp 341-356.
5. **SIBLEY C.H.** et **YAMAMOTO K.R.** : Mouse lymphoma cells : mechanisms of resistance to glucocorticoids. in Monographs on Endocrinology : glucocorticoid hormone action, eds J.D. BAXTER, G.G. ROUSSEAU, vol. XII (1979) SPRINGER Heidelberg, pp 357-376.
6. **KING W.T.** et **GREENE G.L.** : Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. NATURE (1984) 307, 745-747.
7. **WELSHONS W.V.**, **LIEBERMAN M.E.** et **GORSKI J.** : Nuclear localization of unoccupied estrogen receptors. NATURE (1984) 307, 747-749.
8. **SCHRADER W.T.** : New model for steroid hormone action ? NATURE (1984) 308, 17-18.
9. **CLARCK C.R.** : The cellular distribution of steroid hormone receptors : have we got it right ? TRENDS BIOCHEM. SCI. (1984) 9, 207-208.
10. **LUKOLA A.**, **AKERMAN K.** et **PESSA T.** : Human lymphocyte glucocorticoid receptor reside mainly in the cytoplasm. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1985) 131, 877-882.
11. **LEACH K.L.**, **DAHMER M.K.**, **HAMMOND N.D.**, **SANDO J.J.** et **PRATT W.B.** : Molybdate inhibition of glucocorticoid receptor inactivation and transformation. J. BIOL. CHEM. (1979) 254, 11884-11890.
12. **SHERMAN M.R.** et **STEVENS J.** : Structure of mammalian steroid receptors : evolving concepts and methodological developments. ANN. REV. PHYSIOL. (1984) 46, 83-105.
13. **RADOJCIC M.**, **OKRET S.**, **WRANGE O.** et **GUSTAFSSON J.A.** : Characterization of non liganded glucocorticoid receptor in rat liver cytosol using indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay. J. STEROID BIOCHEM. (1985) 23, 1-8.
14. **VEDECKIS W.V.** : Subunit dissociation as a possible mechanism of glucocorticoid receptor activation. BIOCHEMISTRY (1983) 22, 1983-1989.
15. **VEDECKIS W.V.**, **KOVACIC-MILIVOJEVIC B.**, **LA POINTE M.C.** et **REKER C.E.** : Alterations in mouse glucocorticoid receptor structure : effect of various hydrolytic enzymes. in Molecular Mechanism of Steroid Hormone Action, ed. V.K. MOUDGIL (1985) W. DE GRUYTER, Berlin New York, pp 85-110.

16. KOVACIC-MILIVOJEVIC B., LA POINTE M.C., REKER C.E. et VEDECKIS W.V. : Ribonucleic acid is a component of the oligomeric, transformed mouse AtT-20 cell glucocorticoid receptor.
BIOCHEMISTRY (1985) 24, 7357-7366.
17. RAAKA B.M., FINNERTY M., SUN E. et SAMUELS H.H. : Effects of molybdate on steroid receptors in intact GH₁ cells.
J. BIOL. CHEM. (1985) 260, 14009-14015.
18. SILVA C.M. et CIDLOWSKI J.A. : The physiological significance of the structure of glucocorticoid and progesterone receptors. in Molecular Mechanism of Steroid Hormone Action, ed. V.K. MOUDGIL (1985) W. DE GRUYTER, Berlin New York, pp 141-172.
19. OKRET S., WIKSTROM A.C. et GUSTAFSSON J.A. : Characterization of the molybdate-stabilized glucocorticoid receptor. Evidence for a receptor heteromer.
BIOCHEMISTRY (1985) 24, 6581-6586.
20. GEHRING U. et ARNDT H. : Heteromeric nature of glucocorticoid receptors.
FEBS LETT. (1985) 179, 138-142.
21. JOAB I., RADANYI C., RENOIR M., BUCHOU T., CATELLI M.G., BINART M., MESTER J. et BAULIEU E.E. : Common non-hormone binding component in non transformed chick oviduct receptors of four steroid hormones.
NATURE (1984) 308, 850-853.
22. CATELLI M.G., BINART N., JUNG-TESTAS I., RENOIR J.M., BAULIEU E.E., FERAMISCO J.R. et WELCH W.J. : The common 90-Kd protein component of non transformed "8S" steroid receptors is a heat - shock protein.
EMBO J. (1985) 4, 3131-3135.
23. HOUSLEY P.R., SANCHEZ E.R., WESTPHAL H.M., BEATO M. et PRATT W.B. : The molybdate stabilized L-cell glucocorticoid receptor isolated by affinity chromatography or with a monoclonal antibody is associated with a 90-92 kDa non steroid binding phosphoprotein.
J. BIOL. CHEM. (1985) 260, 13810-13817.
24. SANCHEZ E.R., TOFT D.O., SCHLESINGER M.J. et PRATT W.B. : Evidence that the 90-kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein.
J. BIOL. CHEM. (1985) 260, 12398-12401.
25. SHERMAN M.R., MORAN M.C., TUAZON F.B. et STEVENS Y.W. : Structure, dissociation and proteolysis of mammalian steroid receptors.
J. BIOL. CHEM. (1983) 258, 10366-10377.
26. GUSTAFSSON J.A., CARLSTEDT-DUKE J., OKRET S., WIKSTROM A.C., WRANGE O., PAYVAR F. et YAMAMOTO K. : Structure and specific DNA binding of the rat liver glucocorticoid receptor.
J. STEROID BIOCHEM. (1984) 20, 1-4.
27. CARLSTEDT-DUKE J., WRANGE O., OKRET S. et GUSTAFSSON J.A. : The glucocorticoid receptor in rat liver.
BIOCHEM. PHARMACOL. (1984) 33, 913-916.
28. GUSTAFSSON J.A., CARLSTEDT-DUKE J., OKRET S. et WRANGE O. : On the use of antibodies in studies on glucocorticoid receptor structure. in Progress in Clinical and Biological Research : Hormones and Cancer, eds E. GURPIDE, R. CALANDRA, C. LEVY, R.J. SOTO, vol. 142 (1984) ALAN R. LISS, New York, pp 207-222.

29. REICHMAN M.E., FOSTER C.M., EISEN L.P., EISEN H.J., TORAIN B.F. et SIMONS S.S. : Limited proteolysis of covalently labeled glucocorticoid receptors as a probe of receptor structure. *BIOCHEMISTRY* (1984) 23, 5376-5384.
30. SIMONS S.S. : Affinity labeling steroids as biologically active probes of glucocorticoid receptor structure and function. *in* Molecular Mechanism of Steroid Hormone Action, ed. V.K. MOUDGIL (1985) W. DE GRUYTER, Berlin New York, pp 111-140.
31. GEHRING U. et HOTZ A. : Photoaffinity labeling and partial proteolysis of wild-type and variant glucocorticoid receptors. *BIOCHEMISTRY* (1983) 22, 4013-4018.
32. CARLSTEDT-DUKE J. et GUSTAFSSON J.A. : The oligomeric nature of the glucocorticoid receptor. *in* GREMI Symposium : glucocorticoids to-day, eds J.L. JUNIEN, F. RUSSO-MARIE J. BURE (1985) EXCERPTA MEDICA, ELSEVIER, Amsterdam , pp 26-37.
33. GRANDICS P., MILLER A., SCHMIDT T.J. et LITWACK G. : Phosphorylation in vivo of rat hepatic glucocorticoid receptor. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN.* (1984) 120, 59-65.
34. SCHMIDT T.J. et LITWACK G. : Activation of the glucocorticoid receptor complex. *PHYSIOL. REV.* (1982) 62, 1131-1192.
35. DAHMER M.K., HOUSLEY P.R. et PRATT W.B. : Effects of molybdate and endogenous inhibitors on steroid receptor inactivation, transformation and translocation. *ANN. REV. PHYSIOL.* (1984) 46, 67-81.
36. HOUSLEY P.R., GRIPPO J.F., DAHMER M.K. et PRATT W.B. : Inactivation, activation and stabilization of glucocorticoid receptors. *in* Biochemical Actions of Hormones, ed. G. LITWACK, vol. XI (1984) ACADEMIC PRESS, New York, pp 347-376.
37. GRIPPO J.F., HOLMGREN A. et PRATT W.B. : Proof that the endogenous heat-stable glucocorticoid receptor activating factor is thioredoxin. *J. BIOL. CHEM.* (1985) 260, 93-97.
38. HOUSLEY P.R. et PRATT W.B. : Direct demonstration of glucocorticoid receptor phosphorylation by intact L-cells. *J. BIOL. CHEM.* (1983) 258, 4630-4635.
39. LEACH K.L., GRIPPO J.F., HOUSLEY P.R., DAHMER M.K., SALIVE M.E. et PRATT W.B. : Characteristics of an endogenous glucocorticoid receptor stabilizing factor. *J. BIOL. CHEM.* (1982) 257, 381-388;
40. ROUSSEAU G.G. et BAXTER J.D. : Glucocorticoid receptors. *in* Monographs on Endocrinology : glucocorticoid hormone action, eds J.D. BAXTER, G.G. ROUSSEAU, vol. XII (1979) SPRINGER, Heidelberg, pp 49-77.
41. FORMSTECHER P. : Les stéroïdes 17 B carboxamides : une nouvelle classe d'antiglucocorticoïdes. Mémoire DERBH, Lille (1980).
42. YEAKLEY J.M., BALASUBRAMANIAN K. et HARRISON R.W. : Comparison of glucocorticoid receptor binding kinetics with predictions from a bimolecular model. *J. BIOL. CHEM* (1980) 255, 4182-4188.
43. ROUSSEAU G.G. : Structure and regulation of the glucocorticoid hormone receptor. *MOL. CELL. ENDOCRINOL.* (1984) 38, 1-11.

44. ROUSSEAU G.G. et SCHMIT J.P. : Structure-activity relationships for glucocorticoids : determination of receptor binding and biological activity. J. STEROID BIOCHEM. (1977) 8, 911-919.
45. WOLFF M.E. : Structure-activity relationship in glucocorticoids. in Monographs on Endocrinology : glucocorticoid hormone action, eds J.D. BAXTER, G.G. ROUSSEAU, vol. XII (1979) SPRINGER, Heidelberg, pp 97-107.
46. BLANCHARDIE P., LUSTENBERGER P., ORSONNEAU J.L., DENIS M. et BERNARD S. : Influence of molybdate, ionic strength and pH on ligand binding to the glucocorticoid receptor. STEROIDS (1984) 44, 159-174.
47. MAES P. : Etude de la topographie du site de liaison du récepteur à glucocorticoïdes en utilisant des corrélations structure - activité qualitatives et quantitatives dans la série des stéroïdes 17 B carboxamides. Thèse Doctorat 3e cycle, Lille (1983).
48. BELL P.A., WEATHERILL P.J. et JONES T.R. : Influence of hydrophobic interactions on the structure and steroid-binding properties of glucocorticoid receptors. J. STEROID BIOCHEM. (1986) 24, 57-62.
49. SIMONS S.S. et THOMPSON E.B. : Affinity labeling of glucocorticoid receptors : new methods in affinity labeling. in Biochemical Actions of Hormones, ed. G. LITWACK, vol IX (1982) ACADEMIC PRESS, New York, pp 221-254.
50. KATZENELLENBOGEN J.A. et KATZENELLENBOGEN B.S. : Affinity labeling of receptors for steroid and thyroid hormones. VITAM. HORM. (1984) 41, 213-274.
51. SIMONS S.S., THOMPSON E.B. et JOHNSON D.F. : Fluorescent chemoaffinity labeling : potential application of a new affinity labeling technique to glucocorticoid receptors. BIOCHEMISTRY (1979) 18, 4915-4922.
52. PONS M., ROBINSON T.E.J., MERCIER L., THOMPSON E.B. et SIMONS S.S. : Formation of a fluorescent glucocorticoid receptor steroid complex in HTC cells cytosol. J. STEROID BIOCHEM. (1985) 23, 267-273.
53. MILGROM E. : Activation of the steroid-receptor complexes. in Biochemical Action of Hormones, ed. G. LITWACK, vol. VIII (1981) ACADEMIC PRESS, New York, pp 465-493.
54. GRODY J.W., SCHRADER W.T. et O'MALLEY B.W. : Activation, transformation and subunit structure of steroid hormone receptors. ENDOCRINE REVIEWS (1982) 3, 141-163.
55. DANZE P.M. : Transformation du complexe hormone-récepteur à glucocorticoïdes et sa signification biologique. Thèse Médecine, Lille (1983).
56. HIGGINS S.J., BAXTER J.D. et ROUSSEAU G.G. : Nuclear binding of glucocorticoid receptors. in Monographs on Endocrinology : glucocorticoid hormone action, eds J.D. BAXTER, G.G. ROUSSEAU, vol. XII (1979) SPRINGER, Heidelberg, pp 135-160.
57. SIMONS S.S. : Factors influencing association of glucocorticoid receptor-steroid complex with nuclei, chromatin and DNA : interpretation of binding data. in Monographs on Endocrinology : glucocorticoid hormone action, eds J.D. BAXTER, G.G. ROUSSEAU, vol. XII (1979) SPRINGER, Heidelberg, pp 161-188.
58. BARNETT C.A., SCHMIDT T.J. et LITWACK G. : Effects of calf alkaline phosphatase, phosphatase inhibitors, and phosphorylated compounds on the rate of activation of glucocorticoid-receptor complexes. BIOCHEMISTRY (1980) 19, 5446-5455.

59. MILLER-DIENER A., SCHMIDT T.J. et LITWACK G. : Protein kinase associated with the purified rat hepatic glucocorticoid receptor.
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1985) 82, 4003-4007.
60. BEN-OR S. et CHRAMBACH A. : Heterogeneity of the glucocorticoid receptors : molecular transformation during activation detected by electrofocusing.
ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. (1983) 221, 343-353.
61. HOLBROOK N.J., BODWELL J.E. et MUNCK A. : Non activated and activated glucocorticoid receptor complexes in WEHI-7 and rat thymus cells.
J. STEROID BIOCHEM. (1984) 20, 19-22.
62. ARANYI P. : Effects of cross-linking on glucocorticoid receptor activation.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1984) 119, 64-68.
63. TYMOCZKO J.L. et PHILLIPS M.M. : The effects of ribonuclease on rat liver dexamethasone receptor : increased affinity for DNA and altered sedimentation profile.
ENDOCRINOLOGY (1983) 112, 142-149
64. TYMOCZKO J.L. et LEE J.H. : Chymotrypsin treatment of glucocorticoid receptor attenuates RNA-dependant inhibition of DNA-binding. Evidence for a distinct RNA-binding site.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA (1985) 846, 193-199.
65. CHONG M.T. et LIPPMAN M.E. : Effects of RNA and ribonuclease on the binding of estrogen and glucocorticoid receptors from MCF-7 cells to DNA-cellulose.
J. BIOL. CHEM. (1982) 257, 2996-3002.
66. HUTCHENS W.T., MARKLAND F.S. et HAWKINS E.F. : RNA induced reversal of glucocorticoid receptor activation.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1982) 105, 20-27.
67. ECONOMIDIS I. et ROUSSEAU G.G. : Association of the glucocorticoid hormone receptor with ribonucleic acid.
FEBS LETT. (1985) 181, 47-52.
68. VEDECKIS W.V. : Limited proteolysis of the mouse liver glucocorticoid receptor.
BIOCHEMISTRY (1983) 22, 1975-1982.
69. BODWELL J.E., HOLBROOK N.J. et MUNCK A. : Evidence for distinct sulfhydryl groups associated with steroid and DNA-binding domains of rat thymus glucocorticoid receptors.
BIOCHEMISTRY (1984) 23, 4237-4242.
70. SCHMIDT T.J., MILLER-DIENER A., WEBB M.L. et LITWACK G. : Thermal activation of the purified rat hepatic glucocorticoid receptor.
J. BIOL. CHEM. (1985) 260, 16255-16262.
71. SCHMIDT T.J. et LITWACK G. : Purification, activation and phosphorylation of the glucocorticoid receptor. *in* Molecular Mechanism of Steroid Hormone Action : recent advances, ed. V.K. MOUDGIL (1985) W. DE GRUYTER, Berlin New York, pp 309-349.
72. LITWACK G., MILLER-DIENER A., DI SORBO D.M. et SCHMIDT T.J. : Vitamin B6 and the glucocorticoid receptor. *in* Current Topics in Nutrition and Disease : vitamin B6, its role in health and disease, eds R.D. REYNOLDS, J.E. LEKLEM, vol. XIII (1985) ALAN. R. LISS inc. New York, pp 177-191.
73. KARLSON P. : *in* Introduction to modern biochemistry, ed P. KARLSON (1963) ACADEMIC PRESS, New York, pp 140.

74. **MUNCK A.** et **HOLBROOK N.J.** : Glucocorticoid-receptor complexes in rat thymus cells. *J. BIOL. CHEM.* (1984) 259, 820-831.
75. **RAAKA B.M.** et **SAMUELS H.H.** : The glucocorticoid receptor in GH₁ cells. *J. BIOL. CHEM.* (1983) 258, 417-425.
76. **PAPANICHAIL M.**, **TSOKOS G.**, **TSAWDAROGLOU N.** et **SEKERIS C.E.** : Immunocytochemical demonstration of glucocorticoid receptors in different cell types and their translocation from the cytoplasm to the cell nucleus in the presence of dexamethasone. *EXP. CELL. RES.* (1980) 125, 490-493.
77. **GOVINDAN M.V.** : Immunofluorescence microscopy of the intracellular translocation of glucocorticoid-receptor complexes in rat hepatoma (HTC) cells. *EXP. CELL. RES.* (1980) 125, 293-297.
78. **ANTAKLY T.** et **EISEN H.J.** : Immunocytochemical localization of glucocorticoid receptor in target cells. *ENDOCRINOLOGY* (1984) 115, 1984-1989.
79. **GUSTAFSSON J.A.**, **OKRET S.**, **WIKSTROM A.C.**, **ANDERSSON B.**, **RADOJCIC M.**, **WRANGE O.**, **SACHS W.**, **DOUPE A.J.**, **PATTERSON P.H.**, **CORDELL B.** et **FUXE K.** : On the use of poly- and monoclonal antibodies in studies on the structure and function of the glucocorticoid receptor. *in Nobel Symposium : Steroid hormone receptors : structure and function*, eds **H. ERIKSSON**, **J.A. GUSTAFSSON**, vol. 57 (1983) ELSEVIER, Amsterdam, pp 355-386.
80. **ROUSSEAU G.G.** : Control of gene expression by glucocorticoid hormones. *BIOCHEM. J.* (1984) 224, 1-12.
81. **GRONER B.**, **KENNEDY N.**, **SKROCH P.**, **HYNES N.E.** et **PONTA H.** : DNA sequences involved in the regulation of gene expression by glucocorticoid hormones. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* (1984) 781, 1-6.
82. **RINGOLD G.M.** : Steroid hormone regulation of gene expression. *ANN. REV. PHARMACOL. TOXICOL.* (1985) 25, 529-566.
83. **YAMAMOTO K.R.** : Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *ANN. REV. GENETICS* (1985) 19, 209-252.
84. **LAN N.C.**, **KARIN M.**, **NGUYEN T.**, **WEISZ A.**, **BIRNBAUM M.J.**, **EBERHARDT N.L.** et **BAXTER J.D.** : Mechanisms of glucocorticoid hormone action. *J. STEROID BIOCHEM.* (1984) 20, 77-88.
85. **CARTER-SU C.** et **PRATT W.B.** : Receptor phosphorylation. *in The Receptors*. ed. **P.M. CONN**, vol. 1 (1984) ACADEMIC PRESS, Orlando, pp 541-585.
86. **DOUGHERTY J.J.**, **PURI R.K.** et **TOFT D.O.** : Phosphorylation of steroid receptors. *TRENDS PHARMACOL. SCI.* (1985) 6, 83-85.
87. **MUNCK A.** et **BRINCK-JOHNSEN T.** : Specific and non specific physicochemical interactions of glucocorticoids and related steroids with rat thymus cells *in vitro*. *J. BIOL. CHEM.* (1968) 243, 5556-5565.
88. **MOUDGIL V.K.** : Interaction of nucleotides with steroid hormone receptors. *in Molecular Mechanism of Steroid Hormone Action : recent advances*, ed. **V.K. MOUDGIL** (1985) **W. DE GRUYTER**, Berlin New York, pp 351-375.

89. KURL R.N. et JACOB S.T. : Phosphorylation of purified glucocorticoid receptor from rat liver by an endogenous protein kinase.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1984) 119, 700-705.
90. SINGH V.B. et MOUDGIL V.K. : Protein kinase activity of purified rat liver glucocorticoid receptor.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1984) 125, 1067-1073
91. SINGH V.B. et MOUDGIL V.K. : Phosphorylation of rat liver glucocorticoid receptor.
J. BIOL. CHEM. (1985) 260, 3684-3690.
92. SANTI D.V., WASHTIEN W. et POGOLOTTI A.L. : Approaches for purification of the glucocorticoid receptor. in Monographs on Endocrinology : glucocorticoid hormone action, eds J.D. BAXTER, G.G. ROUSSEAU, vol. XII (1979), Springer, Heidelberg pp 109-122.
93. ROUSSEAU G.G., HIGGINS S.J., BAXTER J.D., GELFAND D. et TOMKINS G.M. : Binding of glucocorticoid receptors to DNA.
J. BIOL. CHEM. (1975) 250, 6015-6021.
94. GOVINDAN M.V. et SEKERIS C.E. : Purification of two dexamethasone binding proteins from rat liver cytosol.
EUR. J. BIOCHEM. (1978) 89, 95-104.
95. BERNARD P.A. et JOH T.H. : Characterization and immunocytochemical demonstration of glucocorticoid receptor using antisera specific to transformed receptor.
ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. (1984) 229, 466-476.
96. HACKEY J.F. et PRATT W.B. : Characterization and partial purification of the specific glucocorticoid binding components from mouse fibroblasts.
BIOCHEMISTRY (1971) 10, 3002-3008.
97. LITWACK G., FILLER R., ROSENFELD S.A., LICHTASH N., WISHMAN C.A. et SINGER S. : Liver cytosol corticosteroid binder II, a hormone receptor.
J. BIOL CHEM. (1973) 248, 7481-7486.
98. BLANCHARDIE P., LUSTENBERGER P., ORSONNEAU J.L. et BERNARD S. : Resolution of the molecular forms of rat liver glucocorticoid receptor by affinity chromatography.
BIOCHIMIE (1984) 66, 505-511.
99. WEISZ A., PUCA G.A., MASUCCI M.T., PAGNOTTA R., PETRILLO A. et SICA V. : Interaction of rat liver glucocorticoid receptor with heparin.
BIOCHEMISTRY (1984) 23, 5393-5397.
100. KALIMI G., COLMAN P. et FEIGELSON P. : The "activated" hepatic glucocorticoid receptor complex.
J. BIOL. CHEM. (1975) 250, 1080-1086
101. ATGER M. et MILGROM E. : Chromatographic separation on phosphocellulose of activated and non activated forms of steroid-receptor complex. Purification of the activated complex.
BIOCHEMISTRY (1976) 15, 4298-4304
102. EISEN H.J. et GLINSMANN W. : Partial purification of glucocorticoid receptor from rat liver using DNA cellulose.
J. STEROID BIOCHEM. (1975) 6, 1171-1173
103. EISEN H.J. et GLINSMANN W. : Partial purification of the glucocorticoid receptor from rat liver : a rapid two-step procedure using DNA cellulose.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1976) 70, 367-372.

104. **EISEN** H.J. et **GLINSMANN** W. : Maximising the purification of the activated glucocorticoid receptor by DNA-cellulose chromatography.
BIOCHEM. J. (1978) 171, 177-183
105. **EISEN** H.J., **SCHLEENBAKER** R.E. et **SIMONS** S.S. : Affinity labeling of the rat liver glucocorticoid receptor with dexamethasone 21 mesylate.
J. BIOL. CHEM. (1981) 256, 12920-12925.
106. **COLMAN** P.D. et **FEIGELSON** P. : Partial purification of the activated hepatic glucocorticoid-receptor complex.
MOL. CELL. ENDOCRINOL. (1976) 5, 33-40.
107. **CLIMENT** F., **BUGANY** H. et **BEATO** M. : Partial purification of the activated glucocorticoid receptor of rat liver.
FEBS Lett. (1976) 66, 317-321.
108. **CLIMENT** F., **DOENECKE** D. et **BEATO** M. : Properties of the partially purified activated glucocorticoid receptor of rat liver. Binding to chromatin subunits.
BIOCHEMISTRY (1977) 16, 4694-4703.
109. **ISOHASHI** F., **TERADA** M., **TSUKANAKA** K., **NAKANISHI** Y. et **SAKAMOTO** Y. : A low-molecular-weight translocation modulator and its interaction with a macromolecular inhibitor of the activated receptor-glucocorticoid complex.
J. BIOCHEM. (1980) 88, 775-781.
110. **WESTPHAL** H.M. et **BEATO** M. : The activated glucocorticoid receptor of rat liver : purification and physical characterization.
EUR. J. BIOCHEM. (1980) 106, 395-403.
111. **MOUDGIL** V.K., **HEALY** S.P. et **SINGH** V.B. : Chromatographic separation of non transformed glucocorticoid-receptor complexes from rat liver cytosol. Use of tungstate in the purification, inactivation and resolution of molecular forms.
J. BIOCHEM. (1985) 98, 963-973.
112. **WRANGE** O., **CARLSTEDT-DUKE** J. et **GUSTAFSSON** J.A. : Purification of the glucocorticoid receptor from rat liver cytosol.
J. BIOL. CHEM. (1979) 254, 9284-9290.
113. **OKRET** S., **CARLSTEDT-DUKE** J., **WRANGE** O., **CARLSTROM** K. et **GUSTAFSSON** J.A. : Characterization of an antiserum against the glucocorticoid receptor.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA (1981) 677, 205-219.
114. **WRANGE** O., **OKRET** S., **RADOJCIC** M., **CARLSTEDT-DUKE** J. et **GUSTAFSSON** J.A. : Characterization of the purified activated glucocorticoid receptor from rat liver cytosol.
J. BIOL. CHEM. (1984) 259, 4534-4541.
115. **PAYVAR** F., **DE FRANCO** D., **FIRESTONE** G.L., **EDGAR** B., **WRANGE** O., **GUSTAFSSON** J.A. et **YAMAMOTO** K.R. : Sequence-specific binding of glucocorticoid receptor to MMTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region.
CELL (1983) 35, 381-392.
116. **GAMETCHU** B. et **HARRISSON** R.W. : Characterization of a monoclonal antibody to the rat liver glucocorticoid receptor.
ENDOCRINOLOGY (1984) 114, 274-279
117. **GOVINDAN** M.V. et **GRONEMEYER** H. : Characterization of the rat liver glucocorticoid receptor purified by DNA-cellulose and ligand affinity chromatography.
J. BIOL. CHEM. (1984) 259, 12915-12924.

118. WONG K.C., KORNEL L., BEZKOROVAINY A. et BEVERLEY E.P. : Isolation of cytoplasmic glucocorticoid-binding proteins from rat liver by means of affinity chromatography and its partial characterization.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA (1973) 328, 133-143.
119. DE KLOET E.R. et BURBACH P. : Selective purification of a single population of glucocorticoid receptors from rat brain.
J. NEUROCHEM. (1978) 30, 1505-1507.
120. FAILLA D., TOMKINS G.M. et SANTI D.V. : Partial purification of a glucocorticoid receptor.
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1975) 72, 3849-3852.
121. WEISZ A., BAXTER J.D. et LAN N.C. : Interaction of sodium molybdate with highly purified glucocorticoid receptor.
J. STEROID BIOCHEM. (1984) 20, 289-293.
122. GRANDICS P., PURI R.K. et TOFT D.O. : A new affinity resin for the purification of non transformed avian progesterone receptor.
ENDOCRINOLOGY (1982) 110, 1055-1057.
123. GRANDICS P., GASSER D.L. et LITWACK G. : Monoclonal antibodies to the glucocorticoid receptor.
ENDOCRINOLOGY (1982) 111, 1731-1733.
124. STEROGEL A. : Notice technique d'utilisation 4/82.
G.K. BIOCHEMICALS (1982).
125. GRANDICS P., MILLER A., SCHMIDT T.J., MITTMAN D. et LITWACK G. : Purification of the unactivated glucocorticoid receptor and its subsequent in vitro activation.
J. BIOL. CHEM. (1984) 259, 3173-3180.
126. WEBB M.L., MILLER DIENER A.S. et LITWACK G. : Purification, characterization and activation of the glucocorticoid-receptor complex from rat kidney cortex.
BIOCHEMISTRY (1985) 24, 1946-1952
127. SWEET F. et ADAIR N.K. : Synthesis of an affinity chromatography column designed for recovery of labile proteins.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1975) 63, 99-105.
128. GOVINDAN V.M., GROTE H., SCHMID W. et SEKERIS C.E. : Partial purification of dexamethasone binding proteins from rat liver cytosol.
HOPPE SEYLER'S Z. PHYSIOL. CHEM. (1976) 357, 317.
129. GOVINDAN V.M. : Partial purification of a glucocorticoid receptor from rat liver cytosol.
HOPPE SEYLER'S Z. PHYSIOL. CHEM. (1976) 357, 496.
130. GOVINDAN M.V. et SEKERIS C.E. : Partial purification of rat liver glucocorticoid binding proteins by affinity chromatography.
STEROIDS (1976) 28, 499-507.
131. GOVINDAN M.V. : Purification of glucocorticoid receptors from rat liver cytosol. Preparation of antibodies against the major receptor proteins and application of immunological techniques to study activation and translocation.
J. STEROID BIOCHEM. (1979) 11, 323-332.
132. GOVINDAN M.V. et MANZ B. : Three step purification of glucocorticoid receptors from rat liver.
EUR. J. BIOCHEM. (1980) 108, 47-53.

133. **TSANDAROGLU N.G., GOVINDAN M.V., SCHMID W. et SEKERIS C.E.** : Dexamethasone binding proteins in cytosol and nucleus of rat thymocytes.
EUR. J. BIOCHEM. (1981) 114, 305-313.
134. **GOVINDAN M.V., SPIESS E. et MAJORS J.** : Purified glucocorticoid receptor-hormone complex from rat liver cytosols binds specifically to cloned MMTV long terminal repeats in vitro.
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1982) 79, 5157-5161.
135. **MANZ B., HEUBNER A., KOHLER I., GRILL H.J. et POLLON K.** : Synthesis of biotin-labelled dexamethasone derivatives.
EUR. J. BIOCHEM. (1983) 131, 333-338.
136. **IDZIOREK T.** : Caractérisation du récepteur à glucocorticoïdes du foie de rat purifié sous forme non activée. Thèse Doctorat en Biochimie, UER Sciences, Lille (1985).
137. **KUHN R.W., SCHRADER W.T., SMITH R.G. et O'MALLEY B.W.** : Progesterone binding components of chick oviduct : purification by affinity chromatography.
J. BIOL. CHEM. (1975) 250, 4220-4228.
138. **SICA V., PARIKH I., NOLA E., PUCA G.A. et CUATRECASAS P.** : Affinity chromatography and the purification of estrogen receptors.
J. BIOL. CHEM. (1973) 248, 6543-6558.
139. **VONDERHAAR B. et MUELLER G.C.** : Binding of estrogen receptor to estradiol immobilized on insoluble resins.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA (1969) 176, 626-631.
140. **TRUONG H., GEYNET C., MILLET C., SOULIGNAC O., BUCOURT R., VIGNAU M., TORELLI V. et BAULIEU E.E.** : Purification of estradiol receptor by affinity chromatography. Representative experiments.
FEBS LETT. (1973) 35, 289-294.
141. **TRUONG H. et BAULIEU E.E.** : Parameters influencing the purification of calf uterus estrogen receptor by affinity chromatography.
FEBS LETT. (1974) 46, 321-325.
142. **CUATRECASAS P. et ANFINSEN C.B.** : Affinity chromatography. in Methods in Enzymology, ed. W.B. JAKOBY, vol. XXII, 1970, ACADEMIC PRESS, New York, pp 345-378.
143. **LE GAILLARD F., RACADOT A., RACADOT-LEROY N. et DAUTREVAUX M.** : Isolement de la transcortine humaine par chromatographie d'affinité.
BIOCHIMIE (1974) 56, 99-108.
144. **BUCOURT R., VIGNAU M., TORELLI V., RICHARD-FOY H., GEYNET C., SECCO-MILLET C., REDEWILH G. et BAULIEU E.E.** : New biospecific adsorbents for the purification of estradiol receptor.
J. BIOL. CHEM. (1978) 253, 8221-8228.
145. **MUNCK A., WIRA C., YOUNG D.A., MOSHER K.M., HALLAHAN C. et BELL P.A.** : Glucocorticoid receptor complexes and the earliest step in the action of glucocorticoids on thymus cells.
J. STEROID BIOCHEM. (1972) 3, 567-578.
146. **LOWE C.R. et DEAN P.G.** The chemistry of affinity chromatography. in Affinity Chromatography (1974) JOHN WILEY and Sons, London, pp 218-240.

147. **SUNDBERG L.** et **PORATH J.** : Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography. I Attachment of group-containing ligand to insoluble polymers by bifunctional oxiranes
J. CHROMATOGR. (1974) 90, 87-98.
148. **OESTERLING T.O.** et **GUTTMAN D.E.** : Factors influencing stability of prednisolone in aqueous solution.
J. PHARM. SCI. (1964) 53, 1189-1192.
149. **DEKKER D.** et **BUIJS D.J.** : Stability of corticosteroids under anaerobic conditions. C₆ and C₉ fluorine-containing corticosteroids.
INT. J. PHARM. (1980) 5, 195-206.
150. **ROSNER W.** et **BRADLOW H.L.** : Purification of corticosteroid-binding globulin from human plasma by affinity chromatography.
J. CLIN. ENDOCR. (1971) 33, 193-198.
151. **LUDENS J.H.**, **DE VRIES J.R.** et **FANESTIL D.D.** : Criteria for affinity chromatography of steroid binding macromolecules.
J. BIOL. CHEM. (1972) 247, 7533-7538.
152. **SICA V.** et **BRESCIANI F.** : Estrogen-binding proteins of calf uterus. Purification to homogeneity of receptor from cytosol by affinity chromatography.
BIOCHEMISTRY (1979) 18, 2369-2378.
153. **HUBENER H.J.** et **SCHMIDT J.G.H.** : Ability of liver and serum esterases to saponify various esters of steroid hormones.
HOPPE SEYLER'S Z. PHYSIOL. CHEM. (1954) 296, 246-256.
154. **LE GAILLARD F.** : La transcortine humaine : propriétés physico-chimiques et étude du site de liaison au cortisol. Thèse Doctorat d'Etat, U.E.R. Sciences, Lille (1979).
155. **SIMONS S.S.**, **PONS M.**, **JOHNSON D.F.** : α ketomesylate : a reactive thiol-specific functional group.
J. ORG. CHEM. (1980) 45, 3084-3088.
156. **MARX M.** et **SMITH L.L.** : 21-nitrogen-substituted pregnane derivatives.
U.S. PATENT., 3,020, 275, 6 fev. 1962, 6 pp.
157. **LAURENT H.**, **GERHARDS E.** et **WIECHERT R.** : New biologically active pregnan-21 oic acid esters.
J. STEROID BIOCHEM. (1975) 6, 185-192.
158. **MASON H.L.**, **HOEHN W.M.**, **Mc KENZIE B.F.** et **KENDALL E.C.** : Chemical studies of the suprarenal cortex : III The structure of compounds A, B and H.
J. BIOL. CHEM. (1937) 120, 719-741.
159. **GLAXO** : Nouveaux stéroïdes : leur préparation et leurs applications.
Brevet France 7201852, 20 janv. 1972.
160. **KONIG W.** et **GEIGER R.** : Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden : Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolén.
CHEM. BER. (1970) 103, 788-798.
161. **CLARK J.H.** et **PECK E.J.Jr.** : Steroid receptor characterization and measurement. in Monographs on Endocrinology : steroid receptor characterization and measurement, eds J.H. CLARK, E.J. PECK, vol. XIV (1979) SPRINGER, Heidelberg, pp 4-25.

162. PETERFALVI M., TORELLI V., FOURNEX R., ROUSSEAU G., CLAIRE M., MICHAUD A. et CORVOL P. : Importance of the lactonic ring in the activity of steroidal antialdosterones.
BIOCHEM. PHARMACOL. (1980) 29, 353-357.
163. LEE H.J., BRALOW H.L., MORAN M.C. et SHERMAN M.R. : Binding of glucocorticoid 21-oic acids and esters to molybdate-stabilized hepatic receptors.
J. STEROID BIOCHEM. (1981) 14, 1325-1335.
164. ROUSSEAU G.G., KIRCHHOFF J., FORMSTECHER P. et LUSTENBERGER P. : 17 β -carboxamide steroids : a new class of glucocorticoid antagonists.
NATURE (1979) 279, 158-160.
165. RAFESTIN-OBLIN M.E., LOMBES M., LUSTENBERGER P., BLANCHARDIE P., MICHAUD A., CORNU G. et CLAIRE M. :
Affinity of corticosteroids for mineralocorticoid and glucocorticoid receptors of the rabbit kidney : effect of steroid substitution.
J. STEROID BIOCHEM. (1986) accepté pour publication
166. WALTERS R.R. : Affinity chromatography.
ANAL. CHEM. (1985) 57, 1099A-1114A.
167. DEAN P.D.G., JOHNSON W.S. et MIDDLE F.A. : Matrix preparations and applications. in Affinity Chromatography : a practical approach, eds P.D.G. DEAN, W.S. JOHNSON, F.A. MIDDLE (1985) IRL Press, Oxford, pp 1-30.
168. DEAN P.D.G., JOHNSON W.S. et MIDDLE F.A. : Activation procedures. in Affinity Chromatography : a practical approach, eds P.D.G. DEAN, W.S. JOHNSON, F.A. MIDDLE, 1985, IRL Press, Oxford, pp 31-59.
169. KOHN J. et WILCHEK M. : The use of cyanogen bromide and other novel cyanylating agents for the activation of polysaccharide resins.
APPLIED BIOCHEM. BIOTECHNOL. (1984) 9, 285-305.
170. AXEN R., PORATH J. et ERNBACK S. : Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides.
NATURE (1967) 214, 1302.
171. PORATH J., AXEN R. et ERNBACK S. : Chemical coupling of proteins to agarose.
NATURE (1967) 215, 1491-1492.
172. MARCH S.C., PARIKH I. et CUATRECASAS P. : A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography.
ANAL. BIOCHEM. (1974) 60, 149-152.
173. NISHIKAWA A.H. et BAILON P. : Affinity purification methods. Improved procedures for cyanogen bromide reaction on agarose.
ANAL. BIOCHEM. (1975) 64, 268-275.
174. SHARMA M. et SLAUNWHITE W.R. : Quantitation of alkylamino side chains coupled to agarose beads.
ANAL. BIOCHEM. (1975) 68, 79-86.
175. KOHN J. et WILCHEK M. : A colorimetric method for monitoring activation of Sepharose by cyanogen bromide.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1978) 84, 7-14.

176. KOHN J. et WILCHEK M. : A new approach (cyano-transfer) for cyanogen bromide activation of Sepharose at neutral pH, which yields activated resins, free of interfering nitrogen derivatives.
BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1982) 107, 878-884.
177. CUATRECASAS P., WILCHEK M. et ANFINSEN C.B. : Selective enzyme purification by affinity chromatography.
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1968) 61, 636-643.
178. STAGE D.E. et MANNICK M. : Covalent binding of molecules to CNBr-activated agarose : parameters relevant to the activation and coupling reactions.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA (1974) 343, 382-391.
179. KOHN J. et WILCHEK M. : Procedures for the analysis of cyanogen bromide activated Sepharose or Sephadex by quantitative determination of cyanate esters and imidocarbonates.
ANAL. BIOCHEM. (1981) 115, 375-382.
180. FAILLA D. et SANTI D.V. : A simple method for quantitating ligands covalently bound to agarose beads.
ANAL. BIOCHEM. (1973) 52, 363-368.
181. SCHMITT H.W. et WALKER J.E. : Coupling capacity of solid phase sequencing supports.
FEBS LETT. (1977) 81, 403-405.
182. DEAN P.D.G., JOHNSON W.S. et MIDDLE F.A. : Operationnal methodologies. *in* Affinity Chromatography : a practical approach, eds PDG DEAN, W.S. JOHNSON, F.A. MIDDLE (1985) IRL Press, Oxford, pp 75-98.
183. ARNON R., TEICHER E., BUSTIN M. et SELA M. : Preparation of antiserum to α -foetoprotein making use of estradiol affinity column.
FEBS LETT. (1973) 32, 335-338.
184. HIERONSKI M. et BRODERSEN R. : Covalent binding of bilirubin to agarose and use of the product for affinity chromatography of serum albumin.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA (1974) 354, 121-129.
185. NICOLAS J.C., PONS M., DESCOMPS B. et CRASTE DE PAULET A. : Affinity chromatography. Large scale purification of the soluble 17 B estradiol deshydrogenase from human placenta.
FEBS LETT. (1972) 23, 175-179.
186. WOLPERT J.S. et ERNST FONBERG M.L. : Hydroxamate assay quantitation of ligands covalently bound to affinity chromatography gels.
ANAL. BIOCHEM. (1973) 52, 111-117.
187. KOELSH R., LASH J., MARQUARDT I. et HANSON H. : A convenient method for the estimation of Sepharose-bound protein.
ANAL. BIOCHEM. (1977) 83, 778-781.
188. LOWE C.R. et DEAN P.D.G. : The principles of affinity chromatography. *in* Affinity chromatography, eds C.R. LOWE, P.D.G. DEAN (1974) JOHN WILEY and Sons, London, pp 12-86.
189. IDZIOREK T., FORMSTECHEK P., DANZE P.M., SABLONNIERE B., LUSTENBERGER P., RICHARD C., DUMUR V. et DAUTREVAUX M. : Characterization of the purified molybdate-stabilized glucocorticoid receptor from rat liver.
EUR. J. BIOCHEM. (1985) 153, 65-74.

190. BALLARD P.L., BAXTER J.D., HIGGINS S.J., ROUSSEAU G.G. et TOMKINS G.M. : General presence of glucocorticoid receptors in mammalian tissues.
ENDOCRINOLOGY (1974) 94, 998-1002.
191. GIANNOPOULOS G., HASSAN Z., et SOLOMON S. : Glucocorticoid receptors in fetal and adult rabbit tissues.
ENDOCRINOLOGY (1974) 94, 2424-2427.
192. GUILLAUME V., CORRIOL J. et PAPY J.J. : Une technique sûre d'anesthésie du lapin.
J. PHYSIOL. PARIS (1982) 79, 337-338.
193. BLANCHARDIE P., LUSTENBERGER P., ORSONNEAU J.L. et BERNARD S. : Physicochemical characterization and transformation of the cytosolic glucocorticoid receptor from rabbit liver.
J. STEROID BIOCHEM. (1983) 18, 789-799.
194. SECCO C., REDEUILH G., RADANYI C., BAULIEU E.E. et RICHARD-FOY H. : Purification en deux étapes du récepteur cytosoluble de l'oestradiol d'utérus de veau.
C.R. ACAD. SCI. PARIS (1979) 289, 907-910.
195. RATAJCZAK T. et HANNEL R. : Investigation of methods of estradiol receptor purification prior to affinity chromatography.
J. STEROID BIOCHEM. (1980) 13, 439-444.
196. PIKE J.W. et HAUSSLER M.R. : Purification of chicken intestinal receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D.
PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1979) 76, 5485-5489.
197. REDEUILH G., RICHARD-FOY R., SECCO C., TORELLI V., BUCOURT R., BAULIEU E.E. et RICHARD-FOY H. : Properties of biospecific adsorbents, obtained by immobilization of estradiol 7 α -derivatives for purification of calf uterine cytosol oestradiol receptor.
EUR. J. BIOCHEM. (1980) 106, 481-493.
198. DENIS M. : Chromatographie d'affinité biohormonale.
Mémoire D.E.A. Chimie Moléculaire, U.E.R. Sciences, Nantes (1985).
199. BLONQUIST C.H., KOTTS E.C. et HAKANSON E.Y. : A simple method for detecting steroid aggregation and estimating solubility in aqueous solutions.
ANAL. BIOCHEM. (1978) 87, 631-635.
200. COFFER A.I. et KING R.J.B. : An artefact associated with elution of steroid affinity resins by high concentrations of ligands.
J. STEROID BIOCHEM. (1979) 11, 1547-1549.
201. DE LARMINAT M.A., BRUCHOVSKY N., RENNIE P.S., LEE S.P. et TERTZAKIAN G. : Synthesis and evaluation of immobilized androgens for affinity chromatography in the purification of nuclear androgen receptor.
THE PROSTATE (1984) 5, 123-140.
202. PURI R.K., GRANDICS P., DOUGHERTY J.J. et TOFT D.O. : Purification of non transformed avian progesterone receptor and preliminary characterization.
J. BIOL. CHEM. (1982) 257, 10831-10837.
203. RENOIR J.M., YANG C.R., FORMSTECHER P., LUSTENBERGER P., WOLFSON A., REDEUILH G., MESTER J., RICHARD-FOY H. et BAULIEU E.E. : Chick oviduct progesterone receptor : purification of a molybdate-stabilized form and preliminary characterization.
EUR. J. BIOCHEM. (1982) 127, 71-79.

204. KROSOWSKY Z.S. et FUNDER J.W. : Purification of renal mineralocorticoid receptors using affinity chromatography. in International Symposium on the Adrenal Gland and Hypertension, PADOUE, Italie (1984).
205. SCHRADER W.T. : Methods for extraction and quantitation of receptors. in Methods in Enzymology : hormone action, eds B.W. O'MALLEY, J.G. HARDMAN, vol. 36 (1975), ACADEMIC PRESS, New York, pp 187-210.
206. MACART M. et GERBAUT L. : An improvement of the Coomassie Blue dye binding method allowing an equal sensitivity to various proteins : application to cerebrospinal fluid.
CLIN. CHIM. ACTA (1982) 122, 93-101.
207. TAL M., SILBERSTEIN A. et NUSSER E. : Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins ? A partial answer.
J. BIOL. CHEM. (1985) 260, 9976-9980.
208. SHERMAN M.R. : Physico-chemical analysis of steroid hormone receptors. in Methods in Enzymology : Hormone Action, eds B.W. O'MALLEY, J.G. HARDMAN, vol. 36 (1975) ACADEMIC PRESS, New York, pp 211-234.
209. SIEGEL L.M. et MONTY K.J. : Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA (1966) 112, 346-362.
210. WEATHERILL P.J. et BELL P.A. : Comparison of the physical characteristics of the molybdate-stabilized glucocorticoid receptor from rat, pig and human tissues.
J. STEROID BIOCHEM. (1984) 21, 287-291.
211. BACK S.A. et ALHADEFF J.A. : Differential isoelectric focusing properties of crude and purified human α_2 -macroglobulin and α_2 -macroglobulin proteinase complex.
J. CHROMATOGR. (1983) 278, 43-51.
212. BANERJI A. et KALIMI M. : Development of an $|^3\text{H}|$ glucocorticoid exchange assay in rat liver cytosol.
STEROIDS (1981) 37, 409-421.
213. HARRISON R.W., WOODWARD C. et THOMPSON E. : Titratable effects of p-chloromercuri-phenylsulfonate, a thiol attacking reagent, on glucocorticoid receptor binding.
BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA (1983) 759, 1-6.
214. RENOIR J.M. et MESTER J. : Chick oviduct progesterone receptor : structure, immunology, function.
MOL. CELL. ENDOCRINOL. (1984) 37, 1-13.

APPENDICE TECHNIQUE

I - MATERIEL BIOLOGIQUE

- Préparation du cytosol

Les animaux, rats Wistar mâles (200 à 250 g) ou lapins Fauve de Bourgogne mâles (2000 à 2500 g), sont surrénalectomisés sous anesthésie générale et maintenus en régime normal avec de l'eau salée (NaCl 9‰) ad libitum. Trois jours après l'opération, les animaux sont sacrifiés. Le foie est prélevé rapidement et perfusé avec du soluté physiologique, puis du tampon P_i 20 refroidis à 4°C, jusqu'à blanchissement complet de l'organe. Toutes les manipulations ultérieures sont réalisées à +4°C. Les foies sont épongés, pesés, coupés en petits morceaux, et additionnés de tampon P_i 20 (2 ml par g de tissu). Le broyage et l'homogénéisation sont réalisés au Potter. Une centrifugation de 15 minutes à 3500 g permet d'éliminer le culot. Le surnageant est centrifugé à 105000 g pendant 2 heures à +4°C. Après élimination de la couche lipidique, le surnageant ou cytosol est récupéré par aspiration. Le pH est ajusté à 7,4 à l'aide de K₂HPO₄ 1 M. Il est conservé à -70°C plusieurs mois sans qu'il y ait altération du récepteur.

II - SYNTHESES CHIMIQUES

1) Oxydation de la dexaméthasone (Glaxo Fr 7201852, Janv 20,1972)

1,6 mM de dexaméthasone (ROUSSEL UCLAF) sont dissoutes dans 32 ml de méthanol, puis 9,6 ml d'une solution d'acide periodique à 10% (p/v) sont ajoutés. Le mélange est laissé sous agitation pendant 3 heures à température ambiante. La solution est concentrée sous pression réduite au 1/4 de son volume. Le précipité qui se forme est récupéré et lavé rapidement. Le produit brut est purifié, par dissolution dans l'acétate d'éthyle, extraction en milieu alcalin (Na HCO₃ 0,1 M) et reprecipitation en milieu acide. Le produit purifié DXO est contrôlé en CCM (CHCl₃ / CH₃OH 4:1, R_F = 0) rendement 80-85%.

2) Préparation des 17 β carboxamides (STEROIDS, 1980, 35, 265-272)

1 mM de DXO est dissoute dans 30 ml de CH₂Cl₂ ou de THF, puis 1,5 mM d'HOBT et 1,1 mM de DCCI sont ajoutées dans cet ordre. Après

15 heures sous agitation à 4°C, le précipité de DCU qui s'est formé est éliminé. Au filtrat est ajouté un excès de 2 à 5 fois d'amine. Le mélange est maintenu à 4°C et la réaction apparaît complète après 1 heure. Le milieu réactionnel est dilué à 200 ml avec du CH_2Cl_2 et lavé par 3 x 50 ml NaHCO_3 0,1 M, 3 x 50 ml HCl N, puis 3 x 50 ml d'eau. La phase organique séchée sur Na_2SO_4 est évaporée sous pression réduite. Le produit brut est contrôlé en CCM (cf tableau III) et purifié par cristallisation dans le méthanol. Rendement 70%.

N.B. : Pour le dérivé DXN, les phases HCl sont alcalinisées et réextraites par 3 x 50 ml de CH_2Cl_2 qui sont séchées et évaporées pour obtenir le produit brut.

III - PREPARATION DU GEL D'AFFINITE

1) Activation au bromure de cyanogène.

a) Protocole de MARCH (ANAL. BIOCHEM, 1974, 60, 149-152).

Après lavage du Sepharose CL 4B (Pharmacia) à l'eau, 1 volume de gel est mis en suspension dans 1 volume de tampon phosphate 5 M pH 11,9. Dans le mélange sous agitation, est ajouté de 0,005 à 0,1 volume d'une solution de bromure de cyanogène (100 g/50 ml d'acétonitri-le) selon le degré de substitution souhaité (cf figure 11).

Après 2 minutes de contact, le gel est transféré sur un fritté et lavé à 4°C dans l'ordre par 5 à 10 volumes de tampon bicarbonate 0,1 M pH 9,5, 5 à 10 volumes d'eau distillée et 5 à 10 volumes de tampon bicarbonate 0,2 M pH 9,5. Ce lavage ne doit pas excéder 2 minutes. Le gel est alors transféré dans 1 volume de la solution de diamine (0,02 à 2 M en tampon bicarbonate 0,2 M ajusté à pH 10) refroidie à 4°C. La réaction de couplage est poursuivie pendant 24 heures. Le gel est ensuite lavé par 20 volumes de tampon acétate 0,1 M pH 4,0, 20 volumes d'une solution d'urée 2 M, 20 volumes de tampon bicarbonate 0,1 M pH 10 (ces trois solutions renferment également 0,5 M NaCl) puis 20 volumes d'eau distillée. Le gel est conservé en présence de 0,02% NaN_3 à 4°C.

	Quantité BrCN en mg/ml de gel	Concentration de la solution d'amine	Degré de substitution $\mu\text{M/ml}$
<u>Diaminohexane</u>	10	0,02 M	0,1 - 0,4
	10	2 M	1,4 - 2,0
	12,5	0,2 M	2,5 - 3,0
	25	0,2 M	3,0 - 3,5
<u>Diaminononane</u>	10	0,02 M	0,2 - 0,5
	10	0,5 M	1,5 - 2,5
<u>Diaminododécane</u>	10	0,02 M	0,2 - 0,5
	10	0,5 M	1,2 - 2,0

Les solutions de diaminododécane sont préparées dans un mélange eau/éthanol.

b) Activation par transfert (BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 1982, 107, 878-888).

Après lavage du Sépharose CL 4B à l'eau, 1 volume de gel est amené graduellement dans l'acétone à 60% et refroidi à -15°C . Dans le mélange sous agitation, est ajouté le volume nécessaire de la solution de bromure de cyanogène (100 g/50 ml d'acétonitrile), puis en 1 minute un excès de 1,5 fois de triéthylamine (solution 1,5 M dans l'acétone à 60%). Cette phase ne doit pas excéder 3 minutes. Le mélange est transféré dans 10 volumes d'un mélange à parties égales acétone/HCl 0,1 N refroidi à -15°C . Le gel est alors lavé avec 2 volumes d'acétone à 60%, 2 volumes d'un mélange acétone 60%/DMF (1/1) puis 2 volumes de DMF. Le gel est transféré dans 1 volume de solution de diamine (0,01 M dans le DMF) et le couplage est poursuivi pendant 24 heures.

Après couplage, un protocole de lavage en tampons acétate, bicarbonate et en urée, identique au précédent, déjà décrit est réalisé.

Quantité de BrCN en mg/ml de gel	Degré de substitution $\mu\text{M/ml}$
0,5	0,28
1	0,45
2	0,88

2) **Dosage des amines libres** (FEBS Lett., 1977, 81, 403-405 et J. Chromatogr., 1980, 193, 451-457).

0,5 ml de gel mesurés avec précision sont lavés avec 10 ml de DMF. Le réactif au 2-hydroxynaphtaldéhyde (solution 0,2 M dans le DMF) est ajouté (10 ml). Le tube est laissé sous agitation pendant 15 heures. Après lavage par 4 fois 10 ml de DMF, puis 4 fois 10 ml d'éthanol, 9,5 ml d'une solution de benzylamine (0,4 M dans l'éthanol) sont ajoutés. Après 15 heures d'agitation, la densité optique du surnageant est mesurée à 420 nm, et la concentration en amine calculée d'après $\epsilon = 10,9.10^3$.

3) **Couplage au DXO** (J. STEROID BIOCHEM., 1981, 14, 697-703)

Une dilution isotopique au 1/100.000, soit 0,4 mCi/mM de dexaméthasone est soumise au protocole décrit § II, afin de préparer l'ester activé. La solution d'ester activé (0,1 mM) est filtrée et ajoutée au gel (20 à 50 ml), préalablement amené en milieu THF par paliers progressifs. Le milieu est laissé pendant 15 heures sous agitation à 4°C, puis 24 heures à température ambiante. Le gel est alors rincé abondamment en THF et CH₃OH par paliers successifs de 10 à 20 volumes de solvant, puis ramené graduellement dans l'eau distillée.

La conservation du gel se fait à 4°C en présence d'azide de sodium. Le dosage du ligand fixé est réalisé par comptage d'un aliquote ou par dosage différentiel des amines.

IV - MESURE DE LA LIAISON HORMONE-RECEPTEUR

1) **Mesure de la capacité de liaison spécifique de la [³H] dexaméthasone** (J. MOL. BIOL., 1972, 67, 90-115)

0,5 ml de cytosol ou d'une dilution au 1/11 de l'extrait sulfate de protamine sont incubés en présence de 2.10^{-8} M [³H] dexaméthasone (Amersham 40 Ci/mmol tritiée en 1,2 et 4). Une incubation analogue en présence d'un excès 1000 fois de dexaméthasone froide est faite en parallèle. Les incubations sont réalisées en double pendant 16 heures à 0°C. La radioactivité liée est mesurée par la technique au

charbon dextran. A la fin de l'incubation, 0,2 ml d'incubat sont ajoutés à 0,1 ml de suspension de charbon (charbon activé Norit 3% et dextran T 70 0,3% dans du tampon Tris 10 mM, pH 7,5). Chaque incubat est traité en double. Après 10 secondes d'agitation au Vortex et 10 minutes de contact, les tubes sont centrifugés à 3500 g pendant 5 minutes. 0,15 ml de surnageant sont prélevés et mélangés à 2 ml de scintillant.

La liaison spécifique est calculée par différence de la moyenne des 4 résultats obtenus pour l'incubation en présence d'hormone tritiée et la moyenne de ceux obtenus en présence de l'excès d'hormone froide, et ramenée en cpm.ml^{-1} .

2) Mesure de l'affinité des stéroïdes compétiteurs.

a) Compétition en présence d'une concentration constante en ligand de référence.

Des aliquotes de cytosol (0,5 ml) sont incubés en présence de 10^{-8} M ^3H dexaméthasone et en l'absence ou présence de concentrations croissantes (10^{-8} à 10^{-5} M) de stéroïdes compétiteurs. Après 16 heures d'incubation, la liaison spécifique de l'hormone tritiée est mesurée. A partir de l'inhibition de liaison induite par le compétiteur, les courbes de compétition qui sont tracées permettent de calculer I_{50} : concentration en compétiteur inhibant 50% de la liaison spécifique.

La formule
$$K_I = \frac{K_D}{F_{50} + K_D} \times |I_{50}|$$

K_D Constante de dissociation du ligand de référence

F_{50} Concentration en ligand de référence

permet de calculer la constante d'inhibition K_I .

b) Compétition en présence d'une concentration constante en compétiteur.

Des aliquotes de cytosol (0,5 ml) sont incubés en présence de concentrations croissantes en ^3H dexaméthasone ($2,5 \cdot 10^{-9}$ à $3,5 \cdot 10^{-8}$ M) et en l'absence ou en présence d'une concentration constante en compétiteur ($|\text{compétiteur}| = K_i$). Après 16 heures d'incubation, la liaison spécifique de l'hormone tritiée est mesurée. A partir des courbes $1/B$, en fonction de $1/F$, les constantes d'inhibition sont

calculées d'après les valeurs des abscisses à l'origine.

3) Mesure du déplacement.

Des aliquotes de cytosol (0,5 ml) sont incubés en présence d'une concentration saturante (10^{-6} à 10^{-4} M) en stéroïde compétiteur, pendant 16 heures à 0°C. Au temps zéro, 10^{-7} M de ^3H dexaméthasone sont ajoutés dans les incubats et dans un témoin qui n'a eu aucun traitement. Les tubes sont maintenus à 0°C. La liaison spécifique de l'hormone tritiée est mesurée après des intervalles de temps réguliers entre 30 minutes et 16 heures. Les courbes de déplacement sont tracées à partir de la liaison spécifique exprimée par rapport au témoin en fonction du temps.

V - PURIFICATION DU RECEPTEUR

1) Précipitation par le sulfate de protamine (EUR. J. BIOCHEM., 1978, 89, 95-104).

Un volume de cytosol est amené à 0,075% en sulfate de protamine par addition goutte à goutte d'une solution à 0,5% de sulfate de protamine. Le mélange est maintenu sous agitation. Après 30 minutes, le précipité est récupéré par centrifugation 10 minutes à 20000 g et remis en suspension dans un 1/5 de volume de tampon P_i 160. Après homogénéisation au potter, le mélange est centrifugé 30 minutes à 100000 g. Le surnageant ou extrait sulfate de protamine est utilisé immédiatement.

2) Chromatographie d'affinité.

Adsorption

1 ml de gel est lavé et équilibré en tampon P_i 160. Le gel est alors ajouté à 40 ml d'extrait sulfate de protamine et la suspension agitée pendant 15 heures sur un agitateur rotatif. Un aliquote de surnageant est prélevé au temps zéro et à la fin de l'étape d'adsorption pour mesurer la capacité de liaison de la ^3H dexaméthasone.

Lavage

A l'arrêt du batch, le mélange est transféré dans une colonne (2,5 cm) et le gel est lavé à 4°C par 30 ml de tampon P_i 160, 30 ml de tampon P_i 160 + 0,4 M KCl, 30 ml de tampon P_i 20, et enfin 30 ml de tampon P_i 160 réchauffé à 25°C. Le débit est de 10 ml/mn, et l'ensemble des lavages est effectué en moins de 20 minutes. Des aliquotes de chaque lavage sont gardés pour le dosage des protéines et la mesure de la liaison de la ³H dexaméthasone.

Elution

4,5 ml de solution éluante (5.10⁻⁶ M ³H dexaméthasone dans le tampon P_i 160, activité spécifique 13 Ci/mmol) sont ajoutés et la colonne bouchée est agitée pendant 3 heures à 18°C. L'éluat est recueilli par gravité et congelé à -70°C par fractions de 0,5 ml.

Mesure de la liaison spécifique

Pour les échantillons purifiés, nous utilisons une technique à l'hydroxyapatite. 0,5 ml d'une suspension (200 mg/ml en tampon Tris 0,01 M) d'hydroxyapatite (DNA grade, BIORAD, USA) sont dilués à 1 ml avec du tampon P_i 20. Un aliquote de la préparation purifiée est dilué au 1/5 avec du tampon P_i 20 additionné de sérum albumine (2 mg/ml). 0,125 ml de cette dilution sont ajoutés à la suspension d'hydroxyapatite. Après 10 minutes de contact, le tube est centrifugé et le surnageant éliminé par aspiration. Cinq lavages par 2 ml de tampon sont effectués. La radioactivité est extraite par addition de 1 ml d'éthanol au gel. Après 15 minutes à 30°C, 0,8 ml de surnageant éthanol sont prélevés pour comptage. Une mesure en parallèle est faite en présence de solution éluante à la place de l'échantillon purifié, pour estimer la liaison non spécifique. Les résultats sont ramenés en cpm/ml en tenant compte des dilutions de l'échantillon et de l'isotope.

3) Chromatographie d'exclusion haute performance.

L'éluat de chromatographie d'affinité est concentré par chromatographie sur DEAE Trisacryl dans les conditions suivantes : colonne (1,5 x 1,1 cm) de DEAE Trisacryl équilibrée en tampon P_i 20, débit 36 ml/h, dilution au 1/5 de l'échantillon en tampon P_i 20, lavage avec 20 ml de tampon P_i 20 et élution par 2 ml de tampon P_i 160.

Des fractions de 0,5 ml de l'éluat concentré sont déposées sur une colonne (60 x 0,75 cm) Ultropac TSK G 3000 (LKB, Suède) réfrigérée à 4°C et connectée à un ensemble HPLC Waters 440. L'élution est réalisée en tampon T20 à un débit de 48 ml/h. Des fractions de 1 minute sont collectées, un aliquote de 0,02 ml de chaque fraction est prélevé pour le comptage. Les fractions renfermant la radioactivité liée sont regroupées et congelées à -70°C. La liaison spécifique est évaluée d'après la radioactivité présente dans les fractions et contrôlée par la technique à l'hydroxyapatite (cf paragraphe précédent).

VI - CARACTERISATION DU RECEPTEUR

1) Analyse par gel filtration

Gel filtration basse pression

Une colonne (90 x 1,6 cm) d'Ultrogel AcA 34 (IBF, France) est équilibrée en tampon P_i 160. Les échantillons, 0,5 ml, sont élués dans le même tampon à un débit de 7,5 ml/h à 4°C. La calibration est réalisée avec les protéines suivantes : chymotrypsinogène A (R_S 2,2 nm), ovalbumine (R_S 2,9 nm), sérum albumine bovine (R_S 3,6 nm), catalase (R_S 5,2 nm) et ferritine (R_S 6,1 nm). Le volume exclu (V_o) est mesuré avec du Bleu dextran 2000 et le volume total (V_t) par chromatographie de bichromate de potassium. La courbe d'étalonnage est construite selon les recommandations de PORATH (PURE APPL. CHEM., 1963, 6, 233-241) par régression linéaire de K_D^{1/3} en fonction de R_S.

Dans ces conditions d'analyse, la ferritine forme des agrégats et le profil d'élution est difficilement interprétable. Le rayon de Stokes du récepteur a été de ce fait déterminé par extrapolation linéaire de la courbe d'étalonnage.

Chromatographie d'exclusion haute performance

Une colonne Ultropac TSK G 3000 équipée d'une précolonne et connectée à un appareil WATERS 440 (pompe 6000 A, injecteur U6K et détecteur modèle 480) est équilibrée en tampon T20. L'élution est réalisée avec un débit de 48 ml/h. La calibration et l'exploitation des

résultats est faite comme précédemment avec comme standards : thyroglobuline (R_S 8,5 nm), sérum albumine bovine (R_S 3,6 nm), ovalbumine (R_S 2,9 nm) et inhibiteur trypsique du Soja (R_S 1,1 nm).

2) Chromatographie d'échange d'ions

DEAE Trisacryl et phosphoultrogel (IBF, France) et hydroxylapatite DNA grade (BIORAD, USA) sont préparés selon les recommandations du fabricant. Des colonnes (1,5 x 1,1 cm) sont remplies et équilibrées en tampon P_i 20 (DEAE et HAP) ou T10 (P.U.). Les échantillons sont dilués au 1/10e dans le tampon d'équilibration avant le dépôt. Un lavage de 10 ml par le même tampon précède l'élution en gradient linéaire de 0,02 à 0,4 M phosphate dans le tampon P_i 20 (DEAE et HAP) et de 0 à 0,4 M NaCl dans le tampon T10 (P.U.). Le débit est de 36 ml/h. Des fractions de 2 minutes sont recueillies.

3) Ultracentrifugation analytique

Des gradients linéaires 5-20% (p/v) de saccharose dans le tampon P_i 20 sont préparés. Les échantillons (0,2 ml) sont déposés à la surface. La centrifugation est poursuivie pendant 24 heures à 280000 g (BECKMAN L5/50 équipée d'un rotor SW 50, 6 x 5 ml). Un mélange de protéines standards, catalase (11,2 S), aldolase (7,35 S), albumine (4,6 S), myoglobine (2 S) est analysé séparément lors de chaque expérience. Des fractions de 7 gouttes sont récupérées par gravité après ponction de la base du tube. L'estimation des coefficients de sédimentation est réalisée selon MARTIN et AMES (J.BIOL.CHEM., 1962, 236, 1372-1382).

4) Isoélectrofocalisation

Les plaques d'agarose de 1 mm épaisseur (245 x 110 mm) sont préparés 24 à 72 heures avant l'utilisation et gardées à +4°C. Le mélange chaud : agarose 1% (w/v), sorbitol 12% (w/v) et ampholines pH 3-10 (PHARMACIA, Suède) 0,6% (v/v), est coulé sur une plaque polyester hydrophile Gelbond (PHARMACIA, Suède). Les échantillons (0,02 ml) sont appliqués à 2-3 cm de la cathode au moyen de petits carrés de papiers WHATMAN posés sur le gel. La migration est faite sous puissance constante 15 W pour une tension de 1500 volts maximum et un courant

illimité. L'intégration volt/heure permet d'arrêter la migration dans des conditions reproductibles après 2000 volts/heure. La température de la cuve est maintenue à 0-4°C, par circulation d'eau. Après migration, les couloirs de gels renfermant les échantillons sont découpés en bandes de 2 mm. Les couloirs témoins où ont migré des protéines standard (broad pI calibration kit PHARMACIA) sont colorés au bleu de Coomassie. Une courbe de calibration, distance de migration en fonction du pH, est établie à partir des protéines standards.

5) **Electrophorèse sur gel de polyacrylamide** (LAEMMLI, U.K., NATURE, 1970, 227, 680-685).

Des plaques d'acrylamide 5-20%, de 1,5 mm d'épaisseur (150 x 150 mm) sont préparées selon le protocole de LAEMMLI avec le matériel et les accessoires électrophorèse verticale LKB. Les échantillons sont concentrés par précipitation en présence d'acide trichloracétique (10%) et de SDS (0,1%). Le culot est rincé par un mélange éther/éthanol (1,1) et repris par 0,2 ml de tampon d'électrophorèse additionné de 1% SDS et 1% mercaptoéthanol. Après 3 minutes d'ébullition, les échantillons (0,05 ml) sont déposés en présence de glycérol 10% et de bleu de bromophénol.

La migration est faite à 15°C sous 45 mA/plaque pendant 4 heures. Les étapes de fixation et de coloration par le nitrate d'argent sont effectuées selon le protocole de MERRIL et al. (SCIENCE, 1981, 211, 1437-1438). La courbe de calibration, mobilité relative des protéines en fonction du logarithme du poids moléculaire, est construite selon OSBORN (J. BIOL. CHEM., 1969, 244, 4406-4412).

VII - TRANSFORMATION DU RECEPTEUR

1) Dessalage et transformation.

Les échantillons purifiés sont chromatographiés sur une colonne (9 x 1,1 cm) de Trisacryl GF 05 en tampon P_i 20-molybdate supplémenté avec 2 mg/ml de sérum albumine à un débit de 30 ml/h. Le volume exclu est supplémenté avec 0,4 M KCl et divisé en deux fractions, dont l'une additionnée de 0,01 M molybdate, sert de témoin. Les tubes sont alors

placés au bain-marie à 25°C pendant 30 minutes.

2) Caractérisation du récepteur transformé et mesure du taux de transformation.

Avant la caractérisation, la transformation est arrêtée par addition de 0,01 M molybdate, et refroidissement des tubes à 0°C.

La caractérisation est réalisée simultanément sur les deux échantillons (témoin et transformé) par les techniques suivantes :

- chromatographie d'échange d'ions sur phosphoultrogel
- chromatographie d'exclusion de gel HPLC
- incorporation aux noyaux isolés : des noyaux d'hépatocytes de lapins sont préparés selon TATA (METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. XXXI, 1974, pp 253-262) et contrôlés par examen microscopique. Le contenu en DNA est mesuré par la technique de KAPUSCINSKI et SKOCZYLAS (ANALYT. BIOCHEM., 1977, 83, 252-257). L'incorporation du récepteur transformé est effectuée en ajoutant 0,05 ml de préparations purifiées à une suspension de noyaux (équivalent à 200 µg de DNA) dans 0,5 ml de tampon TKM. Après 30 minutes, l'incubation à 0-4°C sous agitation douce, les noyaux sont récupérés par centrifugation et lavés 4 fois par 1 ml de TKM. Le culot est alors prélevé et compté.

VIII - MISCELLANEEES

1) Dosage des protéines.

La méthode de Coomassie est utilisée avec le réactif proposé par MACART et GERBAUT (CLIN. CHIM. ACTA, 1982, 122, 93-101). Le dosage est réalisé sur appareil COBAS (HOFFMAN-LAROCHE, Suisse) selon deux programmes différents. La sérum albumine bovine sert d'étalon.

2) La radioactivité est mesurée par scintillation dans un compteur β BECKMAN LS 2800. Les échantillons (0,1 - 0,2 ml) sont mélangés à 2 ml de Ready Solv HP^b (BECKMAN, USA). L'efficacité du comptage est de 45% environ. L'atténuation de comptage est corrigée automatiquement par le compteur.

3) Tampons.

P_i 20 : phosphate 20 mM, molybdate 10 mM, β mercaptoéthanol 20 mM, glycérol 20% (v/v), pH 7,4 à 4°C

P_i 20 molybdate : idem P_i 20 en l'absence de molybdate.

P_i 160 : phosphate 160 mM, molybdate 10 mM, β mercaptoéthanol 20 mM, glycérol 20% (v/v), pH 7,4 à 4°C.

TKM : Tris 5 mM, MgCl₂ 5 mM, KCl 2,5 mM, molybdate 10 mM, pH 7,5 à 4°C.

T₂₀ : Tris 20 mM, molybdate 10 mM, KCl 400 mM, pH 7,0 à 4°C.

NOM : LUSTENBERGER

Prénom : Patrick

Titre de Thèse :

La chromatographie d'affinité des récepteurs des hormones stéroïdes : application à la purification du récepteur des glucocorticoïdes du foie de lapin.

RESUME

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude du mécanisme d'action des hormones glucocorticoïdes.

La mise au point d'un gel d'affinité spécifique a été réalisée en étudiant les divers paramètres : nature du ligand et son immobilisation ; type de support et son activation ; nature du bras espaceur et degré de substitution du gel. La matrice d'affinité retenue comporte un dérivé de la dexaméthasone couplé sur un bras aliphatique comportant douze atomes de carbone. Cette démarche a été appliquée à la préparation de gels d'affinité destinés à la purification d'autres récepteurs des hormones stéroïdes.

Un protocole de purification du récepteur des glucocorticoïdes sous forme non transformée du foie de lapin a été élaboré. Une étape de précipitation par le sulfate de protamine précède la chromatographie d'affinité. Après élution biospécifique, l'étape finale met en oeuvre la chromatographie d'exclusion haute performance et aboutit à une préparation purifiée 8000 fois environ avec un rendement de 20%. Cette fraction purifiée a été caractérisée du point de vue physicochimique et s'est révélée identique à la protéine native présente dans le cytosol.

Après élimination du molybdate, le récepteur purifié a été soumis à des conditions induisant sa transformation. La forme transformée a été également caractérisée. Ces résultats montrent que le récepteur purifié reste fonctionnel in vitro si l'on se réfère aux caractéristiques physicochimiques.



Mots-clés :

Récepteur des glucocorticoïdes ; chromatographie d'affinité ; purification ; caractérisation.