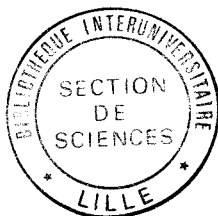


50376
1986
245

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376
1986
845

Année 1986



N° d'ordre : 705

THÈSE

présentée à l'Université de Lille I

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES
OPTION BIOCHIMIE

par

Pierre FORMSTECHE

LE SITE DE LIAISON AUX STEROIDES DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES

**CARACTERISATION A L'AIDE DE SONDES
MOLECULAIRES DIVERSES**

présentée le 28 novembre 1986 devant la Commission d'Examen

JURY

Président : Professeur J. MONTREUIL

Rapporteurs : Professeur M. DAUTREVAUX

Professeur B. DESCOMPS

Professeur G. SPIK

Examineurs : Professeur E. BAULIEU

Professeur S. BERNARD

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, GONTIER, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNIQUES DE LILLE

MM. M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie animale
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BRASSELET Jean-Paul	Géométrie et topologie

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CAYATTE Jean-Louis	Sciences économiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean-Jacques	Biologie
Mle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences économiques
M. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean-Paul	Spectrométrie des solides
M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.P.A.)
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUARÉ Yves	Optique atmosphérique
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographique
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GREGORY Pierre	I.P.A.
M. GREMY Jean-Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.P.A.)
M. JOURNAL Gérard	Spectroscopie hertzienne

M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.P.A.)
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MONTEL Marc	Physique du solide
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PASZKOWSKI Stéphan	Analyse numérique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROBINET Jean-Claude	E.U.D.I.L.
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STAROSWIECKI Marcel	Informatique
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
Mme TJOTTA Jacqueline	Mathématiques
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. WALLART Francis	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
Mme ZINN Justin Nicole	Algèbre

J'exprime ici ma gratitude à mes Juges :

Monsieur le Professeur J. MONTREUIL,

Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de présider le Jury de cette Thèse. J'ai gardé un souvenir vivace de vos cours dispensés dans le cadre de l'enseignement de la Biologie Humaine. Leur clarté, l'enthousiasme que vous y mettiez, l'ouverture permanente qu'ils offraient vers les questions essentielles de la biologie, font qu'ils restent pour moi un modèle de pédagogie scientifique. Veuillez accepter, avec mes remerciements sincères, l'expression de mon profond respect.

Monsieur le Professeur M. DAUTREVAUX

C'est une grande joie pour moi de vous compter parmi mes Juges. Il a y maintenant plus de dix ans que m'avez accueilli dans votre laboratoire. Vous avez guidé avec beaucoup de bienveillance et de compétence mes premiers travaux. Vous avez contribué puissamment par la rigueur et la clarté de vos avis à l'orientation ultérieure de mes recherches. Vous avez su encourager mon goût pour le travail en équipe et tout à la fois restructurer votre groupe de recherches et lui permettre une ouverture vers l'extérieur. Soyez-en remercié, ainsi que de la confiance que vous me témoignez pour l'accomplissement des tâches d'enseignements et d'encadrement hospitalier que vous m'avez confiées. Soyez assuré de toute ma reconnaissance et de mon fidèle attachement.

Monsieur le Professeur B. DESCOMPS

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter d'être le rapporteur de cette thèse. Vous avez déjà témoigné dans le passé de l'intérêt que vous portiez aux travaux réalisés dans notre laboratoire, en tant que Membre du Conseil Scientifique du LA-CNRS n° 268. Soyez-en remercié et acceptez le témoignage de ma profonde gratitude.

Mademoiselle le Professeur G. SPIK

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter d'être également le rapporteur de cette thèse. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à ce travail. C'est avec un vif plaisir que je partage avec vous l'enseignement sur les récepteurs du nouveau DEA commun à nos deux Universités. Soyez assurée de ma respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur E. BAULIEU

Vous m'avez fait l'honneur et le plaisir d'accepter de juger ce travail. Vous m'avez accueilli au tout début de mes travaux et vous m'avez permis un stage de formation accélérée à la manipulation des récepteurs des hormones stéroïdes. Surtout vous avez su écouter mes projets de jeune chercheur, discuter mes idées et me proposer vos conseils avec une disponibilité et une ouverture d'esprit qui m'ont marqué. La suite de mes travaux a été l'occasion d'une collaboration fructueuse avec vos chercheurs pour la purification du récepteur de la progestérone. Vous êtes resté constamment ouvert à l'échange des idées au cours des quelques séminaires auxquels mes collaborateurs et moi-même avons participé dans votre laboratoire. Enfin vous m'avez témoigné votre confiance en me faisant l'amitié d'accueillir dans votre formation un de mes jeunes collaborateurs. Soyez remercié pour tout cela et veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance sincère.

Monsieur le Professeur S. BERNARD

Votre présence dans ce Jury témoigne de la longue amitié qui vous lie aux biochimistes lillois. Vous avez envoyé un de vos élèves à Lille pour qu'il s'y forme et mette ainsi un peu ses pas dans les vôtres. Je crois, et Patrick Lustenberger ne me contredira sans doute pas, que vous avez réussi au-delà de toute espérance. Ce stage a été l'occasion d'une rencontre et le départ d'une grande amitié entre les deux jeunes chercheurs que nous étions. Cette amitié a survécu au retour de votre élève dans votre laboratoire dont les liens avec le nôtre se sont resserrés en une étroite collaboration. J'ai eu l'occasion d'apprécier la chaleur de votre accueil au cours de nombreux déplacements à Nantes. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

C'est avec plaisir que je remercie tous ceux qui ont contribué à ce travail :

Patrick LUSTENBERGER pour la collaboration de tous les instants qui nous a unis durant ses trois années de séjour dans le laboratoire où nous avons travaillé ensemble au développement des dérivés 17 β -carboxamides et des gels d'affinité applicables à la purification des récepteurs stéroïdiens.

Madame T.N. DAO pour sa collaboration technique, son dévouement et sa gentillesse dont j'ai le privilège de bénéficier depuis le début de mes travaux.

Viviane DUMUR pour la part capitale qu'elle a prise dans l'étude de l'interaction des maléimides N-substituées avec le récepteur. Sa grande expérience de la Biochimie, sa patience, son inaltérable bonne humeur, jointes aux remarquables qualités d'expérimentatrice de Pascaline TOULOUSE ont permis au prix d'efforts méritoires de mener à bien cette partie délicate de notre travail.

Pierrette MAES pour les deux ans qu'elle a passé avec moi à l'étude systématique des corrélations structure-activité dans la série des 17 β -carboxamides de la dexaméthasone. Son opiniâtreté et son sens de l'organisation ont contribué à l'acquisition de résultats importants.

Que tous les autres membres de l'équipe des récepteurs, Bernard SABLONNIERE, Pierre-Marie DANZE, Claude RICHARD, Bernadette MASSELOT et Françoise DELPORTE, ainsi que nos thésards Stéphane BLICQ, Philippe LEFEBVRE, Hocine HAMMADI, Nouredine BOUZERNA et Youness BELHASSEN soient également assurés de ma sympathie. Certains d'entre eux développent de nouveaux prolongements aux travaux qui font l'objet de cette thèse, tous contribuent à l'excellente ambiance et au climat amical qui règne dans le laboratoire. Qu'ils en soient remerciés.

Enfin je n'aurai garde d'oublier Madame A. MORANDI pour sa collaboration efficace, dont la frappe de ce volumineux manuscrit n'est pas le moindre exemple, et Madame MOREL qui veille à l'entretien du laboratoire et de l'animalerie.

Mes remerciements s'adressent également à :

Monsieur le Professeur G.G. ROUSSEAU et ses collaborateurs pour leur rôle capital dans la démonstration de l'activité antiglucocorticoïde des 17 β -carboxamides.

Monsieur L. DEVOS pour l'étude radiocristallographique des deux 17 β -carboxamides de la dexaméthasone.

Monsieur le Professeur A. TARTAR pour l'application des programmes de prévision de structure protéique à la séquence primaire du récepteur des glucocorticoïdes du rat et la discussion des résultats fournis par ces calculs.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biochimie Structurale de la Faculté de Médecine de Lille, dirigé par le Professeur M. DAUTREVAUX.

Il a bénéficié ou bénéficie encore des soutiens suivants :

- C.N.R.S., au titre du Laboratoire Associé n° 268 (Professeur BISERTE) jusqu'en 1983.
- I.N.S.E.R.M., C.R.E. n° 854.008 : "Etude structurale et fonctionnelle du récepteur des glucocorticoïdes du foie de rat purifié sous forme non transformée.
- C.E.E.. Stimulation Action Contract n° ST2J-0075-1-B (CD) : "Hormonal Control of eucaryotic gene expression : joint study on the interaction of steroid and thyroid hormone receptors with cloned genes and its physiological significance".

Une partie du travail rapporté dans cette thèse a déjà fait l'objet des publications, communications et mémoire suivants :

A) PUBLICATIONS

- Rousseau, G.G., Kirchhoff, J., Formstecher, P. and Lustenberger, P. (1979) 17 β -carboxamide steroids are a new class of glucocorticoid antagonists
Nature 279, 158-160.
- Formstecher, P., Lustenberger, P. and Dautrevaux, M. (1980) Synthesis of 17 β -carboxamide derivatives.
Steroids 35, 265-272.
- Formstecher, P., Lustenberger, P. and Dautrevaux, M. (1981) Structure-activity relationships in the steroidal 17 β -carboxamide series in Protides of the Biological Fluids, vol. 29, Ed. : H. Peeters, 1981, Pergamon Press, Oxford, pp 393-396.
- Formstecher, P., Dumur, V., Idziorek, T., Danze, P.M., Sablonnière, B. and Dautrevaux, M. (1984) Inactivation of unbound rat liver glucocorticoid receptor by N-alkyl-maleimides at subzero temperatures.
Biochim. Biophys. Acta 802, 306-313.

B) COMMUNICATIONS

- Formstecher, P., Lustenberger, P. and Dautrevaux, M.
Structure-activity relationships in the steroidal 17 β -carboxamide series. Protides of the Biological Fluids, Colloquium 29, Bruxelles May 4-7, 1981.
- Dumur, V., Formstecher, P., Dautrevaux, M.
Inactivation of unbound rat liver glucocorticoid receptor by N-alkyl maleimides. Kinetic studies at subzero temperature.
Poster présenté au "6th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry" Paris 30 Mai-1st June 1983.
- Sablonnière, B., Formstecher, P. and Dautrevaux, M.
Bifunctional steroids as a tool for the glucocorticoid receptor subunit study.
7th International Congress of Endocrinology, July 1-7, 1984, Québec, NTD-3.

C) MEMOIRE

- Formstecher, P.
Les stéroïdes 17 β -carboxamides, une nouvelle classe d'antiglucocorticoïdes.
1980, Mémoire pour l'obtention du DERBH, Lille.

Les résultats acquis dans le domaine de la synthèse et de la mesure de l'affinité des stéroïdes 17 β -carboxamides ont joué un rôle important dans la mise au point des gels d'affinité portant ces stéroïdes comme ligands utilisables pour la purification des récepteurs des glucocorticoïdes et de la progestérone, et ont conduit aux publications suivantes :

- Lustenberger, P., Formstecher, P. and Dautrevaux, M. (1981)
Purification of rat liver glucocorticoid receptor by affinity chromatography : design of a suitable adsorbent.
J. Steroid Biochem. 14, 697-703.
- Lustenberger, P., Formstecher, P. and Dautrevaux, M. (1982)
Rat liver glucocorticoid receptor purified in presence of molybdate in "Protides of the Biological Fluids 29th Colloquium 1981, Ed. : H. Peeters, Pergamon Press, Oxford, pp 583-586.
- Renoir, M., Yang, C.R., Formstecher, P., Lustenberger, P., Wolfson, A., Redeuilh, G., Mester, J., Richard-Foy, H. and Baulieu, E.E. (1982)
Progesterone receptor from chick oviduct : purification of molybdate stabilized form and preliminary characterization (1982)
Eur. J. Biochem. 127, 71-79.

- Idziorek, T., Formstecher, P., Danzé, P.M., Sablonnière, B., Lustenberger, P., Richard, C., Dumur, V. and Dautrevaux, M. (1985)
Characterization of the purified molybdate-stabilized glucocorticoid receptor from rat liver.
Eur. J. Biochem. 153, 65-74.
- Lustenberger, P., Blanchardie, P., Denis, M., Formstecher, P., Orsonneau, J.L. and Bernard, S. (1985)
Non-transformed rabbit liver glucocorticoid receptor : purification characterization and transformation.
Biochimie 67, 1267-1278.

Abréviations utilisées :

DCC	: Dicyclohexylcarbodiimide
DEAE	: Diéthylaminoéthyl-
DTNB	: Acide 5-5' dithio-bis-nitrobenzoïque
DTT	: Dithiothréitol
DXP	: N-propyl-9 α -fluoro-11 β , 17 α -dihydroxy, 16 α -méthyl, 1-4-androstadiène, 17 β -carboxamide
DXB	: N-benzyl,9 α -fluoro, 11 β , 17 β -dihydroxy, 16 α -méthyl, 1-4 androstadiène, 17 β -carboxamide
HPLC	: Chromatographie liquide à haute performance
HTC	: Cellules d'hépatome de rat en culture
LTR	: "Long terminal repeat" : séquence répétée des deux extrémités de génome du rétrovirus.
MMTV	: Virus tumorigène mammotrope de souris
PAGE-SDS	: Electrophorèse en gradient de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
SDS	: Dodécylsulfate de sodium
-SH	: Groupement sulfhydryl
TAT	: Tyrosine-amino-transférase
Tris	: Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane

TABLE DES MATIERES

	Pages
A - PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	1
I - <u>FONCTION DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES</u>	3
GENERALITES	
1 - PENETRATION CELLULAIRE DU STEROIDE	5
2 - LIAISON DE L'HORMONE AU RECEPTEUR	7
3 - TRANSFORMATION DU COMPLEXE GLUCOCORTICOIDE-RECEPTEUR	8
a) Conditions d'obtention de la transformation in vitro	8
b) Facteurs endogènes et exogènes agissant sur la transformation	9
c) Mécanisme de la transformation	16
d) Réalité de la transformation in vivo	18
4 - TRANSLOCATION DU COMPLEXE HORMONE-RECEPTEUR DU CYTOPLASME VERS LE NOYAU. LE PROBLEME DE LA LOCALISATION CELLULAIRE EFFECTIVE DU RECEPTEUR IN VIVO.	20
5 - INTERACTIONS AVEC LES CONSTITUANTS DU NOYAU CELLULAIRE	23
6 - RECYCLAGE ET REGULATION DU RECEPTEUR	28
7 - TAUX D'OCCUPATION DU RECEPTEUR ET REPONSE BIOLOGIQUE	32
II - <u>STRUCTURE DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES</u>	35
1 - LA LIAISON GLUCOCORTICOIDE-RECEPTEUR : APPROCHE PAR LE LIGAND	38
1.1. Caractéristiques essentielles de la liaison	38
a) à l'équilibre	39
b) aspects cinétiques	40
c) aspects thermodynamiques	47
1.2. Corrélation structure du stéroïde-activité de liaison	50
a) généralités	50
b) effets des substituants	52
c) études de conformation	65
d) relation quantitative : QSAR	81

1.3. Marquage d'affinité	83
1.4. Anticorps antiidiotypiques	88
2 - CARACTERISATION DU RECEPTEUR : APPROCHE PAR LA PROTEINE	91
2.1. Le récepteur non lié à l'hormone. Facteurs interférant avec la liaison	91
a) Instabilité du récepteur non lié à l'hormone	91
b) Cystéine essentielle à l'activité de liaison	92
c) Autres aminoacides éventuellement impliqués dans la liaison stéroïde-récepteur	99
d) Phosphorylation du récepteur	102
e) Effet du molybdate sur le récepteur	105
2.2. Fractionnement et étude structurale du récepteur	110
a) Formes moléculaires du récepteur	110
b) Protéolyse partielle du complexe hormone-récepteur : domaines fonctionnels du récepteur	118
c) L'utilisation des anticorps dans l'étude des domaines des récepteurs	123
3 - ETUDE DU GENE DU RECEPTEUR : APPROCHE PAR L'ADN	125
3.1. Clonage de l'ADN complémentaire du récepteur des glucocorticoïdes	125
3.2. Séquence du cDNA du récepteur des glucocorticoïdes	128
a) Séquence complète du cDNA et structure déduite de la protéine	128
b) Domaines à l'intérieur de la structure du récepteur : Homologies de séquence avec le récepteur des oestrogènes, le récepteur de la progestérone et le produit de v-erb-A	129
B - RESULTATS PERSONNELS	137
I- <u>CARACTERISATION ET FRACTIONNEMENT DU RECEPTEUR NON LIE A L'HORMONE</u>	143
1 - STABILISATION DU RECEPTEUR NON LIE	143
1.1. Molybdate	143
1.2. Agents réducteurs des thiols	145
1.3. Glycérol	145
1.4. Nature du tampon	146

2 - FRACTIONNEMENT DU RECEPTEUR NON LIE	146
2.1. Précipitation par le sulfate de protamine	148
2.2. Centrifugation en gradient de sucrose	148
2.3. Chromatographie sur hydroxylapatite	148
2.4. Chromatographie d'exclusion de taille	152
2.5. Chromatographie d'échange d'ions	152
2.6. Conclusion	154
II - <u>UTILISATION DES STEROIDES 17β-CARBOXAMIDES POUR L'ETUDE DU SITE DE LIAISON DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES</u>	155
1 - SYNTHÈSE DES STEROIDES 17 β -CARBOXAMIDES	155
1.1. Préparation des acides 17 β -carboxyliques	155
1.2. Préparation des 17 β -carboxamides	156
2 - L'INTERACTION DES STEROIDES 17 β -CARBOXAMIDES AVEC LE RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES SE FAIT AU NIVEAU DU SITE DE LIAISON DU STEROIDE	169
2.1. Modèle expérimental	169
2.2. Mesure par compétition	170
2.3. Interaction directe avec un 17 β -carboxamide tritié	174
2.4. Structure radiocristallographique comparée de deux 17 β -carboxamides de la dexaméthasone	177
3 - RELATION STRUCTURE ACTIVITE DE LIAISON DES 17 β -CARBOXAMIDES DE LA DEXAMETHASONE	188
4 - DISCUSSION DES RESULTATS AU REGARD DE L'ACTIVITE ANTIGLUCOCORTICOIDE DES 17 β -CARBOXAMIDES DE LA DEXAMETHASONE	201
III - <u>PREPARATION DE STEROIDES BIFONCTIONNELS POUR L'ETUDE DU NOMBRE DE SITES DE LIAISON DU RECEPTEUR</u>	205
1 - PRINCIPE	205
2 - PREPARATION DE STEROIDES BIFONCTIONNELS ET MESURE DE LEUR AFFINITE POUR LE RECEPTEUR	207
2.1. Biscarboxamides de la dexaméthasone	207
2.2. Esters en 21 de la dexaméthasone et de l'acétonide de triamcinolone	210
a) Acétates de la dexaméthasone et de l'acétonide de triamcinolone	210
b) Esters d'acétonide de triamcinolone bifonctionnels	212

2.3. Ethers en 21 de la dexaméthasone	213
2.4. Dérivés à chaîne longue apparentés à l'acétonide de triamcinolone	213
3 - CONCLUSION. PERSPECTIVE : UNE NOUVELLE APPROCHE, LE STEROIDE LESTE	213
IV - <u>UTILISATION DE N-ALKYL ET N-ARYL MALEIMIDES POUR L'EXPLORATION DE L'ENVIRONNEMENT DU THIOL ESSENTIEL A LA LIAISON DU STEROIDE</u>	219
1 - PRINCIPE	219
2 - SYNTHESE DES MALEIMIDES ET DES SUCCINIMIDES N-SUBSTITUEES	222
2.1. Synthèse des maléimides N-substituées	222
2.2. Synthèse des N-alkylsuccinimides	225
3 - PURIFICATION PARTIELLE DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES	225
4 - NECESSITE DE LA STABILISATION DU RECEPTEUR LIBRE SOUS UNE FORME HOMOGENE AVANT L'INACTIVATION PAR LA MALEIMIDE	227
5 - COMPARAISON DES VITESSES DE REACTION DE DIVERSES N-ALKYLMALEIMIDES AVEC LE RECEPTEUR LIBRE. EFFICACITE PARTICULIERE DE LA N-BENZYLMALEIMIDE	232
6 - INTERACTION AVEC LE RECEPTEUR DES N-ALKYLMALEIMIDES INACTIVEES PAR LE β -MERCAPTOETHANOL	237
7 - COMPETITION ENTRE LA N-NONYLSUCCINIMIDE ET LA DEXAMETHASONE TRITIEE POUR LA LIAISON AU RECEPTEUR	238
V - <u>SYNTHESE DES RESULTATS OBTENUS AVEC LES 17β-CARBOXAMIDES ET LES MALEIMIDES N-SUBSTITUEES - COMPARAISON AUX DONNEES DE LA LITTERATURE</u>	243
VI - <u>CONCLUSION - PERSPECTIVES</u>	247
ANNEXE : DONNEES RADIOCRISTALLOGRAPHIQUES COMPLETES DU DXP ET DU DXB, DEUX 17β -CARBOXAMIDES DERIVES DE LA DEXAMETHASONE	251
APPENDICE TECHNIQUE	275
LISTE DES ILLUSTRATIONS	297
RESUME	305
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	307

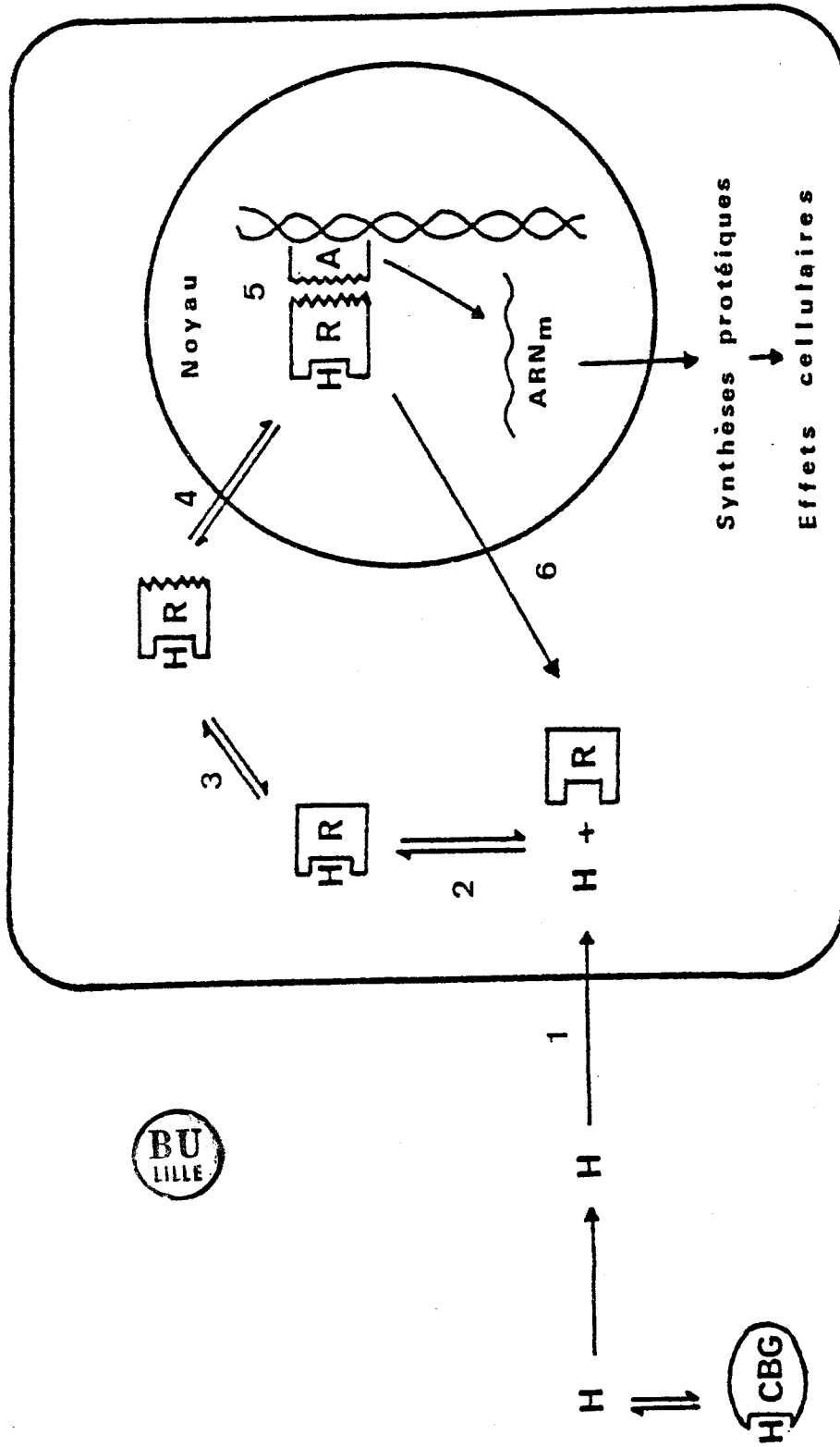
A - PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I FONCTION DU RECEPTEUR
DES GLUCOCORTICOIDES

Les hormones stéroïdes exercent leur action biologique au niveau de leurs tissus cibles après la liaison de l'hormone à un récepteur cellulaire cytosolique spécifique. Le complexe hormone-récepteur une fois formé subit une étape de transformation qui permet sa migration dans le noyau cellulaire où il exerce son action au niveau de régions spécifiques de la chromatine. Cette action aboutit à la mise en jeu de la réponse cellulaire sous forme d'induction ou de répression de synthèse de protéines, le plus souvent enzymatiques. La figure 1 résume ce schéma classique du mécanisme d'action des stéroïdes qui a été élucidé dans les années 1970 et a fait l'objet de nombreuses revues (Baulieu 1975, Grody 1982, Milgrom 1981, Rousseau 1979 et 1984a, Schmidt 1982). Nous allons procéder à un commentaire des différentes étapes de ce modèle dans le cas du récepteur des glucocorticoïdes qui est celui qui fait l'objet de nos travaux depuis des années. Ce commentaire, bien qu'assez détaillé, ne prétend pas à l'exhaustivité, mais vise simplement à dégager les idées essentielles que la communauté scientifique se fait de ce récepteur ainsi que les principales questions qu'elle se pose encore à son sujet.

1 - PENETRATION CELLULAIRE DU STEROÏDE

Cette étape est extrêmement rapide (quelques dizaines de secondes à 37°C). L'hypothèse la plus communément admise est celle d'une diffusion simple du stéroïde à travers la double couche lipidique de la membrane cellulaire (Giorgi 1981, Plagemann 1976) encore que des arguments en faveur de l'existence d'un système de transport actif aient été apportés par certains auteurs (Rao, 1981, Harrison 1979). La signification physiologique de ces derniers résultats ainsi que les données concernant d'éventuels sites membranaires de liaison des glucocorticoïdes (Allera 1980, Koch 1978, Suyemitsu 1975) restent discutables. Il en va d'ailleurs de même du rôle éventuel de la transcortine, protéine plasmatique



BU
LILLE

H CBG

Figure 1 - Mécanisme d'action des hormones glucocorticoïdes au niveau des cellules cibles

1. Pénétration cellulaire de l'hormone
2. Liaison de l'hormone au récepteur
3. Transformation du complexe hormone-récepteur
4. Translocation du complexe transformé vers le noyau
5. Interaction avec le génome
6. Recyclage et régulation du taux de récepteur

porteuse du cortisol, dans la pénétration cellulaire du stéroïde (Lippman 1974) bien que des récepteurs de la transcortine aient été récemment mis en évidence sur les membranes cellulaires de la prostate chez l'homme (Hryb 1986). Il convient de remarquer que les glucocorticoïdes de synthèse les plus actifs tels que la dexaméthasone et l'acétonide de triamcinolone ne se lient pas à la transcortine et pénètrent rapidement dans les cellules cibles. La transcortine ne joue donc sans doute pas un rôle crucial dans l'action des glucocorticoïdes.

Une controverse similaire existe également à propos du mode d'entrée cellulaire des autres hormones stéroïdes (De Ryck 1985, Milgrom 1973, Pietras 1974) et il n'y a guère que le modèle très particulier de l'ovocyte de xénope pour offrir l'exemple indiscutable d'une interaction de la progestérone avec la membrane plasmique ayant un rapport direct et sans doute primordial avec l'activité biologique de cette hormone (Baulieu 1978, Godeau 1978). Ce dernier modèle reste une exception.

2 - LIAISON DE L'HORMONE AU RECEPTEUR

Une fois dans la cellule le stéroïde se lie au récepteur qui est de nature essentiellement protéique et présent en quantité limitée (20 à 30 000 sites de liaison par cellule, soit une concentration intracellulaire de l'ordre de la nanomole et une activité spécifique de liaison de l'ordre de 0,2 à 0,6 picomole de stéroïde par mg de protéine cytosolique). Ce récepteur se lie de manière spécifique et avec une affinité élevée aux glucocorticoïdes. Les caractéristiques détaillées de ce site de liaison seront envisagées dans le second chapitre et nous nous contenterons de signaler ici que le récepteur des glucocorticoïdes comme la plupart des récepteurs des hormones stéroïdes est peu stable en l'absence de ligand, qu'il est stabilisé *in vitro* sous forme non liée par l'addition d'oxyanions du genre molybdate, vanadate ou tungstate et l'addition d'agents réducteurs et enfin qu'une phosphorylation du récepteur est peut-être impliquée dans l'acquisition de sa capacité à lier le stéroïde (Dahmer 1984, Housley 1984).

3 - TRANSFORMATION DU COMPLEXE GLUCOCORTICOIDE-RECEPTEUR

Cette étape consiste en l'acquisition par le complexe hormone-récepteur de la capacité à se lier de manière spécifique au matériel nucléaire (ADN ou chromatine) pour déclencher la réponse cellulaire. Dans le schéma classique (figure 1) il s'agit d'une modification moléculaire qui précède la translocation du complexe du cytoplasme vers le noyau, mais dans l'usage courant le terme englobe parfois les deux processus de translocation et de capacité à se lier à l'ADN. Depuis sa mise en évidence *in vitro* sur système acellulaire (Higgins 1973, Milgrom 1973), ce phénomène a fait l'objet de très nombreux travaux récemment discutés dans d'excellentes revues générales (Danze 1983, Higgins 1979, Grody 1982, Milgrom 1981, Schmidt 1982). Nous ne ferons que résumer ici les principales caractéristiques de ce phénomène complexe encore mal compris.

a) La transformation du complexe hormone-récepteur cytosolique peut être obtenue *in vitro* par chauffage modéré de l'échantillon (généralement 20 à 25°C pendant 30 à 60 minutes), élévation de la force ionique à 0°C, dilution ou gel-filtration de l'échantillon ou encore par élévation du pH. Elle se caractérise par :

. l'acquisition par le complexe d'une affinité accrue vis-à-vis des noyaux isolés et des supports de type DNA-cellulose. La DNA-cellulose, plus pratique à manipuler que les noyaux isolés, ne leur est cependant pas équivalente (Le Fèvre 1979). Plus généralement, l'affinité du complexe transformé pour les échangeurs d'ions se trouve modifiée dans un sens acidophile : affinité accrue pour la phosphocellulose, l'héparine agarose et l'ATP sepharose, réduite pour la DEAE et la QAE cellulose. Le point isoélectrique du complexe hormone-récepteur semble augmenter après transformation d'après les études les mieux documentées (Ben Or 1983, Danze 1986). Il en irait de même pour la charge nette du complexe (Andreasen 1982b). Ce caractère acidophile de la transformation a été mis au compte du dévoilement de charges positives à la surface du récepteur (par exposition de résidus de lysine et d'arginine).

. d'autre part, après bien des polémiques sur les conditions expérimentales à utiliser, en particulier sur le recours au molybdate dans les tampons d'analyse et la force ionique de ces tampons (Bailly 1980, Mc Blain 1981), il semble admis maintenant que la transformation du complexe glucocorticoïde-récepteur soit concomitante d'une réduction de taille de ce complexe (Alexis 1983, Holbrook 1984a, La Pointe 1986, Luttge 1984, Reker 1985, Sablonnière 1986, Sherman 1982, 1983 et 1984, Vedeckis 1981 et 1983, Weatherill 1984) observable en gradient de sucrose (passage de la forme 8-9S à la forme 4S) et en gel filtration (passage de la forme non transformée de 7-8 nm de rayon de Stokes à la forme transformée de 5 nm de rayon de Stokes) à condition que les tampons d'analyse contiennent du molybdate pour "geler" le processus de transformation pendant l'analyse chromatographique ou l'ultracentrifugation. De plus, des formes intermédiaires 6S et 6 nm ont récemment été identifiées au cours de la transformation du complexe hormone-récepteur de souris (Reker 1985, La Pointe 1986).

. la transformation du complexe glucocorticoïde-récepteur semble s'accompagner également d'une stabilisation de ce complexe ainsi qu'en témoigne la diminution de la constante de vitesse de dissociation de l'hormone après transformation (Mc Blain 1981, Moguilewsky 1984, Toth 1983). Mais l'accord n'est pas fait sur ce point (Goidl 1977).

Toutes ces modifications caractérisant la transformation sont obtenues exclusivement avec des complexes glucocorticoïde-récepteur préformés : la liaison préalable de l'hormone est ici indispensable comme cela semble être le cas pour la plupart des récepteurs des hormones stéroïdes à l'exception du récepteur de la progestérone du poulet (Yang 1982). La réversibilité de la transformation des complexes glucocorticoïde-récepteur reste une notion discutée (Aranyi 1983, Bodine 1984, Milgrom 1981, Schmidt 1982).

b) Un grand nombre de facteurs endogènes et exogènes ayant un effet inhibiteur ou activateur sur le mécanisme de transformation ont été décrits dans la littérature (Dahmer 1984, Grody 1982, Schmidt 1982). On peut distinguer idéalement deux catégories de facteurs.

D'une part les facteurs affectant l'étape de transformation proprement dite, c'est-à-dire ceux qui manifestent leur effet exclusivement quand on les ajoute avant l'étape de transformation et qui n'interfèrent pas avec la liaison à l'ADN des complexes déjà transformés. D'autre part les facteurs sans effet sur la transformation elle-même, mais capables d'interférer avec la liaison à l'ADN des complexes transformés. Les facteurs endogènes de ce type sont appelés facteurs de translocation. La distinction entre les différents types de facteurs n'est pas toujours très claire dans la littérature, d'autant que certains facteurs ont pu sembler être impliqués dans les deux étapes de transformation et de translocation. Ces facteurs sont nombreux et comprennent :

. les oxyanions de certains métaux de transition du groupe VI, tels que les ions vanadate, tungstate et surtout molybdate (Dahmer 1984). Ce dernier inhibe de manière réversible la transformation de tous les complexes stéroïde-récepteur à une concentration de l'ordre de 10 mM. Il n'empêche pas la liaison à l'ADN de complexes déjà transformés à la concentration de 10 à 20 mM (Murakami 1981). Il est largement utilisé pour stabiliser le récepteur lié ou non à l'hormone, sous sa forme de haut poids moléculaire. Le mécanisme moléculaire de son action stabilisatrice et inhibitrice de la transformation est encore hypothétique (voir discussion du Chapitre II 2.1 e) mais il s'agit vraisemblablement d'une interaction directe du molybdate avec le récepteur lui-même ainsi qu'en témoigne la persistance de ses effets sur des complexes glucocorticoïde-récepteur ou progestérone-récepteur hautement purifiés sous forme non transformée, persistance observée par la plupart des auteurs (Grandics 1984b, Idziorek 1985b, Renoir 1983, Puri 1982) à l'exception d'un seul (Naray 1983). L'interaction du molybdate avec le complexe hormone-récepteur est assez faible, et pourrait intéresser des groupements phosphate ou plus probablement des résidus de cystéine accessibles à la surface du récepteur (Dahmer 1984).

. un ou plusieurs résidus de cystéine seraient d'ailleurs indispensables à la transformation du complexe glucocorticoïde-récepteur et/ou à sa liaison à l'ADN. Si les résultats obtenus avec l'iodoacétamide restent contradictoires et criticables (Bodwell 1984a, Kalimi 1980, Young 1975), ceux provenant de l'utilisation de réactifs plus spécifiques des cystéines comme le N-éthylmaléimide et surtout les acides 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque), 6,6'-dithiobis nicotinique et méthylméthanethiosulfonique sont beaucoup plus clairs : le traitement des complexes stéroïde-récepteur par les réactifs les plus actifs, avant ou après l'étape de transformation par la chaleur, inhibe la liaison ultérieure à la DNA-cellulose (Bodwell 1984a). Ces résultats suggèrent que des groupements thiols sont localisés au voisinage immédiat du site de liaison à l'ADN du récepteur transformé, sinon dans ce site lui-même. Bodwell (1984b) a d'ailleurs récemment montré que la chromatographie covalente sur une colonne à thiol activé immobilisé avec un bras particulier permettait de retenir le complexe transformé et non le complexe natif. De plus, l'addition d'ADN en solution interfère avec la réaction du récepteur avec le support, ce que l'auteur présente comme un argument supplémentaire pour affirmer l'existence de résidus de cystéine à la surface du récepteur lui-même, dans sa région de liaison à l'ADN, et pour supposer que ces résidus particuliers apparemment inaccessibles sur le récepteur non transformé seraient dévoilés au cours de la transformation. Il existe pourtant sûrement d'autres thiols accessibles sur le complexe glucocorticoïde-récepteur transformé ou non ainsi qu'en témoignent les expériences réalisées avec d'autres colonnes à thiol immobilisé (Idziorek 1985a, Bodwell 1984b). Tous ces résidus thiols sont distincts du résidu impliqué dans la liaison du stéroïde au récepteur (voir chapitre II).

. d'autres aminoacides semblent impliqués dans la liaison du complexe transformé à l'ADN. Tout d'abord des résidus de lysine ainsi que le suggère les effets du phosphate de pyridoxal, bien étudiés par le groupe de Litwack et récemment revus (Schmidt 1982, Litwack 1985, Di Sorbo 1982). Ce réactif empêche la liaison du complexe transformé au DNA en se liant probablement à des résidus de

lysine dévoilés au cours de l'étape de transformation. En effet le traitement préalable du complexe non transformé avec le phosphate de pyridoxal, suivi de la réduction des bases de Schiff formées et de l'excès de réactif par le borohydrure de sodium n'empêche pas la transformation ultérieure du complexe qui peut alors se lier à l'ADN. Il y aurait donc des résidus de lysine dans le site de liaison à l'ADN du complexe activé. Le phosphate de pyridoxal est d'ailleurs parfois utilisé pour éluer les complexes activés liés à la DNA-cellulose. De même, l'utilisation de la 1,2-cyclohexanedione, du rose bengale et du pyrocarbonate d'éthyle ont fourni des éléments en faveur de la présence de résidus arginine et histidine au niveau du site de liaison à l'ADN (Di Sorbo 1980).

. L'effet activateur de la transformation présenté par la phosphatase alcaline d'intestin de veau et l'effet ralentisseur de certains inhibiteurs de phosphatase (Barnett 1980) ont pu laisser penser que la transformation du complexe comporterait une étape de déphosphorylation du récepteur. Ceci est loin d'être clairement démontré, bien que l'action d'une phosphoprotéine phosphatase endogène ait été évoquée. Une discussion claire et complète de ce problème a récemment été menée par Schmidt (1982) et Housley (1984). Les arguments en faveur de la phosphorylation du récepteur sont envisagés plus loin.

. Toute une série de dérivés phosphorylés tels que l'ATP, l'ADP, l'AMP, le pyrophosphate, le paranitrophenylphosphate, l' α -naphtylphosphate et le glycérophosphate semblent activer la transformation du complexe glucocorticoïde-récepteur (Barnett 1980, Holbrook 1983b, John 1979, Moudgil 1984 et 1985). Ces diverses molécules agissent dans des conditions telles que l'opinion qui prévaut actuellement quant à leur mécanisme d'action est celle d'une interaction physicochimique directe avec le récepteur lui-même plutôt qu'un effet enzymatique en rapport avec la phosphorylation du récepteur.

. Le rôle dans la transformation d'une éventuelle molécule d'ARN associé au complexe glucocorticoïde-récepteur a été évoqué par divers auteurs (Anderson 1985, Chong 1982, Economidis 1985, Hutchens 1982, Kovacic 1985, Liao 1980, Mayer 1983b, Reker 1983, Rossini 1983, Sablonnière 1986, Tymoczko 1983 et 1984). La plupart de ces études ont été menées sur des préparations cytosoliques soit supplémentées en ARN, soit traitées à la ribonucléase et analysées ensuite vis-à-vis de leurs propriétés physicochimiques (par centrifugation en gradient de sucrose et/ou en chromatographie d'exclusion de taille) et de leur capacité à se lier à la DNA-cellulose. Un seul auteur a montré plus directement que le complexe hormone-récepteur est une ribonucléoprotéine par des expériences de réticulation chimique (Economidis 1985). L'ARN associé au récepteur serait de petite taille et serait perdu au cours de la transformation qu'il servirait peut-être à moduler (Kovacic 1985, Sablonnière 1986b). Cette question de l'ARN associé aux récepteurs des hormones connaît actuellement un développement croissant car des résultats similaires ont été rapportés pour les récepteurs des oestrogènes (Chong 1982, Thomas 1985), de la progestérone (Liao 1980, Thomas 1986), des androgènes (Liao 1980, Mulder 1984) et de la vitamine D (Franceschi 1984). Il reste à identifier cet ARN, ce qui risque d'être délicat, car il apparaît pour l'instant difficile à copurifier avec le récepteur non transformé.

. Une série de dérivés assez disparates ont également été crédités d'une action sur l'étape de transformation qui paraît ainsi activée par les acides aminés basiques (Schmidt 1982), les bases xanthiques (Calk 1978a) et l'héparine (Mc Blain 1984, Moudgil 1984), alors qu'elle est inhibée par le tosyl-lysylchlorométhane (Hubbard 1984b) et par l'ion lithium (Andreasen 1982a). Les cations divalents ont des effets encore mal compris : Mg^{2+} et Mn^{2+} empêchent la liaison du récepteur transformé à l'ADN tandis que les effets de Ca^{2+} sont plus complexes et passeraient peut-être par l'activation d'une protéase calcium dépendante (Schmidt 1982). Les ions Zn^{2+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} , Fe^{2+} et Cd^{2+} empêchent également la liaison à l'ADN (Norris 1983). Enfin,

l'acide aurintricarboxylique et la rifamycine AF/013, deux molécules connues pour interférer avec des protéines liant l'ADN empêchent la liaison du récepteur activé à l'ADN (Moudgil 1984). Il en va de même pour la 1,10-phénantroline, un chélateur d'ion métallique, ce qui laisse supposer que le récepteur transformé est une métalloprotéine (Schmidt 1981), et pour le bromure d'éthidium un agent intercalant de l'ADN (Izawa 1980).

. plusieurs facteurs endogènes interférant avec la transformation ou la translocation ont été décrits et récemment bien revus (Dahmer 1984). Le mieux documenté est l'inhibiteur thermostable de faible poids moléculaire (PM < 700) dont les effets semblent similaires à ceux du molybdate et dont la nature chimique reste inconnue. Plus récemment ont été décrits un inhibiteur thermolabile de haut poids moléculaire (Barnett 1983) et un stimulateur cytoplasmique thermostable, de haut poids moléculaire, et sensible à la trypsine (Schmidt 1985). Ce dernier serait indispensable pour obtenir une transformation complète du récepteur purifié sous forme non transformée et possède des propriétés communes avec la ribonucléase. Enfin, il existerait au moins un inhibiteur endogène de la translocation (Dahmer 1984, Isohashi 1986) responsable de la diminution de la liaison au noyau des échantillons cytosoliques concentrés en complexe hormone-récepteur activé. Cet inhibiteur est thermolabile et macromoléculaire.

. un dernier facteur à prendre en compte est la nature du stéroïde lié au récepteur. En effet, dès la mise en évidence de l'activité antiglucocorticoïde de certains stéroïdes dérivés de la progestérone, capables de se lier au récepteur sans entraîner de réponse glucocorticoïde, l'hypothèse d'une absence de transformation et de migration au noyau des complexes stéroïde-récepteur obtenus avec ces dérivés a été formulée. Un modèle selon lequel le récepteur serait une protéine allostérique à l'activité régulée par son ligand stéroïdien a même été proposé (Rousseau 1973 et 1975, Samuels 1970). Ce modèle n'est qu'imparfaitement étayé par les résultats expérimentaux : si les complexes progestérone-récepteur des glucocorticoïdes ne migrent pas au noyau (Rousseau 1973), ceux obtenus avec la cortexolone migrent mais se lient avec une affinité réduite au noyau cellulaire (Wira 1974,

Turnell 1974). En fait la faible affinité de ces dérivés pour le récepteur des glucocorticoïdes a empêché de pousser plus loin l'investigation et rend ces premiers résultats discutables. La situation a cependant évolué rapidement ces dernières années avec la description de nouveaux antiglucocorticoïdes plus actifs. Ainsi, le mésylate de dexaméthasone développé par le groupe de Simons (1981) : ce produit présente une affinité relativement élevée pour le récepteur des glucocorticoïdes et surtout il se comporte comme un marqueur covalent du récepteur. Antigluco-corticoïde efficace sur les cellules d'hépatome en culture, il induit un transfert nucléaire beaucoup plus faible que ne le fait la dexaméthasone (Simons 1983 et 1986). Cependant, bien que des anomalies de la transformation des complexes cytosoliques mésylate de dexaméthasone-récepteur et qu'une légère réduction d'affinité des complexes transformés vis-à-vis de la DNA-cellulose et de séquences spécifiques de gènes régulés par les glucocorticoïdes aient été observées (Miller 1984, Simons 1984), elles ne suffisent pas à rendre compte de l'effet antigluco-corticoïde de la molécule. La situation est un peu similaire pour le RU 486, le plus puissant antigluco-corticoïde connu, récemment décrit par les chercheurs du groupe Roussel-Uclaf (Philibert 1981). Ce produit se lie de manière non covalente au récepteur des glucocorticoïdes avec une affinité extrêmement élevée (supérieure à celle de la dexaméthasone). Cependant la transformation et le transfert au noyau des complexes RU 486-récepteur des glucocorticoïdes apparaissent moins efficaces que ceux du complexe dexaméthasone-récepteur (Bourgeois 1984, Moguilewsky 1983). Ce produit stabilise in vitro et in vivo le récepteur sous sa forme non transformée de haut poids moléculaire (Formstecher 1986, Sablonnière 1986). Enfin, les données concernant l'affinité du complexe RU 486-récepteur pour la DNA-cellulose et surtout pour les séquences d'ADN spécifiques de liaison des récepteurs (obtenues à partir du clonage de gènes régulés par les glucocorticoïdes) restent contradictoires : l'affinité est diminuée pour les uns (Bourgeois 1984), accrue pour les autres (Rajpert 1986). Si les données

récentes ne permettent pas encore de comprendre le mécanisme d'action des antigluco-corticoïdes, elles relancent l'intérêt des recherches sur l'implication de l'étape de transformation dans ce mécanisme.

c) Tous ces facteurs divers, capables d'interférer avec la transformation et la volumineuse littérature qu'ils ont suscitée sont à même d'embrouiller l'esprit le plus rassis. Il faut espérer que la purification du récepteur non transformé, l'éclaircissement de sa structure, l'isolement et la caractérisation des facteurs endogènes interférant avec la transformation, ainsi que l'utilisation croissante des séquences d'ADN spécifiques de gènes clonés et de systèmes de transcription *in vitro* pour étudier cette transformation, permettront d'y voir plus clair. Néanmoins, quelques auteurs ont déjà tenté d'organiser tout ou partie des connaissances déjà acquises autour de modèles spéculatifs de la transformation. Un des plus achevés est celui récemment proposé par Vedeckis (Vedeckis 1985) et représenté sur la figure 2. Ce modèle rend compte de la transformation par un mécanisme central de dissociation des sous-unités constituant le complexe hormone-récepteur non transformé. Il ne tranche pas entre les deux hypothèses principales émises à propos de la structure du complexe non transformé, à savoir complexe homooligomérique ou hétérooligomérique. Cette dernière hypothèse semble pourtant actuellement étayée d'une manière de plus en plus claire (voir Chapitre 2) et une protéine de poids moléculaire 90 000 ne liant pas le stéroïde fait indiscutablement partie du complexe oligomérique non transformé. Son rôle dans la transformation est encore mal compris. Cette protéine et peut-être une ou des molécules d'ARN constitueraient les facteurs liés au récepteur (RBF). Le rôle vraisemblable de la dissociation du complexe oligomérique dans l'étape de transformation a été confirmé par des expériences qui montrent que le complexe oligomérique une fois réticulé par des agents bifonctionnels du type diimidates ne peut plus être transformé (Aranyi 1984a). Le schéma de Vedeckis décrit une transformation en deux étapes dont seule la première est sensible au

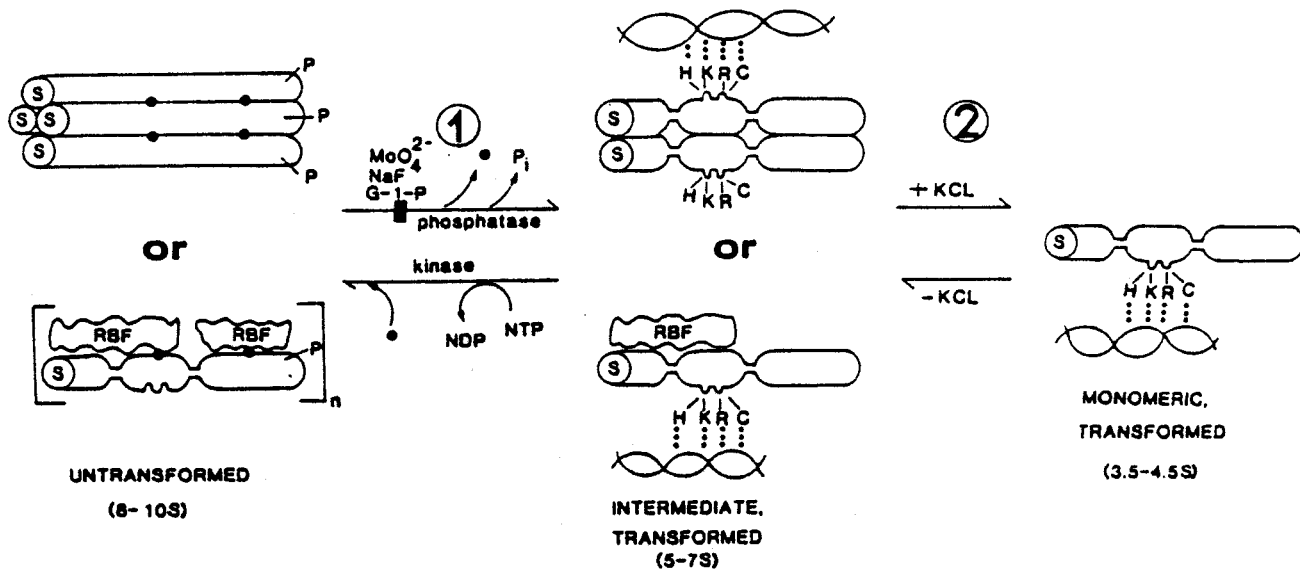


Figure 2 - Modèle de la transformation des complexes glucocorticoïde-récepteur proposé par Vedeckis (1985)



molybdate. Schmidt (1985), étudiant la transformation du récepteur purifié, a récemment proposé également un modèle en deux étapes, la première, sensible à la température et inhibée par le molybdate correspondrait à la dissociation du complexe oligomérique, la seconde insensible à la température et au molybdate, nécessiterait un facteur cytoplasmique macromoléculaire thermostable qui serait peut-être une RNAase endogène.

Enfin pour Gustafsson (1983) la dissociation des sous-unités de l'oligomère non activé serait un phénomène à la signification discutable *in vivo*, qui précéderait l'étape de transformation proprement dite, car il a mis en évidence une forme monomérique non transformée du récepteur. Son groupe vient cependant de modifier sa conception du récepteur transformé qu'il décrit maintenant comme un hétérodimère comportant une unité liant le stéroïde et une protéine de poids moléculaire 72 000 qui jouerait un rôle important dans la spécificité de l'interaction du complexe activé avec l'ADN (Carlstedt-Duke 1985, Gustafsson 1986, Wrange 1986).

d) Réalité de la transformation *in vivo* :

Les complexes stéroïde-récepteur ont été essentiellement étudiés *in vitro* à 0°C sur des échantillons préparés en milieu très hypotonique ou stabilisés par du molybdate de sodium. Qu'en est-il *in vivo*, à 37°C et en milieu isotonique ? La transformation a-t-elle une signification biologique réelle dans la cellule, et tous les complexes hormone-récepteur ne sont-ils pas d'emblée transformés ? Cette interrogation capitale a suscité des travaux qui concluent à la réalité de la transformation *in vivo*, grâce à la mise en évidence de la forme non transformée dans les tissus et cellules intacts (Markovic 1980a, Munck 1979, Miyabe 1983, Holbrook 1983a, Raaka 1983 et 1985).

Munck (1984) a récemment proposé un modèle cinétique de la transformation (figure 3), dans lequel la transformation serait bien l'étape irréversible limitante pour la formation des complexes

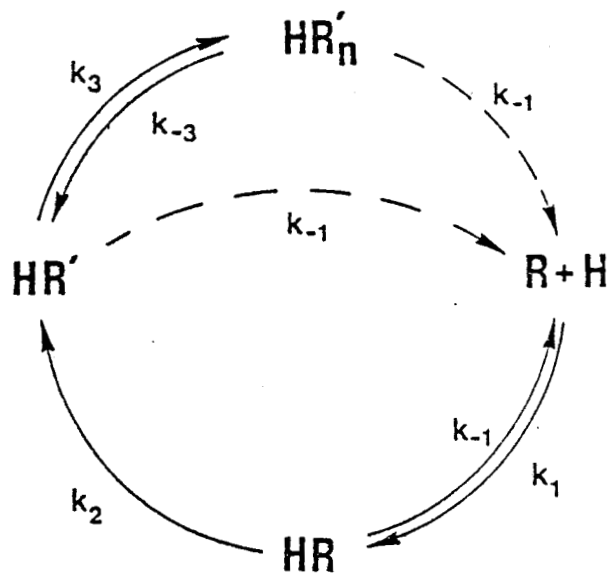


Figure 3 - Modèle cinétique de la transformation des complexes glucocorticoïde-récepteur selon Munck (1984)



nucléaires. A 37°C elle ne nécessiterait avec la dexaméthasone que 30 à 60 secondes dans les thymocytes de rat (Holbrook 1984a, Munck 1984), alors qu'elle apparaît beaucoup plus lente avec l'anti-glucocorticoïde RU 486 (Formstecher 1986). Signalons enfin que Raaka (1983) a proposé un modèle différent de celui de Munck, où la transformation est au contraire complètement réversible. Ce modèle semble confirmé par des résultats récents (Mc Intyre 1985, Raaka 1985). Dans les deux modèles la translocation au noyau est considérée comme réversible. Mais nous allons voir que la notion même de translocation a été récemment contestée.

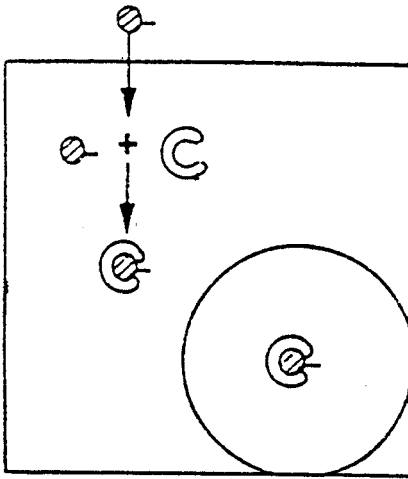
Enfin, certains auteurs ont cherché à voir si le molybdate pouvait avoir une action sur la transformation et la translocation du complexe glucocorticoïde-récepteur sur des cellules en culture. Ils ont obtenu des résultats contradictoires en faveur (Raaka 1985) ou contre (Naray 1983, Svec 1985a) un effet du molybdate sur les cellules entières.

4 - TRANSLOCATION DU COMPLEXE HORMONE-RECEPTEUR DU CYTOPLASME VERS LE NOYAU. LE PROBLEME DE LA LOCALISATION CELLULAIRE EFFECTIVE DU RECEPTEUR IN VIVO.

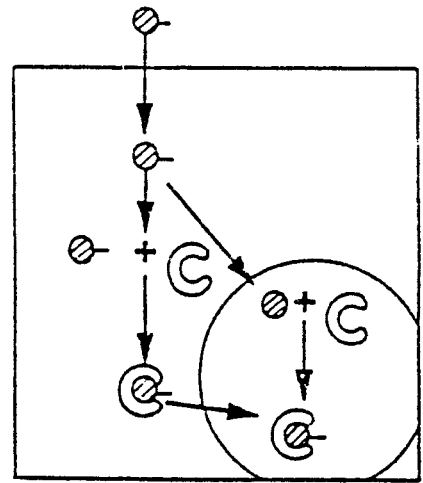
Le modèle communément admis considère qu'en l'absence d'hormone le récepteur est localisé dans le cytoplasme, probablement sous forme soluble, et que ce n'est qu'après avoir lié l'hormone qu'il migre vers le noyau (Rousseau 1983). Les arguments en faveur de ce modèle sont simples : l'hormone radioactive injectée à l'animal entier, ou ajoutée à des cellules en suspension incubées à 37°C est retrouvée essentiellement au niveau du noyau cellulaire avec le récepteur. Au contraire si on fractionne un tissu en l'absence d'hormone, le récepteur est retrouvé dans la fraction cytosolique. L'apparition du complexe nucléaire et la déplétion cytosolique concomitantes à la transformation ont été mises en évidence à de nombreuses reprises in vitro (Higgins 1979) confortant ainsi le dogme du modèle à deux étapes : liaison cytoplasmique puis translocation nucléaire. Mais ce dogme repose en fait sur une conception vraisem-

blablement erronée de ce qu'est le cytosol. En effet, le cytosol, surnageant d'ultracentrifugation d'un homogénat cellulaire total, a été longtemps considéré d'une manière sans doute hâtive et abusivement simplificatrice, comme correspondant essentiellement à la fraction soluble du cytoplasme. Ce point de vue a été récemment remis en cause avec éclat par deux publications concernant le récepteur des oestrogènes dont elles démontrent, avec des techniques différentes, que sa localisation première, sous forme non liée à l'hormone, est déjà nucléaire (King 1984, Wehlshons 1984). Wehlshons (1984) utilisant une technique d'énucléation cellulaire à la cytocholasine B sépare les "cytoplastes" des "nucléoplastes" et retrouve le récepteur des oestrogènes exclusivement au niveau de ces derniers. Sa technique de fractionnement éviterait les artefacts dus à l'homogénéisation totale couramment employée pour préparer le cytosol. De leur côté, King et Greene (1984) localisent le même récepteur dans le noyau des cellules cibles par immunocytochimie avec un anticorps monoclonal anti-récepteur des oestrogènes. Une localisation nucléaire du récepteur de la progestérone a également été rapportée chez le poulet (Gasc 1984) et chez l'homme (Perrot Applanat 1985) par immunocytochimie, et chez le rat (Wehlshons 1985) par énucléation cellulaire. Les résultats obtenus en ce qui concerne le récepteur de glucocorticoïdes sont contradictoires. Les premières études immunocytochimiques menées sur le foie de rat (Govindan 1980, Antakly 1984), les cellules d'hépatome de rat (Gustafsson 1983), l'hippocampe de rat (Gustafsson 1983) et certaines cellules humaines (Papamichail 1980) semblent en faveur d'une localisation surtout cytoplasmique du récepteur non lié à l'hormone avec translocation vers le noyau du complexe hormone-récepteur. Les expériences d'énucléation cellulaire donnent des résultats contradictoires : Wehlshons (1985) observe une localisation nucléaire du récepteur non lié dans les cellules tumorales GH3 de rat alors que dans les mêmes cellules Lukola (1985) obtient le contraire.

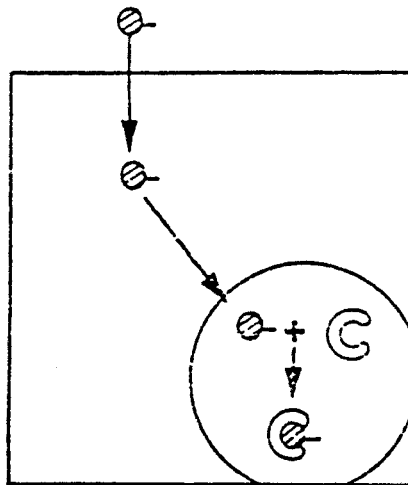
Ces résultats obligent à reconsidérer le modèle classique à deux étapes (une cytosolique et une nucléaire) et à proposer à côté de celui-ci, le modèle à l'équilibre et le modèle nucléaire (figure 4). Le modèle à l'équilibre, dû à Sheridan (1979), postule



(a) modèle en deux étapes



(b) modèle à l'équilibre



(c) modèle nucléaire



○ Hormone
stéroïde

○ Récepteur
non lié

○ Récepteur
lié

Figure 4 - Les trois modèles de distribution intracellulaire des récepteurs des hormones stéroïdes (Clark 1984)

que les deux formes du récepteur, libre ou lié à l'hormone, se partagent entre le cytoplasme et le noyau et que cet équilibre serait rompu de manière artificielle par l'homogénéisation tissulaire. Ce dernier modèle proposé pour le récepteur des oestrogènes ne semble pas s'appliquer au récepteur des glucocorticoïdes car les conditions utilisées par Sheridan donnent dans ce cas un résultat en faveur du modèle à deux étapes (Abbott 1982).

Quoi qu'il en soit, la remise en cause de l'étape de translocation et les controverses qui l'accompagnent (Clark 1984, Szego 1985) ne modifient sans doute pas de manière profonde notre conception du mécanisme d'action des hormones stéroïdes. La notion de transformation reste en effet admise par la plupart des auteurs, elle aurait simplement lieu dans le noyau au lieu de prendre place dans le cytoplasme, et la conséquence principale de tout le remue-ménage entourant ce problème de localisation du récepteur non lié sera peut-être uniquement la nécessité de refaire les schémas de tous les manuels de biochimie montrant le classique modèle à deux étapes (Schrader 1984).

5 - INTERACTION AVEC LES CONSTITUANTS DU NOYAU CELLULAIRE

Depuis la mise en évidence de l'accumulation nucléaire des glucocorticoïdes tritiés et de leurs récepteurs dans les cellules cibles (Beato 1970, Rousseau 1973, Higgins 1973, Kalimi 1983) les travaux se sont multipliés pour comprendre la nature de l'interaction du complexe glucocorticoïde-récepteur avec les constituants du noyau cellulaire et son rôle dans la régulation de l'expression des gènes.

Deux approches essentielles ont été utilisées successivement dans l'étude de ce problème :

- la première consiste à étudier l'interaction des complexes stéroïde-récepteur avec des noyaux ou des fractions nucléaires isolés et à essayer de caractériser des sites spécifiques de liaison. Elle a fait l'objet de revues bien documentées (Yamamoto 1976, Higgins 1979, Walters 1985). La liaison nucléaire mise en évidence sur

cellules entières ou sur noyaux cellulaires isolés in vitro est indiscutable, mais l'homogénéité et la saturabilité des sites de liaison observés l'est beaucoup moins. L'ADN est le constituant nucléaire qui a bien sûr retenu le plus l'attention. Mais la liaison des complexes stéroïde-récepteur transformés à l'ADN résulte probablement en grande partie d'une interaction ionique (voir le paragraphe sur la transformation). Cette liaison est en effet non saturable et montre apparemment pas ou peu de spécificité de tissu ou d'espèce. Les travaux portant sur la comparaison de l'affinité des complexes hormone stéroïde-récepteur pour divers oligonucléotides de synthèse mono ou bicaténaire ont cependant donné quelques résultats montrant certaines différences (Kumar 1983, 1985). Pour expliquer toutes ces observations, on peut postuler avec Yamamoto (1976) l'existence sur le génome d'un petit nombre de sites à haute affinité et haute spécificité qui seraient complètement masqués par un grand nombre de sites moins spécifiques d'affinité beaucoup plus faible. L'ADN n'est cependant pas le seul constituant nucléaire pour lequel les complexes hormone-stéroïde montrent de l'affinité. Des sites accepteurs au niveau de la chromatine ont été postulés et le rôle de certaines protéines non histones a été particulièrement étudié dans le cas du récepteur de la progestérone du poulet (Spelsberg 1983). Des protéines masquant les sites accepteurs nucléaires et d'autres faisant partie de ces sites accepteurs, soit seules, soit plus vraisemblablement en association avec des séquences particulières de l'ADN ont ainsi été partiellement isolées (Spelsberg 1984, Toyoda 1985). Il est vraisemblable que les protéines de la chromatine jouent également un rôle dans l'action des glucocorticoïdes, mais ce problème est difficile à aborder. Enfin, il se pourrait également que la matrice nucléaire participe à la liaison nucléaire des hormones stéroïdes et à leur action (Barrack 1983).

- la seconde approche consiste à utiliser les ressources de la biologie moléculaire pour étudier la régulation par les hormones stéroïdes de gènes particuliers, hormono-sensibles. Cette approche a pris tout récemment un développement considérable et a abouti à

l'acquisition rapide de résultats extrêmement importants qui ont fait progresser de manière spectaculaire notre compréhension de la régulation de l'expression des gènes eucaryotes (Chambon 1984, Ringold 1985, Rousseau 1984, Yamamoto 1985).

L'étude de gènes régulés par les glucocorticoïdes a été à la base de ces résultats, en grande partie grâce au modèle exceptionnel que constitue le virus tumorigène mammotrope de la souris (Hager 1984). L'étude de ce rétrovirus, à l'expression cellulaire induite par les glucocorticoïdes, a permis de localiser avec précision dans son fragment LTR des séquences spécifiques d'ADN nécessaires au contrôle de la transcription du provirus par les glucocorticoïdes. Ces séquences ont été identifiées par diverses expériences de transfection cellulaire, et certaines d'entre elles se sont révélées également capables de lier *in vitro* de manière spécifique le complexe glucocorticoïde-récepteur purifié sous forme transformée. Ces derniers résultats, obtenus essentiellement par des expériences de protection du DNA contre l'action de la DNAase I ou la méthylation au niveau des régions liées au récepteur, ont été récemment étendus à d'autres gènes contrôlés par les glucocorticoïdes.

Beato et coll. ont récemment publié une synthèse des données obtenues par leur groupe dans l'étude des sites de liaison spécifique des récepteurs des hormones stéroïdes (essentiellement glucocorticoïde) sur divers gènes (Beato 1986, Scheidereit 1986). Il apparaît que :

- . les gènes régulés par les glucocorticoïdes contiennent des sites de liaison pour le récepteur des glucocorticoïdes situés à une distance variable du site d'initiation de la transcription (d'environ 100 paires de bases en amont de ce site jusqu'à plus de 2600 paires de bases.

Tout récemment, un site de liaison du récepteur des glucocorticoïdes a également été trouvé au niveau du premier intron du gène de l'hormone de croissance humaine (Eliard 1985, Moore 1985). Il paraît également probable d'après les expériences de transfection

que le site de régulation sensible aux glucocorticoïdes (Glucocorticoid Response Element : "GRE") puisse conserver son activité quelque soit son orientation dans le gène. Ces propriétés rappellent celles des séquences activatrices "enhancer" mises en évidence dans le génome de certains virus. On peut donc imaginer que le site "GRE" se comporte comme un "enhancer" contrôlé par l'hormone stéroïde.

. la séquence de ces sites de régulation "GRE" apparaît hautement conservée dans différents gènes provenant de différentes espèces (homme, rongeurs, poulet) : tous ces sites lient le récepteur des glucocorticoïdes du rat et présentent une homologie de séquence baptisée séquence "consensus" comportant en particulier l'hexanucléotide TGTCT. La figure 5 représente la liaison de deux molécules de récepteurs des glucocorticoïdes à un de ces sites.

. les récepteurs des différentes hormones stéroïdes interagissent avec des séquences d'ADN similaires, et il apparaît probable que le site de liaison au DNA des différents récepteurs sont de structure voisine.

. la liaison du stéroïde ne serait pas absolument nécessaire à l'interaction spécifique du récepteur avec l'ADN.

Tous ces résultats sont extrêmement intéressants. Ils laissent supposer clairement que l'interaction avec les séquences spécifiques de l'ADN ne peut à elle seule expliquer le mécanisme d'action des hormones stéroïdes. D'autres facteurs sans doute chromatinien interviennent à n'en pas douter pour augmenter la spécificité de l'interaction et réguler l'accessibilité de ce site sur les différents gènes en fonction de la différenciation cellulaire. A ce propos le domaine immunogène du récepteur qui n'est impliqué ni dans la liaison au stéroïde, ni dans la liaison à l'ADN (voir chapitre 2) pourrait jouer un rôle dans une interaction avec des facteurs chromatinien, car la perte de ce domaine ou son altération dans des cellules mutantes nt^i conduit à une liaison anormale à l'ADN et à la perte de la sensibilité aux glucocorticoïdes (Gehring 1983, Okret 1983, Gruol 1984). Rappelons que c'est

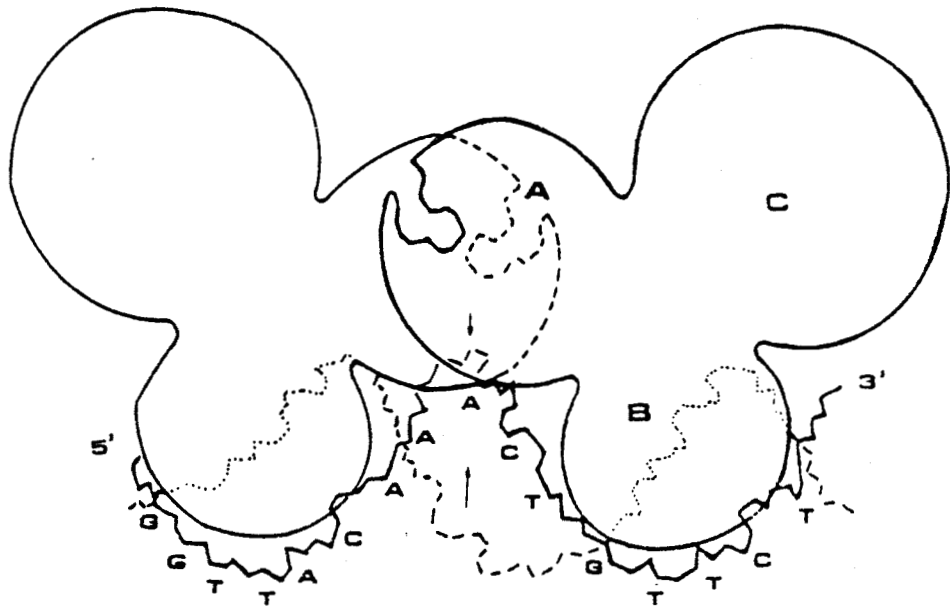


Figure 5 - Vue schématique de l'interaction hypothétique de deux monomères du récepteur des glucocorticoïdes avec le site de liaison situé sur le LTR de MMTV à la position -186. Les domaines de liaison à l'ADN (B), au stéroïde (A) et le domaine antigénique (C) sont indiqués (Scheidereit 1986)

au niveau de ce domaine que la protéine 72K identifiée par le groupe de Gustafsson se lierait pour augmenter la spécificité d'interaction du récepteur avec le DNA (Gustafsson 1986, Carlstedt-Duke 1985). Le mécanisme moléculaire par lequel l'information apportée par le récepteur au niveau du site de régulation spécifique du gène est transmise au site promoteur et déclenche son effet sur la transcription est encore tout à fait hypothétique (Tableau I).

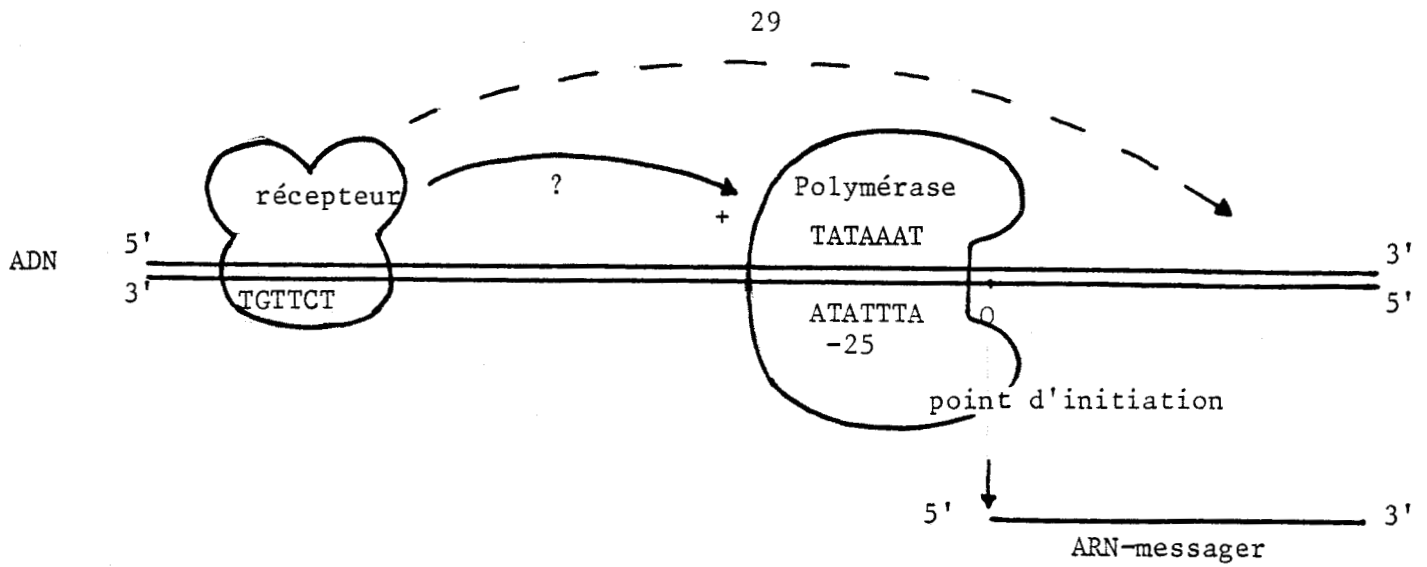
Un effet sur la structure de la chromatine paraît vraisemblable ainsi qu'en atteste l'apparition sous l'effet de glucocorticoïdes de sites hypersensibles à la DNAase I sur le fragment LTR du virus mammothrope de souris (Zaret 1984). Ces sites coïncident avec le site de régulation par les glucocorticoïdes.

Enfin, pour être complets, signalons que des effets post-transcriptionnels des récepteurs des hormone-stéroïde ne sont pas exclus et pourraient concerner la stabilisation d'ARN-messagers spécifiques (Rousseau 1984b).

6 - RECYCLAGE ET REGULATION DU RECEPTEUR

Après avoir interagi avec le noyau le récepteur retourne très vraisemblablement dans le cytoplasme. L'état dans lequel il accomplit ce retour est sujet à controverse (voir le paragraphe sur la transformation). Selon des auteurs comme Munck (1984) et Schmidt (1982) la transformation du complexe glucocorticoïde-récepteur et la dissociation ultérieure du complexe nucléaire seraient des étapes irréversibles et il existerait un véritable cycle intracellulaire du récepteur (Figure 6). La dissociation du complexe nucléaire s'accompagnerait de la libération du stéroïde et de l'oxydation du récepteur qui devrait subir une étape de réduction et de phosphorylation pour recouvrer son activité de liaison du stéroïde.

Selon les élégants travaux du groupe de Samuels (Raaka 1983 et 1985, Mc Intyre 1985) basés sur des études métaboliques utilisant des acides aminés marqués avec des atomes lourds, toutes les étapes



Hypothèse	Probabilité de l'hypothèse	Référence
Suppression de l'effet d'une protéine répresseur	faible	Ringold 1984
Interaction directe avec l'ARN polymérase	faible	"
Déroulement local de la double hélice d'ADN facilitant la liaison de l'ARN polymérase sur son site	faible	"
Modification de la conformation de l'ADN au niveau du site de liaison du récepteur avec formation d'un site d'entrée par des "facteurs d'initiation" qui glisseraient ensuite jusqu'au promoteur et activeraient la polymérase	?	"
Induction d'un changement de structure de la chromatine (déprotection par des protéines nucléaires, effet d'une ADN gyrase, etc...) qui se propagerait jusqu'au site promoteur	bonne	"
Destabilisation de la double hélice d'ADN par intercalation du stéroïde après liaison du complexe stéroïde-récepteur à l'ADN	?	Sluyser 1983
Effet chimique : modification du degré de méthylation des gènes, qui conditionnerait leur transcription		Rousseau 1984b

TABLEAU I - Hypothèses concernant le mécanisme moléculaire par lequel les complexes stéroïde-récepteur stimulent la transcription des gènes qu'ils contrôlent.

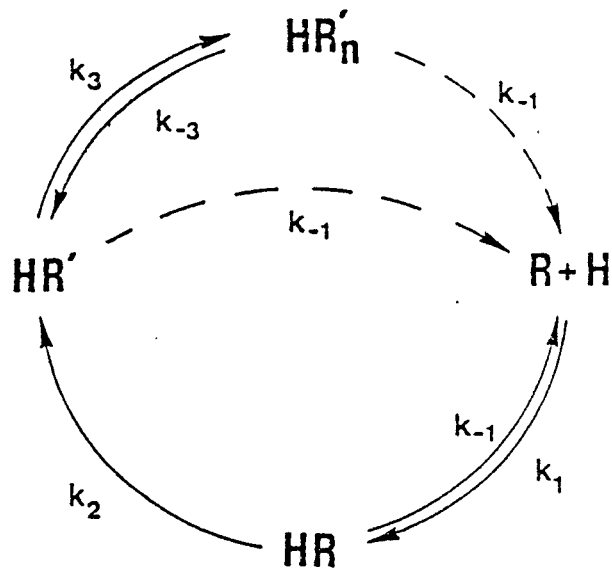


Figure 6 - Modèle cinétique de Munck (1984)

L'étape de transformation est irréversible

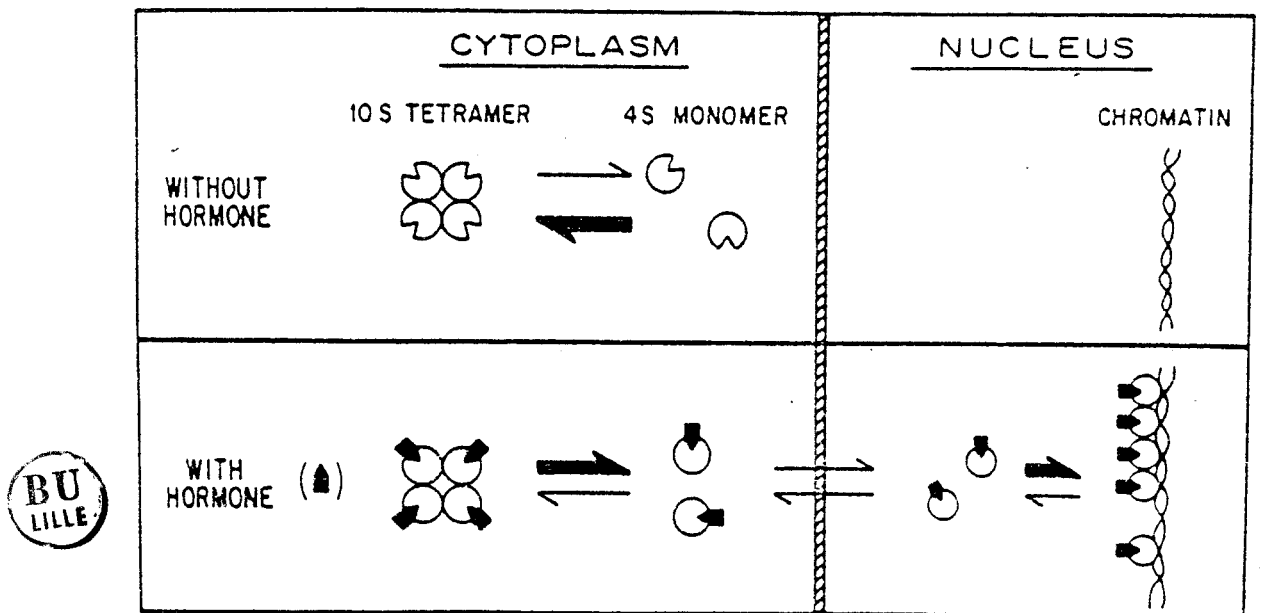


Figure 7 - Modèle à l'équilibre de Raaka (1983). Toutes les

étapes sont réversibles et la répartition du récepteur entre les différentes formes (transformée monomère 4S et non transformée 10S tétramère) dépend de la présence de l'hormone

seraient réversibles et le modèle le plus vraisemblable est celui d'un équilibre entre les diverses formes du récepteur (Figure 7). Le récepteur non lié serait sous forme oligomérique 10S, sa liaison à l'hormone entraînerait sa conversion en une forme monomérique 4S qui migrerait au noyau mais pourrait retourner ensuite inchangée dans le cytoplasme et, après le départ de l'hormone, redonner la forme 10S. Le récepteur serait soumis à un contrôle du type "down-régulation" en présence de ligand (Mc Intyre 1985). Cette régulation négative se traduirait par une diminution de 50 % des sites récepteurs en présence de l'hormone. Cette diminution réversible n'implique aucun effet sur la synthèse du récepteur et correspondrait uniquement à une diminution de 50 % de sa demi-vie en présence de l'hormone. Cet effet serait spécifique de la forme 4S, induite par l'hormone, dont la sensibilité à la protéolyse serait beaucoup plus grande que celle de la forme 10S (Mc Intyre 1985, Svec 1985b). Dans ce cadre, il est tout à fait intéressant d'observer que cet effet de "down-régulation" n'est pas présenté par l'antigluco-corticoïde RU 486 (Rajpert 1986) qui stabilise le récepteur cellulaire sous forme 8S (Formstecher 1986, Sablonnière 1986a).

Un certain nombre d'autres facteurs physiologiques ou non se sont vu attribuer des effets sur le nombre, l'affinité et l'activité des récepteurs des glucocorticoïdes *in vivo* ou sur des cellules en culture. Ces facteurs ainsi que l'ontogénèse et l'évolution avec l'âge du taux des récepteurs ne seront pas abordés ici. Ils ont fait l'objet d'excellentes revues (Rousseau 1984a, Sibley 1979, Harris 1979). Nous signalerons simplement que le chromosome codant pour le récepteur des glucocorticoïdes a été identifié chez la souris (Franck 1980) et chez l'homme (Gehring 1985) où il s'agit du chromosome 5. Enfin, le problème de la résistance acquise aux glucocorticoïdes présentée par différentes souches tumorales mutantes d'origine animale ou humaine ne sera pas non plus envisagé. Il a fait lui aussi l'objet de revues récentes (Stevens 1983, Thompson 1985, Harris 1979). L'existence d'une mutation portant sur le récepteur lui-même est fréquemment responsable de la résistance observée. De même, nous ne

ferons que signaler la description de cas de résistance innée aux glucocorticoïdes chez l'homme, résistance en rapport avec une anomalie héréditaire des récepteurs des glucocorticoïdes (Chrousos 1982, Iida 1985) portant sur leur nombre et/ou leur affinité apparente pour le stéroïde.

7 - TAUX D'OCCUPATION DES RECEPTEURS ET REPONSE BIOLOGIQUE

Les premiers auteurs qui ont mis en évidence les récepteurs ont bien sûr cherché à montrer que la liaison de l'hormone sur son récepteur potentiel était en rapport avec la réponse biologique induite dans la cellule. Il a ainsi été vérifié dans les cellules HTC, que l'ordre d'affinité pour le récepteur cytosolique *in vitro* à 0°C des différents glucocorticoïdes agonistes testés, naturels ou de synthèse, correspondait parfaitement à celui de leur activité d'induction enzymatique sur les cellules entières à 37° (Rousseau 1972, Rousseau 1975). De plus, il a été montré dans les mêmes cellules HTC d'hépatome de rat (Bloom 1980) et dans le thymocyte de souris (Dausse 1977), que la réponse biologique observée (induction de la tyrosine aminotransférase ou inhibition de l'incorporation de l'uridine) était rigoureusement proportionnelle au taux d'occupation par l'hormone des récepteurs nucléaires après incubation sur cellules entières à 37°C (Figure 8). Ces résultats très satisfaisants pour l'esprit viennent d'être remis en cause par l'observation d'un effet biologique maximum des glucocorticoïdes sur les cellules AtT20 de souris et les cellules d'hépatome de rat FU5 à des doses correspondant à une saturation très partielle des récepteurs (Svec 1982, Svec 1984, Mercier 1983). Ces observations sont en faveur de l'existence dans ces cas d'un grand nombre de récepteurs de réserve. Ils posent le problème de l'existence de sites de liaison nucléaires à très haute affinité et très faible capacité, saturables par un nombre limité de complexes hormone-récepteur. Une discussion plus générale de cette question des récepteurs de réserve dans le domaine des hormones stéroïdes a été faite par Walters (1985). L'existence de récepteurs de réserve a été fréquemment observée dans le cas des récepteurs de membrane. Leur rôle reste mal compris.

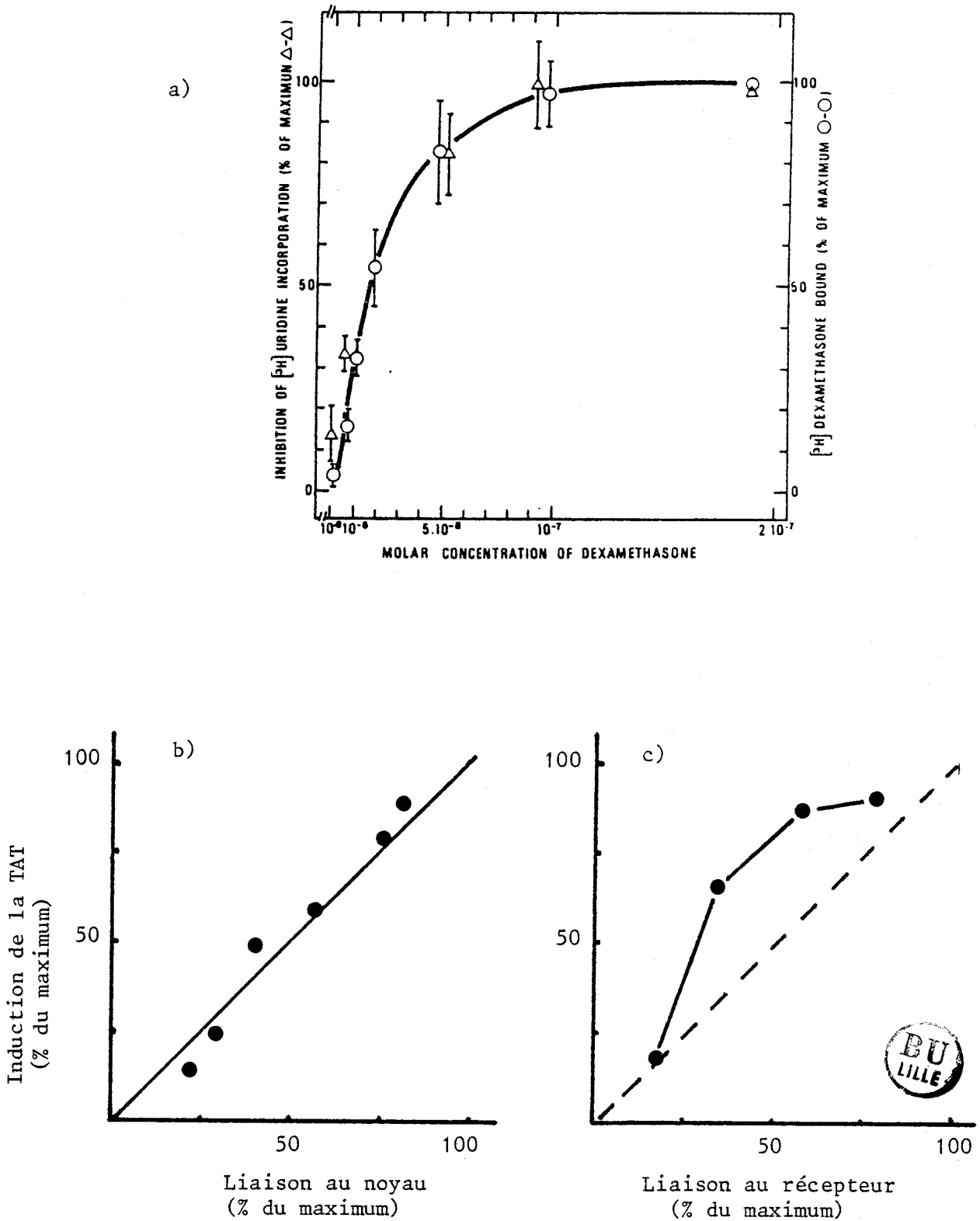


Figure 8 - Relation entre taux d'occupation des récepteurs des glucocorticoïdes et réponse cellulaire

- a) Inhibition d'incorporation de l'uridine tritiée dans les thymocytes (Dausse 1977)
- b) Induction de la tyrosine aminotransférase (TAT) dans les cellules d'hépatome HTC (Bloom 1980) et
- c) dans les cellules FU 5-5 (Mercier 1983)

II STRUCTURE DU RECEPTEUR
DES GLUCOCORTICOIDES

Tenter de définir un récepteur c'est se livrer à une manière de jeu aux règles bien codifiées. La phase préliminaire à ce jeu va consister à définir ces règles, qui sont ici les critères à respecter du point de vue de la spécificité de la liaison, de son affinité, de la concentration en sites de liaison et du rapport entre la saturation de ces sites et le déclenchement de la réponse biologique. La deuxième phase est celle du choix des partenaires : ligand et récepteur, en l'occurrence ici les glucocorticoïdes et la protéine cytosolique réceptrice de ces hormones stéroïdes particulières. La troisième phase est celle du jeu proprement dit, dont le but est d'aboutir à une élucidation complète de la structure et de la fonction du récepteur. Pour atteindre ce but il va falloir au cours de la partie extorquer un maximum de renseignements aux partenaires ligand et protéine. Tout l'art du jeu de la recherche scientifique est contenu dans le choix et la formulation des questions qui seront posées au système expérimental en cause. La pertinence de la question conditionne en effet la richesse de la réponse. Il faut cependant tenir compte dans son choix des limitations imposées par le système expérimental qui peut se révéler incompatible avec la formulation directe de certaines questions essentielles et passionnantes. Dans le cas des récepteurs des hormones stéroïdes, protéines peu abondantes et instables, il a longtemps été impossible de procéder à une purification du polypeptide liant le stéroïde. L'interrogatoire direct d'une molécule aussi évanescence avait ainsi de quoi rebuter et il apparaissait au contraire beaucoup plus facile de questionner le ligand sur ses relations avec le récepteur. Le ligand, molécule stable et de faible poids moléculaire, dont la chimie fournit de très nombreux analogues structuraux, a été largement utilisé avec ces analogues pour obtenir des indications sur la structure du site de liaison du récepteur et les mécanismes moléculaires

impliqués dans l'établissement de la liaison et de la réponse biologique. Malheureusement cette approche simple, fondée essentiellement sur des expériences diverses de liaison et des études de conformation moléculaire, apporte des renseignements assez limités. Elle connaît un renouveau avec le développement des techniques de marquage d'affinité et l'utilisation des anticorps antiidiotypiques. Ces deux derniers progrès subis par ce que nous appellerons l'approche "par le ligand", autorisent à partir d'un travail centré sur celui-ci, une caractérisation plus directe de la protéine de liaison. L'approche "par la protéine" a de son côté fait des progrès spectaculaires depuis que l'on maîtrise mieux la stabilité du récepteur et que l'on sait le purifier. Cette purification partielle ou totale a permis de préciser les propriétés physico-chimiques du récepteur, d'en étudier les domaines structuraux et d'obtenir des anticorps qui ont joué un rôle considérable dans la caractérisation de ces domaines. Ces anticorps sont également à l'origine de l'émergence récente de la troisième approche, l'approche "par l'ADN". En effet, le progrès de la biologie moléculaire et l'existence d'anticorps antirécepteurs spécifiques ont conduit à l'isolement de l'ADN complémentaire codant pour le récepteur et à la détermination de la structure primaire de celui-ci. Nous allons dans ce chapitre envisager successivement les trois approches suivies pour aborder l'étude du récepteur des glucocorticoïdes. Nous dégagerons des résultats foisonnants, et sur certains points parfois contradictoires, qu'elles ont livrés, les traits essentiels qui donnent actuellement de ce récepteur une image encore incomplète, mais pourtant singulièrement cohérente.

1 - LA LIAISON GLUCOCORTICOÏDE-RECEPTEUR : APPROCHE PAR LE LIGAND

1.1. Caractéristiques essentielles de la liaison glucocorticoïde-récepteur

Nous avons déjà exposé quelques généralités sur la nature des récepteurs cytosoliques des glucocorticoïdes et la liaison du stéroïde hormonal à ces récepteurs (voir chapitre I,

paragraphe 2). Les aspects théoriques et les problèmes pratiques liés à l'exploration de l'interaction hormone stéroïde-récepteur ont fait l'objet d'un précédent mémoire (Formstecher 1980a). Nous nous limiterons ici à présenter les résultats principaux concernant les paramètres de liaison du stéroïde au récepteur des glucocorticoïdes. Une étude complète et détaillée des divers aspects de cette liaison n'a été possible que pour les quelques stéroïdes tritiés disponibles sur le marché scientifique. Cette étude donne des résultats très intéressants pour comprendre le mécanisme de la liaison hormone-récepteur et vérifier la validité des modèles théoriques. Elle est indispensable pour la caractérisation éventuelle d'un comportement particulier des anti-glucocorticoïdes sur le plan de leurs propriétés de liaison au récepteur et pour la compréhension des bases moléculaires de l'activité anti-glucocorticoïde. Elle a fait l'objet de revues relativement récentes (Bell 1979, 1982).

a) Liaison à l'équilibre

Du fait de la labilité du récepteur des glucocorticoïdes, la détermination des paramètres de liaison à l'équilibre nécessite de stabiliser le récepteur. En présence d'agents réducteurs, d'EDTA et de molybdate, la demi-vie du récepteur devient largement supérieure au temps nécessaire à l'établissement de l'équilibre avec tous les stéroïdes testés (Bell 1982) et la correction proposée pour tenir compte de la dénaturation du récepteur est inutile (Bell 1973). On met en évidence une seule classe de sites de liaison à haute affinité, saturables et spécifiques. La spécificité de liaison dépend de la nature du stéroïde. Les stéroïdes de synthèse fluorés, tels que la dexaméthasone ou l'acétonide de triamcinolone ne se lient qu'au récepteur et pas à la transcortine. La concentration des sites dans le foie ou le thymus de rat surrénalectomisé est 0,5 à 1,0 pmol/mg de cytosol, soit environ 3000 à 5000 sites par cellule. La constante de dissociation à l'équilibre de la dexaméthasone est de l'ordre de la nM dans divers tissus cibles (Baxter 1971, Koblinsky 1982, Pratt 1975, Yeakley 1980). La valeur de cette

constante mesurée *in vitro* dans du cytosol dépend de la composition du tampon d'homogénéisation. La calcium libre à une concentration de l'ordre de la micromole par litre, entraîne une diminution apparente d'un facteur trois du K_d à l'équilibre par un mécanisme inconnu (Rousseau 1982). Les sites de liaison sont apparemment indépendants puisque les diagrammes de Hill ont une pente égale à l'unité (Jones 1980 ; Rousseau 1972 et 1977). Les divers stéroïdes testés se lient donc à la même classe de sites récepteurs ou à deux classes de sites mutuellement exclusifs et présents en nombre égal.

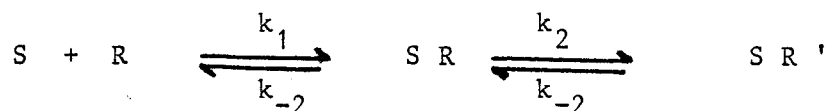
b) Aspects cinétiques de la liaison

Les résultats des quelques études réalisées à ce jour sont regroupés dans le tableau II.

- Cinétique d'association

. A faible concentration en stéroïde (jusque 20 nM) la cinétique d'association est du deuxième ordre à 0°. Les stéroïdes testés présentent des constantes de vitesse d'association variant de 0,2 à $4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ mn}^{-1}$. Si on compare les résultats concernant des tissus du même animal (thymus et foie de rat), les résultats se resserrent et la constante de vitesse d'association dépend manifestement assez peu de la nature du stéroïde ($0,2$ à $0,9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ mn}^{-1}$).

. A concentration élevée en stéroïde (jusque 600 nM suivant les stéroïdes testés) certains auteurs n'obtiennent plus une cinétique du deuxième ordre (Bell 1978, 1980, 1982 ; Jones 1982 ; Pratt 1975). Pratt (1975) observe que la vitesse initiale d'association ne varie pas linéairement avec la concentration en stéroïde : il obtient une courbe à deux pentes dont la cassure apparaît pour une concentration en stéroïde variable selon les cas (30 nM pour l'acétonide de triamcinolone, 150 nM pour le cortisol) et correspond à une saturation du récepteur inférieure à 25 %. Pour expliquer ces résultats il propose un modèle de liaison à deux étapes.



Stéroïde	Tissu étudié	Auteurs	$k + 1$	$k - 1$	$\frac{k-1}{k+1}$	K_D	$\frac{K_D}{k-1/k+1}$
			$\times 10^{-6} M^{-1} mn^{-1}$	$\times 10^{-3} mn^{-1}$	(nM)	(nM)	
Acétonide de triamcinolone	Thymus de rat	Schaumburg (1972)	0,17(a)	< 0,05(a)	< 0,3	1,6(a)	6
		Bell (1973)	0,7	0,26	0,37	8,8(b)	24
	Fibroblastes de souris	Pratt (1975)	0,67	0,04	0,06	1,6	27
	Cellules At-T-20	Yeakley (1980)	1,4	0,034	0,024	1,9	80
Dexaméthasone	Cellules HTC	Baxter (1971)	4,1	3,0	0,74	3,0	4,1
	Thymus de rat	Schaumburg (1972)	0,28(a)	0,37(a)	1,3	1,9(a)	1,5
		Bell (1973)	0,4	3,1(b)	8	15 (b)	1,9
	Foie de rat	Koblinski (1972)	0,87	1,2	1,4	3,7	2,6
	Fibroblastes de souris	Pratt (1975)	0,31	0,12	0,39	7,6	19
	Cellules At-T.20	Yeakley (1980)	1,6	0,76	0,48	5,6	12
Corticostérone	Thymus de rat	Schaumburg (1972)	0,33(a)	0,84(a)	2,5	3,5(a)	1,4
	Cellules At-T.20	Yeakley (1980)	1,4	4,9	3,5	24	7
Cortisol	Thymus de rat	Schaumburg (1972)	0,17(a)	0,83(a)	4,9	8,5(a)	1,7
		Bell (1973)	0,50	16	32	59	1,9
	Fibroblastes de souris	Pratt (1975)	0,3	13	43	28	0,7
Progestérone	Cellules HTC	Rousseau (1972)	"très rapide"	34		23	
	Thymus de rat	Jones (1980)		28		39	
Déoxycorticostérone	Thymus de rat	Schaumburg (1972)	0,28(a)	1,5(a)	5,2	5,3(a)	1,02
11-Déoxycortisol	Thymus de rat	Bell (1973)		33		130	

(a) à - 5° dans le glycérol
(b) incubation manifestement trop courte

TABLEAU II - Paramètres d'interaction de divers stéroïdes avec le récepteur des glucocorticoïdes

selon le modèle $S + R \xrightleftharpoons[k-1]{k+1} SR$

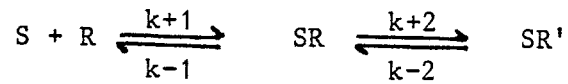
La première étape correspondrait à la formation rapide d'un complexe SR d'affinité assez faible, suivie de la deuxième étape de production lente de complexe à haute affinité SR'. Ce modèle obéit à une cinétique michaelienne. La constante de dissociation caractérisant le premier équilibre serait à peu près la même pour les différents stéroïdes (80 à 240 nM) dont les différences d'affinité pour le récepteur s'expliqueraient par les propriétés cinétiques particulières de la deuxième réaction. En effet, si les valeurs de k_2 apparaissent également très voisines pour les trois stéroïdes testés, la constante de vitesse de dissociation k_{-2} varie considérablement. Des résultats similaires ont été rapportés par le groupe de Bell (Bell 1982, Jones 1982) qui observent des différences quantitatives entre les paramètres mesurés pour des stéroïdes agonistes et antagonistes (Tableau III). L'application de ce modèle michaelien à l'interaction glucocorticoïde-récepteur a été remise en cause par Yeakley (1980). Cet auteur a montré que la variation non linéaire de la vitesse d'association avec la concentration en stéroïde peut très bien s'expliquer avec un modèle bimoléculaire simple d'interaction stéroïde-récepteur prenant également en compte l'inactivation du récepteur libre. Notons cependant que si une stabilisation correcte du récepteur libre n'était pas assurée dans les expériences initiales de Pratt, il n'en allait pas de même dans celles plus récentes de Jones.

- Cinétique de dissociation

La dissociation du complexe stéroïde-récepteur des glucocorticoïdes apparaît comme étant un phénomène simple du premier ordre. La constante de vitesse de dissociation varie considérablement selon la nature du stéroïde testé et il apparaît que les différences d'affinité entre stéroïdes proviennent essentiellement de leurs différences de vitesse de dissociation du récepteur. La plupart des auteurs interprètent ce résultat en faisant l'hypothèse que l'association stéroïde-récepteur est un phénomène ne mettant pratiquement pas en jeu les groupements fonctionnels portés par le noyau stéroïde, ces groupements n'intervenant que pour arrimer secondairement le

Stéroïde	K_M (nM)	$k + 2$ (min^{-1})	$k - 2$ (min^{-1})	$k-2/k+2$
Acétonide de triamcinolone	243	0,250	$4,91 \times 10^{-4}$	$1,96 \times 10^{-3}$
Dexaméthasone	254	0,246	$2,19 \times 10^{-3}$	$8,89 \times 10^{-3}$
11-désoxycorticostérone	76,4	0,067	$2,36 \times 10^{-2}$	0,35
Progestérone	47,8	0,048	$2,37 \times 10^{-2}$	0,49

TABLEAU III - Constantes d'interaction stéroïde-récepteur
des glucocorticoïdes d'après le modèle michaelien
(Bell 1982)



L'acétonide de triamcinolone et la dexaméthasone sont des agonistes puissants, tandis que la 11-désoxycorticostérone et la progestérone sont des antiglucocorticoïdes.

stéroïde au récepteur et diminuer ainsi sa vitesse de dissociation (Munck 1972, Wolff 1982, Eliard 1984).

- Discordance entre K_d mesuré à l'équilibre et rapport des constantes de vitesse $\frac{k - 1}{k + 1}$

Les résultats publiés jusqu'en 1980 montrent une différence qui peut être très importante et semble proportionnelle à l'affinité du stéroïde considéré pour le récepteur (Tableau II). Son existence a été considérée comme un argument en faveur de modèles d'interaction stéroïde-récepteur comportant plusieurs étapes (cf supra). Mais il semble maintenant établi que l'explication la plus vraisemblable soit l'absence de véritable équilibre au cours des mesures de K_d et/ou l'inactivation progressive du récepteur (Aranyi 1979, Bell 1973, Yeakley 1980). Jones (1982) dans une étude plus récente trouve une bonne concordance entre les valeurs de K_d mesurées à l'équilibre ou calculées à partir des constantes de vitesse d'association et de dissociation pour une dizaine de stéroïdes divers.

-Spécificité éventuelle du comportement cinétique des antigluco-corticoïdes

Le tableau IV montre clairement qu'il n'existe apparemment pas de corrélation entre les valeurs des constantes cinétiques d'interaction des stéroïdes avec le récepteur des glucocorticoïdes et leur classification en fonction de leur effet biologique. Les différences d'affinité sont en revanche mieux corrélées avec la nature des divers substituants portés par le noyau stéroïde (voir le paragraphe 1.2 de ce chapitre). Bell (1982) et Jones (1982) observent cependant des différences quantitatives entre antagonistes et agonistes dans les paramètres d'interaction avec les deux formes de complexe stéroïde-récepteur postulées par le modèle michaelien (tableau III). Les valeurs du K_M pour les deux antagonistes testés sont significativement plus faibles que celles des agonistes, tandis que la constante de vitesse de dissociation $k-2$ est plus élevée. Les

Stéroïde	Classification	K_d (nM)	k_{+1} ($1 \cdot \text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$)	k_{-1} (min^{-1})
Acétonide de triamcinolone	Ag	0,12	$1,58 \times 10^6$	$4,91 \times 10^{-4}$
RU 486	An	2,5		$1,7 \times 10^{-4}$
Dexaméthasone	Ag	4,02	$8,83 \times 10^5$	$2,19 \times 10^{-3}$
6 α ,16 α -Diméthyl progestérone	Ag/An	4,62	-	-
Corticostérone	Ag	12,1	$6,94 \times 10^5$	$1,26 \times 10^{-2}$
11 β -hydroxyprogestérone	Ag/An	14,7	-	-
11-Déoxycorticostérone	Ag/An	15,8	$5,08 \times 10^5$	$2,36 \times 10^{-2}$
Prednisolone	Ag	18,1	$4,52 \times 10^5$	$9,29 \times 10^{-3}$
16 α -méthylprogestérone	An	32,7	-	-
Progestérone	An	33,8	$6,42 \times 10^5$	$2,37 \times 10^{-2}$
Aldostérone	Ag/An	73,2	$1,40 \times 10^5$	$9,03 \times 10^{-3}$
Cortisol	Ag	73,2	$3,26 \times 10^5$	$2,78 \times 10^{-2}$
11-Déoxycortisol	Ag/An	191	-	0,17
17-Hydroxyprogestérone	An	367	-	> 0,15

TABLEAU IV - Paramètres d'interaction de divers stéroïdes antagonistes (An), agonistes partiels (Ag/An) et agonistes purs (Ag) avec le récepteur des glucocorticoïdes du thymus de rat (Bell 1982). Les valeurs concernant le RU 486 sont celles de Philibert (1984).

mêmes auteurs voient un argument supplémentaire en faveur de l'existence de la forme intermédiaire de liaison à faible affinité du complexe stéroïde-récepteur dans l'observation d'une courbe de dissociation biphasique de ce complexe quand il est formé avec la progestérone. Cet antiglucocorticoïde favoriserait cette forme intermédiaire qu'il ne convertirait que partiellement en la forme plus stable SR' (voir précédemment). Mais un tel effet n'est pas observé avec le RU 486 antiglucocorticoïde extrêmement actif, à très forte affinité pour le récepteur dont il se dissocie très lentement (Philibert 1984). Force est donc de conclure qu'il n'existe aucune particularité des paramètres de liaison des divers stéroïdes en rapport avec leur activité biologique.

- Coopérativité négative et deuxième site de liaison

L'existence d'un deuxième site de liaison des stéroïdes sur le récepteur a été évoquée pour rendre compte de l'augmentation de la vitesse de dissociation du complexe [³H] Dexaméthasone-récepteur observée en présence de certains stéroïdes tels que la progestérone (Jones 1980, Suthers 1976, Svec 1980). Cet effet n'est observé qu'à de très fortes concentrations en stéroïde (plus de 10 µM), concentrations largement supérieures à celles auxquelles l'effet antiglucocorticoïde de la progestérone commence à se manifester. La signification physiologique de ce deuxième site et son éventuelle spécificité antiglucocorticoïde sont très discutables. En fait, aucun des modèles d'interaction proposés pour rendre compte en termes de modalités particulières de la liaison de la différence d'activité biologique des agonistes et des antagonistes (Bell 1979) n'a pu pour l'instant être suffisamment étayé sur le plan expérimental pour emporter l'adhésion. Il en est ainsi du modèle allostérique proposé par Samuels et Tomkins (1970), du modèle de conformation induite de Pratt (1975), du modèle avec site d'entrée de Bell (1978) et du modèle avec coopérativité négative et deuxième site de liaison que nous venons de discuter. C'est très probablement d'une caractérisation plus précise du récepteur sur le plan structural et

conformationnel après liaison, soit d'un agoniste puissant, soit d'un antagoniste à forte affinité comme le RU 486, que viendront les progrès dans la compréhension du mécanisme par lequel le récepteur s'aperçoit qu'il a affaire à une antihormone plutôt qu'à un stéroïde biologiquement actif (voir précédemment chapitre I, paragraphe 3-b).

c) Aspects thermodynamiques de la liaison

Ils ont été peu étudiés du fait de la grande labilité à la chaleur du récepteur des glucocorticoïdes qui limite fortement l'intervalle de température utilisable. La réaction de dégradation du récepteur, qui concerne essentiellement le récepteur libre non lié à l'hormone, augmente considérablement de vitesse avec la température et ceci introduit un biais dans la détermination de la constante de dissociation à l'équilibre : les échantillons incubés avec de faibles concentrations d'hormone sont beaucoup plus sensibles à ce phénomène que ceux correspondant à la saturation du récepteur et ceci aboutit à des diagrammes de Scatchard faussés avec des mesures erronées de la constante de dissociation à l'équilibre. D'autre part, quand la température s'élève, le complexe hormone-récepteur se transforme, ce qui complique l'interprétation des résultats puisqu'on n'a plus alors affaire à une interaction bimoléculaire simple. Tout ceci explique la discordance apparente des résultats publiés à ce jour (Tableau V).

Selon les deux études les mieux documentées (Wolff 1978, Eliard 1984) les diagrammes de Van't Hoff et d'Arrhénius décrivant l'effet de la température sur l'interaction du récepteur des glucocorticoïdes avec la corticostérone, le cortisol ou la dexaméthasone sont curvilinéaires. A l'équilibre, l'enthalpie de la réaction décroît avec la température. Il en va de même pour l'entropie. Pour d'autres auteurs au contraire, l'enthalpie de la réaction ne varie pas avec la température car les diagrammes de Van't Hoff obtenus sont rectilignes (Koblinsky 1972, Snochowski 1980, Cardo 1983). Les parts relatives de l'enthalpie et de l'entropie dans l'énergie de

Matériel utilisé	Cellules d'hépatome de rat HTC	Foie de rat	Muscle de rat	Cellules humaines IM 9	Thymus de Veau		
Stéroïde utilisé	Corticostérone	Dexaméthasone	Dexaméthasone	Dexaméthasone	Dexaméthasone		
Auteur	Wolff 1978	Koblinski 1972	Snochowski 1980	Eliard 1984	Cardo 1983		
Présence de MoO ₄	-	-	-	+	-	+	
Mesures à l'équilibre							
à 0°	ΔG	- 28	- 46	- 41	- 47,1	- 46	- 46
	ΔH	5	- 25,5	0	35,5	- 75	- 42
	ΔS	121	75	151	302	- 96	17
à 5°	ΔG	- 27,4					
	ΔH	0					
	ΔS	100,3					
à 10°	ΔG	- 27,8			- 49,3		
	ΔH	- 4,2			- 7,3	- 75	- 42
	ΔS	83,6			148		
à 15°	ΔG	- 27,3		- 44,5			
	ΔH	- 9,2		0			
	ΔS	63		155			
à 20°	ΔG	- 28,1					
	ΔH	- 13,4					
	ΔS	50					
à 23-25°	ΔG			- 44,1	- 49,8		
	ΔH			0	- 74,5	- 75	- 42
	ΔS			149	- 83		
Aspects cinétiques :							
énergie d'activation de formation du complexe							
à 0°	ΔG*		61		45,3	23,8	28,8
	ΔH*	53,5			84,1	17,5	57
	ΔS*	72			142	- 23	106
à 25°	ΔG*				44,3	23,9	28,8
	ΔH*				24,2	17,5	57
	ΔS*				- 68	- 23	106

TABLEAU V - Principaux paramètres thermodynamiques de l'interaction glucocorticoïde-récepteur d'après la littérature. ΔG et ΔH sont exprimés en kJ.mol⁻¹ et ΔS en Jmol⁻¹ T⁻¹

liaison font d'ailleurs l'objet de controverses. Pour la plupart des auteurs, l'entropie de la réaction, fortement positive à 0°C (75 à 302 Jmol⁻¹ T⁻¹) joue un rôle favorable prépondérant dans la liaison à basse température, et la participation de l'enthalpie apparaît négligeable (Snochowski 1980) ou modérément défavorable (Wolff 1978, Eliard 1984). Quand la température augmente le facteur entropique resterait prépondérant (Wolff 1978, Snochowski 1980) ou verrait son importance diminuer au profit de l'enthalpie de liaison (Eliard 1984). Cette discussion a de l'importance car elle conditionne notre conception des interactions physiques responsables de la liaison stéroïde-récepteur. En effet, une liaison où l'entropie domine est vraisemblablement de type hydrophobe alors que la part de l'enthalpie correspond sans doute à un autre type de liaison non covalente (liaison hydrogène en particulier). Pour Wolff (1982) le phénomène est essentiellement hydrophobe et le calcul de la surface d'interaction entre le récepteur et son ligand montre d'ailleurs que les deux faces du noyau stéroïdien sont impliquées dans la liaison. Pour Eliard (1984) au contraire, pas plus d'une face du stéroïde ne serait engagée dans la liaison avec le récepteur qui comporterait deux étapes : une première étape de reconnaissance hydrophobe non spécifique suivie d'une seconde étape d'arrimage spécifique du ligand grâce aux liaisons non covalentes engagées avec des fonctions particulières portées par le noyau stéroïdien. Les données de l'étude thermodynamique à l'équilibre, celles concernant les variations avec la température de l'enthalpie et de l'entropie d'activation du complexe stéroïde-récepteur, le recours à l'utilisation de molybdate et le contrôle sérieux des conditions expérimentales étayaient fortement le modèle proposé par cet auteur, modèle inspiré du schéma général d'interaction protéine-ligand décrit par Ross (1981). Tous ces résultats bien cohérents sont difficiles à concilier avec ceux de Cardo (1983) qui observe dans le thymus de veau une liaison avec la dexaméthasone dont l'enthalpie et l'entropie sont fortement négatives à 0°C en l'absence de molybdate. L'enthalpie est ici le facteur prépondérant de la liaison. L'addition de molybdate entraîne une modification profonde de l'enthalpie qui diminue

fortement , et surtout de l'entropie qui devient positive sans toutefois jouer le rôle principal dans la liaison. L'auteur interprète ses résultats comme un argument en faveur de l'interaction directe du molybdate avec le récepteur sans exclure que le récepteur ait été complètement transformé en l'absence de molybdate. En effet, la transformation s'accompagne également de phénomènes thermodynamiques propres que le groupe de Milgrom a bien étudiés (Atger 1976, Milgrom 1981). La transformation apparaît comme une réaction réversible avec une variation d'énergie libre très faible ($\Delta G = 1 \text{kJmol}$) Cet équilibre est peu sensible à la température. Les valeurs positives élevées de l'enthalpie et de l'entropie d'activation sont en faveur de la rupture de liaisons non covalentes au cours de la transformation. Le diagramme énergétique de la liaison du stéroïde au récepteur et de la transformation du complexe est représenté sur la figure 9.

1.2. Corrélation structure du stéroïde-activité de liaison au récepteur

a) Généralités

Un certain nombre de travaux ont été consacrés à l'étude systématique de la corrélation entre structure stéroïde et activité de liaison au récepteur des glucocorticoïdes (Rousseau 1972 et 1977, Dausse 1977, Ojasoo 1978, Wolff 1978). Les séries de produits sont importantes et leur effectif , de l'ordre de 30 à 40 en général, atteint plus de 700 dans le travail monumental d'Ojasoo qui ne retient cependant que les résultats des 81 stéroïdes les plus intéressants. Son étude a le mérite de tester la liaison de chaque stéroïde à chacun des cinq récepteurs des hormones stéroïdes (androgènes, oestrogènes, progestérone, minéralocorticoïde et glucocorticoïde) ce qui permet d'évaluer non seulement l'affinité de chaque stéroïde, mais aussi sa spécificité de liaison. La mesure de l'affinité de ces très nombreux stéroïdes, qui n'existent bien sûr pas sous forme radioactive, est réalisée à l'aide d'expériences de compétition où le stéroïde à tester est, soit ajouté en quantités croissantes à un milieu d'incubation comportant le récepteur cyto-

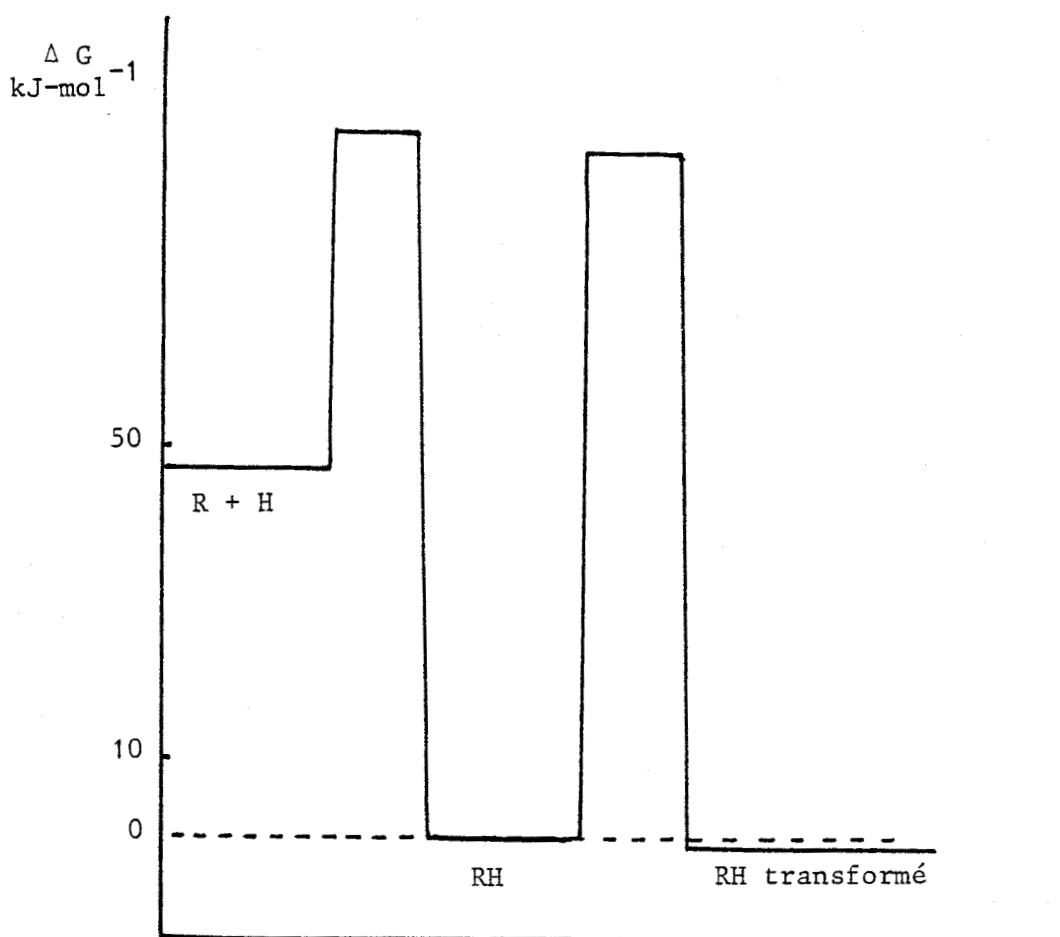


Figure 9 - Variation d'énergie durant la liaison de l'acétonide de triamcinolone (H) au récepteur (R) des glucocorticoïdes et la transformation du complexe (d'après Milgrom 1981).

lique et une quantité fixe de glucocorticoïde radioactif de référence, soit ajouté à concentration fixe à une gamme d'incubation comportant le même récepteur et des concentrations croissantes de ligand radioactif de référence. Les résultats obtenus sont reportés sur des courbes du type de celles représentées sur la figure 10. Le premier type de compétition a le mérite de permettre la comparaison facile sur une même courbe de l'affinité de plusieurs produits distincts, alors que le second a l'avantage de visualiser le caractère compétitif de l'inhibition de liaison obtenue. La théorie et les limites pratiques de ces méthodes ont été détaillées lors d'un précédent mémoire (Formstecher 1980). Le ligand de référence est le plus souvent la dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse à forte affinité et forte spécificité pour le récepteur des glucocorticoïdes. Les compétitions ont été menées vis-à-vis du récepteur cytosolique des cellules d'hépatome de rat en culture (Rousseau 1972 et 1985, Wolff 1978), du foie de rat (Ojasoo 1977) ou des thymocytes de souris (Dausse 1977). Toutes ces expériences de compétition ont été réalisées à 0°C. Ces mesures in vitro sur fractions acellulaires ne donnent pas forcément un reflet fidèle de ce que serait la liaison sur des cellules intactes à 37°C et leur signification physiologique n'est pas garantie (Jones 1979, Mc Donald 1979). L'effet de la température sur l'affinité de la liaison stéroïde-récepteur peut varier en effet avec le stéroïde considéré (voir précédemment les aspects thermodynamiques de l'interaction). Cependant, pour des raisons pratiques de stabilité du récepteur, les valeurs obtenues à 0°C sont les seules que nous discuterons.

La figure 11 représente les structures des principaux stéroïdes testés avec une indication de leur affinité et éventuellement de leur activité biologique (agoniste ou antagoniste).

b) Effet des substituants

L'effet individuel des substituants sur les diverses positions du noyau stéroïdien et de la chaîne latérale a été mesuré par la comparaison de paires de stéroïdes ne différant que par un seul

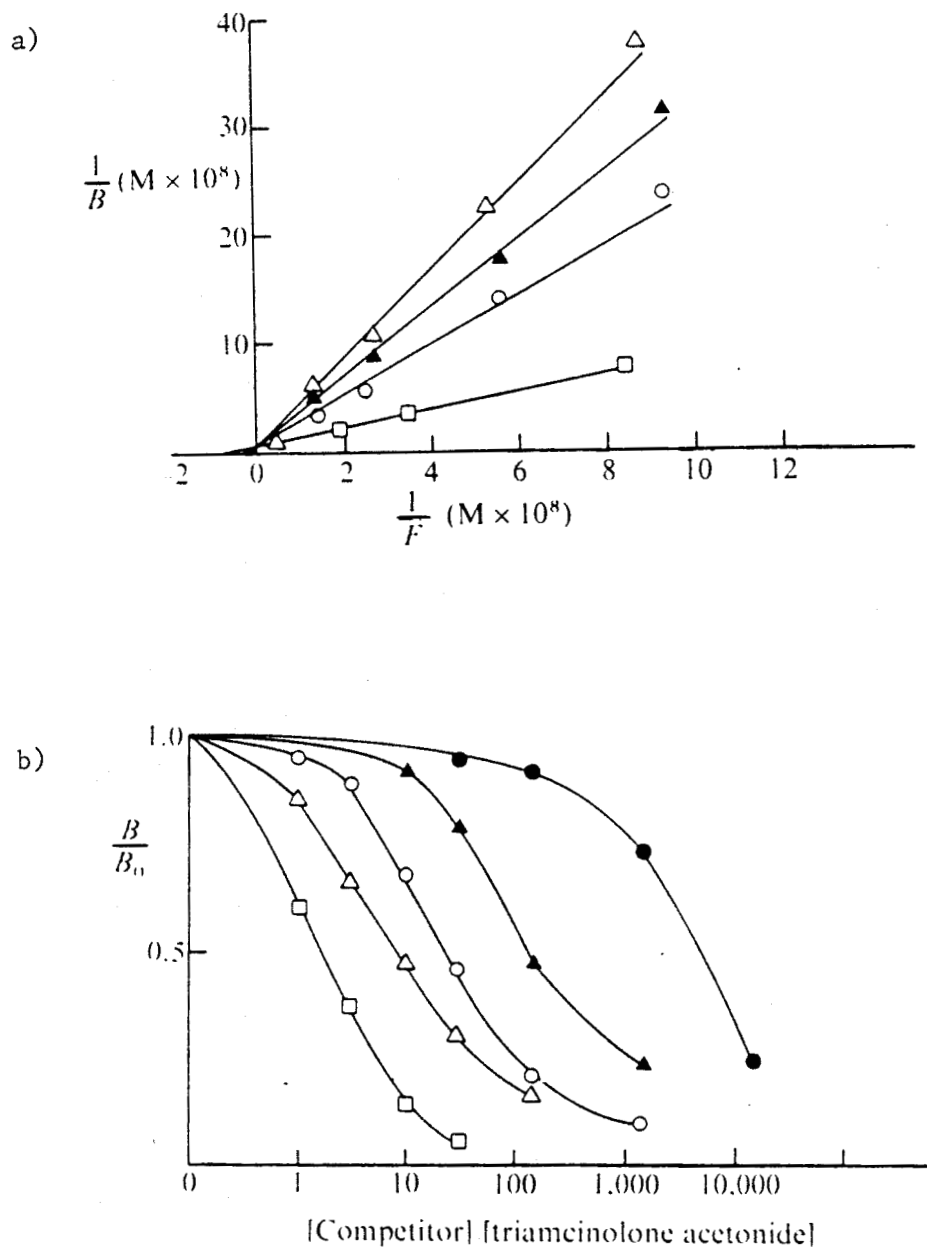


Figure 10 - Un exemple de courbes de compétition entre des stéroïdes compétiteurs froids et un ligand de référence, la dexaméthasone tritiée, pour la liaison au récepteur des glucocorticoïdes.

- a) à concentration fixe en compétiteur et variable en dexaméthasone
 b) à concentration fixe en dexaméthasone et variable en compétiteur

(d'après Rousseau 1979b)

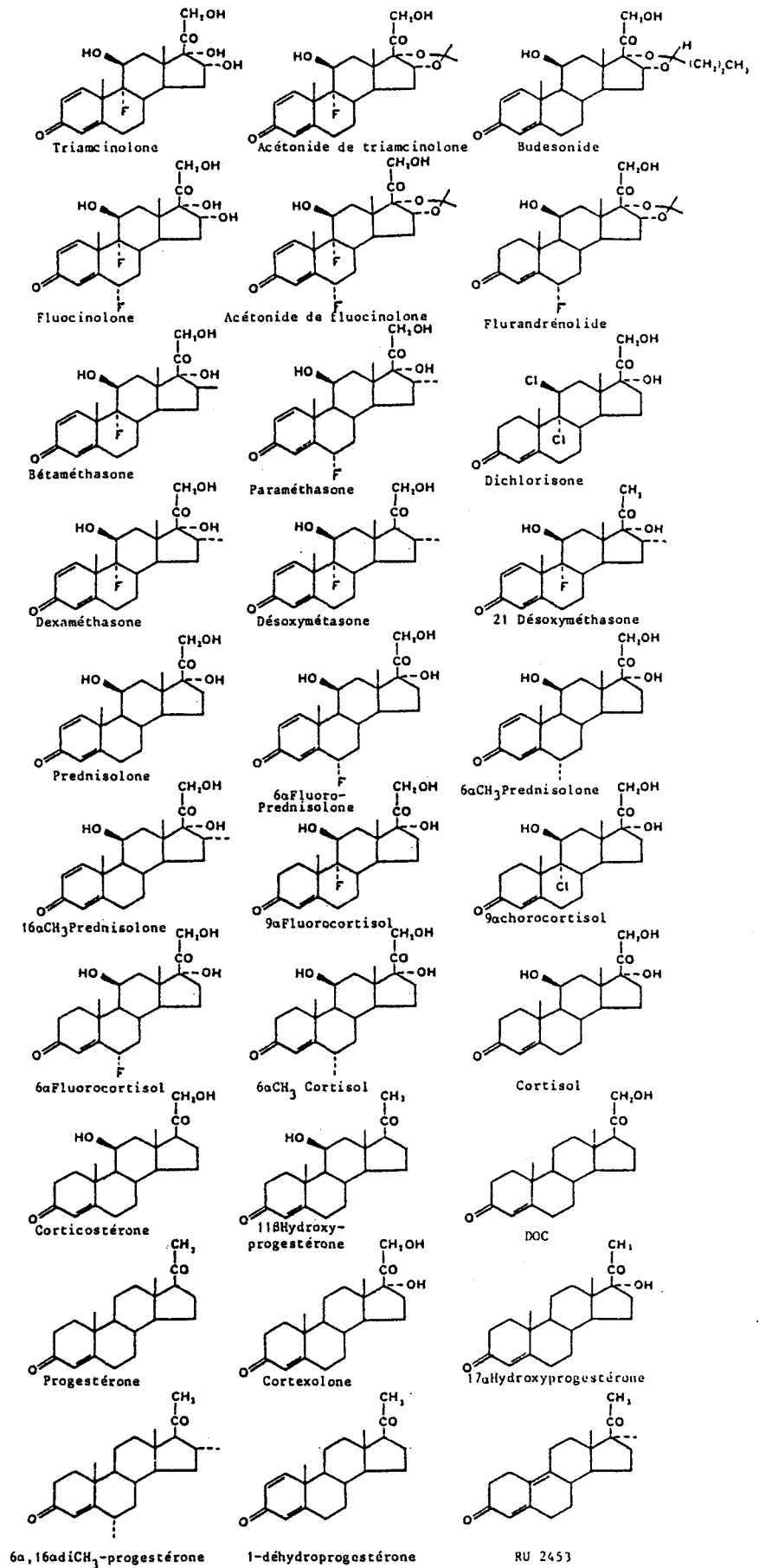
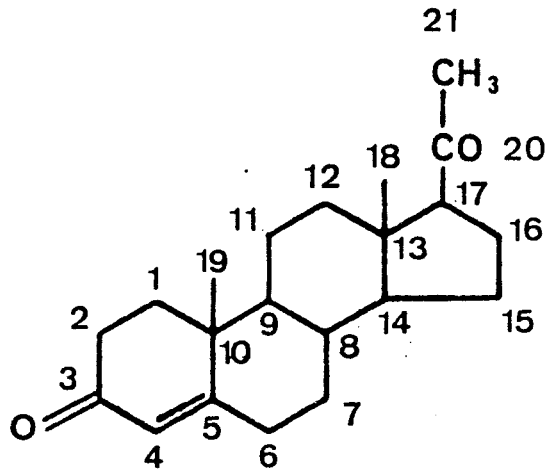


Figure 11 - Structure de divers stéroïdes ayant une bonne affinité pour le récepteur des glucocorticoïdes. Ils sont tous agonistes sauf les sept derniers qui ont une activité antiglucocorticoïde (d'après Rousseau 1972 et 1975, Ojasso 1978, Dausse 1977, Wolff 1978, Dahlberg 1984).

substituant sur la même position. Ces comparaisons effectuées sur des stéroïdes ayant pour la plupart comme structure de base le noyau pregnane aboutissent aux résultats essentiels suivants (Tableau VI) : une liaison correcte exige une structure de base de type 3,20-dioxo-4-pregnène, l'hydroxylation en 11 et en 21 augmentent cette affinité ainsi que l'introduction d'une double liaison en 1-2 et la substitution du carbone 6 ou du carbone 9 par un halogène de faible volume. Une substitution du carbone 1 ou 2 du cycle A, l'hydroxylation du carbone 11 en α plutôt qu'en β et la réduction des cétones en 3 ou en 20 apparaissent incompatibles avec la liaison. La substitution sur les autres positions apparaît moins cruciale. Si l'hydroxylation en 16 α et en 17 α a un effet négatif sur l'affinité, cet effet peut être renversé par le couplage sur le 16 α 17 α glycol d'une cétone ou d'un aldéhyde, acétone dans le cas de l'acétonide de triamcinolone ou butyraldéhyde dans celui du budésonide (Dahlberg 1984). Ces deux produits figurant parmi les stéroïdes présentant la plus forte affinité pour le récepteur, ce qui laisse supposer que les contraintes stériques sont modérées en regard du cycle D, puisqu'on peut greffer un substituant encombrant, mais que cette région est également importante pour l'affinité de la liaison. La substitution des carbones 16 et 17 augmente d'ailleurs la spécificité glucocorticoïde de la liaison, avec une diminution de liaison aux autres récepteurs, en particulier minéralocorticoïde (Ojasoo 1978). L'effet de plusieurs substituants sur la même molécule n'est que grossièrement additif (l'additivité diminue avec le nombre de substituants). L'effet d'un même substituant sur la même position dépend parfois de la structure du stéroïde de départ et de la nature des substituants qu'il porte déjà, c'est ainsi que la méthylation en 16 a un effet positif quand le stéroïde de départ est hydroxylé en 21 (Rousseau 1977) ou méthylé en 6 (Ojasoo 1977) et négatif dans le cas contraire. De même l'hydroxylation en 11 a un effet positif sur l'affinité des dérivés du prégnène et négatif sur celle de certains dérivés de l'androstane (Rousseau 1977), tandis que l'ablation du méthyl 19 améliore l'affinité des dérivés 11 désoxy et réduit celle



n° du carbone	Substituant	Effet sur l'affinité
1	CH ₃	↓
	Δ ¹⁻²	↑
2	CH ₃	↓
3	réduction de la cétone	↓
4-5	réduction de la Δ ₄₋₅	↓
6	αCH ₃	↑
	αF	↑
	αOH	↓
9	αF ou αCl	↑
	αBr	↓
	αOCH ₃	↓
11	βOH	↑
	αOH	↓
	11β OH → 11 céto	↓
14	αOH	↓
16	αCH ₃	↓ ou ↑
	βCH ₃	↓ ou ↑
	αOH	↓
17	αOH	↓
	αCH ₃	↑
18	al	↓
19	nor	↓ ou ↑
20	réduction de la cétone	↓
21	OH	↑

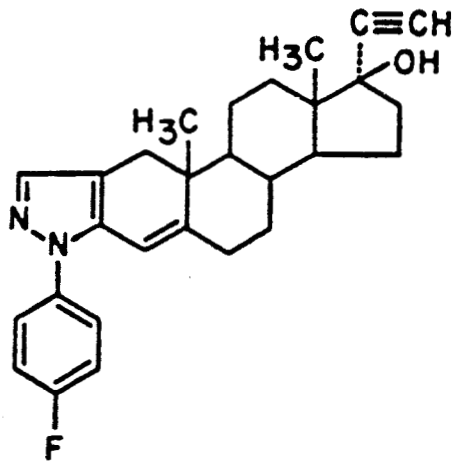
TABLEAU VI - Effet des substituants des stéroïdes à noyau 3,20 dioxo 4-pregnène (progestérone) sur leur affinité pour le récepteur des glucocorticoïdes (d'après Rousseau 1972, 1977, 1983, Duval 1977, Ojasoo 1978, Wolff 1978, Wynne 1980).

des 11β hydroxy (Wynne 1980). Enfin, l'introduction d'un fluor en 9α est bénéfique aux dérivés tels que l'acétonide de triamcinolone, mais pas à ceux de la série du budésonide (Dahlberg 1984).

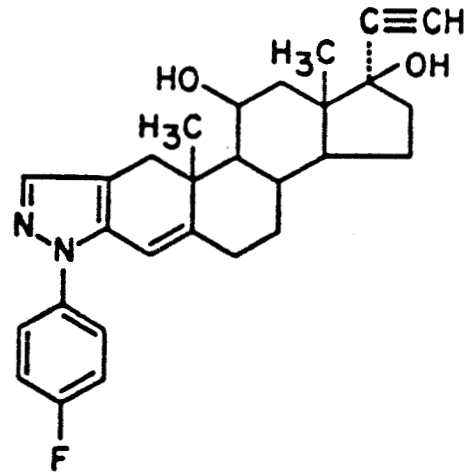
Le rôle fondamental dans la liaison au récepteur des glucocorticoïdes de la cétone en 3, de l'hydroxylation en 11β et de la chaîne latérale 17β est cependant remis en cause par l'existence de stéroïdes ayant une bonne affinité pour le récepteur sans présenter toutes ces propriétés structurales considérées comme essentielles. C'est ainsi que :

. le caractère indispensable de la cétone en 3 peut être discuté au vu de l'activité de liaison élevée présentée par les dérivés 3-chloro et 3-bromo de l'acétonide de triamcinolone et de l'acétonide de fluocinolone (Aranyi 1978) et surtout du cortivazole et de ses dérivés, dont la figure 12 montre la structure (Simons 1979, Lamontagne 1984, Winneker 1984, Dausse 1977). Ces derniers produits ne comportent pas de cétone en 3 et sont très fortement encombrés sur le cycle A par le substituant phénylpyrazole. Ils figurent pourtant parmi les meilleurs ligands du récepteur des glucocorticoïdes et les plus actifs des agonistes. Leur interaction avec le récepteur se fait probablement selon des modalités particulières, car ni le dérivé 17,21 spiro, ni le 21 mésylate du cortivazole ne se comportent comme des antiglucocorticoïdes, au contraire des dérivés correspondants de la dexaméthasone. De plus, le 21 mésylate de cortivazole est incapable de se lier de manière covalente au récepteur, au contraire du 21 mésylate de dexaméthasone (Lamontagne 1984). Il est donc fort possible que ces dérivés ne se positionnent pas dans le site de liaison de la même façon que les dérivés habituels du prégnane.

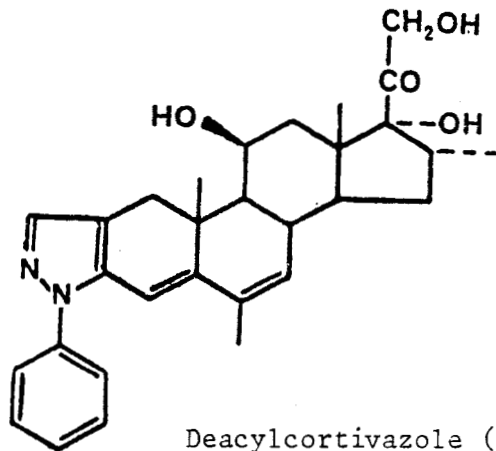
. de même, le rôle fondamental de l'hydroxyle en 11β dans la liaison au récepteur doit-il être reconsidéré, du fait de l'excellente affinité présentée par la dichlorisone, stéroïde chloré en 11 (Wolff 1978) et surtout par les dérivés de la famille du RU 38486 (Philibert 1984, Teutsch 1984), qui portent à la place de l'hydroxyle



Nivazole (39)



Win 44577 (296)



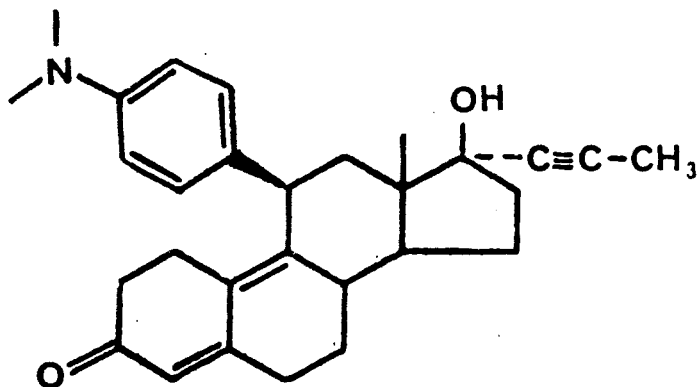
Deacylcortivazole (~ 100)



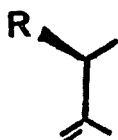
Figure 12 - Structure de quelques phénylpyrazolo - stéroïdes ayant une forte affinité pour le récepteur des glucocorticoïdes. Entre parenthèses figure leur affinité relative par rapport à la dexaméthasone, en %)
(d'après Simons 1979, Dausse 1977, Winneker 1984).

11 β un substituant très encombrant sur cette position du noyau stéroïde (figure 13). Bien que le RU 486 ne comporte ni hydroxyle en 11 β ni chaîne latérale en 17 β son affinité pour le récepteur est nettement supérieure à celle de la dexaméthasone. Ici encore, le volume du substituant en 11 (figure 14) amène à se demander si ce produit interagit bien avec le récepteur dans la même position que les autres stéroïdes. La constatation que le 3 carboxyméthylxime du RU 486 conserve une bonne affinité pour le récepteur, au contraire du 3 carboxyméthylxime de la dexaméthasone, permet d'en douter (Philibert 1985). L'existence d'un hydroxyle en 11 β semble pourtant indispensable à l'acquisition par le stéroïde d'une activité agoniste puisque, à l'exception de la dichlorisone, tous les stéroïdes ne comportant pas d'hydroxyle en 11 sont antigluco-corticoïdes. On peut citer la progestérone et ses dérivés, la promegestone (R5020), la cortexolone, la testostérone et ses dérivés, le Δ 1-11 oxo-11-désoxycortisol (Chrousos 1982), et bien sûr le RU 486.

. la chaîne latérale en 17 β peut subir des modifications importantes qui restent compatibles avec une bonne liaison (figure 15), telle la modification du 21 hydroxyle en 21 mésylate (Lamontagne 1984), le blocage des OH en 21 et 17 α pour donner un 17, 21 acétonide (Rousseau 1983), ou la cyclisation en 17-21 spirostéroïde (Lamontagne 1984). L'oxydation de la chaîne latérale pour donner un dérivé 21 carboxylique n'est pas compatible avec une liaison au récepteur qui réapparaît après estérification du carboxyle (Lee 1981). De même, l'oxydation plus poussée conduit à des dérivés 17 β carboxyliques de très faible affinité, dont nous avons montré que l'affinité redevient très appréciable après amidification (Rousseau 1979b). Il en va de même après estérification (Manz 1983). Une partie non négligeable de ces stéroïdes modifiés sur la chaîne latérale sont des antigluco-corticoïdes, ce qui souligne l'importance de l'interaction du récepteur avec cette région du stéroïde. L'hydroxylation en 21 n'est pas indispensable pour observer une forte affinité et une activité agoniste si le stéroïde est substitué par



RU 38 486 ou RU 486



R

Affinité relative pour le récepteur
des glucocorticoïdes
(dexaméthasone = 100)

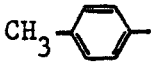
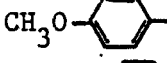

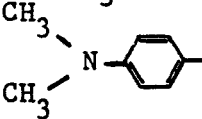
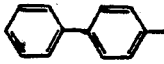
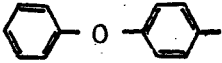
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2-$	83
$(\text{CH}_3)_3\text{C}-$	59
	296
	299
	246
	302
	160
	100



Figure 13 - Structure du RU 486 et de quelques stéroïdes apparentés
(Teutsch 1984)

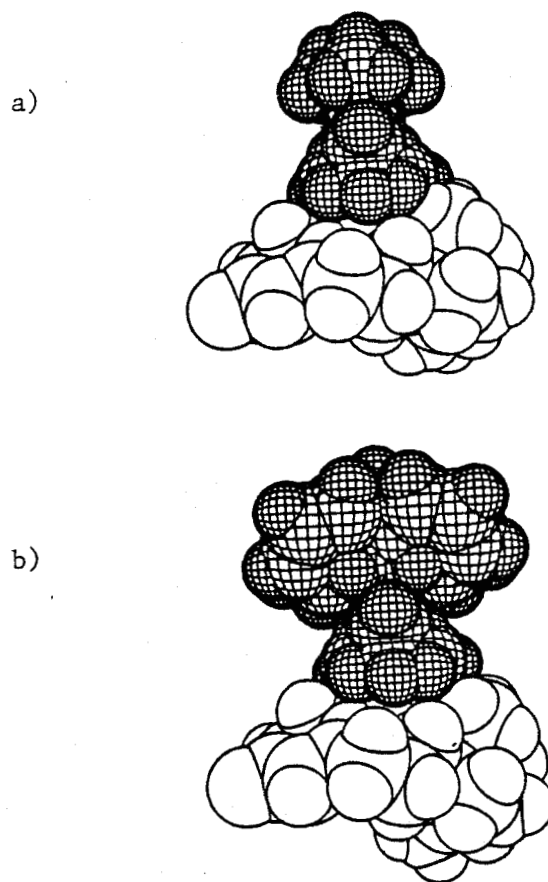
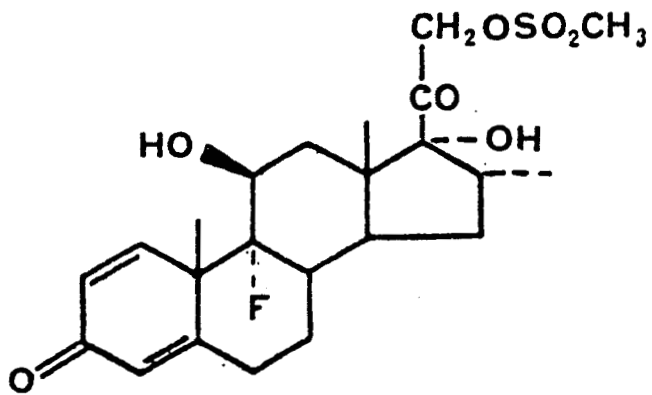
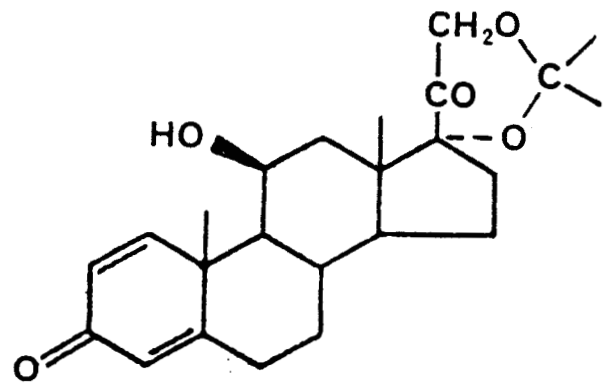


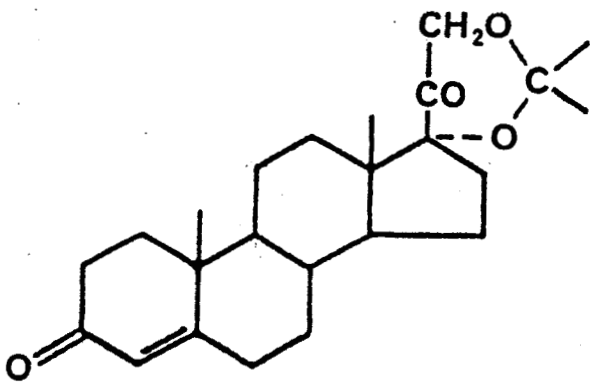
Figure 14 - Visualisation de la taille de la poche hydrophobe en regard du carbone 11 dans les dérivés p.tertiobutyl-phenyl (a) et p.phenoxyphenyl(b) apparenté au RU 486. Le programme de visualisation suppose une libre rotation du substituant (d'après Teutsch 1984). Le noyau stéroïde est en blanc.



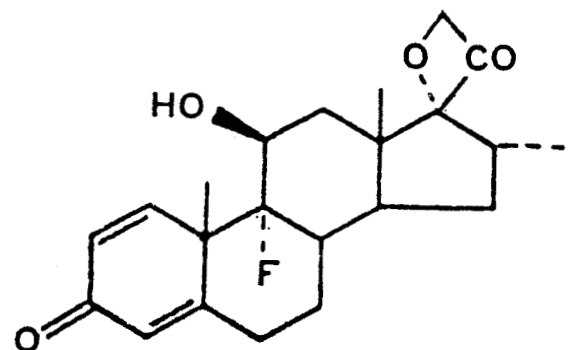
21 mésylate de dexaméthasone
(irréversible, An)



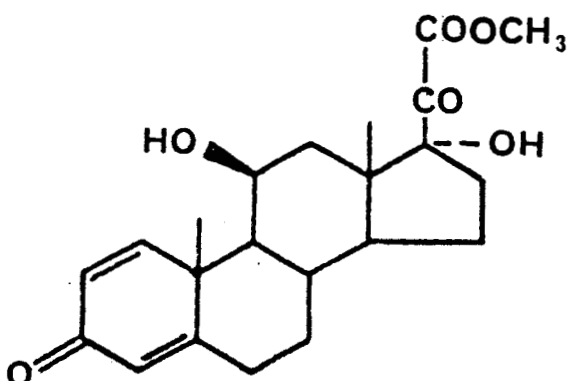
17,21 acétonide de prednisolone
(5 nM, Ag)



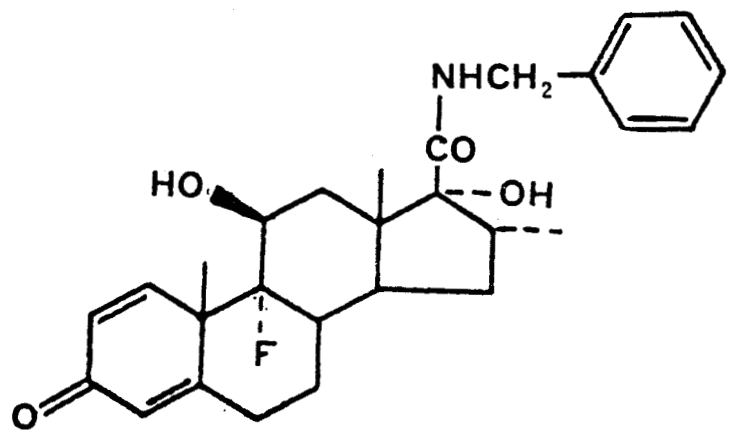
17,21 acétonide de cortisolone
(70 nM, An)



Dexaméthasone oxetanone
(32 nM, An)



Méthylprednisolonate
(RBA = 0,47, Ag)



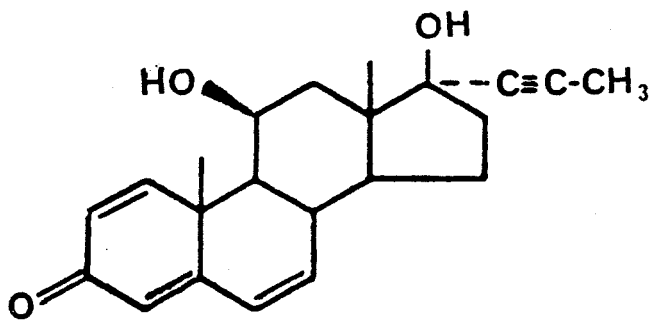
DXB
(100 nM, An)

Figure 15 - Stéroïdes à chaîne latérale 17 β modifiée se liant au récepteur des glucocorticoïdes. Valeur du K_D et activité agoniste (Ag) ou antagoniste (An) sont indiquées entre parenthèses.

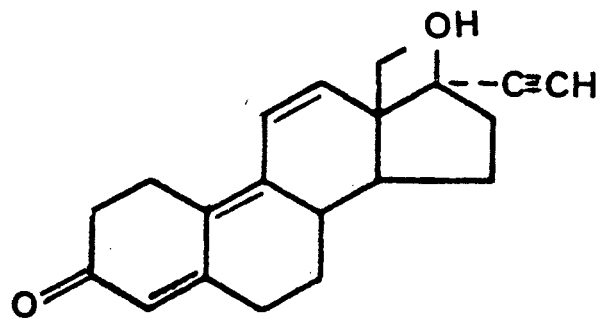
ailleurs avec des groupements favorables, comme par exemple dans la 21 désoxymétasone (Dausse 1977, Wolff 1978). D'autre part, il a été montré, essentiellement par les chercheurs de la firme Roussel-Uclaf, que l'existence d'une chaîne latérale en 17 β n'était même pas nécessaire (figure 16) pour obtenir une bonne affinité de liaison pour le récepteur des glucocorticoïdes (Ojasoo 1978, Raynaud 1980, Gomez-Sanchez 1983). Le RU 26 988, stéroïde 17 β hydroxylé avec une chaîne 17 α propynyl se lie avec une affinité voisine de celle de la dexaméthasone au récepteur des glucocorticoïdes (RBA = 100 à 130 d'après Gomez-Sanchez 1983 et Raynaud 1980) dont il serait le marqueur le plus spécifique, sans aucune liaison croisée avec le récepteur des minéralocorticoïdes. D'autres dérivés, tels que le RU 2323, qui ne présentent pas de chaîne latérale 17 β , ni d'hydroxyle en 11 β , ni de méthyl 19, mais comportent trois doubles liaisons conjuguées en 4, 9, 11, ont une très bonne affinité pour le récepteur des glucocorticoïdes. Ces dérivés ne présentent qu'une très faible spécificité, en effet ils se lient également très bien aux récepteurs des androgènes et de la progestérone, plus modérément aux récepteurs des oestrogènes et des minéralocorticoïdes (Delettré 1980, Ojasoo 1978). Leur manque de spécificité est attribué à la grande flexibilité de leur structure, en particulier pour ce qui est de la conformation du cycle A (Delettré 1980).

. le noyau stéroïde lui-même peut subir des modifications telles que l'introduction d'un hétéroatome d'oxygène en 2 dans le cycle A du RU 2999 (figure 16) ou en 11 dans le cycle C du Δ 1-11-oxa-11-désoxycortisol (Chrousos 1982) : les produits obtenus se lient encore au récepteur, mais sont antiglucocorticoïdes (Dausse 1977, Chrousos 1982).

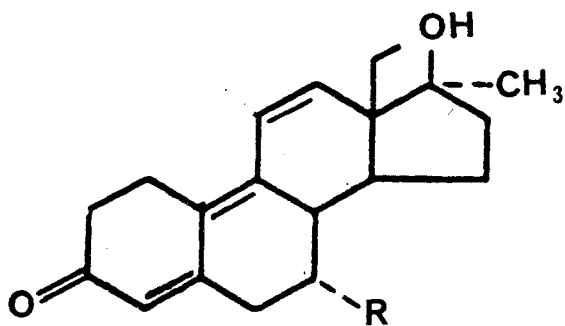
. enfin, un certain nombre de dérivés non stéroïdiens entrent en compétition avec la liaison de la dexaméthasone à son récepteur spécifique (figure 17). Les affinités observées sont beaucoup plus faibles que celles présentées par les dérivés stéroïdiens (K_D de l'ordre de la micromole au lieu de la nanomole) mais elles sont



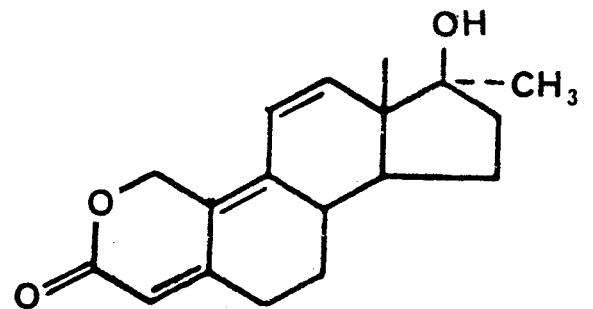
RU 26 988 (RBA = 127)



RU 2323 (gestrinone) (RBA = 77)



R = H RU 2309 (RBA = 155)

R = CH₃ RU 4841 (RBA = 145)

RU 2929 (RBA = 38-68)



Figure 16 - Stéroïdes sans chaîne latérale 17 β et cependant capables de se lier avec une bonne affinité au récepteur des glucocorticoïdes (Ojasoo 1978, Raynaud 1980, Delettré 1980, Dausse 1977). Voir aussi les figures 12 et 13.

cependant loin d'être négligeables. Aucune communauté de structure n'apparaît entre les diverses molécules de la figure 17, qui montre simplement que des ligands non stéroïdiens de bonne affinité, éventuellement antiglucocorticoïdes, peuvent être trouvés pour le récepteur des glucocorticoïdes. Nous remarquerons cependant que, si l'inhibition compétitive par une molécule X de la liaison d'un ligand à sa protéine est une condition nécessaire pour affirmer que X entre en compétition avec le même site de liaison que le ligand de référence, cette condition n'est pas suffisante, et qu'une inhibition compétitive peut être obtenue si la molécule X et le ligand s'adressent à deux classes de sites distincts et mutuellement exclusifs sur la même macromolécule.

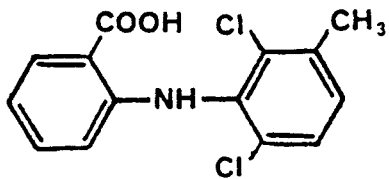
Au terme de cette comparaison des données brutes de liaison des différents ligands stéroïdiens capables d'interagir avec le récepteur des glucocorticoïdes, le foisonnement des résultats est tel que ceux-ci apparaissent difficiles à organiser d'une manière rationnelle. Une approche conformationnelle de la structure de ces différents stéroïdes et des modifications induites par les divers substituants peut laisser espérer un progrès dans la compréhension de l'interaction glucocorticoïde-récepteur et de ses détails moléculaires.

c) Etudes de conformation moléculaire

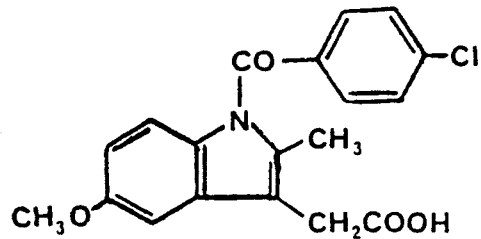
- Méthodes

Le problème de la détermination de la conformation moléculaire des stéroïdes glucocorticoïdes a été abordé en utilisant différentes techniques.

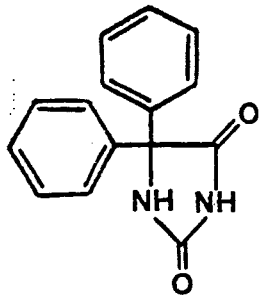
En dehors du cas particulier de la cristallographie, dont la contribution est considérable, le recours aux méthodes physicochimiques est resté limité. C'est ainsi que la mesure du moment dipolaire (Allinger 1961), la spectrophotométrie infra-rouge (Cole 1968, Eger 1971), la résonance magnétique nucléaire des protons (Takahashi 1961, Cole 1968 et 1970, Genard 1976, Delaroff 1979), du carbone 13



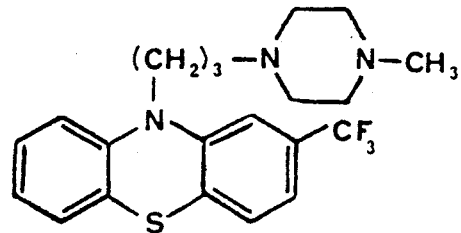
Ac. méclofénamique
(20 μM , Feldman 1978)



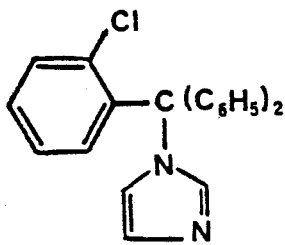
Indométhacine
(100 μM , Feldman 1978)



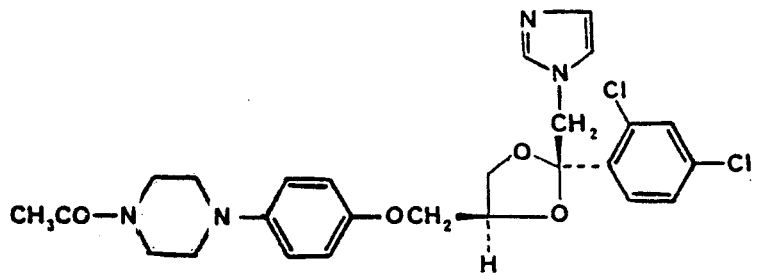
Diphénylhydantoïne
(Katsumata, 1982)



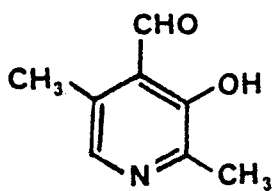
Trifluoroperazine
(6 μM , An, Van Bohemen 1983)



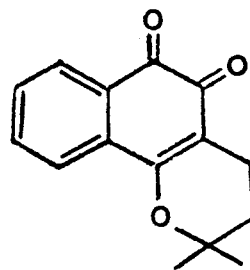
Clotrimazole
(0,5-1,0 μM , An, Loose 1983)



Kétoconazole
(20 μM , An, Loose 1983)



5-désoxypyridoxal
(8,1 μM , O'Brien 1982)



β -lapachone
(6 μM , Schmidt 1984)



Figure 17 - Divers ligands non stéroïdiens capables de se lier au récepteur des glucocorticoïdes. Les références bibliographiques, le K_i apparent quand il est connu, ainsi que l'activité biologique sont indiqués à côté du nom de chaque produit.

(Bhacca 1973, Giannini 1974, Genard 1976) et du fluor 19 (Giannini 1974, Genard 1976) ainsi que le dichroïsme circulaire ont été appliqués avec des bonheurs divers à l'étude de la conformation des glucocorticoïdes. Leur contribution principale concerne la détermination de la conformation de la chaîne latérale en 17 et du cycle A, qui sont les deux zones principales de variabilité de la conformation et portent des fonctions chimiques essentielles à l'activité biologique. Au contraire de ces études en solution qui ne fournissent que des informations partielles sur la conformation moléculaire des stéroïdes, la diffraction des rayons X apporte la détermination complète de leur structure à l'état solide. Plus de 400 structures de stéroïdes, dont plus de 90 prégnanes, étaient publiées en 1984. Elles ont fait l'objet d'un travail minutieux de comparaison de la part du groupe de Duax, à qui l'on doit des atlas fort bien conçus regroupant la plupart des structures publiées (Duax 1975b, Griffin 1984) et de nombreuses revues (Duax 1975a, 1976, 1978a, 1982, 1984), d'ailleurs assez redondantes. Les groupes de Dideberg à Liège et de Mornon à Paris ont également contribué à ce travail de synthèse et tenté de dégager des corrélations entre la structure cristalline et l'activité biologique de nombreux stéroïdes (Dideberg 1976, Delettré 1980, Mornon 1977). Les résultats des mesures cristallographiques constituent également une base de données extrêmement utile pour l'application des méthodes de calcul de conformation.

A partir de la formule du stéroïde et des valeurs de liaisons interatomiques et des angles de liaison il est en effet possible de construire des modèles représentant ces molécules. La méthode la plus simple est le recours aux modèles du genre Dreiding, mais l'effet des substituants sur la conformation moléculaire n'est pas toujours bien pris en compte par ces modèles. Les effets sur les angles de liaison et la longueur de celles-ci, modestes à l'échelle d'une ou deux liaisons interatomiques, peuvent avoir un retentissement important sur la conformation générale de la molécule. Une méthode un peu plus élaborée a consisté à procéder par addition de cycles de structure connus (Altona 1968). Mais actuellement la

méthode de choix est le calcul de conformation moléculaire. Sa première utilisation dans le domaine des glucocorticoïdes a été la détermination de la conformation de la chaîne latérale 17 β par le calcul des orbitales moléculaires selon la théorie étendue de Hückel (Kier 1968). Puis des méthodes de paramétrisation des orbitales moléculaires comme le CNDO/2 ont été employées (Kollman 1973) et enfin, avec les progrès des calculateurs, sont apparus des programmes d'optimisation complète de géométrie moléculaire comme le GEMO (Cohen 1971). Ce dernier programme utilise un modèle de départ construit à partir des données standard de distances interatomiques et d'angles de liaison fournies par la cristallographie. Il minimise ensuite l'énergie globale de la molécule provenant de ces liaisons et de ces angles, mais aussi des angles de torsion et des autres interactions intramoléculaires, en introduisant des modifications successives à la conformation de départ et en calculant les variations de l'énergie globale qu'elles entraînent. Les conformations correspondant aux minima d'énergie moléculaire sont sélectionnées, car elles définissent l'état de la molécule considéré comme le plus probable en solution. Le programme GEMO a été appliqué au calcul de la conformation de divers stéroïdes par les chercheurs de chez Roussel-Uclaf, et plus particulièrement aux glucocorticoïdes par le groupe de G. Rousseau (Rousseau 1978, Schmitt 1977, 1978a,b, 1979).

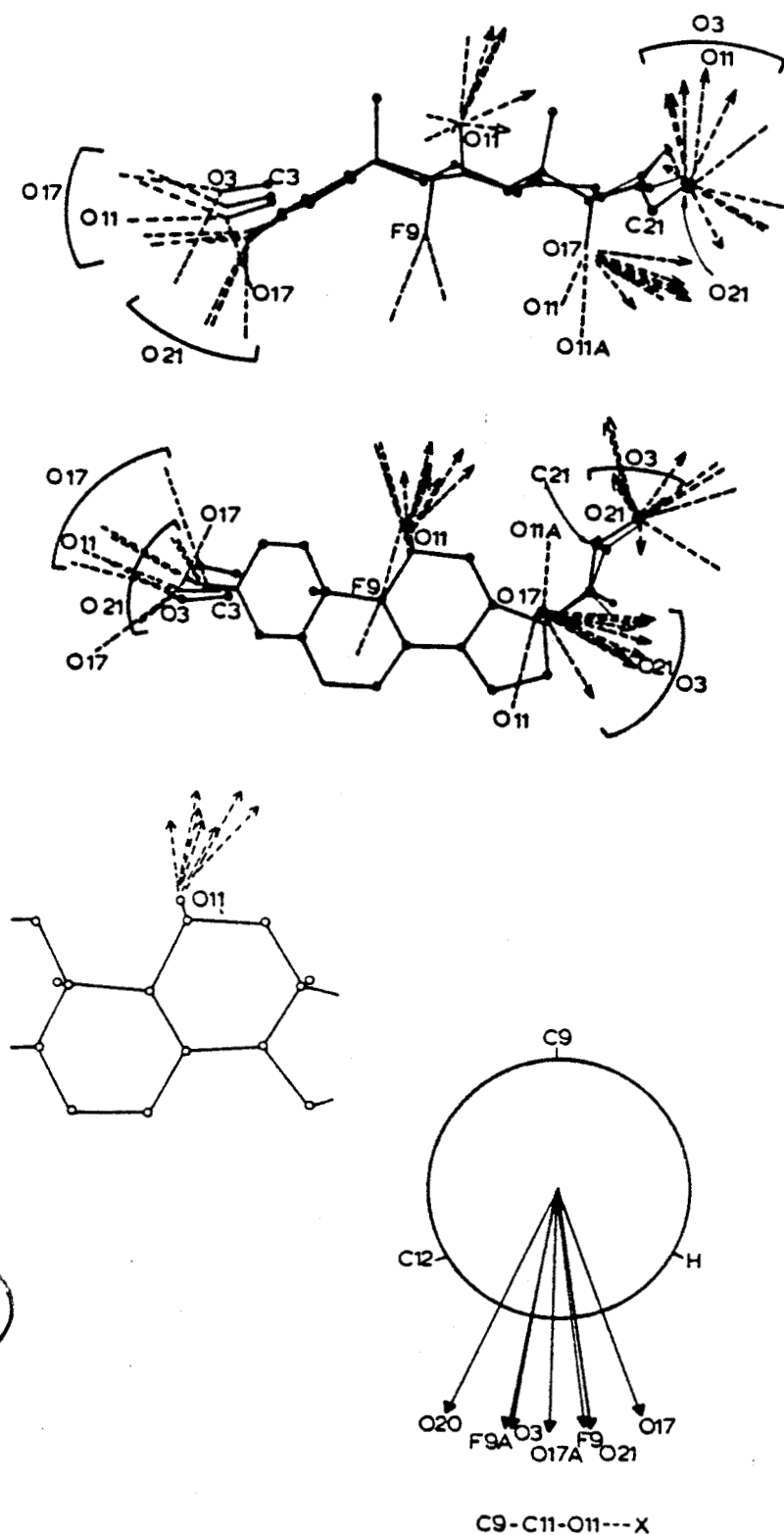
Ces différentes méthodes donnent des résultats présentant un certain nombre de divergences au sujet de la conformation de la chaîne latérale et du cycle A des glucocorticoïdes. Les partisans de chaque technique mettent en avant ses mérites propres pour en justifier les résultats. Ainsi, les spectroscopistes insistent-ils sur le caractère plus physiologique des conformations observées en solution, par rapport à celles obtenues à l'état solide où les contraintes intermoléculaires ne sont sans doute pas négligeables. Mais même en solution des divergences apparaissent selon la nature du solvant utilisé, et on peut à bon droit s'interroger sur le caractère "physiologique" du comportement d'un stéroïde étudié

par résonance magnétique nucléaire de proton dans le benzène, le chloroforme ou l'acétone (Cole 1970) ou par spectrophotométrie infra-rouge dans le tétrachlorure de carbone ou le diméthylsulfoxyde (Eger 1971). De leur côté, les cristallographes, Duax en tête bien sûr, font valoir que l'étude par diffraction des rayons X des cristaux de plus de 400 stéroïdes, et plus particulièrement ceux qui cristallisent dans plusieurs systèmes différents, a clairement montré que la conformation à l'état solide est proche de l'état d'énergie minimum, et correspond à une structure qui existe en solution (Duax 1981, 1984). Les contraintes intermoléculaires du "packing" dans le cristal ne joueraient qu'un rôle limité dans la conformation observée, et d'ailleurs les directions des liaisons hydrogène intermoléculaires contractées par les oxygènes en 3, 11, 17, 20 et 21 des glucocorticoïdes apparaissent étonnamment conservées quel que soit le cristal étudié, ce qui montre qu'elles sont contrôlées essentiellement par des forces intramoléculaires (figure 18). Enfin, les partisans des méthodes de calcul par optimisation d'énergie mettent en avant l'avantage de l'économie de moyens de leur méthode qui autorise la prévision de la conformation d'un stéroïde à partir de sa seule formule, et qui, même quand une structure cristallisée a été décrite, ouvre la voie à la vérification de son niveau d'énergie moléculaire et à l'identification d'autres conformères possibles d'énergie voisine du minimum. En fait, les deux méthodes, radiocristallographie et prévision de structure par le calcul, apparaissent tout à fait complémentaires.

- Résultats

Les résultats que donnent ces différentes méthodes dans l'élucidation de la conformation des stéroïdes capables de se lier au récepteur des glucocorticoïdes peuvent être regroupés comme suit :

- . le cycle A des dérivés 3-oxo- Δ^4 présente une certaine flexibilité. La radiocristallographie montre que les conformations les plus fréquentes sont la demi-chaise 1α , 2β et le sofa 1α , tandis que la demi-chaise inversée 1β , 2α est beaucoup plus rare (figure 19) et serait caractéristique des ligands ayant une bonne affinité pour le



BU
LILLE

Figure 18 - Direction des liaisons hydrogène (----) observées dans des stéroïdes du type glucocorticoïde.

- a) Schéma général
- b) Situation de l'oxygène en 11. La direction de la liaison hydrogène impliquant cet oxygène comme donneur d'hydrogène ne dépend pas de la nature de l'atome accepteur (d'après Duax, 1975)

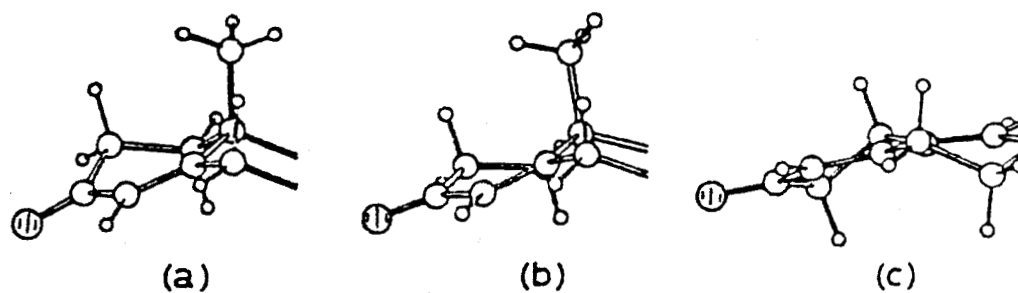


Figure 19 - Conformations du cycle A observées à partir de la comparaison de 94 stéroïdes 4ène-3one. 88 ont une conformation du type a) chaîne $1\alpha, 2\beta$ ou b) sofa 1α . 6 présentent la conformation inhabituelle c) en chaîne inversée $1\alpha\beta, 2\alpha$ (Duax 1984)

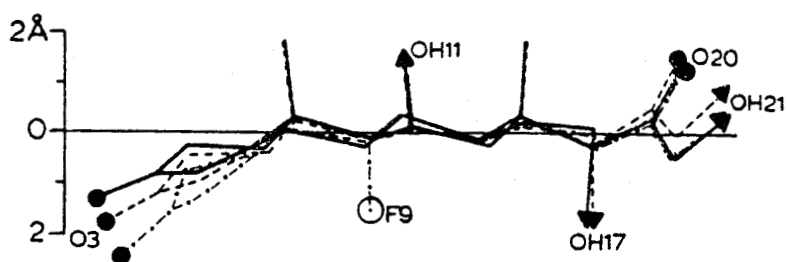


Figure 20 - Superposition de deux conformations cristallographiques distinctes du cortisol (--- et —) et de celle du 9α -fluorocortisol (· - · -) Duax 1984)

récepteur de la progestérone. (Duax 1978 et 1984).

Dans son travail d'optimisation complète de géométrie portant sur la conformation d'une quinzaine de stéroïdes dérivés de la progestérone se liant au récepteur des glucocorticoïdes Schmitt (1978) obtient toujours une conformation en demi-chaise $1\alpha, 2\beta$ au minimum d'énergie. Une désaturation supplémentaire du cycle A (introduction d'une double liaison 1-2) ou une substitution du cycle D sur le carbone 6 et surtout sur le carbone 9 modifie la conformation du cycle A et surtout son orientation par rapport au reste de la molécule. Weeks (1973) a comparé les structures du cortisol, du 6α -fluorocortisol, du 9α -fluorocortisol et de la 6α -méthylprednisolone. Il apparaît que le cycle A est beaucoup plus "courbé" vers le bas par rapport au plan moyen des cycles B, C et D dans le 9α fluorocortisol que dans le cortisol (Figure 20). Ce résultat a été confirmé sur d'autres stéroïdes ayant une structure du type 9α -fluoro, 11β -hydroxy-4ène-3one (Weeks 1976, Duax 1984). Le 6α fluorocortisol et la 6α -méthylprednisolone présentent une courbure un peu plus faible que les dérivés 9α -fluorés. La raison de cette courbure est claire dans la 6α -méthylprednisolone où la double liaison en 1-2 apparaît responsable (l'effet est d'ailleurs observé sur un modèle de Dreiding). Dans le cas des 9α fluorés, elle l'est beaucoup moins et des résultats contradictoires ont été obtenus par la résonance magnétique nucléaire du carbone 13 et du fluor 19 et la méthode CNDO à propos de l'implication des effets électroniques et stériques de l'halogénéation en 9 (Kollman 1973, Giannini 1974, Genard 1976). Quoiqu'il en soit, l'intérêt majeur de l'observation de Weeks et Duax est que l'activité biologique des stéroïdes considérés semble proportionnelle au degré de courbure observé pour le cycle A. Ceci se retrouve au niveau de leur affinité pour le récepteur et Duax émet l'hypothèse qu'une conformation très courbe de la molécule de stéroïde est préférée par le site de liaison du récepteur (Duax 1976, 1984). En effet, la courbure du cycle A entraîne une modification très significative des distances séparant l'oxygène de la cétone en 3 de ceux portés par la chaîne latérale (oxygènes 17, 20

et 21) et peut donc retentir sur la possibilité pour ces atomes de contracter ou non des liaisons hydrogène de manière satisfaisante avec les acides aminés du centre actif du récepteur (figure 21). Dideberg (1976) a de son côté proposé une valeur moyenne de $16,5 \text{ \AA}$ pour la distance séparant les atomes du récepteur capables de fixer le stéroïde par ses oxygènes O_3 et O_{21} . Dans le cas du cortisol, le cycle A apparaît flexible, car plusieurs conformations de ce cycle ont été observées après cristallisation de cette molécule dans des systèmes différents (Duax 1984). L'équilibre entre les différents conformères serait déplacé vers la forme favorable à la liaison dans les dérivés 9α fluorés. La flexibilité du cortisol expliquerait qu'il puisse se lier à la fois à la transcortine et au récepteur au contraire des dérivés fluorés comme la dexaméthasone qui ne se lient qu'au récepteur. L'augmentation de l'angle entre le cycle A et le plan des cycles B et C après introduction d'une double liaison en 1-2, d'un méthyl en 6α ou d'un hydroxyl en 11β est également prévue par l'optimisation complète de géométrie moléculaire (Schmitt 1978b). Une très grande flexibilité du cycle A est entraînée par l'introduction d'une double liaison en 9 dans les dérivés 4,9 diènes-3 ones, et plus encore dans les 4,9,11 triènes-3 ones (Figure 22). Cette flexibilité est visualisée par le dichroïsme circulaire (Delaroff 1979) et surtout par la radiocristallographie et le calcul de conformation par optimisation complète de géométrie (Delettré 1980) qui montre par exemple que des "mouvements" de la molécule de RU 2323 ayant une amplitude de $3,3 \text{ \AA}$ pour la position relative de l'extrémité du cycle A n'entraîneraient qu'une variation d'énergie inférieure à 2 kcal/mole. Cette valeur est à comparer aux -12 kcal/mole de l'énergie de liaison correspondant à une constante de dissociation à l'équilibre K_D de 10^{-9} M . Cette flexibilité est parfaitement en accord avec le considérable manque de spécificité de liaison présenté par ce dérivé qui se fixe à la plupart des récepteurs des hormones stéroïdes (voir précédemment).

. les cycles B, C et D ont une conformation beaucoup plus rigide que le cycle A et subissent peu de variations au travers des différentes structures observées. Les cycles B et C ont une structure en chaise

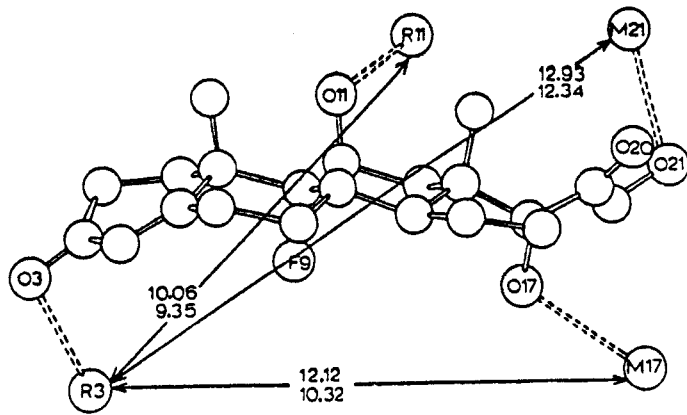
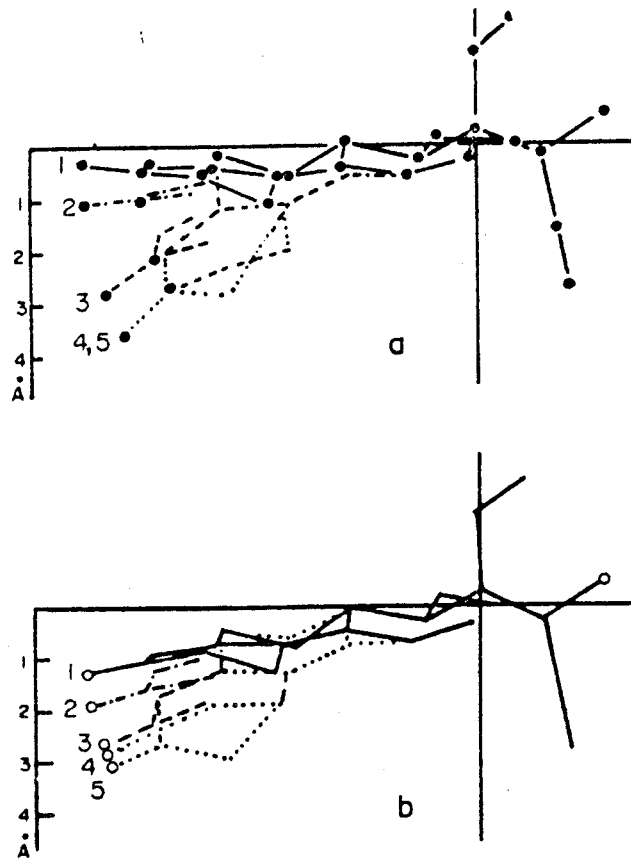


Figure 21 - Distance entre les points hypothétiques de liaison du cortisol (valeurs du haut) et du 9 α -fluorocortisol au récepteur (R) ou à d'autres macromolécules (M) (D'après Duax 1976)



BU
LILLE

Figure 22 - Conformations cristallines (a) et calculées par le programme GEMO (b) du RU 2323, un stéroïde 3 α -oxo-4,9,11 triène (Delettré 1980)

peu influencée par les substituants qu'ils portent, et cristallographie et optimisation de géométrie donnent des résultats parfaitement concordants (Schmitt 1978a). Le cycle D est plus flexible avec des possibilités de conformation variant selon les substituants entre la demi-chaîne 13β , 14α , l'enveloppe 13β et plus rarement l'enveloppe 14α (Duax 1975). L'accord entre la radiocristallographie et l'optimisation de géométrie est ici un peu moins bon que pour les cycles B et C (Schmitt 1978a).

. la chaîne latérale est, avec le cycle A, le deuxième point de variabilité de la structure des glucocorticoïdes. Les modèles de Dreiding laissent supposer une rotation libre de la chaîne latérale autour de la liaison $C_{17}C_{20}$ et de l'hydroxyle en 21 autour de la liaison $C_{20}C_{21}$. Le méthyl 18 introduit cependant une interaction stérique. Le problème consiste à déterminer la conformation la plus probable de cette chaîne latérale en solution. En dehors des résultats discutables de Takahashi (1964) en faveur d'une orientation de la liaison $C_{20}O_{20}$ vers l'extérieur du cycle D et de l'existence de deux liaisons hydrogène entre les hydroxyles 17 et 21 et l'oxygène en 20, toutes les études physicochimiques en solution utilisant la mesure du moment dipolaire (Allinger 1961), le dichroïsme circulaire (Wellman 1965), la spectrophotométrie infrarouge (Cole 1968) ou la résonance magnétique nucléaire des protons (Cole 1968 et 1970) montrent que cette liaison $C_{20}O_{20}$ se projette au-dessus du cycle D et éclipe à peu près la liaison $C_{16}C_{17}$. Des résultats contradictoires sont obtenus pour la liaison $C_{21}O_{21}$ qui éclipserait la liaison $C_{20}O_{20}$ et serait compatible avec une liaison hydrogène intermoléculaire entre O_{20} et OH_{21} (Cole 1968 et 1970) ou serait au contraire orientée en trans par rapport à cette liaison $C_{20}O_{20}$ (Bhacca 1973). Eger (1971) a d'autre part montré en spectrophotométrie infrarouge que la chaîne 20 oxo, 17α , 21-dihydroxy n'engageait probablement aucune liaison hydrogène intramoléculaire et devait se comporter essentiellement comme un donneur de proton pour

des liaisons hydrogène intermoléculaires, l'oxygène en 20 ne pouvant se comporter comme un accepteur. L'étude radiocristallographique de 35 dérivés du prégnane confirme que la liaison $C_{20}O_{20}$ se projette au-dessus du cycle D et révèle une structure globalement assez invariante de la chaîne latérale où le substituant en 21 est toujours en cis par rapport à l'oxygène 20 (Duax 1976). L'orientation de la liaison $C_{20}O_{20}$ au-dessus du cycle D varie assez peu (figure 23), bien qu'elle soit sensible à la nature du substituant en 21 et surtout en 17α . La valeur moyenne de l'angle de torsion $C_{13}C_{17}C_{20}O_{20}$ est de $104^\circ \pm 11$ pour les 17α (H) et de $89^\circ \pm 7$ pour les 17α (OH). L'angle de torsion $O_{20}C_{20}C_{21}O_{21}$ est voisin de 0 mais il ne semble pas exister de pont hydrogène intramoléculaire (Weeks 1973). Le calcul d'optimisation complète de géométrie retrouve une orientation de la liaison $C_{20}O_{20}$ éclipsant à peu près la liaison $C_{16}C_{17}$, mais l'effet de l'hydroxyle en 17α sur la valeur de l'angle de torsion $C_{13}C_{17}C_{20}O_{20}$ est plus important et s'exerce dans un sens opposé à ce qui est observé en cristallographie (Schmitt 1978a), avec une valeur de $110,3^\circ$ pour les 17α (H) et de $88,3^\circ$ pour les 17α (OH). L'auteur rapproche ce résultat de l'effet défavorable sur la liaison au récepteur de l'hydroxylation en 17α . Une liaison hydrogène intramoléculaire entre O_{20} et l'OH 21 apparaît possible. Le mérite de la méthode d'optimisation est de montrer qu'en fait la chaîne latérale peut tourner autour de la liaison $C_{17}C_{20}$ sans se heurter à des barrières d'énergie très considérables. En effet, la molécule absorbe les variations d'énergie provoquées par cette rotation en modifiant légèrement sa conformation générale, et la rotation est plus facile qu'on aurait pu l'imaginer. L'énergie minimale correspond pour les 17α (H) à une valeur de l'angle de torsion $C_{16}C_{17}C_{20}O_{20}$ de 270° et cette conformation serait peut-être celle qui est préférée par le récepteur.

. l'effet des substituants des divers cycles du noyau stéroïde sur la conformation générale de la molécule a été exploré. Il apparaît que des substituants peuvent avoir des effets à longue

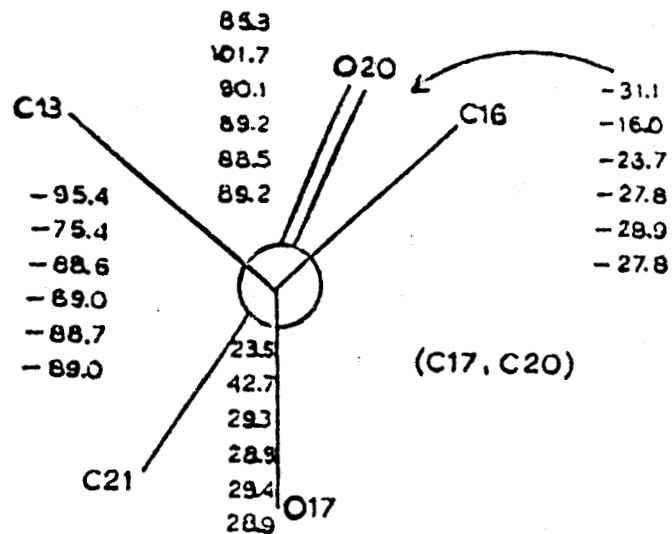
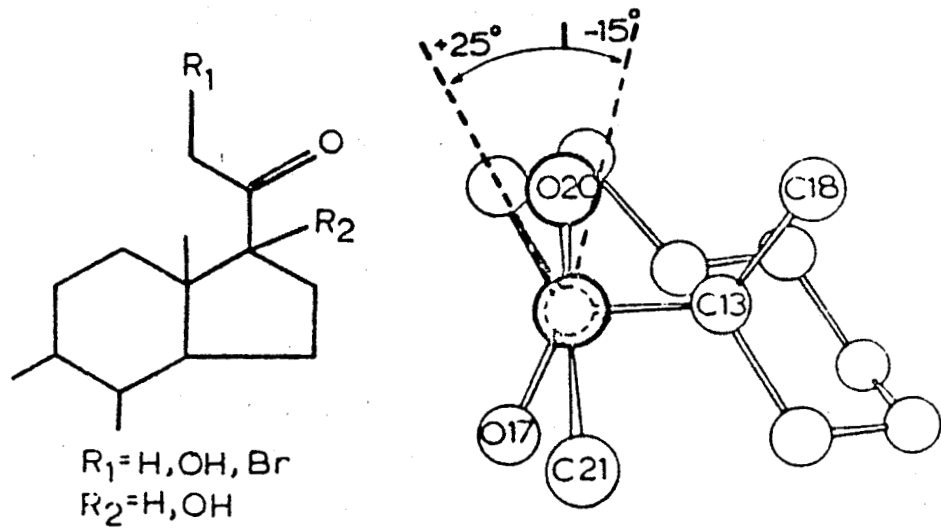


Figure 23 - Géométrie de la chaîne latérale C17

a) Vue d'ensemble (Duax 1976)

b) Valeurs des angles de torsion en projection de Newman le long de la liaison C17-C20 (Weeks 1973). Valeurs de haut en bas pour le cortisol, le 6 α -fluorocortisol, le 9 α -fluorocortisol, la 6 α -méthylprednisolone, la cortisone et la 4-chlorocortisone.

distance sur cette conformation (Duax 1977, 1978b). Le calcul de conformation montre leurs effets sur la courbure générale de la molécule, sa torsion longitudinale et la conformation du cycle D. Il apporte une explication à l'observation des effets contradictoires entraînés par le même substituant sur des stéroïdes différents (Schmitt 1978a,b, 1979).

. Un point important est la comparaison des conformations des stéroïdes agonistes et antagonistes. La cristallographie et l'optimisation de géométrie apportent peu de révélations dans ce domaine. La comparaison de la structure des principales molécules concernées montre que leur point commun est la structure Δ_4 3-one alors que leurs différences s'expriment essentiellement dans la région 11 β et la chaîne latérale (figure 24). Le rôle probable d'une liaison hydrogène entre l'OH en 11 β et le récepteur est souligné par la diminution d'un facteur deux de la vitesse de dissociation des complexes glucocorticoïde-récepteur dans l'eau lourde (Aranyi 1984b). Cet effet n'est observé qu'avec les stéroïdes 11 β hydroxylés qui protègent d'ailleurs mieux le récepteur contre l'inactivation thermique (Toth 1983). Une différence entre agonistes et antagonistes portant sur la capacité à engager des liaisons hydrogène au niveau de la chaîne latérale est probablement également en cause dans le cas du dérivé 17-21 oxetanone de la dexaméthésonne dont la conformation générale est extrêmement voisine de celle de la dexaméthésonne (figure 25), et des dérivés 17,21 acétonide (Rousseau 1983).

Toutes ces études de conformation n'éclairent que modérément notre compréhension de l'interaction glucocorticoïde-récepteur. Elles ont cependant conduit Duax (1984) à proposer pour les glucocorticoïdes un modèle dans lequel la liaison serait gouvernée essentiellement par la conformation du cycle A, tandis que les régions 11 β et le cycle D seraient impliqués dans le contrôle de l'activité biologique du complexe (figure 26). Dans ce modèle, la chaîne latérale pourrait contracter une interaction directe avec l'ADN. La base de cette dernière hypothèse est la possibilité de cocrystalliser des molécules de déoxycorticostérone et d'adénine

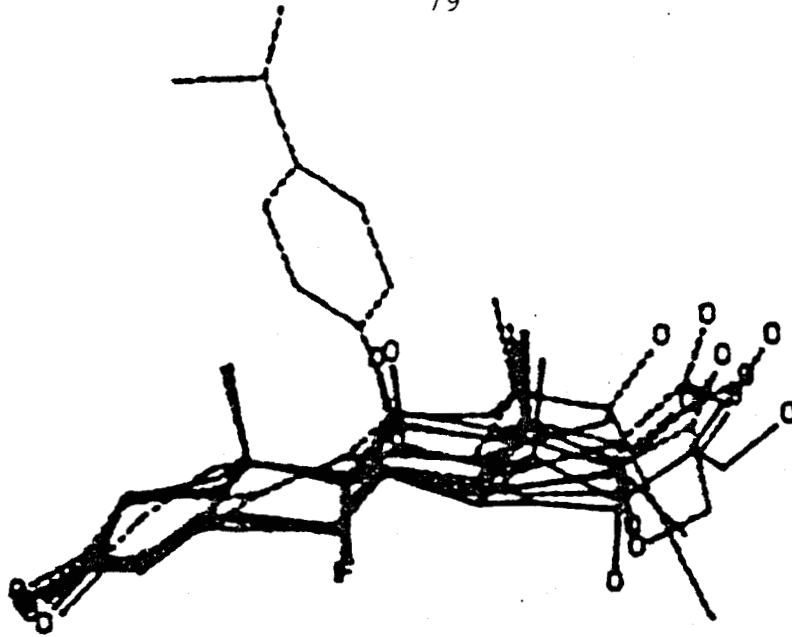


Figure 24 - Superposition des structures de plusieurs antiglucocorticoïdes (progestérone, testostérone, 11 désoxycortisol, 17-21 spiro dexaméthasone et RU 486) sur celle de la dexaméthasone (Duax 1984). La dexaméthasone est en trait plein.

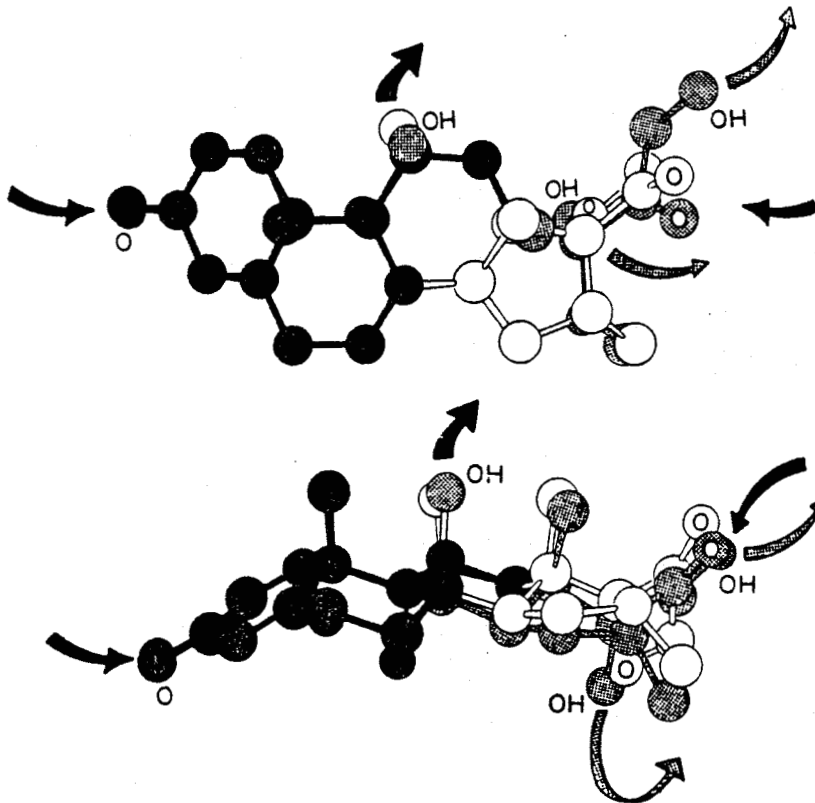


Figure 25 - Comparaison de la conformation et de la capacité à contracter des liaisons hydrogène de la dexaméthasone et son dérivé antiglucocorticoïde 17,21 spiro (ou oxétanone). Structure commune en noir, agoniste ombrée, antagoniste en blanc (Duax 1982).

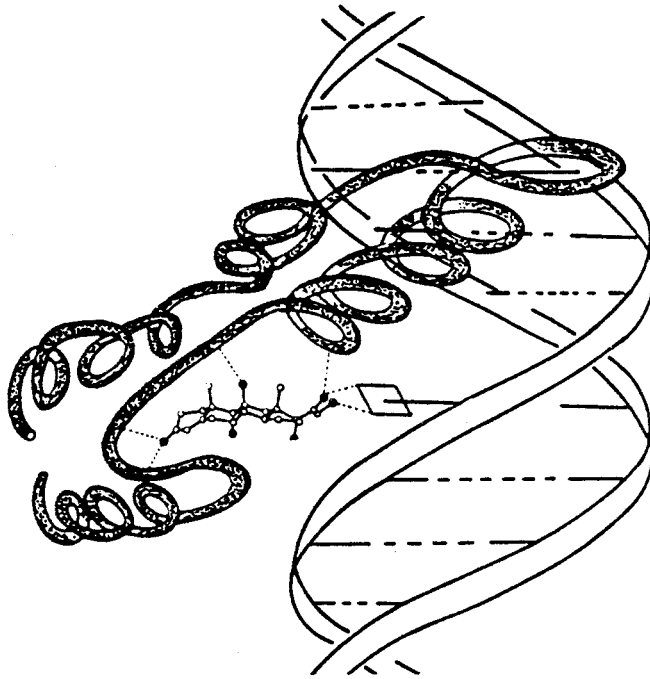


Figure 26 - Modèle d'interaction entre le glucocorticoïde, son récepteur et la double hélice d'ADN (Duax 1984)

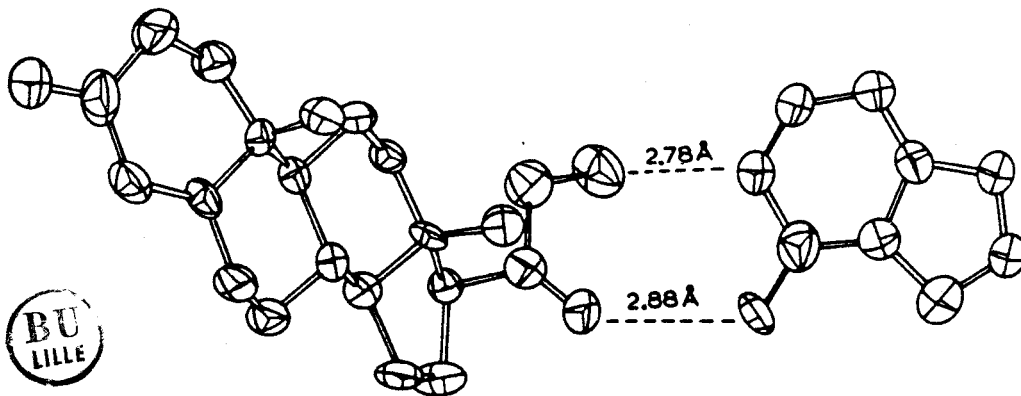


Figure 27 - Structure cristalline d'un complexe moléculaire entre 11 désoxycorticostérone et l'adénine (Weeks 1975, Duax 1978a)

(Weeks 1975). Ce modèle peut être rapproché de celui de Sluyser (1983) qui va jusqu'à imaginer une intercalation du stéroïde dans la double hélice d'ADN (figure 28).

d) Relation quantitative : QSAR

Les deux seules tentatives d'établissement d'une relation quantitative entre la structure des stéroïdes exprimée à l'aide de paramètres quantifiables, et leur activité de liaison à des récepteurs des hormones stéroïdes, mesurée par leur constante de dissociation à l'équilibre K_D , ont pour origine le groupe de Wolff. Elles concernent, l'une la liaison au récepteur de la progestérone (Lee 1977), et l'autre la liaison au récepteur des glucocorticoïdes (Wolff 1978). Dans ce dernier cas, une équation multiparamétrique rendant compte de l'activité de liaison pour le récepteur de 29 stéroïdes divers ayant en commun la structure 3,20 dioxo-4-pregnène a été proposée.

$$\log K_D = -0,022 (+ 0,002) SA - 0,59(+ 0,05) P + 1,50 (+ 0,35) \text{ tilt} + 6,10 (+ 0,49) R_X - 6,59$$

où SA = surface hydrophobe du stéroïde

P = + 1 si il existe un OH en 11 β ou en 21

0 dans le cas contraire

- 1 si un groupe polaire est présent en C₁₆ ou C₁₇.

tilt = distance C₃C₁₇

R_X = encombrement du substituant éventuel en 9, mesuré par rapport au chlore

avec n = 29 r = 0,97 s = 0,26

L'équation obtenue montre un taux de corrélation hautement significatif. Mais on ne peut qu'être très défavorablement impressionné par le recours systématique à des paramètres quantitatifs arbitraires et à des coefficients comme le facteur P, dans l'établissement de cette relation qui ne vaut probablement que pour les

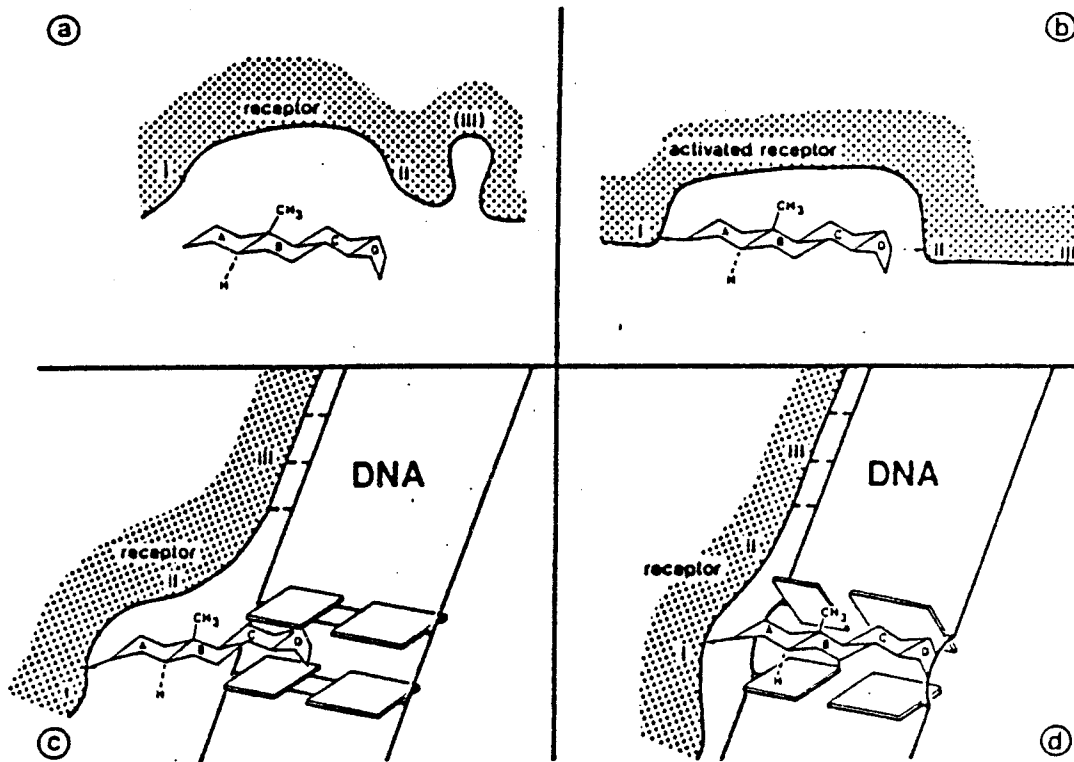


Figure 28 - Schéma proposé pour l'interaction glucocorticoïde-récepteur puis récepteur-glucocorticoïde et DNA par Sluyser (1983)



29 stéroïdes considérés dans l'échantillon. Le caractère très finaliste de cette approche n'apporte finalement, à notre sens, qu'une apparence quantitative aux résultats observés et n'ajoute rien à leur description qualitative. Il paraît d'ailleurs évident que la remarquable affinité pour le récepteur de produits comme le cortivazole ou le RU 486 n'auraient jamais été prévue par cette équation. Une des difficultés qui explique l'intérêt limité des résultats de cette étude est sa prétention à vouloir regrouper en une seule équation les propriétés de stéroïdes divers modifiés en des régions très différentes de la molécule dont l'environnement dans le récepteur est certainement très variable. Des résultats plus intéressants pourraient très certainement être obtenus en comparant l'affinité pour le récepteur de stéroïdes appartenant à une série homogène de dérivés substitués sur la même position, ce qui renseignerait uniquement sur le voisinage de cette position mais avec davantage de précision.

1.3. Marquage d'affinité

Le marquage d'affinité est une technique qui vise au marquage sélectif et covalent des sites de liaison des macromolécules. Il implique dans un premier temps la liaison réversible du marqueur, qui est un ligand modifié de façon à contenir une fonction réactive, dans le site actif de la macromolécule puis, dans un deuxième temps, la fixation covalente du marqueur avec des constituants de la macromolécule situés dans, ou à proximité immédiate de ce site actif. La sélectivité du marquage dépend étroitement de la sélectivité de l'interaction du marqueur avec le site de liaison. C'est pourquoi cette méthode procède tout à fait de l'approche "par le ligand", même si, quand elle réussit, elle ouvre la voie à l'étude directe de la protéine marquée de manière covalente, possible alors en conditions dénaturantes. De nombreux travaux ont été consacrés au marquage d'affinité des récepteurs des hormones stéroïdes (Katzenellenbogen 1984, Simons 1982). Les facteurs essentiels dans le choix du ligand marqueur et de la technique de marquage sont la sélectivité de la liaison au site actif et l'efficacité du marquage covalent. La

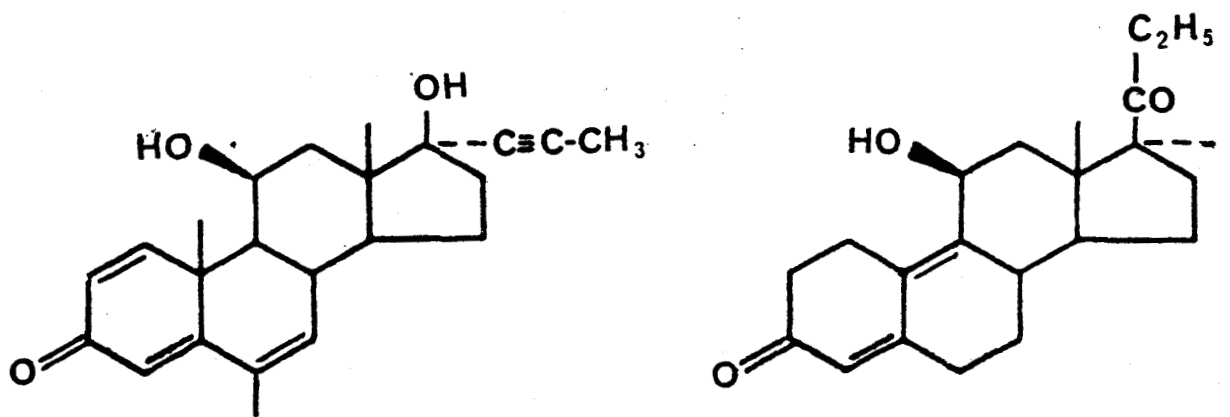
sélectivité de la liaison dépend en grande partie de l'affinité du ligand pour le récepteur. Si elle est très forte le ligand marqueur pourra être employé en concentration faible, ce qui limite les liaisons non spécifiques. La sélectivité et surtout l'efficacité du marquage dépendent aussi de la nature de la fonction réactive portée par le ligand et du type de technique de marquage utilisé. En pratique, deux techniques ont été employées avec des bonheurs divers pour le marquage du récepteur des glucocorticoïdes avec des stéroïdes marqueurs variés.

- le marquage de photoaffinité

La réactivité à la lumière des cétones α insaturées de l'acétonide de triamcinolone (Westphal 1981, Dellweg 1982, Gehring 1983) et du R 5020 (Nordeen 1981) a été mise à profit pour ce marquage. L'existence d'une diénone sur le R 5020 en fait en théorie une molécule facilement photoactivable (Figure 28bis). Le marquage est pratiqué à 0-4° sur des préparations de récepteur cytosolique brut ou plus ou moins purifié. Après incubation avec le stéroïde marqueur et élimination du stéroïde libre par le charbon activé, l'échantillon est irradié à 320-350 nm pendant 5 à 45 min. Avec les deux stéroïdes la sélectivité de fixation est bonne, bien que la fixation non spécifique soit relativement importante dans le cytosol. Mais l'efficacité du marquage est faible et ne dépasse généralement pas 5 % dans le cytosol. Sur des échantillons partiellement purifiés elle atteint 8 à 12 % (Dellweg 1982), voire même 20 à 40 % (Westphal 1981). Cette technique reste d'emploi délicat, et bien qu'elle ait conduit à certains succès dans l'étude de la structure du récepteur (voir le paragraphe 2.2.b de ce chapitre), elle est actuellement supplantée par l'utilisation du marquage électrophile au mésylate de dexaméthasone.

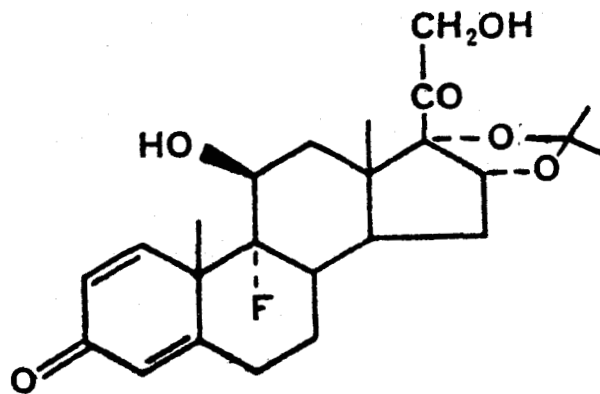
- le marquage électrophile

Un certain nombre de stéroïdes modifiés, candidats potentiels au marquage électrophile du récepteur des glucocorticoïdes ont été synthétisés par divers auteurs (Simons 1980a, b ; Dunkerton 1982,



RU 28362

R 5020



Acétonide de triamcinolone

Figure 28bis - Stéroïdes utilisés pour le marquage du récepteur des glucocorticoïdes par photoaffinité. Le R 5020 et le RU 28362 comportent deux doubles liaisons conjuguées avec la cétone en 3 du cycle A ce qui les rend plus réactifs que l'acétonide de triamcinolone. Le rendement de marquage atteindrait 25 à 30 % avec le RU 28362 qui serait plus spécifique du récepteur des glucocorticoïdes que le R 5020 (Hermann 1986).

Lamontagne 1984) et testés sur le plan de leur liaison avec ce récepteur (Simons 1980c, 1981, 1983, 1986 ; Weisz 1983). Parmi ces stéroïdes, tous modifiés sur le carbone 21 (figure 29), seuls les dérivés 21-0-méthylsulfonate (mésylate) du cortisol (1) et surtout de la dexaméthasone (10), semblent se lier de manière covalente au récepteur. D'une manière surprenante, le mésylate de déacetylcortivazole (14), bien que son affinité pour le récepteur semble supérieure à celle du mésylate de dexaméthasone, est incapable de marquer covalentiellement le récepteur. Ceci pourrait être dû à un mode d'interaction particulier avec le récepteur de ce stéroïde au cycle A substitué par un groupement encombrant (voir précédemment le paragraphe 1.2 de ce chapitre), ce qui écarterait du site de liaison la chaîne latérale 17β (Simons 1986). L'efficacité de couplage du mésylate de dexaméthasone avec le récepteur est bonne, de 13 % dans les premiers essais (Simons 1981) elle pourrait atteindre 70 à 90 % en augmentant le pH à 8-9 et en travaillant sur du récepteur concentré en optimisant les conditions de température et de durée du marquage (Simons 1983). Mais la spécificité de la liaison covalente est relativement faible car le mésylate de dexaméthasone peut réagir avec d'autres nucléophiles présents dans le milieu, c'est pourquoi les meilleurs résultats sont obtenus avec du récepteur fractionné et partiellement purifié. En effet Homma (1985) a montré que dans le cytosol de foie de rat, le mésylate de dexaméthasone se liait de manière très importante à la forme Y_b de la glutathion-S-transférase, un enzyme de poids moléculaire 24 kD. Il existe également un marquage non spécifique important sur une protéine de 67 kD. Malgré ces difficultés expérimentales, le mésylate de dexaméthasone bénéficie d'applications croissantes pour la caractérisation du récepteur des glucocorticoïdes qu'il a indiscutablement fait progresser. Conjointement avec l'utilisation des anticorps (Eisen 1981), et en autorisant le fractionnement du récepteur dans des conditions dénaturantes ou après hydrolyse enzymatique il s'est révélé un outil très intéressant pour l'étude de cette protéine de liaison des glucocorticoïdes (Cidlowski 1984b, Reichman 1984, Smith 1985). Une autre

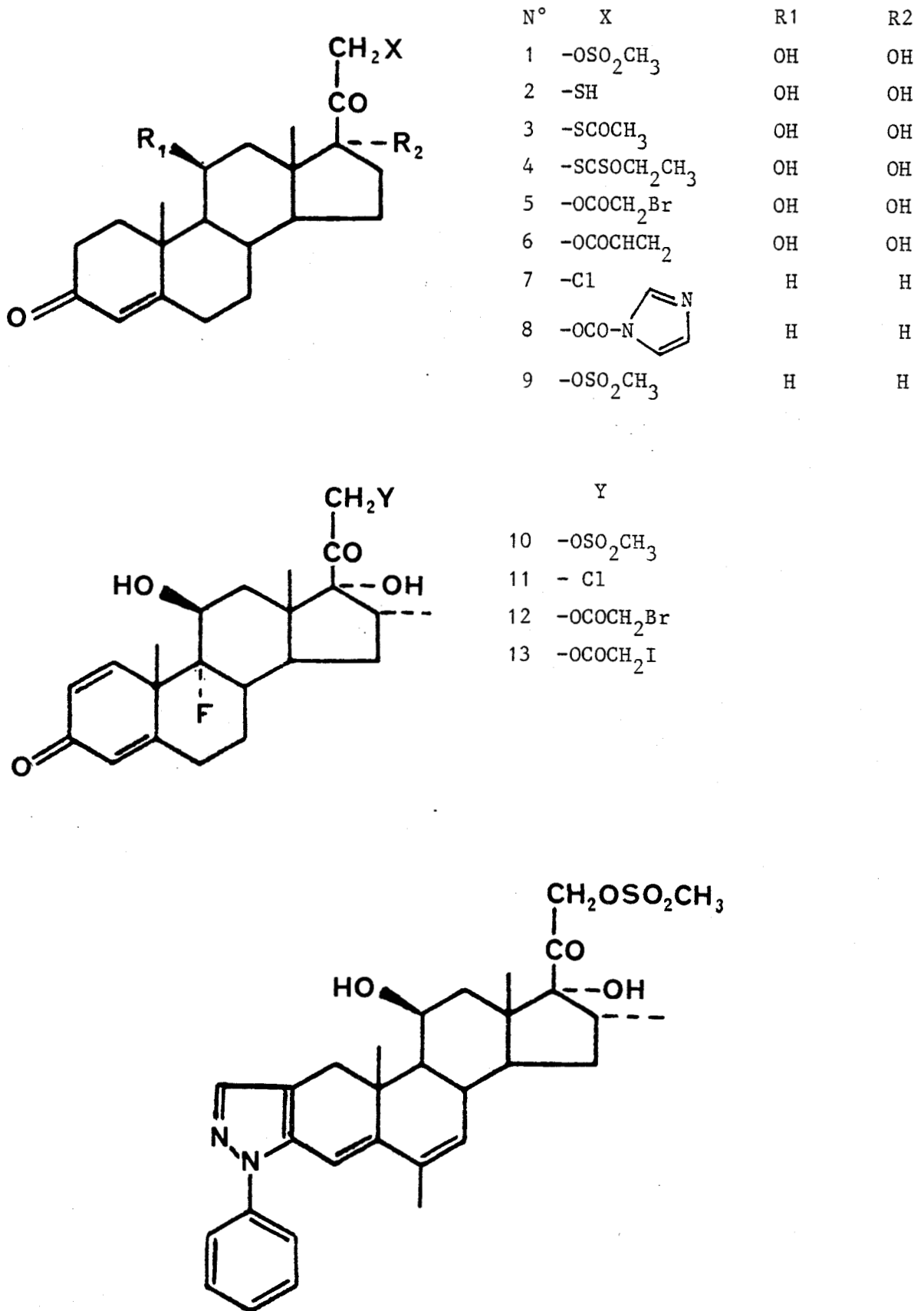


Figure 29 - Divers stéroïdes modifiés en position 21 et testés comme marqueurs d'affinité potentiels du récepteur des glucocorticoïdes (Dunkerton 1982, Lamontagne 1984, Simons 1980a, b).

propriété très intéressante de ce produit et du mésylate de cortisol est qu'il présente une activité antigluco-corticoïde dans des cellules en culture (Lamontagne 1984, Simons 1980c, 1986) et que les complexes mésylate de dexaméthasone-récepteur subissent une transformation anormale (Simons 1984, et voir précédemment chapitre I, paragraphe 3b).

Un inconvénient du mésylate de dexaméthasone est qu'aucune identification directe de l'acide aminé sur lequel il se fixe dans le site actif du récepteur n'a encore été obtenue. Il est à souhaiter que de nouveaux stéroïdes marqueurs d'affinité à haute affinité soient développés pour permettre une étude plus précise de ce site actif.

1.4 Anticorps antiidiotypique

Selon l'hypothèse d'après laquelle le site de liaison d'un anticorps est l'image en miroir de son épitope antigénique, on peut imaginer qu'un anticorps antiidiotypique (c'est-à-dire un anticorps spécifique du site de combinaison à l'antigène du premier anticorps) soit homologue de cet épitope. L'anticorps antiidiotypique comporterait ainsi des structures constituant une "image interne" de l'antigène (figure 30). On peut donc s'attendre à ce que des anticorps antiidiotypiques dirigés contre des hormones réagissent avec les récepteurs de ces hormones. Cette hypothèse, vérifiée avec succès dans le cas des récepteurs membranaires de plusieurs hormones (insuline, acétylcholine, catécholamines et TSH), commence seulement à être testée dans le cas des hormones stéroïdes et de leurs récepteurs. Pourtant l'approche antiidiotypique présente des attraits considérables. Elle part du ligand, bien défini et facile à obtenir, pour obtenir des anticorps dirigés contre le récepteur sans jamais avoir eu à purifier cette protéine peu abondante et très fragile. D'autre part, elle conduit à la préparation d'anticorps dirigés contre le site de liaison au stéroïde ou son voisinage immédiat. En jouant sur le choix du ligand et l'orientation de ses motifs au cours de l'immunisation, on peut espérer produire des anticorps antiidiotypiques reconnaissant des épitopes distincts du site de liaison (il faut

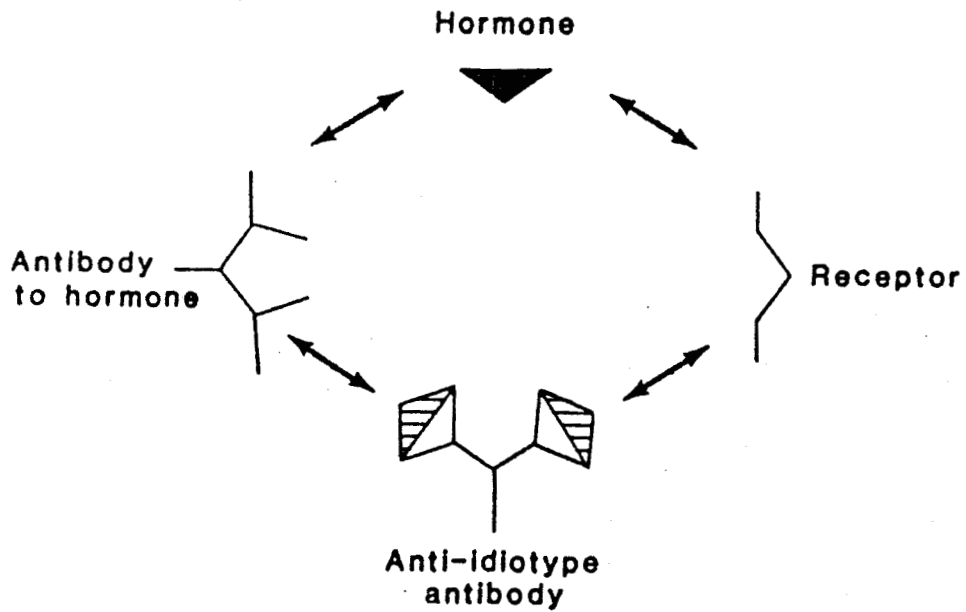


Figure 30 - Principe de l'approche antiidiotypique. L'anticorps anti-hormone et le récepteur de l'hormone sont équivalents. L'anticorps antiidiotypique porte l'image de l'hormone et peut aussi reconnaître le récepteur.

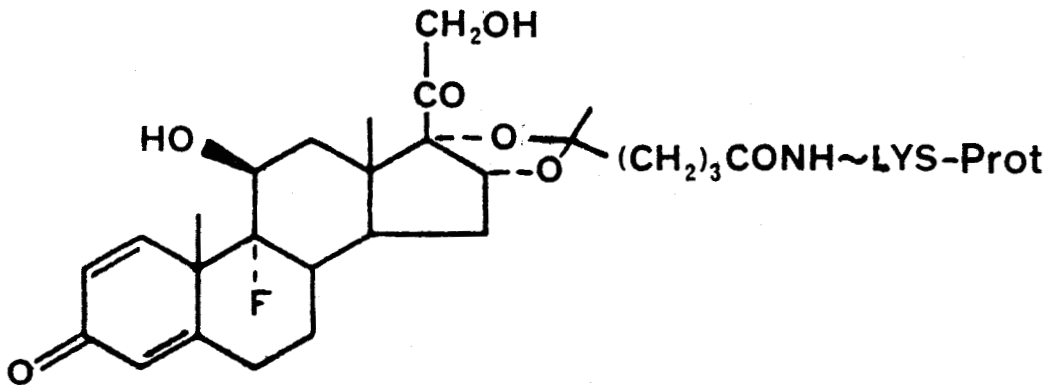


Figure 31 - Dérivé de la triamcinolone utilisé pour la préparation d'anticorps antiidiotypiques (Cayanis 1986)

pour cela disposer d'anticorps monoclonaux) et les utiliser pour faire une carte de ce site.

Une seule publication fait pour l'instant état de l'utilisation de l'approche antiidiotypique dans l'étude des récepteurs des hormones stéroïdes (Cayanis 1986). L'auteur a préparé un dérivé de la triamcinolone qu'il a couplé à la thyroglobuline pour immuniser une souris et un lapin (figure 31). Les anticorps antitriamcinolone produits par le lapin ont été purifiés par chromatographie d'affinité puis clivés par la papaïne. Les fragments Fab obtenus ont servi au criblage par méthode Elisa des anticorps auto-antiidiotypiques monoclonaux induits par l'immunisation de la souris. Un anticorps monoclonal du type IgM a ainsi été sélectionné. Cet anticorps se lie non seulement au Fab des anticorps antitriamcinolone mais il réagit aussi avec le récepteur des glucocorticoïdes. Il n'empêche cependant pas la liaison du stéroïde par le récepteur dont il reconnaît sans doute un épitope distinct du site de liaison, mais voisin de celui-ci (voir plus loin le paragraphe 2.2c de ce chapitre). Cette première application de l'approche antiidiotypique en appelle d'autres qui ne manqueront sans doute pas de voir le jour dans un avenir proche. Mais il faut savoir que des difficultés existent aussi avec cette approche et que tout anticorps antistéroïde n'a pas forcément un idiotype à la structure voisine de celle du site de liaison du récepteur correspondant (Agarwal 1986).

2 - CARACTERISATION DU RECEPTEUR : APPROCHE PAR LA PROTEINE

2.1 - Le récepteur non lié à l'hormone. Facteurs interférant avec l'activité de liaison

a) Instabilité du récepteur non lié à l'hormone

Le récepteur cytosolique des glucocorticoïdes est très instable en l'absence de son ligand (Kirkpatrick 1972, Bell 1973, Pratt 1975, Rafestin-Oblin 1977). Il est de nature protéique car les enzymes protéolytiques tels que la pronase, la papaïne, la trypsine et la chymotrypsine détruisent l'activité de liaison. Au contraire, DNAase, RNAase, collagénase, hyaluronidase, neuraminidase et lysozyme n'ont pas d'effet apparent sur cette activité. Des protéases endogènes présentes dans le cytosol jouent probablement un rôle dans la dégradation du récepteur libre ou lié à son hormone (Sherman 1978 et 1983, Vedeckis 1983a, Bodwell 1985), dont elles réduisent la taille sans toujours attaquer le site de liaison du stéroïde (voir plus loin le paragraphe 2.2). Pourtant les inhibiteurs de protéases courants comme le TPCK, le TLCK et le PMSF sont sans effet sur la stabilité du récepteur hépatique du rat (Schmid 1976). Le rôle des protéases activées par le calcium a été cependant particulièrement évoqué. Les différences de stabilité présentées par le récepteur en fonction des tissus étudiés proviennent peut-être d'une richesse plus ou moins grande de ces tissus en protéases endogènes ou en inhibiteurs de ces protéases. Un des inhibiteurs endogènes de la dégradation des complexes glucocorticoïde-récepteur récemment décrit (Holbrook 1984b) présente de nombreux points communs avec la calpastatine, inhibiteur naturel de la calpaïne une protéase endogène ubiquitaire et calcium dépendante (Bodwell 1985). On peut rapprocher de cette observation celles de l'inactivation rapide du récepteur libre en présence de calcium à 25°C (Aranyi 1980, Kalimi 1983) et de sa stabilisation en présence d'EDTA (Bell 1973, Hubbard 1983 et 1983b). Le glycérol est réputé stabiliser le récepteur des glucocorticoïdes (Schaumburg 1972, Schmid 1976) mais il n'aurait en réalité aucun effet de stabilisation sur la forme libre du récepteur et agirait en renforçant l'interaction stéroïde-récepteur et en

stabilisant uniquement la forme liée (Jones 1982a). Les agents chaotropiques comme le thiocyanate de sodium inactivent rapidement le récepteur non lié à 4°C (Kalimi 1982).

b) Cystéine essentielle à l'activité de liaison

Plusieurs arguments sont en faveur de l'implication d'une cystéine dans la liaison du stéroïde au récepteur :

- tout d'abord les agents réducteurs des thiols comme le β -mercaptoéthanol ou le dithiothreitol ont un grand effet stabilisant sur le récepteur dans la plupart des tissus étudiés (Rees 1975, Grandberg 1977, Schmid 1976). Dans certains tissus, dont le foie, cette stabilisation serait assurée par un facteur endogène thermostable, qui a récemment été identifié comme étant probablement la thioredoxine, un polypeptide de poids moléculaire 12 000 qui catalyse la réduction des ponts disulfure des protéines en présence de NADPH (Grippio 1985). L'addition d'un réducteur comme le dithiothreitol permet de réactiver dans certains tissus le récepteur inactivé par traitement à la chaleur (Sando 1979, Hubbard 1982). Cet effet est accru en présence de molybdate (voir plus bas (e)). Enfin, il faut signaler que le dithiothreitol semble avoir un effet sur les complexes glucocorticoïde-récepteur préformés puisqu'il en augmente la vitesse de dissociation en présence de molybdate, par un mécanisme inconnu (Buell 1985).

- Les réactifs spécifiques des thiols inactivent le récepteur des glucocorticoïdes non lié à l'hormone. C'est le cas de la N-éthylmaleimide à une concentration de 0,5 à 6 mM (Young 1975, Rees 1975). Il en va de même de l'acide parachloromercuriphenylsulfonique, alors que des résultats contradictoires sont obtenus avec l'iodoacétamide et l'acide iodoacétique : le premier inactive le récepteur à l'inverse du second.

La liaison préalable au récepteur d'un stéroïde à forte affinité comme la dexaméthasone protège complètement le site de liaison des effets de la N-éthylmaleimide 1 à 5 mM pendant 30 minutes à 0°C (Rees 1975, Young 1975, Kalimi 1980), alors que la protection est faible ou nulle en présence de corticostérone, stéroïde de plus faible affinité pour le récepteur (Schaumburg 1972). Dans ce cas la protection

est améliorée si on travaille à basse température (- 5°C en présence de glycérol). La protection du complexe dexaméthasone-récepteur vis-à-vis de l'iodoacétamide 1 à 12 mM est totale (Young 1975, Kalimi 1980, Koblinsky 1972). Un problème particulier est posé par les agents mercuriels tels que le parachloromercuribenzoate, le parachloromercuriphenylsulfonate et le mercuriacétate contre l'effet inactivant desquels les complexes glucocorticoïde-récepteur ne sont que partiellement protégés quand ces réactifs sont utilisés à de faibles concentrations (0,2 à 1 mM) pendant un temps court à 0°C et pas du tout si on les utilise à des doses plus élevées ou un temps un peu plus long (Gardner 1973, Koblinsky 1972, Rees 1975). Banerji (1981) a rapporté que la dissociation complète du complexe [³H] dexaméthasone-récepteur des glucocorticoïdes du foie de rat peut être obtenue en 90 minutes à 0°C en présence de parachloromercuribenzoate 0,5 mM et que le récepteur inactivé peut être entièrement régénéré par traitement avec du dithiothréitol 25 mM. Des faits similaires ont été décrits pour le récepteur de la progestérone et celui de la vitamine D : inactivés sous forme non liée à l'hormone par tous les réactifs des thiols, ils sont protégés par la fixation préalable de l'hormone des effets des maléimides, de l'iodoacétamide et du DTNB mais pas de ceux des mercuriels qui entraînent la dissociation rapide du complexe (Coty 1980). Cette observation pose le problème de la spécificité de l'action des agents mercuriels vis-à-vis des thiols du récepteur. Pourquoi le même résidu de cystéine essentiel serait-il masqué à l'action de la N-éthylmaléimide et accessible à celle des mercuriels ? Le Gaillard (1983) a observé que le parachloromercuribenzoate utilisé sur le complexe transcortine humaine-cortisol purifié, dans les mêmes conditions que celles employées avec les récepteurs (c'est-à-dire un excès molaire important du réactif vis-à-vis du ou des thiols essentiels supposés), était capable de provoquer la dissociation rapide de ce complexe sans interagir avec aucune des deux cystéines de la protéine. Cet effet est réversible par addition de dithiothréitol, mais également d'EDTA. Cet auteur conclut donc fort justement à un effet non spécifique du parachloromercuribenzoate mettant en jeu d'autres résidus aminoacides que la cystéine et il encourage les

expérimentateurs à la prudence dans l'interprétation des résultats obtenus avec le parachloromercuribenzoate. Une autre explication a été proposée par Harrison (1983) à propos des effets des mercuriels sur le récepteur des glucocorticoïdes : il observe qu'à faibles doses (25 à 200 μM pendant 15 minutes à 0°C) le parachloromercuriphenylsulfonate n'inactive pas le récepteur non lié à l'hormone mais entraîne une diminution sensible de son affinité pour le stéroïde sans modification du nombre de sites de liaison présents ni de leur spécificité vis-à-vis de divers stéroïdes. Cet effet dépend de la dose de parachloromercuriphenylsulfonate et il est entièrement réversible après addition de dithiothréitol. L'auteur considère que ses résultats ne sont pas compatibles avec l'existence d'une seule cystéine essentielle dans le site de liaison, mais peuvent s'expliquer par l'existence de plusieurs cystéines dans et au voisinage de ce site, cystéines non indispensables à la liaison, mais qui participeraient au maintien de l'intégrité du site de liaison. Un argument en faveur de l'existence de plusieurs cystéines sur le récepteur est fourni par cet auteur : du récepteur marqué par le mésylate de dexaméthasone, stéroïde réputé réagir avec la cystéine essentielle du site de liaison pour s'y fixer de manière covalente (Simons 1981), est retenu sur une colonne portant du parachloromercuriphenylsulfonate immobilisé. Harrison en déduit que la cystéine essentielle étant bloquée par le mésylate de dexaméthasone, le récepteur est retenu sur la colonne par une autre cystéine. Il montre que la rétention est obtenue également avec du "méro" récepteur, le plus petit fragment de protéolyse partielle du récepteur (voir paragraphe 2.2). Ses conclusions sont intéressantes, mais comme le récepteur chargé sur la colonne était sous forme dénaturée par le dodécylsulfate de sodium, il est impossible de savoir si les thiols mis en évidence par la rétention sur la colonne étaient accessibles ou non dans la protéine native. De toutes façons, l'existence de cystéines essentielles à la transformation des complexes glucocorticoïde-récepteur et distincte de la cystéine essentielle à la liaison du stéroïde est bien documentée (voir chapitre précédent, paragraphe 1.3).

La rétention des complexes glucocorticoïde-récepteur sous forme native, transformée ou non, a d'ailleurs été récemment obtenue sur des colonnes portant des fonctions thiol activées (Bodwell 1984b, Idziorek 1985). Certaines colonnes (figure 32), comme l'agarose CL-4B-diamino-ethyl-succinyl-thioethylamine-2-thiopyridyl ou le support commercial de chez Pharmacia qui comporte une molécule de glutathion immobilisée dont le thiol est activé à la 2-thiopyridine, retiennent les deux formes des complexes hormone-récepteur. Une seule, l'agarose CL-4B-diaminoethyl-succinyl-cystéinyl-2-thiobenzoïque, ne lie que les complexes transformés. Ces résultats montrent qu'il existe des thiols accessibles sur les complexes glucocorticoïde-récepteur, thiols distincts de celui du centre actif, et dont certains sont situés dans la région de liaison à l'ADN et démasqués par la transformation. La raison pour laquelle les complexes non transformés sont retenus sur les deux premières colonnes et pas sur la troisième reste mystérieuse. Le(s) thiol(s) impliqué(s) ont peut-être un environnement particulier qui limite leur réactivité avec le thiol activé de cette colonne. Il convient de noter qu'à l'exception des travaux de notre groupe (Idziorek 1985a) tous ces résultats ont été acquis sur du récepteur non purifié, ce qui limite leur portée.

Enfin on rapprochera des effets des réactifs spécifiques des thiols l'inhibition de la liaison de l'acétonide de triamcinolone sur le récepteur des glucocorticoïdes obtenu avec les inhibiteurs de protéase suivants : le tosyllysylchlorométhane, le tosylphenylchlorométhane et surtout le E-64 (Hubbard 1984a). Les deux premiers sont des inhibiteurs de protéase à sérine connus pour réagir avec l'histidine du centre actif de ces enzymes mais également pour pouvoir réagir avec des thiols. Le E-64 est un inhibiteur spécifique de protéase à cystéine dont il bloquerait le thiol du centre actif. L'hypothèse d'une certaine communauté de structure entre le centre actif de certaines protéases et le site de liaison des récepteurs des hormones stéroïdes n'est pas neuve (Baker 1977 et 1980). Quoiqu'il en soit ces résultats engagent à la prudence dans l'utilisation des inhibiteurs de protéases au cours de la manipulation des récepteurs. Dans ce même cadre des inhibiteurs enzymatiques, Schmidt (1984) a récemment rapporté que la β -lapachone

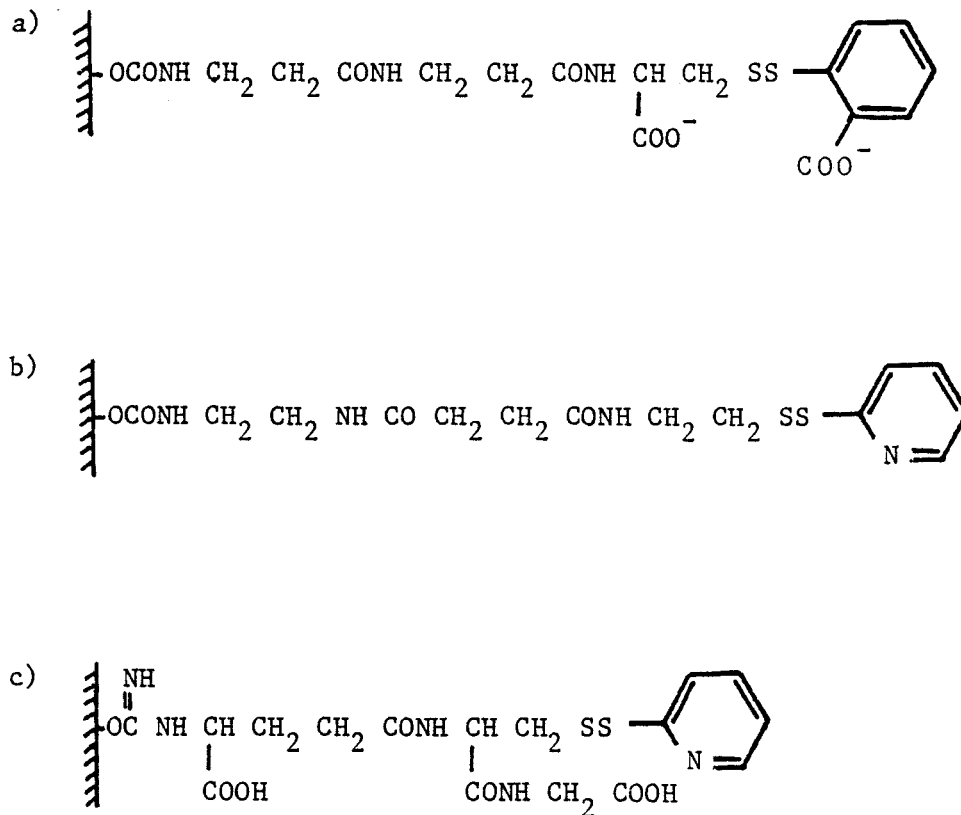


Figure 32 - Structure des différents gels portant des fonctions thiols activées utilisés pour immobiliser le récepteur des glucocorticoïdes.

- a) agarose CL-4B-diaminoéthyl-succinyl-cystéinyl-2-thiobenzoïque
- b) agarose CL-4B-diaminoéthyl-succinyl-thioéthylamine-2-thiopyridyl
- c) agarose CL-4B- γ -glutamyl-S-(2 thiopyridyl)cystéinyl-glycine

un inhibiteur de l'ADN polymérase α , était capable d'inactiver à 0°C le récepteur des glucocorticoïdes non lié du foie de rat. Cet effet est augmenté en présence de molybdate et aboli en présence de dithiothréitol. La β -lapachone se comporte comme un inhibiteur compétitif de la liaison du stéroïde ($K_i = 6 \mu\text{M}$). Son effet est réversible et se manifeste également sur le récepteur purifié. Le mécanisme d'action de la lapachone est inconnu, mais bien qu'elle ne semble pas capable d'oxyder le thiol du centre actif, le fait qu'elle inhibe spécifiquement deux enzymes comportant une cystéine essentielle (l'ADN polymérase et la transcriptase reverse) et que son effet soit bloqué par le dithiothréitol semblent suffisant à Schmidt pour évoquer l'implication de la cystéine essentielle du récepteur. Cette hypothèse paraît assez légère et le produit, une 1,2-naphtoquinone substituée (voir précédemment la figure 17), pourrait tout aussi bien réagir avec une autre aminoacide et son inactivation par le dithiothréitol pourrait s'expliquer par une réaction directe de la β -lapachone avec le réducteur.

- le troisième argument en faveur de l'existence d'une cystéine directement impliquée dans la liaison des glucocorticoïdes à leur récepteur est fourni par l'utilisation des dérivés mésylates de divers glucocorticoïdes, et en particulier du 21-mésylate de dexaméthasone (Simons 1980a et 1981). Simons (1980a) a montré qu'en milieu aqueux faiblement alcalin les alpha céto mésylates possèdent une réactivité extrêmement élevée et très sélective vis-à-vis des thiols. Ils réagissent en effet beaucoup plus lentement avec les amines primaires et les carboxyles et pratiquement pas avec les hydroxyles et le noyau imidazole. Or, le dérivé tritié du mésylate de dexaméthasone (figure 33) se lie de manière covalente et spécifique au récepteur cytosolique des glucocorticoïdes (Simons 1981). Le matériel marqué de manière covalente présente un poids moléculaire apparent en électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS similaire à celui du récepteur purifié (85 à 90 000 daltons) et il est reconnu par un anticorps polyclonal antirécepteur (Eisen 1981). Simons a proposé que le marquage covalent du mésylate de dexaméthasone se fasse au niveau de

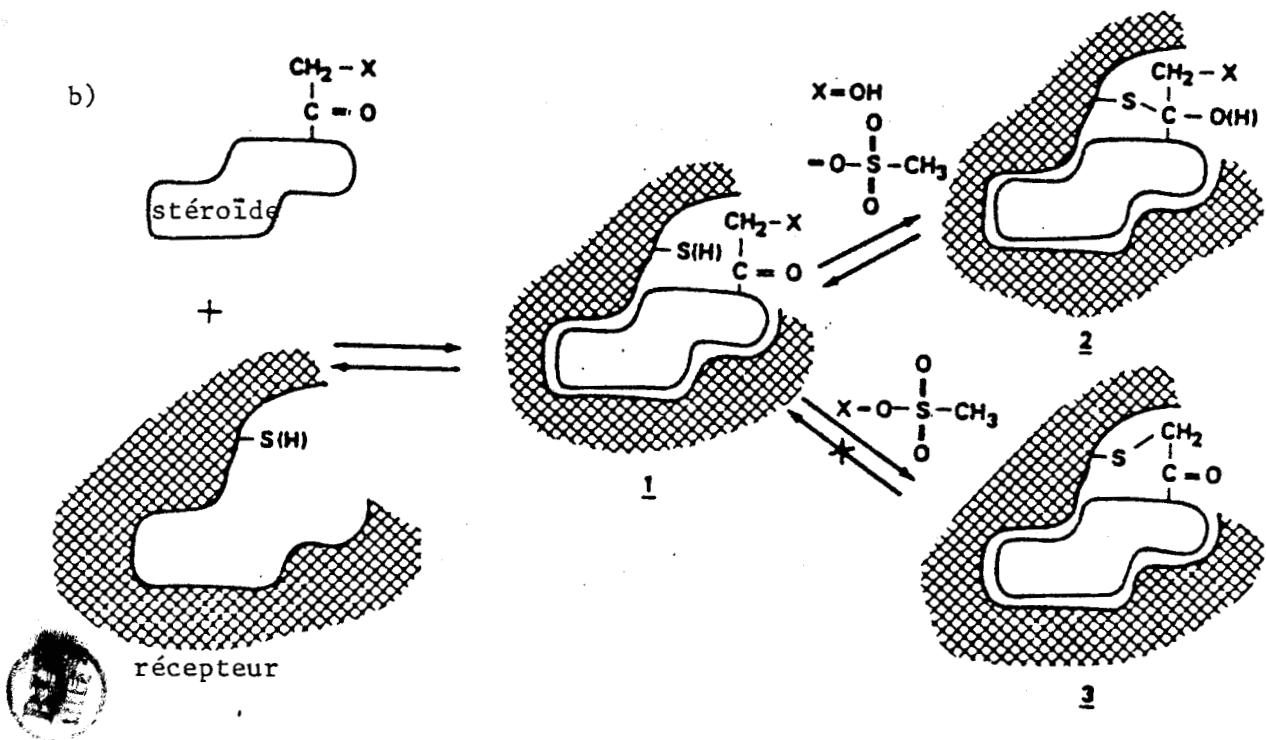
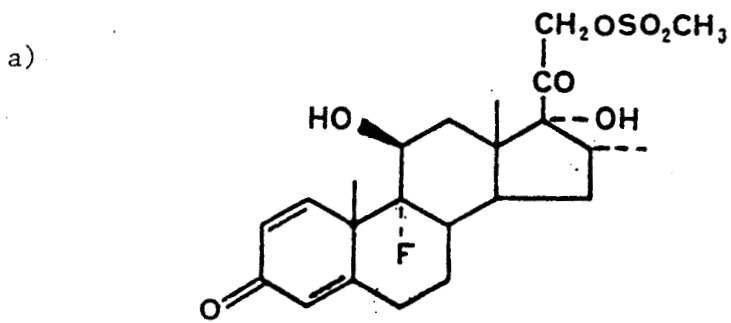


Figure 33 - a) Structure et b) mécanisme de liaison du mésylate de dexaméthasone sur le récepteur des glucocorticoïdes (Simons 1981)

la cystéine essentielle à la liaison du stéroïde, qui serait ainsi située dans le site de liaison lui-même, dans la région voisine de la chaîne latérale 17 β -du stéroïde (figure 33). Selon lui, les glucocorticoïdes s'associeraient au récepteur et formeraient ensuite une liaison hémithioacétal entre leur cétone en 20 et le thiol de cette cystéine. Cette liaison serait réversible même avec le 21 mésylate de dexaméthasone. Cependant, dans ce dernier cas, le thiol engagé dans la liaison hémithioacétal pourrait aussi réagir pour déplacer l'anion méthane sulfonate du carbone 21 adjacent pour donner de manière irréversible un complexe stéroïde-récepteur comportant une liaison thioether. Aucune identification absolue de l'acide aminé modifié par le mésylate de dexaméthasone n'a été obtenue à ce jour.

Si aucune preuve directe de la présence d'une cystéine dans le site de liaison du récepteur n'a encore été apportée, un faisceau d'arguments solides et convaincants a cependant pu être réuni en faveur de cette hypothèse.

c) Autres aminoacides éventuellement impliqués dans la liaison stéroïde-récepteur.

- Lysine

Le phosphate de pyridoxal à une concentration de l'ordre de 1 mM inactive en 15 minutes à 25°C le récepteur des glucocorticoïdes non lié à l'hormone. Cet effet, qu'il partage avec le pyridoxal, mais pas avec la pyridoxine, la pyridoxine-5'-phosphate ni la 4-désoxypyridoxine, dépend de la concentration en réactif et de la température (Naray 1982, Litwack 1985). Il est très lent à 0°C. La courbe d'inhibition de la liaison au récepteur de l'acétonide de triamcinolone en fonction de la concentration est du type non compétitif mixte (Di Sorbo 1980, Litwack 1985). L'efficacité de la compétition dépend fortement de la température : nulle à 0°C, elle augmente très sensiblement au-dessus de 20°C. Le phosphate de pyridoxal diminue aussi la stabilité à 25°C des complexes glucocorticoïde-récepteur préformés (Calk 1978, 1982). Les conditions utilisées (une seule concentration de stéroïde) ne permettent pas de trancher entre un effet sur la constante de dissociation à l'équilibre des complexes ou sur le nombre de sites. Ces



quelques résultats constituent des arguments très indirects en faveur de l'implication de résidus de lysine dans l'activité de liaison au stéroïde du récepteur. Ils sont indiscutablement moins bien étayés que ceux concernant le rôle du résidu de lysine dans la liaison des complexes glucocorticoïde-récepteur à l'ADN. Dans ce cas la démonstration de la nature réversible de l'effet du phosphate de pyridoxal après addition d'amines primaires, et de l'irréversibilité provoquée par la réduction au borohydrure de sodium constituent des arguments puissants en faveur de la liaison covalente du phosphate de pyridoxal sur une ou plusieurs lysines (Calk 1978, et cf supra chapitre I paragraphe 3). Cependant, tout récemment Cidlowski (1984a) a localisé un site de liaison du phosphate de pyridoxal sur le "méro" récepteur des glucocorticoïdes. Ce méro récepteur, plus petit fragment du récepteur liant encore l'hormone, a été généré en soumettant le complexe cytosolique à une hydrolyse enzymatique ménagée par la trypsine ou la chymotrypsine. Après traitement par le phosphate de pyridoxal puis réduction par le borohydrure de sodium le mérorécepteur acquiert de l'affinité pour le DEAE-Biogel 5A, sur lequel il est retenu à l'inverse du mérorécepteur non traité. De plus, son point isoélectrique diminue. Ces résultats sont en accord avec la fixation covalente du phosphate de pyridoxal sur une lysine du mérorécepteur, ce qui ajoute à la protéine une nouvelle charge négative portée par le phosphate du cofacteur. Il y aurait donc des lysines accessibles au voisinage du site de liaison à l'hormone du récepteur.

On peut enfin rapprocher des résultats obtenus avec le phosphate de pyridoxal la capacité du 5'-désoxypyridoxal (l'analogue de synthèse non phosphorylé du phosphate de pyridoxal portant un méthyl en 5') à provoquer la dissociation rapide à 0°C du complexe glucocorticoïde-récepteur (O'Brien 1980 et 1982). Son effet dépend de la concentration et du pH du milieu. Il est accru en milieu alcalin, probablement par déprotonation de l'ion pyridinium. Sur des cellules entières le 5'-désoxypyridoxal inhibe à faibles doses (10 à 100 μM) et de manière compétitive la fixation de la dexaméthasone au récepteur ($K_i = 8,1 \mu\text{M}$). Cet effet est réversible et spécifique du 5'-désoxypyridoxal et n'est

présenté ni par le phosphate de pyridoxal ni par ses dérivés phosphorylés en 5' ou ne comportant pas de fonction aldéhyde. Le mode d'action du 5' désoxypyridoxal est inconnu. O'Brien (1982) a postulé une liaison compétitive directe dans le site actif du récepteur, hypothèse rendue probable par l'allure des courbes de compétition et les paramètres hydrophobes de l'interaction (nécessité d'un substituant apolaire en 5' et effet du pH).

- Arginine

Les réactifs spécifiques des résidus arginine ont un effet sur la liaison des glucocorticoïdes à leur récepteur dans le cytosol. La 1,2-cyclohexanedione inhiberait à 25°C la liaison du stéroïde selon un mécanisme non compétitif mixte (Di Sorbo 1980, Litwack 1985). A 0°C le phénylglyoxal 10 à 20 mM inactive le récepteur non lié (Shyamala 1982). Ajouté en même temps que le stéroïde il inhibe la liaison de celui-ci de manière compétitive. Enfin, il provoque la dissociation des complexes hormone-récepteur déjà formés. La fixation préalable du stéroïde semble protéger partiellement le site de liaison des effets du phénylglyoxal, qui dépendent de sa concentration et apparaissent partiellement réversibles par gel-filtration à 0°. Le glyoxal, le méthylglyoxal et la 1,2-cyclohexanedione, autres réactifs des arginines, présentent des effets similaires à ceux du phénylglyoxal, alors que la 1,4-cyclohexanedione et la 2,4-pentanedione sont inactives. De plus, l'effet de la 1,2-cyclohexanedione est renforcé en tampon borate, connu pour stabiliser les interactions entre le groupement guanidine de l'arginine et les α,β -dicétones. Tous ces éléments sont en faveur d'une ou plusieurs arginines impliquées dans la liaison du stéroïde au récepteur. Ces résidus arginine seraient situés sur le récepteur, soit dans le site de liaison lui-même, soit ailleurs sur la molécule qu'ils stabiliseraient dans une conformation compatible avec la liaison de l'hormone. Il pourrait s'agir dans ce dernier cas d'un mécanisme similaire à celui qui a été proposé dans le cas de la transcortine humaine (Perini 1983) où une arginine semble nécessaire au maintien d'une forte activité de liaison, sans pour autant que la fixation du stéroïde lui assure une bonne

protection.

On le voit le rôle des résidus d'acides aminés basiques dans la liaison du stéroïde est beaucoup moins clairement établi que celui de la cystéine.

d) Phosphorylation du récepteur

Le rôle éventuel d'un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation dans le contrôle de l'activité du récepteur des glucocorticoïdes, suspecté depuis longtemps sur la base d'arguments indirects, est l'objet d'un intérêt croissant depuis qu'il a été montré que le récepteur est phosphorylé *in vivo*, comme le sont d'ailleurs le récepteur de la progestérone et celui des oestrogènes (Housley 1984, Dougherty 1985). Nous allons résumer les principaux faits expérimentaux décrits à ce jour en distinguant :

- les arguments indirects en faveur de l'intervention d'un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation du récepteur :

. l'activité de liaison des récepteurs des glucocorticoïdes dans les cellules intactes dépend des conditions métaboliques et de la fourniture d'énergie. Le récepteur des thymocytes de souris, inactivé en conditions anaérobies et de privation énergétique, est réactivé en conditions aérobies (Munck 1968), sans que cette réactivation nécessite de synthèse protéique (Bell 1973). Les fluctuations de la concentration cellulaire en récepteur actif, capable de lier l'hormone, sont parallèles à celles du taux d'ATP intracellulaire et il semble exister un équilibre rapide entre les formes intracellulaires inactive et active du récepteur (Wheeler 1981).

. le récepteur cytosolique non lié à l'hormone est rapidement inactivé *in vitro* à 25°C par un facteur endogène ayant des propriétés communes avec celles des phosphatases. Cette inactivation du récepteur cytosolique *in vitro* est bloquée par certains inhibiteurs de phosphatases comme l'ion fluorure et des dérivés phosphorylés de faible poids moléculaire (dont le glucose 1-phosphate et certains nucléotides). La phosphatase alcaline purifiée d'intestin de veau dégrade le récepteur cytosolique non lié et n'a pas d'effet sur la

liaison du stéroïde déjà fixé au récepteur. Des résultats similaires sont obtenus avec la phosphoprotéine phosphatase de muscle de lapin (Housley 1982).

- . le récepteur cytosolique non lié inactivé par traitement à 25°C peut être partiellement réactivé en présence d'ATP 10 mM, ou mieux d'ATP plus du molybdate (voir paragraphe (e)).

- . les nucléotides cycliques et la protéine-kinase dépendante de l'AMP cyclique présentent dans certains cas des variations cellulaires en rapport avec l'activité du récepteur (Oikarinen 1984, Gruol 1986). Gruol (1986) a montré tout récemment que des souches mutantes de lymphome de souris résistantes à l'AMPc et contenant une kinase AMPc dépendante défectueuse présentaient souvent une résistance spontanée aux glucocorticoïdes avec une activité de liaison effondrée.

- les données concernant la phosphorylation du récepteur :

- . le récepteur des glucocorticoïdes est phosphorylé in vivo et ceci a été particulièrement bien démontré par Housley (1983) sur des cellules L929 de souris cultivées en présence de phosphate marqué au phosphore 32. Le récepteur purifié ensuite par chromatographie d'affinité apparaît phosphorylé d'après l'analyse du matériel élué par électrophorèse en gradient d'acrylamide et électrophorèse bidimensionnelle. En effet, il y a coïncidence parfaite entre les bandes marquées au ³²P et celles marquées par le mésylate de dexaméthasone. Bien que la purification du récepteur ne soit pas totale, deux critères de spécificité sont réunis : d'une part la bande phosphorylée correspondant au récepteur n'est éluee du gel d'affinité que par des stéroïdes capables aussi d'éluer le récepteur, d'autre part du cytosol de cellules d'une souche mutante ne contenant pas de récepteur ne contient pas non plus la bande phosphorylée spécifique du récepteur. L'hydrolyse totale et l'analyse des acides aminés montre que la phosphorylation intéresse essentiellement des résidus de sérine. Des résultats similaires ont été obtenus chez le rat ayant reçu une injection de phosphate marqué au ³²P et dont le récepteur hépatique a ensuite été purifié par chromatographie d'affinité ou chromatographie sur DNA-cellulose : ce récepteur apparaît également phosphorylé

après analyse par électrophorèse en gradient d'acrylamide (Grandics 1984a, Singh 1985).

. certains auteurs ont montré qu'une activité kinasique était associée au récepteur purifié (Kurl 1984, Miller-Diener 1985, Singh 1984). Les caractéristiques de cette activité varient selon les auteurs : pour les uns elle est magnésium dépendante (Kurl 1984, Singh 1984) alors que pour les autres elle est calcium dépendante, sans pourtant que la calmoduline n'est d'effet (Miller-Diener 1985). Cette activité kinasique permet la phosphorylation du récepteur purifié et d'autres protéines. Pour Kurl (1984) et Miller-Diener (1985) elle serait portée par le récepteur lui-même qui s'autophosphorylerait. Cette autophosphorylation du récepteur purifié nécessiterait même que le récepteur soit lié à un stéroïde agoniste puissant comme l'acétonide de tiamcinolone, et soit sous forme transformée (Miller-Diener 1985). Le même auteur voit dans l'inhibition de la phosphorylation du récepteur par le 8-azido ATP et la fluoro-sulfonylbenzoyladénosine un argument en faveur de l'existence d'un site de liaison de l'ATP sur le récepteur lui-même. Sanchez (1986), très critique vis-à-vis de cette notion d'une activité autophosphorylante du récepteur, montre clairement que le récepteur purifié grâce à un immunoabsorbant portant un anticorps monoclonal antirécepteur n'a aucune activité kinasique, pas plus d'ailleurs que la protéine 90-92K non liante qui l'accompagne en présence de molybdate (Housley 1985, Sanchez 1985). Mais il souligne qu'il existe une protéine kinase magnésium dépendante facilement copurifiée avec le récepteur si on ne prend pas suffisamment de précautions.

. enfin Singh (1985) a montré que le récepteur purifié est un bon substrat de phosphorylation *in vitro* sous l'action d'une kinase AMP_c -dépendante en présence de magnésium.

Tous ces résultats établissent de manière claire que le récepteur est une phosphoprotéine. Mais ils ne permettent pas de comprendre le rôle de cette phosphorylation. Pour l'instant aucune variation du taux de phosphorylation du récepteur lui-même n'a pu être mesurée

et corrélée avec son activité biologique. Mais le fait que le récepteur soit une phosphoprotéine et les nombreux arguments indirects en faveur de l'implication d'un mécanisme de phosphorylation-déphosphorylation dans le contrôle de son activité expliquent la faveur actuelle du modèle selon lequel le récepteur devrait être phosphorylé pour pouvoir lier l'hormone puis serait déphosphorylé à un autre stade de son cycle cellulaire (au cours de la transformation ou après son interaction avec le noyau). Cependant un autre modèle où le taux de phosphorylation du récepteur augmenterait après liaison du stéroïde n'est pas exclu car il vient d'être sérieusement étayé dans le cas du récepteur de la progestérone de lapine par le groupe de Milgrom (Logeat 1985). Dans un tel modèle, le récepteur déjà phosphorylé pour lier l'hormone, serait phosphorylé davantage au cours de l'activation, puis serait déphosphorylé après interaction avec le noyau.

e) Effet du molybdate sur le récepteur non lié à l'hormone :

Le remarquable effet stabilisant de l'ion molybdate sur le récepteur des glucocorticoïdes a été particulièrement bien étudié par le groupe de Pratt qui l'a mis le premier en évidence en 1977, et qui vient de publier deux synthèses très claires des résultats obtenus depuis cette date (Dahmer 1984, Housley 1984). Il apparaît que :

. le molybdate inhibe avec une efficacité remarquable l'inactivation par la chaleur du récepteur cytosolique des glucocorticoïdes sous forme non liée à l'hormone. Cet effet est maximum à une concentration de 10 mM. Il est également présenté par deux autres oxyanions des métaux de transition du groupe VI, le vanadate et le tungstate. Le molybdate stabilise également le récepteur contre l'inactivation provoquée par l'addition d'une forte quantité de sel à 0°C ou le relargage du récepteur par le sulfate d'ammonium.

. dans le cytosol des thymocytes de rat, dépourvu d'activité réductrice endogène, la stabilisation du récepteur libre n'est obtenue qu'en présence de réducteur exogène (dithiothreitol par exemple) et

de molybdate. En l'absence de ces deux facteurs, le récepteur est dégradé de manière pratiquement irréversible par la chaleur. En présence de molybdate l'activité de liaison disparaît après chauffage à 25°C, mais elle peut être complètement réactivée par l'addition secondaire du réducteur. Le molybdate apparaît ainsi stabiliser une forme "oxydée" non liante du récepteur. Une observation un peu similaire d'un effet synergique du molybdate et du dithiothréitol sur la réactivation du récepteur du rein de rat a été récemment rapportée (Hubbard 1982).

. de même, le récepteur cytosolique perd en l'absence de ses agents endogènes de stabilisation sa capacité de liaison du stéroïde après traitement par la phosphatase alcaline purifiée d'intestin de veau ou par la phosphoprotéine phosphatase du muscle de lapin. Le molybdate n'empêche pas la disparition de l'activité de liaison sous l'action de ces deux enzymes (qu'il n'inhibe pas à la concentration de 10 mM), mais le récepteur inactivé en sa présence peut être complètement réactivé par l'addition d'un agent réducteur (dithiothréitol). Le molybdate stabilise ici une forme du récepteur inactivée par déphosphorylation.

Ces différents résultats ont conduit Pratt et ses collaborateurs à proposer le modèle représenté sur la figure 34. D'après ce modèle, le récepteur présente sa pleine activité de liaison à l'hormone sous la forme phosphorylée et réduite (1). La déphosphorylation conduit à la forme (2), encore capable de lier l'hormone, mais qui est transformée en forme (5) inactive, très rapidement en l'absence de réducteurs et de molybdate et un peu plus lentement en présence de réducteurs. La forme (1) peut également subir une oxydation qui donne la forme (4) incapable de lier l'hormone et inactivée pratiquement définitivement par déphosphorylation conduisant à la forme (5), encore qu'une réactivation partielle en présence d'ATP et de molybdate puisse être obtenue (cf Supra (d)). Le molybdate empêcherait la dénaturation irréversible de la forme (2) en générant la forme (3) incapable de lier le stéroïde, mais dont le retour à la forme liante (2) est assuré par les agents réducteurs exogènes (dithiothréitol) ou endogènes (thioredoxine). La déphosphorylation du récepteur serait empêchée par des inhibiteurs exogènes (fluorure,

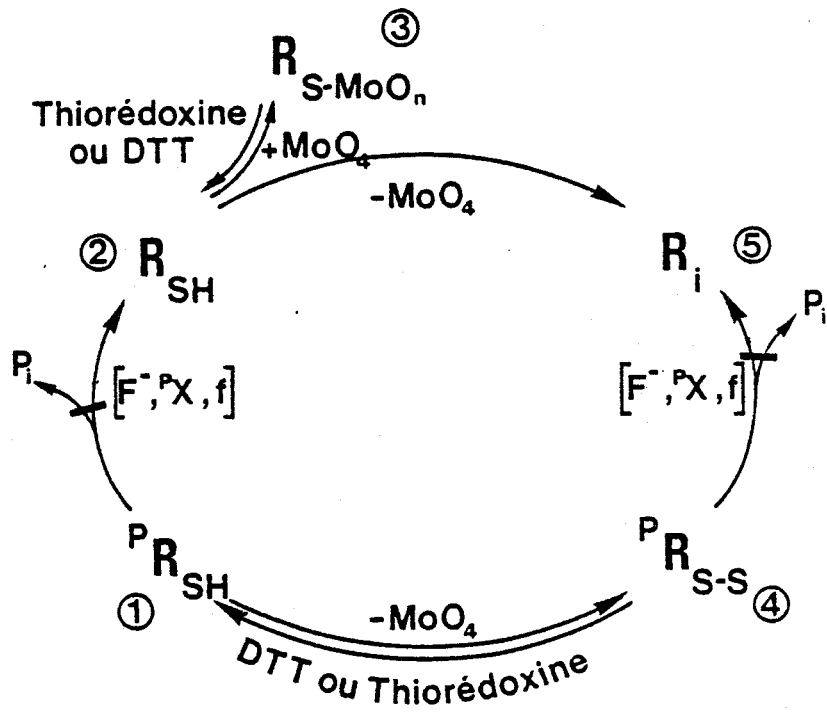


Figure 34 - Modèle hypothétique d'interaction du molybdate avec le récepteur des glucocorticoïdes (Housley 1984). Les formes 1 et 2 lient l'hormone. Les formes 3,4 et 5 en sont incapables mais les deux premières sont réactivables par réduction. au contraire de la forme 5. Les ions fluorure (F^-), les dérivés phosphorylés (P^X) et le facteur endogène thermostable (f) inhibent la déphosphorylation du récepteur.

dérivés phosphorylés de faible poids moléculaire) ou endogène (facteur f). Le facteur f est un facteur stabilisant présent dans certains tissus, dont le foie. Il est de faible poids moléculaire (inférieur à 700), résistant à tous les enzymes testés sur lui, thermostable et de nature encore inconnue. Comme le molybdate il stabilise le récepteur non lié à l'hormone et inhibe la transformation du complexe hormone-récepteur. A la différence du molybdate il inhibe la phosphorylase phosphatase.

Le mécanisme d'action du molybdate reste encore inconnu. L'hypothèse d'un effet indirect par inhibition enzymatique d'une phosphatase ou de protéases (Sherman 1983) dégradant le récepteur, est abandonnée. Une interaction directe avec le récepteur paraît beaucoup plus vraisemblable. En effet le molybdate protège le récepteur contre les effets purement physiques des sels et du relargage, le stabilise sous une forme de haut poids moléculaire, modifie son affinité pour le stéroïde (Blanchardie 1984, Cardo 1983) et surtout maintient ses effets sur des préparations de récepteur hautement purifié sous forme non transformée (Grandics 1984b, Idziorek 1985, Lustenberger 1985, Weisz 1984). L'interaction molybdate récepteur est sans doute faible puisqu'il n'a d'effet qu'à une concentration millimolaire et que cet effet est facilement réversible. Elle pourrait intéresser une cystéine comme dans le cas d'autres protéines liant le molybdate (Weathers 1979). Cardo (1983) a montré récemment qu'en présence de molybdate la vitesse d'association de la dexaméthasone au récepteur du glucocorticoïde du thymus de veau est réduite d'un facteur 10 et l'enthalpie d'activation multipliée par 3,5. Ceci a amené cet auteur à proposer que le molybdate se lie à la cystéine essentielle à la liaison du stéroïde et que son départ soit indispensable à la fixation de celui-ci. La nécessité de l'évacuation préalable du molybdate serait responsable de la barrière d'énergie de fixation du stéroïde observée en présence de cet ion. Le molybdate pourrait aussi agir ailleurs sur le récepteur en empêchant un changement de conformation du récepteur qui entraînerait son inactivation après l'oxydation de la cystéine essentielle à la liaison du stéroïde. Le groupement

phosphorylé ne serait pas nécessaire à la liaison du stéroïde puisque celle-ci serait possible en son absence (forme (2) de la figure 34), mais sa présence ralentirait l'oxydation de la cystéine essentielle en empêchant peut-être, comme le molybdate, un changement de conformation du récepteur. L'étude de l'interaction du molybdate avec du récepteur hautement purifié devrait permettre de progresser dans la compréhension de son mode d'action.

2.2 - Etude structurale du récepteur

Du fait de sa grande instabilité et de sa faible abondance dans les tissus cibles, le récepteur est une protéine fort difficile à purifier. C'est ce qui explique que sa structure soit encore imparfaitement connue. Un certain nombre de résultats ont cependant déjà été acquis à partir, soit de complexes stéroïde-récepteur non purifiés, soit des faibles quantités de matériel purifié obtenues par les quelques équipes spécialisées dans ce travail. Le recours à des méthodes de fractionnement simples et applicables à des complexes stéroïde-récepteur non covalents, telles que la chromatographie d'exclusion de taille et l'ultracentrifugation en gradient de densité, a joué un rôle considérable dans la détermination de la structure globale et des paramètres physicochimiques des différentes formes de récepteur, purifié ou non. Ces méthodes, longtemps les seules utilisables, bénéficient depuis quelques années du renfort très appréciable des techniques de marquage d'affinité (voir précédemment le paragraphe 1.3) et de caractérisation immunochimique du récepteur. Ces dernières doivent leur essor à la description récente par les équipes qui purifient le récepteur d'un grand nombre d'anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre cette protéine. Enfin, l'existence chez la souris en particulier, de souches cellulaires mutantes produisant un récepteur aux propriétés fonctionnelles anormales associées à des particularités structurales a également largement contribué à caractériser les différents domaines de la protéine. Nous allons maintenant décrire les différentes formes moléculaires présentées par le complexe glucocorticoïde-récepteur natif avant de montrer comment l'élucidation de la structure de son unité de liaison au stéroïde a procédé des apports respectifs des expériences de protéolyse partielle et de l'utilisation des anticorps.

a) Formes moléculaires du récepteur

On peut distinguer le récepteur non lié à l'hormone, le complexe stéroïde-récepteur non transformé et le complexe transformé.

- le récepteur non lié à l'hormone

C'est une forme de récepteur particulièrement instable, encore que la part de cette instabilité vraiment intrinsèque au récepteur et celle qui revient aux divers autres constituants cytosoliques (en particulier enzymatiques) soient mal délimitées (voir précédemment le paragraphe 2.1). Son fractionnement n'a fait l'objet que de quelques rares tentatives. Le récepteur des cellules d'hépatome de rat a ainsi été partiellement purifié par chromatographie d'exclusion de taille sur Biogel A 0,5 m ou sur Sepharose CL 4B, par chromatographie hydrophobe sur n-alkyl agarose et par précipitation par le sulfate de protamine (Bernard 1984, Govindan 1978, Santi 1979). Ces différentes méthodes purifient individuellement le récepteur d'un facteur 4 à 10 avec un rendement de 60 à 90 %. La combinaison de la précipitation par le sulfate de protamine et de la gel filtration a conduit à une purification de 53 fois avec un rendement de 48 % (Bernard 1984). Il s'agit d'une purification très modeste, la purification totale réclamant un enrichissement d'environ 10 000 fois. Dans tous ces travaux, le récepteur fractionné sous forme non liée à l'hormone est repéré après la séparation par incubation des fractions obtenues avec le stéroïde. On ne détecte ainsi que la forme active du récepteur. Le récepteur total a également été détecté après fractionnement en gel filtration à l'aide d'un anticorps polyclonal antirécepteur, capable de reconnaître le récepteur même sous forme inactive, ne liant plus l'hormone (Radojčić 1985). Le récepteur libre fractionné en présence de molybdate présente un rayon de Stokes de 8,0 nm identique à celui du récepteur lié à l'hormone. En l'absence de molybdate, le rayon de Stokes est de 5,7 nm comme pour le complexe stéroïde-récepteur, mais à la différence de ce dernier, le récepteur libre ne se lie pas à la DNA-cellulose, ce qui fait dire à l'auteur que le passage de la forme 8,0 nm à la forme 5,7 nm ne résume pas le phénomène de transformation qui ne se limiterait pas à une simple dissociation des sous-unités d'une forme oligomérique de haut poids moléculaire (voir précédemment chapitre I, paragraphe 3).

Dans toutes ces études, aucune différence physicochimique n'a été observée entre le récepteur non lié à l'hormone et la forme correspon-

dante du complexe hormone-récepteur. Une analyse fine utilisant des techniques à forte résolution comme par exemple la chromatographie sur support à haute performance mériterait d'être appliquée au récepteur des glucocorticoïdes, car dans le cas du récepteur des oestrogènes des modifications physicochimiques induites par la liaison du stéroïde ont pu être caractérisées (Dunaway 1985, Hansen 1985, Hutchens 1985).

- le récepteur non transformé

Nous avons déjà mentionné que le molybdate inhibe la transformation des complexes glucocorticoïde-récepteur et les stabilise sous une forme de haut poids moléculaire (voir précédemment, chapitre I paragraphe 3). Cet effet a été utilisé par de nombreux auteurs pour caractériser le récepteur cytosolique non transformé (Alexis 1983, Sablonnière 1986, Sherman 1982, 1983a et 1984, Vedeckis 1981 et 1983a,b, Weatherill 1984b) ou le purifier sous cette forme (Grandics 1984b, Lustenberger 1982 et 1985, Idziorek 1985b, Weisz 1984). Tous ces travaux donnent des résultats globalement concordants et similaires à ceux obtenus avec les récepteurs des autres hormones stéroïdes (revus par Vedeckis 1985b). Le molybdate stabilise les complexes hormone-récepteur sous une forme non transformée de haut poids moléculaire (environ 300 à 330 kD) de constante de sédimentation 8-10 S et de rayon de Stokes 7 à 8,5 nm. La transformation de ces complexes est accompagnée (ou précédée ?) d'une réduction de taille menant à une forme plus petite sédimentant entre 4 et 5 S, de rayon de Stokes 5 à 6 nm, soit un poids moléculaire d'environ 90 à 100 kD. Des complexes de taille intermédiaire et déjà transformés sont observés dans certaines conditions (Reker 1985, Sherman 1984, La Pointe 1986). Les figures 35 et 36 représentent deux modèles d'organisation moléculaire des complexes glucocorticoïde-récepteur récemment proposés par le groupe de Sherman (1983) et Vedeckis (1983b). La structure précise de la forme non transformée de haut poids moléculaire n'est pas connue, mais il s'agit très vraisemblablement d'un oligomère comportant plusieurs sous-unités dont la dissociation conduit à la forme transformée. La sous-unité liant le stéroïde a un poids moléculaire de 90 à 94 kD chez le rat, ainsi que le montre l'analyse

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

Figure 35 - Modèle moléculaire des récepteurs stéroïdiens d'après Sherman (1983a) et caractéristiques physicochimiques des différentes formes observées (RNP = ribonucléoprotéines)

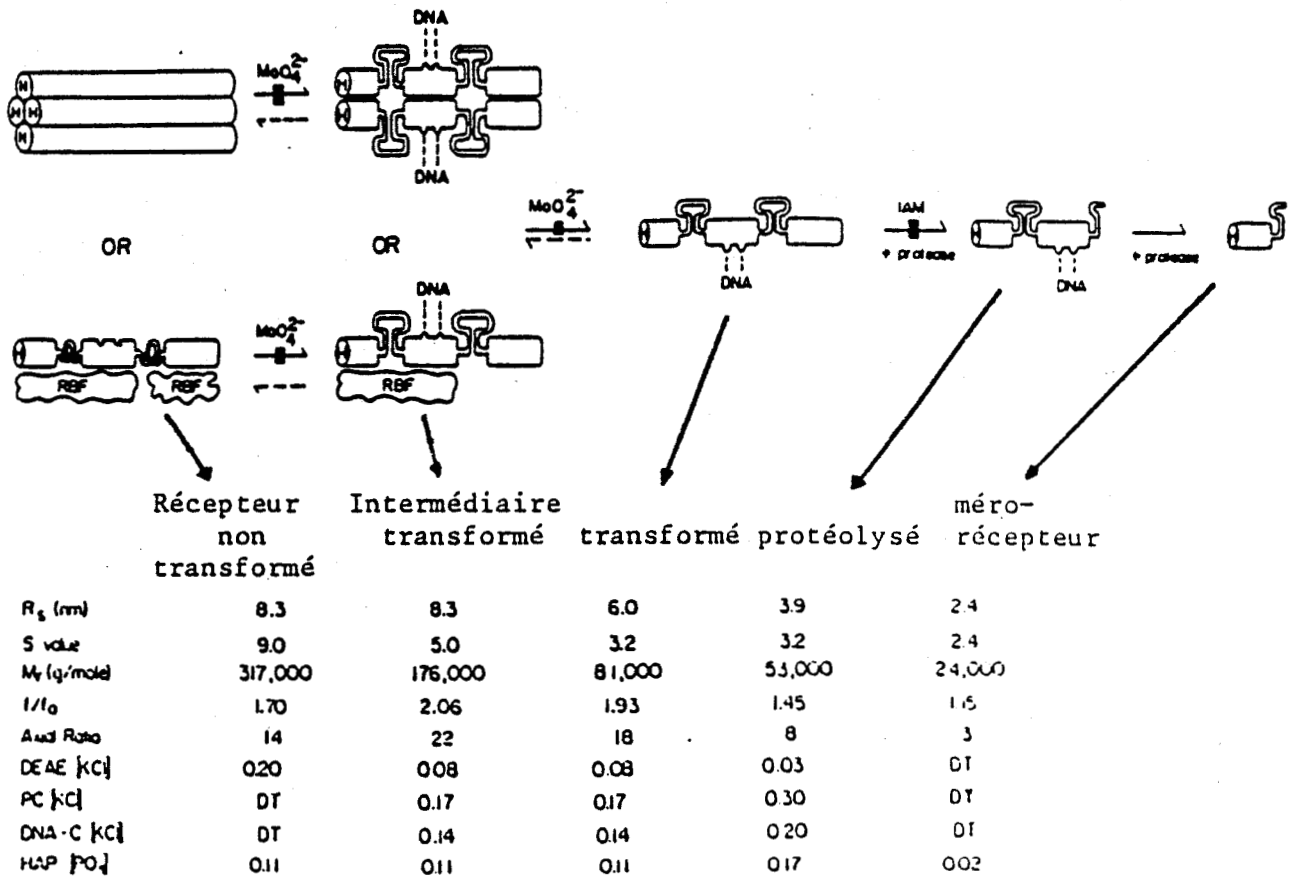


Figure 36 - Modèle moléculaire de Vedeckis (1983b) et tableau des propriétés physicochimiques des différentes formes de récepteur avec en particulier les concentrations en sel des pics d'élution après chromatographie sur divers supports (DT non retenu, RBF : receptor binding factors, IAM : iodoacétamide)

par électrophorèse en gel de polyacrylamide du récepteur purifié sous forme transformée ou non. Les modèles de complexes non transformés présentés sur les figures 35 et 36 ne tranchent pas entre les deux hypothèses d'une structure homopolymérique, dans laquelle le récepteur serait constitué de l'assemblage de sous-unités liantes identiques, et d'une structure hétéromérique, dans laquelle divers facteurs protéiques ou non seraient associés à une seule sous-unité liante.

La structure hétéroooligomérique apparaît actuellement comme la plus vraisemblable car elle vient d'être étayée par deux arguments expérimentaux indépendants et très convaincants. Tout d'abord Gehring (1985a) a montré que les complexes non transformés d'une souche cellulaire mutante nt^i de lymphome de souris S-49-1 avaient un poids moléculaire apparent d'environ 285 kD contre 325 kD pour les complexes de la souche sauvage (d'après leurs paramètres hydrodynamiques). Or, le marquage par photoaffinité des récepteurs des deux souches a montré que dans la variété sauvage, la protéine liant le stéroïde avait une masse moléculaire de 94 kD alors que chez le mutant la masse du polypeptide liant le stéroïde n'était que de 40 kD. La faible réduction de masse du complexe non transformé du mutant par rapport à la souche sauvage (environ 40 à 50 kD) n'est compatible qu'avec la présence d'un seul polypeptide liant le stéroïde dans ce complexe. D'autre part, Okret (1985) a observé que le complexe non transformé n'était capable de fixer qu'une seule molécule d'anticorps monoclonal antirécepteur transformé, ce qui confirme qu'il ne comporte probablement qu'une seule sous-unité liante. Si tel est bien le cas, se pose alors le problème de la nature des facteurs associés à la sous-unité liante dans le complexe non transformé stabilisé par le molybdate. Parmi les candidats potentiels on peut déjà proposer :

. des facteurs protéiques (les RBF, "Receptor Binding Factors" de la figure 36).

Au premier rang de ceux-ci figure la protéine de 90 kD non liante décrite chez la souris comme un constituant du récepteur non transformé purifié en présence de molybdate par le groupe de Pratt

(Housley 1985). Cette protéine, qui apparaît phosphorylée, est une protéine de choc thermique (Sanchez 1985). Elle est perdue par le complexe au cours de la transformation du complexe (Mendel 1986). Une protéine similaire, de 90 kD, est associée aux récepteurs des hormones stéroïdes, stabilisés par le molybdate chez le poulet (Joab 1984) où il s'agit également d'une protéine de choc thermique (Catelli 1985). Enfin, une protéine du même type existe également chez des espèces primitives comme les champignons aquatiques du type *Achlya ambisexualis*. Ces champignons sexués possèdent un récepteur pour un stéroïde particulier, l'anthéridiol, récepteur qui en présence de molybdate est associé à une protéine de 88 kD présentant une forte communauté antigénique avec les protéines 90 kD du poulet et des mammifères (Riehl 1985). Ces protéines à localisation cytoplasmique prédominante sont présentes en excès 100 fois molaire par rapport aux récepteurs chez le poulet et elles leur semblent associées dans la forme 8S, même en l'absence de molybdate (Joab 1984). Leur rôle exact reste encore très mal compris. Elles stabilisent peut-être le récepteur sous forme non transformée en interagissant avec son site de liaison à l'ADN. Elles participent sans doute aussi à d'autres fonctions cellulaires. Elles sont en particulier capables de s'associer dans le cytoplasme à la protéine du virus de sarcome de Rous, pp60^{src}, pour former un complexe au rôle inconnu dans les cellules infectées par ce virus (Shuh 1985).

A côté de la protéine 90 kD figurent peut-être d'autres facteurs comme les facteurs endogènes de haut poids moléculaire inhibiteurs de la transformation et/ou de la liaison à l'ADN, mais ces facteurs ne sont pas bien caractérisés et rien ne prouve qu'ils soient physiquement associés au récepteur (voir Chapitre I, paragraphe 3).

. une molécule d'ARN

De nombreux arguments indirects sont en faveur de la présence d'un ARN dans le complexe non transformé. Hutchens (1982) a obtenu la réversion de la transformation et le passage de la forme 4S à la forme 8S du récepteur par addition de facteurs cytosoliques

ressemblant à des ARN. D'autres auteurs ont montré que le traitement par les RNAase A et T₁ des complexes glucocorticoïdes 7-8 S les transformaient en complexes 3-4 S (Tymoczko 1983 et 1984) et que cet effet est inhibé par l'inhibiteur de RNAase placentaire humain et le molybdate mais pas par des antiprotéases. En présence de molybdate, la diminution de taille est modérée et n'est détectée qu'en chromatographie d'exclusion de taille à haute performance qui visualise une réduction du rayon de Stokes de 8 à 7 nm sans modification apparente de la constante de sédimentation (Sablonnière 1986b). Des effets similaires de réduction de taille sous l'effet de la ribonucléase A ont été observés sur des complexes hormone-récepteur nucléaires (Rossini 1983). D'autre part, les résultats du groupe de Vedeckis suggèrent qu'un ARN de faible poids moléculaire (36 kD) soit un constituant de la forme intermédiaire transformée 5,2 S (Kovacic-Milivojevic 1985). Enfin, l'association d'ARN au récepteur marqué de manière covalente par le mésylate de dexaméthasone a été récemment démontrée par des expériences de réticulation chimique du complexe non transformé (Economidis 1985). La caractérisation du type d'ARN impliqué dans la liaison au récepteur n'a pas encore été obtenue, tandis que son rôle physiologique demeure hypothétique.

. la participation de constituants lipidiques dans la structure du complexe 8 nm stabilisé par le molybdate a récemment été suggérée par Bell (1986) qui observe une réduction de taille à 6 nm en présence de molybdate après chromatographie sur Lipidex 1000 ou par traitement à la phospholipase C. Ces résultats demandent à être étayés de manière plus convaincante.

. enfin l'inhibiteur de transformation thermostable de faible poids moléculaire déjà évoqué au Chapitre I pourrait également faire partie du complexe non transformé qu'il stabiliserait sous cette forme.

Si le molybdate stabilise la forme oligomérique du récepteur non transformé, le phosphate de pyridoxal semble au contraire en favoriser la dissociation (Cidlowski 1979 et 1982, Kalimi 1980, O'Brien 1981) en complexes d'une taille égale ou même inférieure à celle de la forme monomérique transformée. Il en irait d'ailleurs de même pour le récepteur nucléaire extrait par le phosphate de pyridoxal qui apparaîtrait plus petit qu'après extraction conventionnelle par le chlorure de sodium 0,4 M (Cidlowski 1979). L'effet du phosphate de pyridoxal sur le récepteur cytosolique non transformé n'est pas empêché par le molybdate. La réduction par le borohydrure de sodium des complexes traités par le phosphate de pyridoxal rend cet effet irréversible (O'Brien 1981). Les complexes obtenus alors ont une tendance très réduite à former des agrégats de haut poids moléculaire en faible force ionique, même en présence de molybdate (Dolan 1980, Cidlowski 1982). Le mécanisme d'action du phosphate de pyridoxal passe probablement par la formation de bases de Schiff avec des fonctions aminées de résidus de lysine portés par le récepteur et indispensables au maintien de sa conformation et de ses interactions avec les autres constituants du complexe oligomérique non transformé.

- Le récepteur transformé

Il est maintenant bien démontré que le complexe glucocorticoïde-récepteur transformé a un poids moléculaire de 90 à 100 kD suivant les espèces animales. Ce poids moléculaire a été obtenu par le calcul, à partir des paramètres hydrodynamiques du complexe, et par l'analyse en électrophorèse en gradient de polyacrylamide SDS du récepteur purifié (Wrange 1979, Govindan 1980a) ou marqué de manière covalente par le mésylate de dexaméthasone (Simons 1981, Eisen 1981) ou par photoaffinité (Dellweg 1982, Nordeen 1981, Wrange 1984). Le poids moléculaire de 40 kD primitivement rapporté par le groupe de Beato (Westphal 1980 et 1981) résultait probablement d'une protéolyse partielle du complexe stéroïde-récepteur par des protéases endogènes (voir plus loin). Il en va sans doute de même du Binder IB, forme particulière du récepteur, observée essentiellement dans le rein de rat par le groupe de Litwack (Markovic 1980b, Mayer 1983a). Contrairement à ce que soutiennent ceux qui l'ont décrite, cette forme ne correspond pas à un récepteur distinct de la forme 90 kD habituelle, car Eisen (1986) vient de démontrer que le Binder IB est un produit

de protéolyse de ce polypeptide 90 kD. Le récepteur transformé de 90 kD est une protéine très asymétrique et acidophile, se liant à la DNA-cellulose et à la phosphocellulose (Figure 36).

Des valeurs très diverses ont été proposées pour son point isoélectrique, mais cela tient sans doute en grande partie aux conditions techniques de réalisation de l'isoélectrofocalisation (Ben Or 1983, Danzé 1986). En agarose, le point isoélectrique du récepteur transformé est d'environ 4,8-5 (Danzé 1986). En électrophorèse bidimensionnelle le récepteur marqué au mésylate de dexaméthasone se répartit en plusieurs isoformes, ce qui traduit une hétérogénéité de charge de la molécule, peut-être en rapport avec son degré de phosphorylation (Cidlowski 1984b, Smith 1985). Sa charge nette mesurée en utilisant un système de partage de phases, serait de - 10 contre - 50 pour le complexe non transformé (Andreasen 1982b). Bien que nettement moins acide que celui-ci, le récepteur transformé n'en est pas moins également une protéine globalement acide dont l'affinité pour les supports anioniques s'explique sans doute par l'exposition d'une région localisée regroupant un grand nombre de charges positives. L'opinion couramment admise est que le récepteur transformé serait un monomère constitué d'une seule chaîne polypeptidique 90 kD. Toutefois, ainsi que nous l'avons déjà signalé au Chapitre I paragraphe 3, le groupe de Gustafsson insiste actuellement sur l'existence d'une protéine 72K associée à ce monomère, protéine qui jouerait un rôle important dans la liaison à l'ADN du complexe transformé (Carlstedt-Duke 1985, Gustafsson 1986).

b) Protéolyse partielle du complexe hormone-récepteur :
domaines fonctionnels du récepteur

Le récepteur des glucocorticoïdes peut subir sous l'effet de protéases endogènes ou exogènes une protéolyse partielle qui conduit à des fragments de taille assez bien définie conservant la capacité de lier le stéroïde et l'ADN pour les plus grands d'entre eux ou simplement le stéroïde pour les plus petits. On peut en effet distinguer :

- la forme partiellement protéolysée décrite par de nombreux auteurs (Carlstedt-Duke 1977, 1979, 1982, Middlebrook 1977, Sherman 1978, 1983a, Wrangé 1978, Stevens 1979 et 1981a, Vedeckis 1983a, b) : de

rayon de Stokes 3 à 4 nm, elle sédimente entre 3,2 et 4,0 S. Elle est obtenue facilement par hydrolyse ménagée avec la chymotrypsine. Son poids moléculaire calculé d'après les paramètres hydrodynamiques est de 40 à 55 kD alors que l'analyse en gel de polyacrylamide-SDS de récepteurs marqués de manière covalente et soumis à une protéolyse partielle par la chymotrypsine révèle des fragments prépondérants de 42 kD (Dellweg 1982, Gehring 1983, Reichman 1984). Elle est un peu plus hydrophile que la forme transformée non protéolysée ainsi qu'en témoignent ses paramètres de rétention sur DEAE-cellulose, phosphocellulose et DNA-cellulose (figure 36). Son point isoélectrique et sa charge nette sont voisins de ceux du complexe non protéolysé (Vedeckis 1985b). Enfin elle est nettement moins asymétrique que les complexes transformés ou non, car son rapport axial n'est que de 3 à 8. La partie manquante du récepteur partiellement protéolysé est sans doute enlevée en un seul morceau, car c'est avec cette partie que réagissent la plupart des anticorps mono et polyclonaux dirigés contre le récepteur, et ces anticorps détectent encore du matériel immunogène dans les fragments ne liant pas l'hormone, libérés par l'hydrolyse enzymatique du récepteur purifié (Carlstedt-Duke 1982 et 1984). Il existe donc probablement un point de coupure préférentielle entre ces deux régions. Un point intéressant à noter est l'existence dans des souches mutantes de cellules de lymphomes de souris glucocorticoïde-résistantes d'un récepteur anormal, tronqué, d'une taille de 40 kD, présentant une affinité élevée pour le DNA sans avoir d'activité biologique. Ce récepteur anormal présente des propriétés physicochimiques très voisines de celles de la forme partiellement protéolysée du récepteur normal et n'est pas reconnu par les anticorps antirécepteurs (Dellweg 1982, Gehring 1983, Nordeen 1981, Okret 1983b, Stevens 1981a,b, Westphal 1984). Il est tentant de conclure que ces mutants ont perdu la partie "immunogène" du polypeptide normal, partie qui jouerait un rôle important dans la spécificité de l'interaction du complexe activé avec l'ADN et dans la modulation de ses effets sur la chromatine (voir Chapitre I).

- le mérorécepteur est le plus petit fragment du complexe hormone-récepteur non dénaturé qui conserve encore la capacité de lier le st ro ide. Il est obtenu sous l'effet de diverses protéases endogènes, dont probablement la calpaïne, protéase activée par le calcium (voir précédemment le paragraphe 2.1), et par des protéases exogènes (Sherman 1978, 1983, Carlstedt-Duke 1979, Holbrook 1983a, Stevens 1981a, Vedeckis 1983, Wrangle 1978 et 1984). Parmi celles-ci, la plus efficace est la trypsine. Le mérorécepteur est un complexe de 1,9 à 2,4 nm de rayon de Stokes et de constante de sédimentation 2,4 à 3,0 S, ce qui donne un poids moléculaire calculé de 19   27 kD. Son rapport de friction est voisin de 1 et son rapport axial compris entre 1 et 3, ce qui indique une structure globulaire. Il n'est pas retenu par la DEAE-cellulose ni surtout par la DNA-cellulose (Wrangle 1978, Carlstedt-Duke 1979, Holbrook 1983a, Stevens 1981a, Vedeckis 1983a), ce qui semble indiquer qu'il a perdu la région nécessaire à cette liaison, région encore présente dans la forme partiellement dégradée et donc probablement distincte mais contigüe de celle qui lie le st ro ide. Le seul support courant sur lequel il soit adsorbé est l'hydroxyapatite (Holbrook 1983a, Vedeckis 1983a). Le mérorécepteur est la forme probablement la plus basique du complexe d'après son point isoélectrique (Cidlowski 1984a, Danz  1986). Il comporte des r sids de cystéine et de lysine accessibles (Harrison 1983, Cidlowski 1984a) ainsi que nous l'avons discuté précédemment (voir paragraphe 2.1, b et c de ce chapitre).

A côté des r sids de lysine situés dans le mérorécepteur (Cidlowski 1984a), il en existerait au moins un autre au niveau du point de clivage par la trypsine situé entre le mérorécepteur et un petit fragment du site de liaison à l'ADN (Ninh 1982). En effet, le traitement du récepteur par le phosphate de pyridoxal, suivi de sa digestion partielle par la trypsine donne un mérorécepteur d'une taille un peu plus grande qu'en l'absence de traitement préalable par le phosphate de pyridoxal. Ce mérorécepteur particulier ne se lie pas à la DNA-cellulose, mais après traitement à l'hydroxylamine pour déplacer le phosphate de pyridoxal lié aux protéines, il peut être transformé de manière efficace et se lier

alors à la DNA-cellulose. L'effet protecteur contre la digestion par la trypsine du récepteur des glucocorticoïdes reste controversé : en effet, si la protection n'est que très partielle pour Ninh, elle est beaucoup plus forte pour Cidlowski (1980).

Enfin, des formes apparentées au récepteur ont été mises en évidence par hydrolyse enzymatique du récepteur marqué de manière covalente par le mésylate de dexaméthasone ou l'acétonide de triamcinolone (Gehring 1983, Reichman 1984). Des fragments de 27 à 30,5 kD sont obtenus par hydrolyse ménagée par la trypsine ou par l'endoprotéinase Lys-C en conditions non dénaturantes. D'une manière surprenante, des fragments de taille voisine 26 à 32 kD sont également obtenus en conditions dénaturantes ainsi qu'avec des enzymes de spécificités différentes comme la chymotrypsine ou la protéase V8 de Staphylocoque doré (Reichman 1984). Ceci indique la présence probable d'un point "chaud" de la séquence primaire en aminoacides regroupant des motifs de coupure pour plusieurs protéases. La digestion en conditions dénaturantes produit également des peptides plus petits de masse minimale 14 à 16 kD selon Reichman (1984), voire même 8 kD pour Westphal (1980). La structure covalente d'aucun de ces peptides du site de liaison du stéroïde n'a été publiée pour le moment.

Tous ces résultats ont conduit les groupes de Gustafsson (Carlstedt-Duke 1982, Gustafsson 1986) et de Vedeckis (1985a, b) à proposer des modèles très voisins d'organisation en domaines du polypeptide de 90-98 kD monomère du récepteur des glucocorticoïdes (figure 37). Vedeckis (1985b) a vu dans les propriétés structurales et fonctionnelles des divers mutants de récepteur observés dans les lymphomes de souris, des arguments en faveur de la disposition séquentielle suivante à partir de l'extrémité N-terminale : site de liaison du stéroïde, site de liaison à l'ADN, puis site modulateur. Nous verrons au paragraphe 3 que l'étude du cDNA du récepteur n'a pas confirmé cet enchaînement hypothétique.

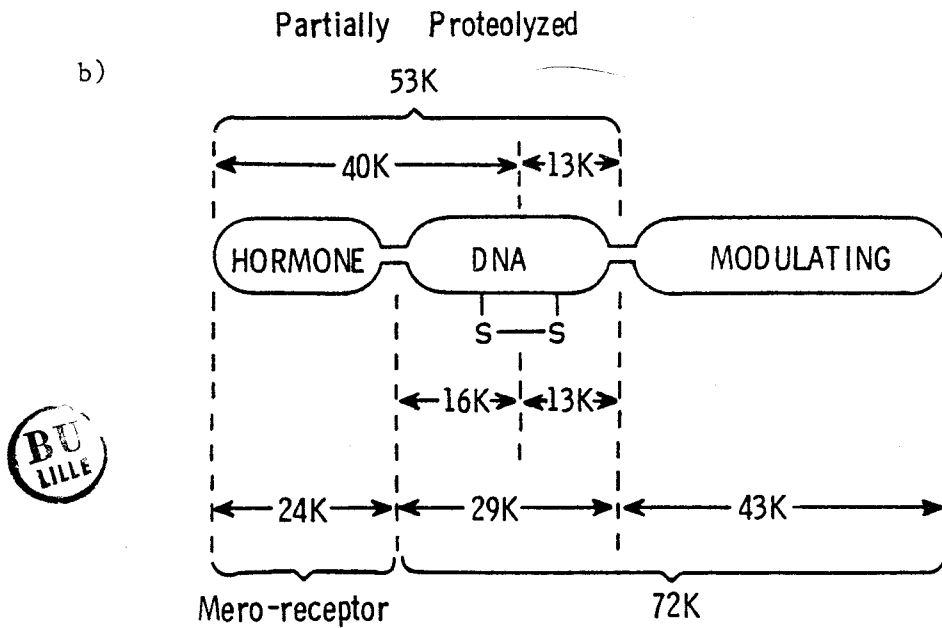
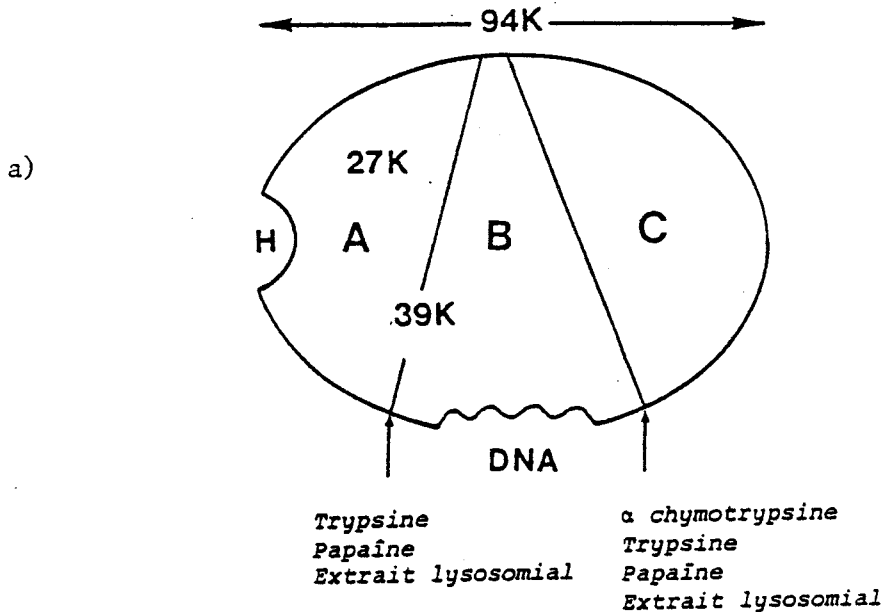


Figure 37 - Organisation en domaines fonctionnels du monomère de récepteur des glucocorticoïdes selon a) Gustafsson (1986), b) Vedeckis (1985a,b). On distingue le domaine de liaison au stéroïde A, le domaine de liaison à l'ADN B, et le domaine immunogène modulateur C.

c) L'utilisation des anticorps dans l'étude des domaines du complexe glucocorticoïde-récepteur.

- Un grand nombre d'anticorps polyclonaux et monoclonaux ont été développés ces dernières années contre le récepteur des glucocorticoïdes du rat essentiellement (Govindan 1979 ; Eisen 1980 ; Okret 1981, 1983a, 1984 ; Carlstedt-Duke 1982 ; Westphal 1982 ; Grandics 1982 ; Gametchu 1984) mais aussi contre le récepteur humain (Harmon 1984). Ces anticorps ont été utilisés comme sondes pour caractériser les domaines fonctionnels du récepteur : leur interaction avec le récepteur partiellement protéolysé et avec le méréorécepteur a été étudiée par plusieurs auteurs. Il apparaît qu'aucun anticorps, à l'exception d'un seul, ne reconnaît le méréorécepteur, ni la forme partiellement protéolysée comportant le site de liaison à l'ADN. L'anticorps qui fait exception est le monoclonal préparé par Gametchu (1984) dont Eisen (1985) vient de montrer qu'il réagit avec la forme 97 kD du récepteur du foie de rat et son produit de digestion enzymatique partielle de 45 kD. Ce fragment se lie à l'ADN. Sa digestion par la trypsine produit deux fragments de 27 et 31 kD liant le stéroïde et pas l'anticorps, plus un fragment immunoréactif de 16 kD. Ce dernier se lie à l'ADN et fait donc probablement partie du site de liaison à l'ADN du récepteur. La fixation préalable de l'anticorps au complexe hormone-récepteur transformé n'empêche pas sa liaison à l'ADN, ce qui laisse penser que la région de 16 kD comprend deux parties, dont l'une lie l'anticorps et l'autre l'ADN. L'anticorps de Gametchu a également joué un rôle important dans la démonstration récente de l'identité du Binder IB, forme particulière du récepteur trouvée dans certains tissus, avec un produit de dégradation protéolytique du récepteur normal (Eisen 1986). De même, les autres anticorps antirécepteur spécifiques du domaine modulateur ont joué un rôle capital dans la caractérisation des mutants du récepteur du type nt⁻ et ntⁱ, ainsi que nous l'avons déjà signalé.

On le voit, les anticorps antirécepteurs ont joué et continueront de jouer un rôle important dans l'étude de la structure intime du récepteur. Il faut souhaiter que la collection d'anticorps déjà décrits s'enrichisse de nouveaux représentants, de préférence monoclonaux et dirigés contre la région de liaison à l'ADN et au stéroïde. Ce dernier but sera sans doute le plus difficile à atteindre, car le site de liaison du stéroïde des divers récepteurs, probablement bien conservé à travers les espèces, apparaît très peu immunogène. C'est ici que l'approche antiidiotypique, que nous avons présentée au paragraphe 1.4 de ce chapitre, peut apporter une contribution de poids. Le travail dans ce domaine en est à ses tout premiers débuts et un seul anticorps antiidiotypique réagissant avec le récepteur des glucocorticoïdes a été décrit à ce jour (Cayanis 1986). Cet anticorps monoclonal du type auto antiidiotypique, a été obtenu par immunisation d'une souris avec un dérivé de la triamcinolone. Il semble réagir avec le récepteur des glucocorticoïdes du foie de rat, qu'il peut retenir partiellement sur un immunoabsorbant, déplacer légèrement en gradient de sucrose et reconnaître en western-blot. Mais il n'empêche pas la liaison de l'acétonide de triamcinolone au récepteur, ni d'ailleurs de dérivés de la triamcinolone obtenus par couplage à des peptides divers. L'épitope reconnu par cet anticorps apparaît donc situé au voisinage du site de liaison du stéroïde plutôt que dans le site lui-même, comme on aurait pu l'espérer.

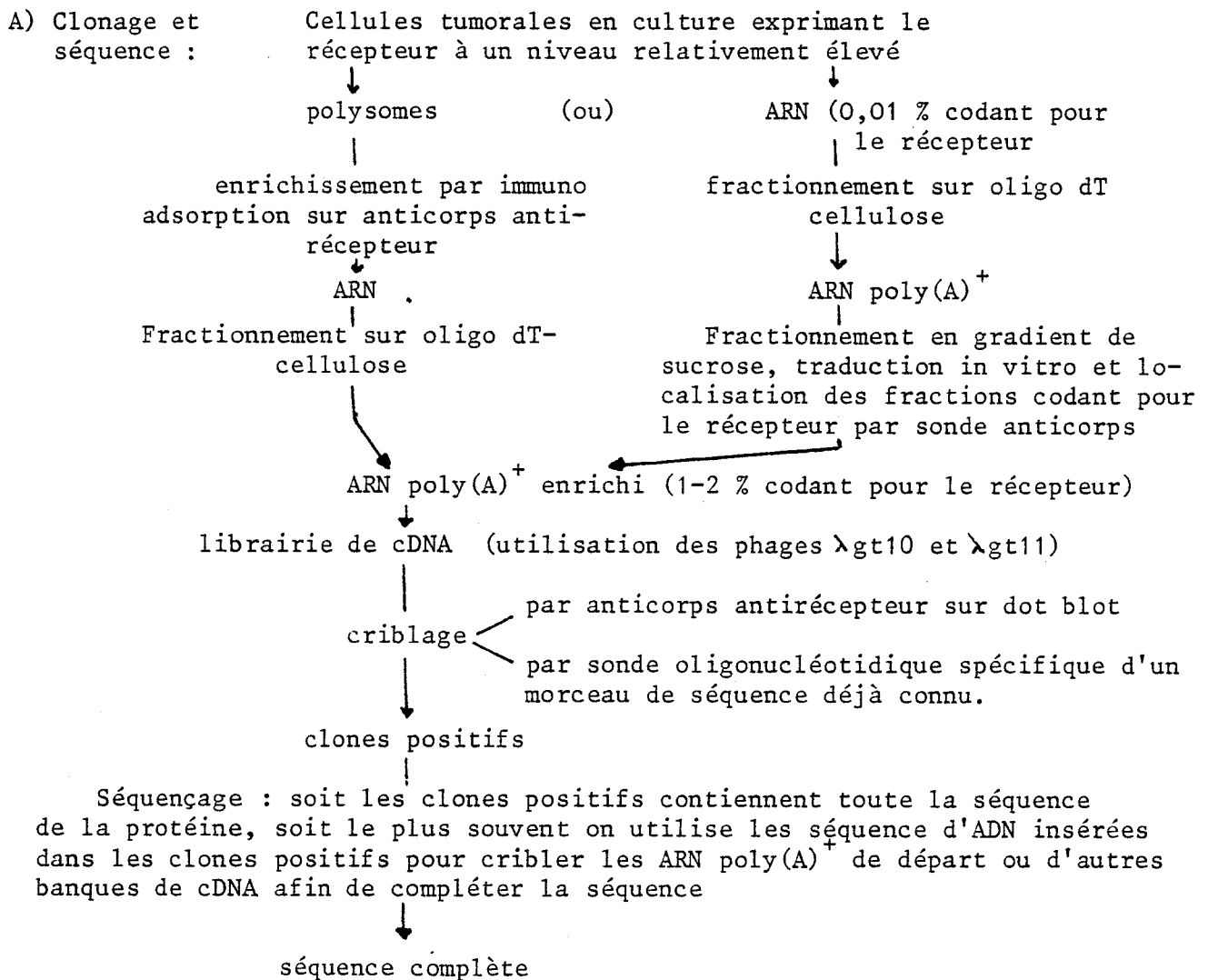
3 - ETUDE DU GENE DU RECEPTEUR : APPROCHE PAR L'ADN

Les progrès techniques de la biologie moléculaire qui permettent maintenant de cloner des cDNA à partir d'ARN messagers transcrits en faible quantité et l'utilisation des sondes anticorps antirécepteurs produites par les équipes spécialisées dans la purification de ces protéines ont conduit ces deux dernières années à des résultats spectaculaires : les séquences complètes des cDNA codant pour les récepteurs humains des glucocorticoïdes et des oestrogènes, et du récepteur des oestrogènes du poulet sont maintenant connues. Leur comparaison a fourni d'emblée des résultats tout à fait passionnants, dont la constatation inattendue d'une forte homologie de séquence avec l'oncogène v-Erb A n'est pas le moindre. Le tableau VII résume la stratégie employée pour le clonage et l'étude du cDNA des récepteurs.

3.1 Clonage du cDNA du récepteur des glucocorticoïdes

Plusieurs groupes, associant le plus souvent des équipes complémentaires spécialisées, les unes dans la biologie moléculaire des gènes et les autres dans l'étude des récepteurs des glucocorticoïdes, se sont attaqués à ce difficile travail. Ils ont utilisé des cellules tumorales d'origine murine et humaine, choisies pour leur contenu élevé en récepteur et donc en ARN messager codant pour cette protéine.

Le groupe de Yamamoto et Gustafsson (Miesfeld 1984) a identifié un cDNA de 2,6 kilobases faisant partie du gène du récepteur dans des cellules d'hépatome de rat. Un anticorps monoclonal anti-récepteur a servi à préparer des polysomes enrichis en ARN-messager codant pour le récepteur. L'ARN messager enrichi (2 % d'homogénéité) a ensuite permis de préparer une librairie de cDNA qui a été criblée. Le cDNA de 2,6 kb a été employé pour étudier l'ADN génomique des cellules de rat et de souris : le récepteur y est codé par un seul gène donnant un produit de transcription de 6 kilobases. La séquence



B) Utilisation du cDNA cloné :

- . insertion dans un vecteur d'expression : contrôle du caractère fonctionnel de la protéine exprimée
- . utilisation de cDNA présentant des délétions ou modifiés par mutagenèse dirigée, localisation des domaines fonctionnels de la protéine et de ses acides aminés essentiels.
- . localisation chromosomique du gène du récepteur, isolement éventuel de ce gène.

TABLEAU VII- Stratégie employée pour le clonage et l'étude des cDNA codant pour les récepteurs des hormones stéroïdes.

complète du cDNA correspondant vient d'être publiée (Miesfeld 1986). Le gène du récepteur présenterait des anomalies qualitatives et quantitatives dans des lignées de cellules mutantes exprimant des déficits spécifiques de la fonction du récepteur (Miesfeld 1984, Bishop 1986).

Le récepteur humain a été cloné dans les cellules tumorales du sein MCF7 par le groupe de Chambon (Govindan 1985) à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre le récepteur du rat. A partir d'une librairie de DNA complémentaire de l'ARN poly(A)+ de ces cellules, construite dans des phages λ gt 11, plusieurs clones comportant des insertions courtes exprimant des épitopes reconnus par l'anticorps ont été isolés. Les sondes cDNA obtenues ont permis d'identifier par Northern blot un ARN poly(A)+ majeur de 7 kb dans les cellules MCF7. La séquence du cDNA n'est pas encore publiée.

Le récepteur humain a également été cloné par le groupe d'Evans dans des cellules lymphoïdes IM9 et des fibroblastes (Weinberger 1985a, Hollenberg 1985). Ce groupe a eu recours pour le criblage à un anticorps antirécepteur polyclonal et non spécifique, ne réagissant qu'avec la protéine dénaturée, c'est-à-dire un outil a priori bien peu satisfaisant pour mener à bien ce genre de tâche. Weinberger est pourtant parvenu à un criblage satisfaisant en augmentant la spécificité de son immunosérum par sélection des épitopes reconnus par celui-ci. Une librairie de cDNA des cellules IM9 préparée dans des phages λ gt 11 a été criblée par dot-blot sur nitrocellulose avec l'immunosérum de départ. Les spots positifs ont été élués et les gamma-globulines qu'ils avaient fixées ont été utilisées pour révéler un Western blot du cytosol des cellules IM9 : certains spots avaient libéré des anticorps reconnaissant bien les bandes correspondant au récepteur (94 kD et 79 kD). Les protéines produites par les clones correspondant à ces spots ont été utilisées pour préparer un immunoadsorbant qui a permis de purifier l'immunosérum de départ. Les anticorps obtenus ne réagissaient plus qu'avec le récepteur. Ceci prouvait que ce clone contenait bien des séquences d'ADN inséré codant pour le récepteur. Ces séquences couvrant 1,4 kb ont été utilisées pour cloner une

deuxième librairie de cDNA à partir de fibroblastes humains avec le vecteur de Okayama-Berg : 12 clones positifs couvrant une longueur de 4,0 kb ont été sélectionnés, ce qui était encore insuffisant pour couvrir tout le gène du récepteur. Un troisième criblage d'une deuxième banque de cDNA de fibroblastes humains (2×10^6 clones) a permis enfin d'obtenir un clone positif qui complétait la séquence du récepteur. Les sondes de cDNA fournies par ces clones ont confirmé la localisation du gène du récepteur humain sur le chromosome 5 et identifié une séquence apparentée sur le chromosome 16.

3.2 - Séquence du cDNA du récepteur des glucocorticoïdes

a) La séquence complète codant pour le récepteur humain (Hollenberg 1985) est représentée sur la figure 38 . Elle comporte 4800 nucléotides dont 2331 codant pour la protéine, soit 777 aminoacides. Le point de départ de la transcription n'est pas établi avec certitude. Un point très important à signaler est l'existence d'une variante de cette séquence produite par certains clones : cette variante, notée β comporte 742 aminoacides et ne diffère de la forme représentée sur la figure 38 que par son extrémité C-terminale à partir du résidu 728 (figure 39). Ces deux formes de cDNA α et β après insertion dans un vecteur de transcription, conduisent à l'expression d'ARN messagers dont les produits de transcription in vitro ont une masse moléculaire de 94K, similaire à celle du récepteur des cellules IM 9. De plus, la protéine correspondant au cDNA α est capable de lier l'acétonide de triamcinolone de manière spécifique in vitro alors que celle qui correspond au cDNA β en est incapable. Une différence frappante entre les deux extrémités C-terminales des formes α et β est la présence dans la première d'un résidu de cystéine entouré d'aminoacides hydrophobes, alors que la seconde comporte une chaîne polaire très courte, sans aucune cystéine. La tentation est grande de voir dans cette cystéine le résidu essentiel à la liaison du stéroïde et d'attribuer à la région C-terminale de la protéine un rôle capital dans cette fonction du récepteur.

La séquence complète codant pour le récepteur du rat (Miesfeld 1986) apparaît sur la figure 38bis. Elle code pour une protéine de 795 aminoacides présentant une très grande homologie de séquence avec le récepteur humain. L'expression de la région codante a été obtenue in vitro, après transfection, et conduit à l'obtention d'un récepteur tout à fait fonctionnel.

b) Domaines à l'intérieur de la structure du récepteur

- Weinberger (1985b) a proposé pour le récepteur des glucocorticoïdes l'organisation en domaine représentée sur la figure 40 :

. la partie N-terminale de la protéine porterait la région immunogène. En effet, il a pu localiser le site de liaison de son anticorps entre les acides aminés 145 et 278 grâce à l'étude immunochimique des produits d'expression des clones comportant divers fragments du cDNA codant pour le récepteur. De plus, cette partie comporte une région courte d'homologie partielle avec les protéines homéotiques codées par les gènes antennapedia et fushi tarazi de la drosophile.

. la moitié C-terminale présente une homologie de séquence élevée avec le produit de transcription de l'oncogène v-Erb A (Debuire 1984). L'homologie globale est de 22 % entre les 387 acides aminés C-terminaux du récepteur et les 395 acides aminés de la protéine codée par v-erb A. Cette homologie atteint 40 % entre les résidus 421 et 481 du récepteur qui délimitent une région particulière riche en cystéine, lysine et arginine. Neuf des dix cystéines présentes dans cette région du récepteur sont conservées dans la protéine de v-erb A. Cette séquence serait impliquée dans la liaison du récepteur à l'ADN.

. l'extrémité C-terminale du récepteur est essentielle à la liaison du stéroïde (voir plus haut).

- La découverte inattendue d'une homologie de séquence entre un récepteur des hormones stéroïdes et la protéine p75-gag-erb-A a été confirmée de manière spectaculaire avec la publication par le groupe de Chambon des séquences d'ADN complémentaire codant pour le récepteur des oestrogènes humain (Walter 1985, Green 1986) et de poulet (Krust 1986). A ces résultats viennent s'ajouter ceux tout récents concernant la séquence de l'ADN complémentaire du récepteur de la progestérone de l'oviducte de poule (Jeltsch 1986, Conneely 1986). Cette homologie est extrêmement élevée dans la région riche en cystéine, lysine et arginine qui existe également sur les récepteurs des oestrogènes et de la progestérone. La figure 41 donne le détail de cette région (Conneely 1986), tandis que la figure 42 montre l'homologie entre les séquences de trois des récepteurs des hormones stéroïdes décrits à ce jour et la protéine codée par v-erb A. Krust(1986),

```

TTTTTAGAAAAAATATATTTCCCTCTGCTCCTTCTGCGTTCACAAGCTAAGTTGTTTATCTCGGCTGGGGGGAACTGCGGACGGTGGGGGGAGCGGGCTCTCTGCCAGACT 120
              10                20                30
MetAspSerLysGluSerLeuThrProGlyArgGluGluAsnProSerSerValLeuAlaGlnGluArgGlyAspValMetAspPheTyrLysThrLeuArgGlyGly
TGAATATTCAGTATGACTCCAAAGAAATCATTAACCTCTGGTAGAAAGAAAACCCAGCAGTGCTGCTGCTCAGGAGAGGGGAGATGCTGATGGACTTCTATAAAACCTTAAGAGGAGGA 240
              40                50                60                70
AlaThrValLysValSerAlaSerSerProSerLeuAlaValAlaSerGlnSerAspSerLysGlnArgArgLeuLeuValAspPheProLysGlySerValSerAsnAlaGlnGlnPro
GCTACTGTAGGGTTTCTGCGTCTTACCCTCAGTGGCTGCTTCTCAATCAGACTCCAAGCAGCGAAGACTTTGTGTGATTTCCAAAAGGCTCAGTAAGCAATGCCAGCAGCCA 360
              80                90                100                110
AspLeuSerLysAlaValSerLeuSerMetGlyLeuTyrMetGlyGluThrGluThrLysValMetGlyAsnAspLeuGlyPheProGlnGlnGlyGlnIleSerLeuSerSerGlyGlu
GATCTGTCCAAAGCAGTTTCACTCTCAATGGGACTGTATATGGGAGACAGAAAACAAAGTGATGGGAAATGACCTGGGATCCACAGCAGGGCCAAAATCAGCTTTCTCTGGGGGAA 480
              120                130                140                150
ThrAspLeuLysLeuGluGluSerIleAlaAsnLeuAsnArgSerThrSerValProGluAsnProLysSerSerAlaSerThrAlaValSerAlaAlaProThrGluLysGluPhe
ACAGACTTAAAGCTTTGGGAAGAAAGCATTTGCAAACCTCAATAGTCCAGCAGTGTTCCAGAGAACCCAAAGATTCCAGATCCACTGCTGTGCTGTGCCCCACAGAGAGGAGTTT 600
              160                170                180                190
ProLysThrHisSerAspValSerSerGluGlnGlnHisLeuLysGlyGlnThrGlyThrAsnGlyGlyAsnValLysLeuTyrThrThrAspGlnSerThrPheAspIleLeuGlnAsp
CCAAAACCTCAGCTGATGTATCTTCAAGAACAGCAACATTGAGGGCCAGACTGGCACCAACGGTGGCAATGTAATGTTATACCAGACCAAGACCTTTGACATTTGACAGGAT 720
              200                210                220                230
LeuGluPheSerSerGlySerProGlyLysGluThrAsnGluSerProTrpArgSerAspLeuLeuIleAspGluAsnCysLeuLeuSerProLeuAlaGlyGluAspAspSerPheLeu
TTGGAGTTTCTCTGGTCCCCAGTAAAGAGAGCAATGAGATCCTTGGAGATCAGACCTGTGATAGATAAAAAGTTTGCTTCTCTCTGGGGAGAGAGGATTCATTCTCT 840
              240                250                260                270
LeuGluGlyAsnSerAsnGluAspCysLysProLeuIleLeuProAspThrLysProLysIleLysAspAsnGlyAspLeuValLeuSerSerProSerAsnValThrLeuProGlnVal
TTGGAGGAAAGCTGAAATGAGGACTGCAAGCTCTCATTTACCAGCACATAAACCCAAAATTAAGATAATGGAGATCTGGTTTTGTCAGCCCCAGTAATGTAACACTGCCCAAGTG 960
              280                290                300                310
LysThrGluLysGluAspPheIleGluLeuCysThrProGlyValIleLysGlnGluLysLeuGlyThrValTyrCysGlnAlaSerPheProGlyAlaAsnIleIleGlyAsnLysMet
AAAACAGAAAAGAAATTTTCATCGAATCTGCACCCCTGGGTAATTAAGCAAGAAAACCTGGCCACAGTTTACTGTACGGCAAGCTTCTCTGGAGCAAATAATATGGTAATAAATG 1080
              320                330                340                350
SerAlaIleSerValHisGlyValSerThrSerGlyGlyGlnMetTyrHisTyrAspMetAsnThrAlaSerLeuSerGlnGlnGlnAspGlnLysProIlePheAsnValIleProPro
TCTGCCATTTCTGTTTCAATGGTGTGAGTACCTCTGGAGGACAGATGTACCCTATGACATGAATACAGCATCCCTTCTCACAGCAGGATCAGAGGCTATTTTTAATGTCATTCACCA 1200
              360                370                380                390
IleProValGlySerGluAsnTrpAsnArgCysGlnLysSerGlyAspAsnLeuThrSerLeuGlyThrLeuAsnPheProGlyArgThrValPheSerAsnGlyTyrSerSerPro
ATTCCTGTGGTTCCGAAAATGGAAATAGTGCCAAAGGATCTGGAGATGACAACTTCTCTGGGACTCTGAACCTCCCTGGTGCAGAACGTTTTTCTAATGGCTATTCAGCCCC 1320
              400                410                420                430
SerMetArgProAspValSerSerProProSerSerSerThrAlaThrThrGlyProProProLysLeuCysLeuValCysSerAspGluAlaSerGlyCysHisTyrGlyValLeu
AGCATGAGACCGATGTAAGCTCTCTCCATCCAGCTCTCTCAACAGCAACAACAGGACCACCTCCAAAACCTCTGGCTGGTGTGCTGTGATGAGCTTCAGGATGTCATTATGGAGTCTTA 1440
              440                450                460                470
ThrCysGlySerCysLysValPhePheLysArgAlaValGluGlyGlnHisAsnTyrLeuCysAlaGlyArgAsnAspCysIleIleAspLysIleArgArgLysAsnCysProAlaCys
ACTGTGAGAGCTGTAAAGTTTTCTTCAAAGAGCAGTGAAGGACAGCACAATTACCTATGCTGGAGGAAGATGTGCATCATCGATAAAAATCGAAGAAAACACTGCCAGCACTGC 1560
              480                490                500                510
ArgTyrArgLysCysLeuGlnAlaGlyMetAsnLeuGluAlaArgLysThrLysLysLysIleLysGlyIleGlnGlnAlaThrThrGlyValSerGlnGluThrSerGluAsnProGly
CGCTATGCAAAATGCTTCTCAGGCTGGAAATGAACTGGAGGCTGAAAAACAAGAAAAAATAAAGGAATTCAGCAGGGCCACTCAGGAGTCTCAAGAACAACCTCTGAAAATCTCTGCT 1680
              520                530                540                550
AsnLysThrIleValProAlaThrLeuProGlnLeuThrProThrLeuValSerLeuLeuGluValIleGluProGluValLeuTyrAlaGlyTyrAspSerSerValProAspSerThr
AACAAAACAATAGTCTCTGCAAGTACCACAACCTCACCCTACCTCTGGTGTCACGTGTTGGAGTTATGAACCTGAACTGTTATATGAGCAGATATGATAGCTCTGTCCAGACTCAACT 1800
              560                570                580                590
TrpArgIleMetThrThrLeuAsnMetLeuGlyGlyArgGlnValIleAlaAlaValLysTrpAlaLysAlaIleProGlyPheArgAsnLeuHisLeuAspAspGlnMetThrLeuLeu
TGGAGATCATGACTAGCTCAACATGTTAGAGGGGGCGCAAGTATGGCAGCAGTGAATGGGCAAAAGGCAATACCAGGTTTCAGCAACTACACCTGGATGCCAAAATGCCCTACTG 1920
              600                610                620                630
GlnTyrSerTrpMetPheLeuMetAlaPheAlaLeuGlyTrpArgSerTyrArgGlnSerSerAlaAsnLeuLeuCysPheAlaProAspLeuIleIleAsnGluGlnArgMetThrLeu
CAGTACTCTGGATGTTTTCTATGCGATTGCTCTGGGGTGGAGATCATATAGACAATCAAGTGCAAACTCTGCTGTTTTGCTCCTGATCTGATTATTAATGAGCAGAGAAAGACTCTA 2040
              640                650                660                670
ProCysMetTyrAspGlnCysLysHisMetLeuTyrValSerSerGluLeuHisArgLeuGlnValSerTyrGluGluTyrLeuCysMetLysThrLeuLeuLeuSerSerValPro
CCCTGCATGTAGCAACATGTAACACATGCTGTATGTTTCTCTGAGTTACACAGGCTTCAGGATCTTTAGAGAGTATCTCTGTATGAAAACCTTACTGCTTCTCTCAGTTCT 2160
              680                690                700                710
LysAspGlyLeuLysSerGlnGluLeuPheAspGluIleArgMetThrTyrIleLysGluLeuGlyLysAlaIleValLysArgGluGlyAsnSerSerGlnAsnTrpGlnArgPheTyr
AAGGAGGGTCTGAAAGAGCCAGAGCTATTTGATGAAATGAAATGACCTACATCAAGAGCTAGGAAAAGCCATTGCAAGAGGGAAGGAAACTCCAGCAGAACTGGCAGCGGTTTTAT 2280
              720                730                740                750
GlnLeuThrLysLeuLeuAspSerMetHisGluValValGluAsnLeuLeuLysTyrCysPheGlnThrPheLeuAspLysThrMetSerIleGluPheProGluMetLeuAlaGluIle
CAACTGACAAAACCTCTGGATTTATGTCATGAAAGTGGTTGAAAATCTCCTTAACTATGCTTCAAAACATTTTGATAAGACCATGATATTGAATCCCGGATGTTAGCTGAAATC 2400
              760                770
IleThrAsnGlnIleProLysTyrSerAsnGlyAsnIleLysLysLeuPheHisGlnLysSTOP
ATCCAAATCAGATACCAAAAATATTCAAATGGAAATATCAAAAACCTCTGTTTCAACAAAAGTACTGCCCTTAATAAGAAATGGTTGCTTAAAGAAAGTGCATAATTAATAGCTTTTATTG 2520

```



Figure 38 - ADN complémentaire et séquence protéique du récepteur humain des glucocorticoïdes d'après Hollenberg (1985)

GACGGTCGGGGGGGGGGGACCTCCGGGGCAGGAGTCCCCCCCCGGGCTCACATTAATATTGGCA 68

1 10 20

```

met asp ser lys glu ser leu ala pro pfo gly arg asp glu val pro gly ser leu leu gly gln gly arg gly ser val met asp phe 10
ATG GAC TCC AAA GAA TCC TTA GCT CCC CCT GGT AGA GAC GAA GTC CCT GGC AGT TTG CTT GGC CAA GGG AGG GGG AGC GTA ATG GAC TTT 20
tyr lys ser leu arg gly gly ala thr val lys val ser ala ser pro ser val ala ala ala ser gln ala asp ser lys gln gln 60
TAT AAA AGC CTG AGG GGA GCA GCT ACA GTC AAG GTC TCT GCA TCT TCG CCC TCA GTG GCT GCT GCT TCT GCA GCA GAT TCC AAG CAG CAG
arg ile leu leu asp phe ser lys gly ser thr ser asn val gln gln arg gln gln gln gln gln gln gln gln gln gln gln gln 90
AGG ATT CTC CTT GAT TTC TCG AAA GGC TCC ACA AGC AAT GTG CAG CAG CGA CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG
gln gln gln gln gln gln pro gly leu ser lys ala val ser leu ser met gly leu tyr met gly glu thr glu thr lys val met gly 120
CAG CAG CAG CAG CAG CAG CCA GGC TTA TCC AAA GCC GTT TCA CTG TCC ATG GGG CTG TAT ATG GGA GAG ACA GAA ACA AAA GTG ATG GGG
asn asp leu gly tyr pro gln gln gly gln leu gly leu ser ser gly glu thr asp phe arg leu leu glu ser ile ala asn leu 150
AAT GAC TTG GGC TAC CCA CAG CAG GGC CAA CTT GGC CTT TCC TCT GGG GAA ACA GAC TTT CGG CTT CTG GAA GAA AGC ATT GCA AAC CTC
asn arg ser thr ser val pro glu asn pro lys ser ser thr ser ala thr gly cys ala thr pro thr glu lys glu phe pro lys thr 180
AAT AGG TCG ACC AGC GTT CCA GAG AAC CCC AAG AGT TCA AGC TCT GCA ACT GGG TGT GCT ACC CCG ACA GAG AAG GAG TTT CCC AAA CTT
his ser asp ala ser ser glu gln asn arg lys ser thr thr gly thr asn gly gly ser val lys pro thr asp gln ser 210
CAC TCG GAT GCA TCT TCA GAA CAG CAA AAT CGA AAA AGC CAG ACC GGC ACC AAC GGA GGC AGT GTG AAA TTG TAT CCC ACA GAC CAA AGC
thr phe asp leu leu lys asp leu glu phe ser ala gly pro ser lys asp thr asn gln ser pro trp arg ser asp leu leu ile 240
ACC TTT GAC CTC TTG AAG GAT TTG GAG TTT TCC GCT GGT TCC CCA AGT AAA GAC ACA AAC GAG AGT CCC TGG AGA TCA GAT CTG TTG ATA
asp gln asn leu leu ser pro leu ala gly glu asp asp pro phe leu leu glu gly asn thr asn glu asp cys lys pro leu ile leu 270
GAT GAA AAC TTG CTT TCT CCT TFG GCG GGA GAA GAT GAT CCA TTC CTT CTC GAA GGG AAC ACG AAT GAG GAT TGT AAG CCT CTT ATT TTA
pro asp thr lys pro lys ile lys asp thr gly asp thr ile leu ser ser pro ser val ala leu pro val lys thr val lys glu lys 300
CCG GAC ACT AAA CCT AAA ATT AAG GAT ACT GGA GAT ACA ATC TTA TCA AGT CCC AGC AGT GTG CCA CTA CCC CAA GTG AAA ACA GAA AAA
asp phe ile glu leu leu tyr pro gly val ile lys gln gln lys leu pro val tyr cys gln ala ser phe ser thr asp gln thr asn 330
GAT GAT TTC ATT GAA CTT TGC ACC CCC GGG GTA ATT AAG CAA GAG AAA CTG GGC CCA GTT TAT TGT CAG GCA AGC TTT TCT GGG ACA AAT
ile ile gly asn lys met ser ala ile ser val his gly val ser thr ser gly gln met tyr his tyr asp met asn thr ala ser 360
ATA ATT GGT AAT AAA ATG TCT GCC ATT TCT GTT CAT GGT GTG AGT ACC TCT GGA GGA CAG ATG TAC CAC TAT GAC ATG AAT ACA GCA TCC
leu ser gln gln gln asp gln lys pro val phe asn val ile pro pro ile pro val gly ser glu asn trp asn arg cys gln gly ser 390
CTT TCT CAG CAG CAG GAT CAG AAG CCI GTT TTT AAT GTC ATT CCA CCA ATT CCT GTT GGT TCT GAA AAC TGG AAT AGG TGC CAA GGC TCC
gly glu asp ser leu thr ser gly ala leu asn phe pro gly arg ser val phe ser asn gly tyr ser pro pro cys asp gln pro 420
GGA GAG GAC AGC CTG ACT TCC TTG GGG GCT CTG AAC TTC CCA GGC CCG TCA GTG TTT TCT AAT GGG TAC TCA AGC CCT GCA ATG AGA CCA
asp val ser ser pro pro ser ser ala ala thr gly pro pro lys leu cys leu val cys ser asp glu ala ser gly cys 450
GAT GTA AGC TCT CCT CCA TCC AGC TCG TCA GCA GCC ACG GGA CCA CCA CCT CCC AAC CTC TGC CTG TGC TCC GAT GAA GCT TCA GGA TGT
his tyr gly val leu thr cys gly ser cys lys val phe phe lys arg ala val glu gly gln his asn tyr leu cys ala gly arg asn 480
CAT TAC GGG GTG CTG ACA TGT GGA AGC TGC AAA GTA TTC TTT AAA AGA GCA GAG GAA GGA CAG CAC AAT TAC CTT TGT GCT GGA AGA AAC
asp cys ile ile asp lys ile arg arg lys asn cys pro ala cys arg tyr arg lys cys leu gln ala gly met asn leu glu ala arg 510
GAT TGC ATC ATT GAT AAA ATT CGA AGG AAA AAC TGC CCA GCA TGC CCG TAT CCG AAA TGT CTT CAG GCT GGA ATG AAC CTT GAA GCT CGA
lys thr lys lys lys ile lys gly ile gln gln ala thr ala gly val gln asp thr ser glu asn pro asn lys thr ile val pro 540
AAA ACA AAG AAA AAA ATC AAA GGG ATT CAG CAA GCC ACT GCA GGA GTC TCA CAA GAC ACT TCG GAA AAT CCT AAC AAA ACA ATA GTT CCT
ala ala leu pro gln leu thr pro thr leu val ser leu leu glu val ile glu pro glu val leu tyr ala gly tyr asp ser val 570
GCA GCA TTA CCA CAG CTC ACC CCT ACC TTG GTG TCA CTG CTG GAG GTG AAT GAA CCC GAG GTG TTG TAT GCA GAT GAT AGC TCT GTT
pro asp ser ala trp arg ile met thr thr leu asn met leu gly gly arg gln val ile ala ala val lys trp ala lys ala ile leu 600
CCA GAT TCA GCA TGG AGA ATT ATG ACC ACA CTC AAC ATG TTA GGT GGG CGT CAA GTG ATT GCA GCA GTG AAA TGG GCA AAG GCG ATA CTA
gly leu arg asn leu his leu asp gln met thr leu leu tyr ser trp met phe leu met ala leu gly thr thr arg ser 630
GGC TTG AGA AAC TTA CAC CTC GAT GAC CAA ATG ACC CTG CTA CAG TAC TCA TGG ATG TTT CTC ATG GCA TTT GCC TTG GGT TGG AGA TCA
tyr arg gln ser ser gly asn leu leu cys phe ala pro asp leu ile ile asn glu gln arg met ser leu pro cys met tyr asp gln 660
TAC AGA CAA TCA AGC GGA AAC CTG CTC TGC TTT GCT CCT GAT CTG ATT AAT GAG CAG AGA ATG TCT CTA CCC TGC ATG TAT GAC CAA
cys lys his met leu phe val ser ser glu leu gln arg leu gln val ser tyr glu glu tyr leu cys met lys thr leu leu leu 690
TGT AAA CAC ATG CTG TTT GTC TCC TCT GAA TTA CAA AGA TTG CAG GTA TCC TAT GAA GAG TAT CTC TGT ATG AAA ACC TTA CTG CTT CTC
ser ser val pro lys ser gln gly leu lys ser gln glu phe asp gly ile arg met thr tyr ile lys glu val ala ile val 720
TCC TCA GTT CCT AAG GAA GGT CTG AAG AGC CAA GAG TTA TTT GAT GAG ATT CGA ATG ACT TAT ATC AAA GAG CTA GGA AAA GCC ATC GTC
lys arg glu gly asn ser ser gln asn trp gln arg phe tyr gln leu thr lys leu leu asp ser met his glu val val glu asn leu 750
AAA AGG GAA GGG AAC TCC AGT CAG AAC TGG CAA CCG TTT TAC CAA CTG ACA AAG CTT CTG GAC TCC ATG CAT GAG GTG GTT GAG AAT CTC
leu thr tyr cys phe gln thr phe leu asp lys thr met ser ile glu phe pro glu met leu ala glu ile ile thr asn gln ile pro 780
CTT ACC TAC TGC TTC CAG ACA TTT TTG GAT AAG AAC ATG AGT ATT GAA TTC CCA GAG ATG TTA GCT GAA ATC ATC ACT AAT CAG ATA CCA
lys tyr ser asn gly asn ile lys lys leu leu phe his gln lys OP (795)
AAA TAT TCA AAT GGA AAT ATC AAA AAG CTT CTG TTT CAT CAA AAA TGA

```

CTGCCCTACTAGAAGGGTGCCTTAAGAAAAGTTGAATTTATAGCTTTTACTG 2510

TACAAACTATCAATTTGCTTTGATGATGTTTTGTTGTTCTTTTGTTCCTGTTGTTTTGTTTAAACAGCGCAGTACATGTTGTTTATAGAGGGCCAAAGACTTGGCCACAGAAGCAGT 2750

TGAGTCAACACTCTGAAGTGTAGACACAGCACAGTGAAGTGTATTGTTGGTATCACAGAAAATAACAGTTACGTGGAGGACTGGCCACTGTCAGATGGGAAACCGCCAAAGCCAC 2990

CGTCCCAAGTCTGTGGTTCAACTTTCTGACTCAGAAGCTTTACAGTGGCTGGGAAAACCTTTAGACTTTCTGTTGGTTATTTTCCCATGTATAGTTAGGATGGTATTTTGAT 3230

TATGATCCCAAGCTGAAAAGTTTACAAGTGTATATCAGAAAAGGGAAAGTGGCTTTTATAGCTATTACTGCTGGTTTTAACAATTTCCCTTATATTCAGTGAACATGCTTCT 3470

TATGATCCCAAGCTGAAAAGTTTACAAGTGTATATCAGAAAAGGGAAAGTGGCTTTTATAGCTATTACTGCTGGTTTTAACAATTTCCCTTATATTCAGTGAACATGCTTCT 3710

AAATTAACCAAGTCTGTAAGTCTCTCACTGAGATGAGAATATCAATTTAAACAAGCAGAAAGGAGTGTAGCCCTTCTGTCGACCTTACCRCCTTCTGTGACTCAAGGCTTAA 3950

TGCTTACTAAGCCACAAGAAATCYGATTTCTYACTTTAAAGGGCCAAATTAATTTGTAATGAAGAAAATGAAAATCTAATATTAATAAATATTTAATTTAATTTAAT 4190

TATAGTTTCGATATATATATATCGGTATTCAGTACTGCTTGGGAAGGGAAAGGGCTACTGCACTTTACATGCAATTTAATAAGCTGTAATAAGCTGTAATAAGAA 4430

ACCCGTCTGAAAYAAAATACCTTTTGTCTAAGCTAGGGAAAGGGAGCYYGAGAYYGGCCCTGATATYGGAGGTTCCGAGGGCTCGGATYYAAGGATCNA YAGGGGATCTAATCC 4670

CGCATGCTTAACTCACCCACCAATGACTCTGTGAGTGYAGGYYGGTTATTAATATCCCCGCTTATACATATATAATAAGGAYAGAAGGGTGGCCCTCACGTTGTTCCAGGG 4910

GCAAGCCAGAAATACCAATCCCTCCACCTTCAATGATCCATTTCCAAGTAAGTACCTTAAATTTAAAATGAGCTCTTAAATATGATTTATGATACATTTATGGAATGTTAATAC 5150

AAATTTAAATAAAAAAGTAAATTTGNAATTCCTCTAAAAGGGATTTGCTGATTTGTAATGGTTAAAATGGTCTCAAAGTACTTTAAGATAATGTAAACCCAGTGGATTTGAAAT 5390

ATGTCCTTACGAAATACCAATCCCTTCCAACTGATATATCCAGAAAAGGAGACAGGAAACTTGGGAAAGGAAAGGGAAAGTAAAGCAGTCTGATGAAACACACAA 5630

TAAGTCAGATACCAAAAGCCACAGCCACAGCTGTGGGCTAAGGATGAGTCAGGTCAGCTTGGGGCTGAGAACCCAGCACTCCACTGCTACAGAGAGGGGACGGCAG 5870

GGATGGCAGAGTGGATCCGATCCCGAGTCAGTGTCTCTTATTCAGCTGTTAGTTCAGATGAGTTCAGCTGACAGCAAGTGTGATCTGTCAGCAAGCATCTGAGCTGTGATCCG 6110

CTGTCACCTTCAACTATTTAGGTTTAAATAACTTCAGTGAGACTCGTGACATTCCTGATCATCATGACCTCTTAAAGATACTTTAATCTGCTGAGGACAAAAGGGCAG 6322

ACCCTGATTTAAAAATCCGCTTCTACCTACATYAGTGGAAATGTCACAGYGTAAAAATTTGTTGGAAATGTTTAACTTTTATTCTTTAAAATTTGCTGCTGTTGATTTACCAAAAC 6322

ACCAATGACTGAATGGCTGAAAATGTTAGTCAGCCATTTACAGCAATGCCAAATATGGATAACACATATAAAAAATCTGCTTTTTC

Translated Mol. Weight = 87512.83



Figure 38bis - ADN complémentaire et séquence protéique du récepteur des glucocorticoïdes chez le rat d'après Miesfeld (1986).

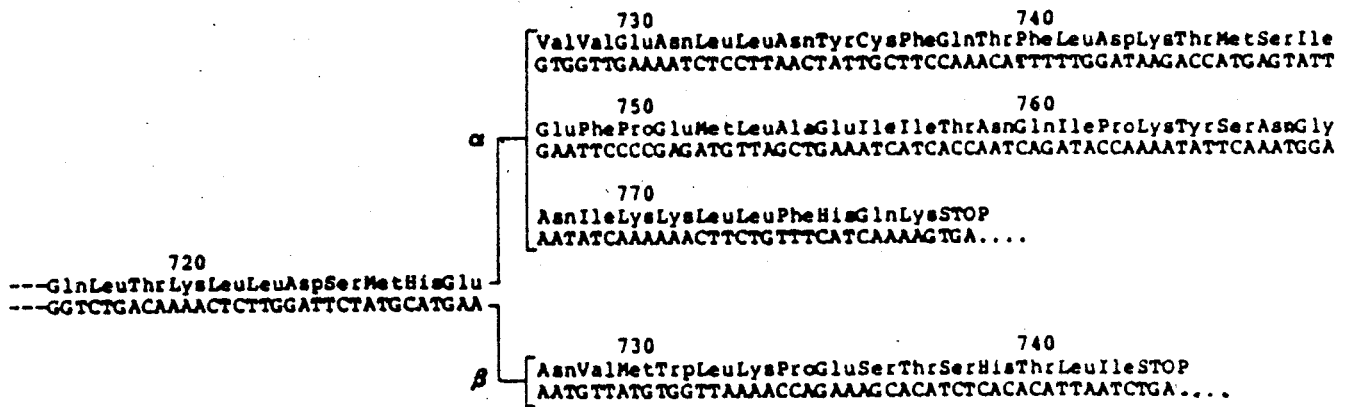


Figure 39 - Comparaison des deux formes α et β d'ADN complémentaires correspondant à la partie C-terminale du récepteur des glucocorticoïdes humain d'après Hollenberg (1985). La protéine correspondant à la forme α lie le stéroïde au contraire de celle correspondant à la forme β .

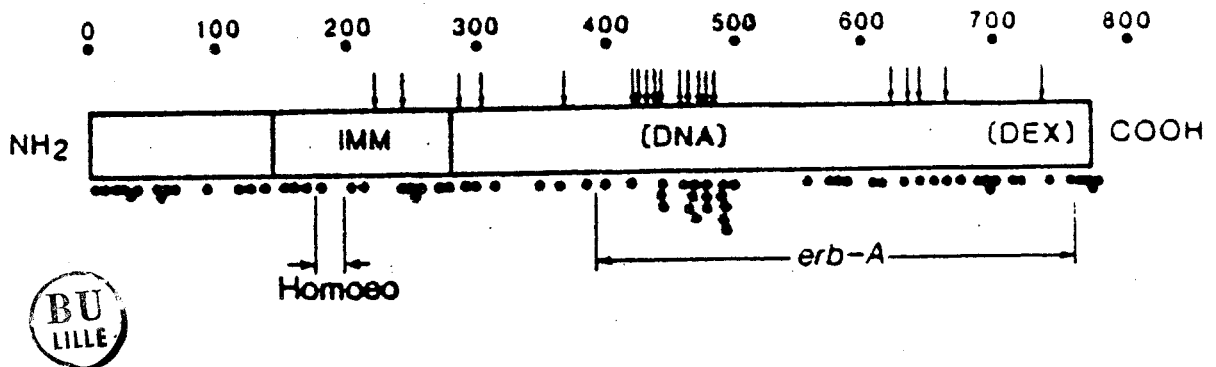


Figure 40 - Domaines dans la structure primaire du récepteur des glucocorticoïdes et homologie de séquence avec le produit de *v-erb-A* et les gènes homéotiques. Les flèches indiquent la position des cystéines du récepteur, les cercles noirs celle des résidus basiques (lysine et arginine). Les domaines immunogènes (IMM), de liaison probable à l'ADN (DNA) et au stéroïde (DEX) sont indiqués. D'après Weinberger (1985b).

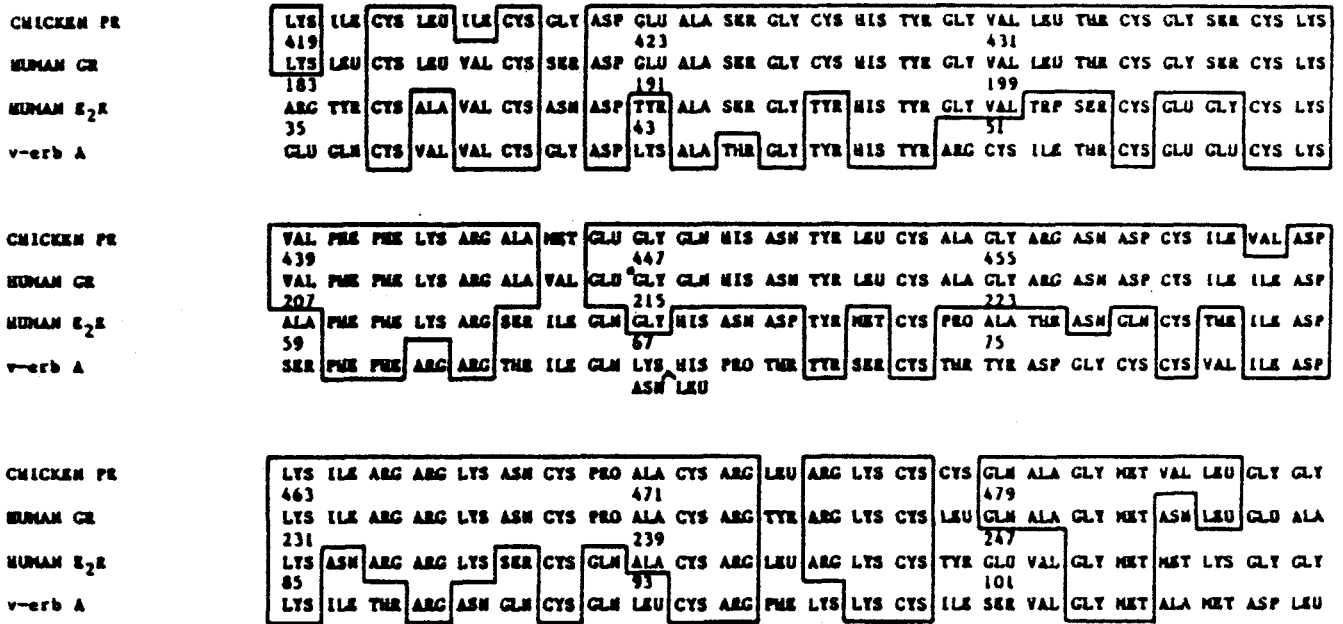


Figure 41 - Homologie de séquence en acides aminés de la région riche en cystéine, lysine et arginine des récepteurs humains des oestrogènes et des glucocorticoïdes du récepteur de la progestérone de la poule, et du produit de l'oncogène v-erb-A. D'après Conneely (1986).

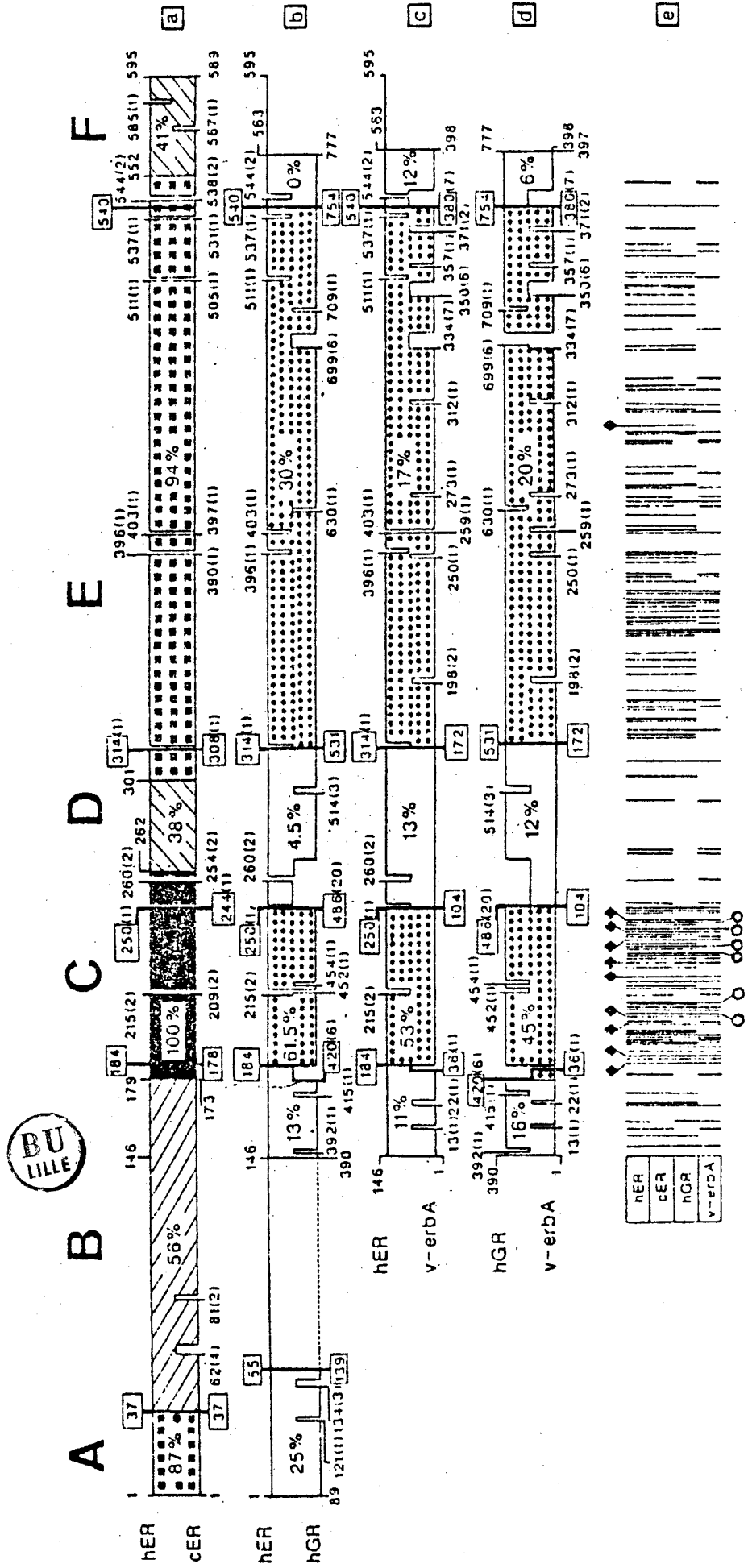


Figure 42 - Alignement schématique des séquences des récepteurs des oestrogènes humains (hER) et de poulet (cER), du récepteur humain des glucocorticoïdes (hGR) et du produit de l'oncogène v-erb-A. Les positions des vides introduits dans les séquences pour obtenir l'homologie maximale sont indiquées et la taille de ces "trous" figure entre parenthèses. Les séquences sont comparées deux à deux et le taux d'homologie en % est indiqué pour chaque domaine (de A à F). Les positions des acides aminés identiques dans au moins trois des quatre protéines comparées, dont celles des cystéine (♦) et des acides aminés basiques (O) hautement conservés sont indiquées en e . D'après Krust (1986).

sur la base de ces comparaisons, propose que toutes ces protéines appartiennent à une même famille dont les membres présenteraient la même organisation interne en domaines distincts :

. le domaine C, le mieux conservé, correspondrait au site de liaison de l'ADN. Les neuf cystéines conservées et les acides aminés basiques y jouent un rôle capital. La spécificité de liaison en fonction de la protéine concernée serait gouvernée par les acides aminés et les moins conservés de cette région dont la structure associerait essentiellement des feuillets β et des coudes β . Il est possible que certaines cystéines soient impliquées dans la liaison à un métal comme le zinc pour former des structures en forme de doigt ou de boucle similaires à celles observées dans d'autres protéines liant l'ADN comme le facteur de transcription TF III A de *Xenopus* (Muller 1985, Berg 1986, Jeltsch 1986).

. le domaine E, moins bien conservé et globalement hydrophobe, correspondrait au site de liaison du stéroïde, ainsi que l'a confirmé l'étude des produits d'expression de cDNA comportant une délétion dans cette région pour le récepteur des oestrogènes comme pour le récepteur des glucocorticoïdes.

L'homologie de séquence est extrêmement élevée dans cette région pour les récepteurs des oestrogènes de deux espèces aussi éloignées que l'homme et le poulet, mais dont les récepteurs présentent la même spécificité de liaison hormonale. Elle est fortement significative entre les récepteurs humains des oestrogènes et des glucocorticoïdes, et plus faible mais indiscutable avec le produit de v-erb-A. La structure secondaire prédite d'après la séquence primaire associe des hélices α à des feuillets β ce qui est classique dans l'organisation de sites de liaison protéique de ligands hydrophobes. La taille moyenne du domaine E est de 226 acides aminés, ce qui est en accord avec la masse moléculaire de 20 à 27 kD attribuée au récepteur des hormones stéroïdes (Vedeckis 1983, Wrangé 1984, Sherman 1978, 1984).

. Les domaines C et E sont reliés entre eux par un domaine D très variable. L'ensemble C + D + E regroupe 334 aminoacides pour le récepteur des glucocorticoïdes, soit une masse d'environ 37 kD, très voisine des 39 kD du fragment obtenu après protéolyse limitée par la

chymotrypsine du complexe glucocorticoïde-récepteur purifié, fragment encore capable de lier le stéroïde et l'ADN (Wrange 1984).

. les domaines N-terminaux A et B sont peu ou pas conservés entre des récepteurs différents, en particulier pour la région B portant le site immunogène du récepteur des glucocorticoïdes. La protéine p75-gag-erb-A ne comporte pas ce domaine, mais on ne sait pas ce qu'il en est de la protéine produite par c-erb-A. Le ligand endogène éventuel de cette protéine reste à découvrir (stéroïde, hormone thyroïdienne, autre ?).

Il est tout à fait intéressant de constater que tous ces résultats fournis par la séquence de l'ADN complémentaire codant pour le récepteur des glucocorticoïdes s'articulent d'une manière particulièrement satisfaisante avec ceux apportés par l'approche directe de la protéine (voir partie 2 de ce chapitre, et en particulier le paragraphe 2.2).

B - RESULTATS PERSONNELS

La volumineuse revue générale qui précède montre que les récepteurs des hormones glucocorticoïdes sont l'objet d'une attention considérable de la part du monde scientifique et suscitent un grand nombre de travaux et de publications. La figure 43 illustre ce fait en montrant que sur les cinq dernières années les récepteurs des glucocorticoïdes ont fait l'objet de près de 120 publications par an. Ce sont actuellement les plus étudiés des récepteurs stéroïdiens, avec les récepteurs des oestrogènes. L'intérêt croissant pour les récepteurs des glucocorticoïdes s'explique par leur ubiquité dans l'organisme avec pour conséquence l'existence d'un grand nombre de tissus cibles pour ces stéroïdes et de modèles cellulaires en culture permettant d'étudier leur action au niveau moléculaire. Rappelons que c'est sur des gènes régulés par les glucocorticoïdes qu'ont été d'abord mises en évidence les séquences nucléotidiques de reconnaissance spécifique des récepteurs stéroïdiens et ceci n'a pas peu contribué à l'augmentation spectaculaire de la popularité des récepteurs des glucocorticoïdes. Notre place dans l'étude de ces récepteurs est relativement modeste puisque nous ne sommes responsables que d'une quinzaine de publications dans ce domaine depuis 1978. Notre approche a d'abord été centrée sur la mise au point d'un gel d'affinité pour la purification du récepteur des glucocorticoïdes. Ceci nous a amené à travailler sur le ligand pour trouver le bon stéroïde et la bonne manière de le greffer sur un support insoluble. D'autre part, il nous a fallu étudier le récepteur sur le plan de sa stabilité et de ses propriétés structurales et fonctionnelles avant et après purification. Ce travail nous l'avons d'abord mené seul, puis avec le concours de Patrick Lustenberger. Après le retour de celui-ci à Nantes l'étude des récepteurs des glucocorticoïdes s'est progressivement développée dans notre laboratoire et concerne maintenant une véritable équipe de recherches dont nous assurons la coordination et l'animation scientifique sous la Direction du Pr. Dautrevaux. L'objet du présent mémoire est de rapporter un certain nombre de travaux où notre part

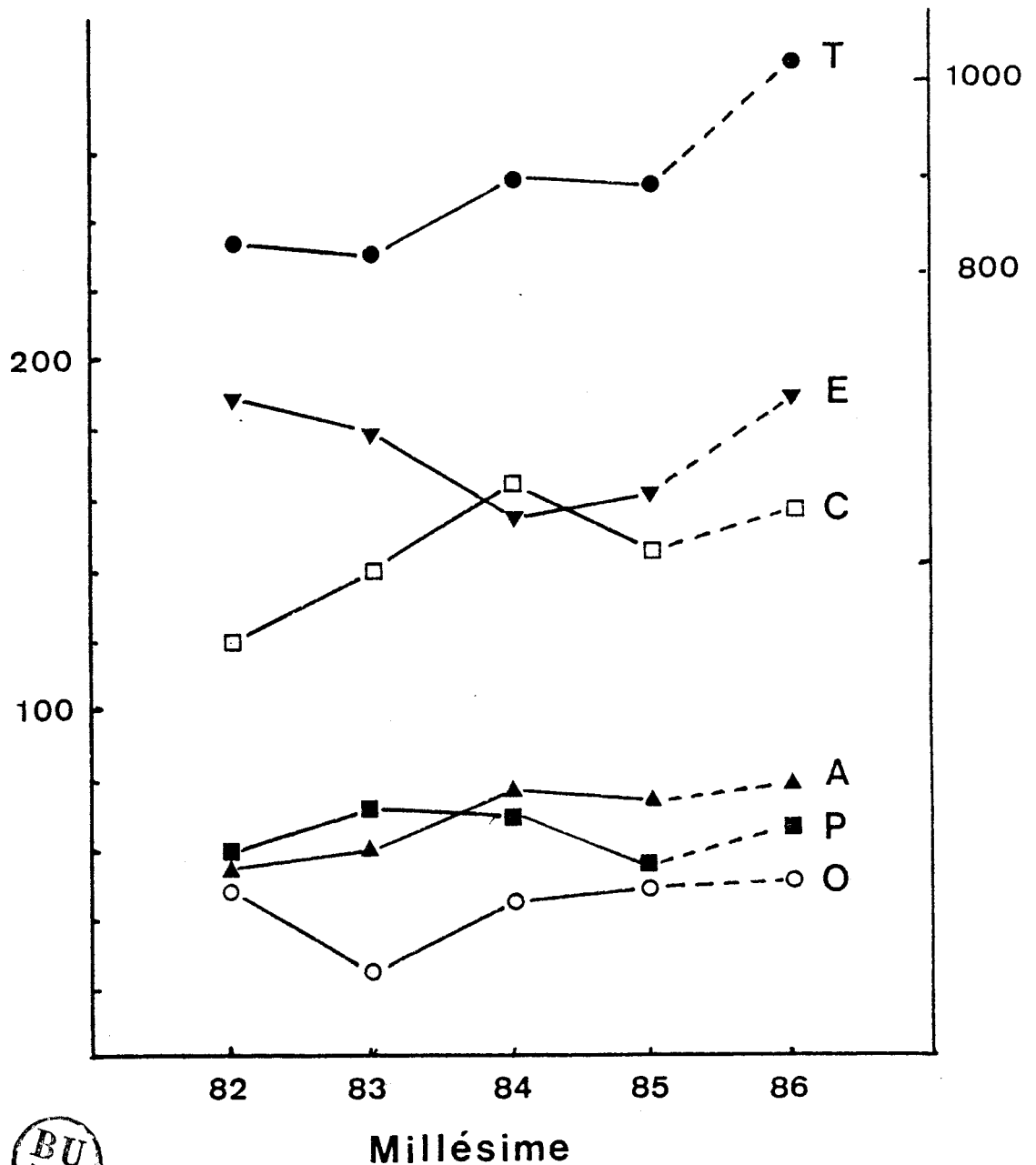


Figure 43 - Evolution de la littérature concernant le transport plasmatique et le mécanisme d'action des stéroïdes hormonaux (T) et plus spécifiquement les récepteurs des oestrogènes (E), des glucocorticoïdes (C), des androgènes (A), de la progestérone (P), de la vitamine D, de l'aldostérone, de l'ecdysone, etc... (groupés en O) Nombre de publications par an et projection pour 1986 d'après le Sheffield University Biomedical Information Service.

personnelle a été particulièrement significative. Ces travaux procèdent d'une approche structurale et visent à une meilleure caractérisation du site de liaison du récepteur pour le stéroïde. Ils ont été menés pour l'essentiel en utilisant pour l'étude du récepteur non fractionné des outils chimiques originaux, dans une tentative de renouvellement de l'application traditionnelle des relations structure-activité. L'originalité de nos travaux tient à notre sens, tant à la nature chimique de ces outils qu'à la manière dont nous les avons employés pour la caractérisation du site de liaison du récepteur. A l'heure de la publication en chaîne, prodige de la biologie moléculaire, de la séquence en aminoacides de quatre des récepteurs des hormones stéroïdes, dont celui qui a fait l'objet de nos travaux, une telle approche peut paraître obsolète, voire mériter le qualificatif infamant de ringarde. Pour notre défense nous pourrions arguer de la date de certains de nos travaux (fin des années 70), date à laquelle le problème de la purification des récepteurs et de l'obtention d'anticorps dirigés contre eux était loin d'être résolu, et où l'approche indirecte connaissait encore une certaine vogue. Mais nous préférons manier plus vigoureusement le paradoxe et affirmer hautement qu'à notre avis ce type d'approche, à condition de l'utiliser avec discernement pour la vérification d'hypothèses précises, reste d'actualité et peut compléter heureusement les résultats obtenus par les sorciers de la biologie moléculaire. Le récepteur des glucocorticoïdes n'est pas qu'un enchaînement d'acides nucléiques, c'est d'abord une protéine avec sa structure tridimensionnelle et ses fonctions de liaison au stéroïde, à l'ADN, à d'autres protéines. Le site de liaison au stéroïde n'est pas qu'une image en creux inerte de la forme du ligand, c'est aussi le lieu de la discrimination entre stéroïde agoniste et antagoniste et du départ de l'information commandant la transformation du complexe hormone-récepteur, son interaction avec la chromatine et la réponse biologique in vivo. Ces évidences méritent d'être rappelées pour justifier les efforts du biochimiste des protéines impliqué dans l'étude aride et difficile du site de liaison au stéroïde des récepteurs. Un argument supplémentaire justifiant un renouveau de

l'intérêt pour une approche plus ou moins indirecte, utilisant du récepteur peu ou pas fractionné, étudié in vitro dans les conditions les plus "physiologiques" possibles, est fourni par la difficulté à obtenir du récepteur purifié conservant un contrôle hormonal de ses propriétés de liaison à l'ADN. C'est là l'un des enseignements intéressants du récent Congrès de Madrid où plusieurs orateurs ont insisté sur l'existence vraisemblable d'interactions protéine-protéine au sein du complexe glucocorticoïde récepteur non transformé, interactions probablement relativement stables in vivo, mais rapidement déstabilisées in vitro au cours du fractionnement.

Dans ce mémoire, nous avons tenté d'apporter une réponse à quelques questions qu'il nous avait paru intéressant de poser au système glucocorticoïde-récepteur.

A savoir :

- 1) Le récepteur présente-t-il des propriétés physicochimiques différentes selon qu'il est lié à l'hormone ou non ?
- 2) Peut-on obtenir des renseignements intéressants sur le site de liaison du stéroïde en renouvelant l'approche structure stéroïde-activité de liaison au récepteur ? Pour ce faire, deux séries de stéroïdes ont été employées. Tout d'abord une série de 17 β -carboxamides dérivés de la dexaméthasone et tous modifiés dans la même région pour obtenir une sorte de carte de cette région. Ensuite une série de 17 β -carboxamides bifonctionnels développés dans le but de compter le nombre de sites de liaison accessibles dans les diverses formes (transformée ou non) du récepteur.
- 3) Peut-on explorer l'environnement de la cystéine essentielle à la liaison du stéroïde en utilisant une série de maléimides N-substituées avec des groupements fonctionnels divers d'hydrophobicité variée ?

La réponse à chacune de ces questions ponctuelles n'apporte qu'une simple touche supplémentaire dans une vision impressioniste du récepteur. Mais nous verrons dans la discussion que ces touches modestes se marient heureusement entre elles et avec les résultats obtenus par d'autres méthodes.

I - CARACTERISATION ET FRACTIONNEMENT DU RECEPTEUR NON LIE A
L'HORMONE.

On connaît très peu de choses du récepteur des glucocorticoïdes sous forme non liée à l'hormone car il est très instable en l'absence de son ligand (voir partie bibliographique II, 2.1.a). Depuis l'avènement de l'utilisation du molybdate dans le domaine des récepteurs de hormones stéroïdes, un fractionnement du récepteur des glucocorticoïdes non lié à l'hormone est devenu envisageable, grâce à l'excellente action stabilisatrice de cet oxyanion (voir partie bibliographique II, 2.1.e). Nous avons donc tenté de fractionner le récepteur non lié par différentes méthodes de séparation des protéines, chromatographique ou non, dans un double but : voir si le récepteur non lié présente ou non des propriétés physicochimiques différentes de celles du complexe hormone récepteur préformé, et mettre au point un protocole de purification partielle du récepteur non lié. Cette purification partielle du récepteur non lié peut en effet présenter un grand intérêt pour la mise en oeuvre ultérieure de techniques comme le marquage d'affinité du récepteur ou l'utilisation de réactifs spécifiques d'acides aminés particuliers. Nous avons dans un premier temps examiné les conditions de la stabilisation du récepteur sous forme non liée.

1- STABILISATION DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES SOUS FORME NON LIEE A L'HORMONE

Nous avons étudié rapidement dans notre modèle les effets des meilleurs agents de stabilisation à ajouter au récepteur cytosolique et aux tampons de fractionnement.

1.1. Molybdate

Nous avons vérifié que conformément aux données de la littérature le molybdate présente un effet stabilisant remarquable et protège le récepteur non lié à l'hormone contre l'inactivation par la chaleur (tableau VII). Cet effet se maintient après fraction-

Molybdate (mM)	0	1	3	10	30	50	100
Demi-vie du récepteur non lié chauffé à 23°C, puis incubé à 0° avec la dexaméthasone [³ H] (tampon : phosphate 20 mM, β-mercaptoéthanol 20 mM, glycérol 10 %, pH 7,4)							
Cytosol	2h 30	7h 30	-	16h	14h	8h	5h 40
Extrait sulfate de protamine	<2h	2h 30	8h	11h	7h	5h	3h
Extrait sulfate de protamine en phosphate 156 mM	<<2h			<2h	2h		
Demi-vie du récepteur lié à l'hormone - extrait sulfate de protamine (phosphate 20 mM)	1,5h		4h	20h			

TABLEAU VIII- Effet du molybdate sur la stabilisation du récepteur des glucocorticoïdes du foie de rat lié à l'hormone ou non et partiellement purifié ou non.

nement du récepteur par précipitation au sulfate de protamine qui apporte une purification d'un facteur 6 à 10 fois, ce qui est un argument en faveur d'une interaction directe molybdate-récepteur. Le molybdate protège cependant beaucoup moins bien le récepteur contre les effets conjugués de la température et d'une force ionique élevée que contre ceux du chauffage en milieu hypotonique, et on peut sans doute expliquer ainsi que son action diminue d'efficacité à forte concentration. Nous avons choisi en routine de travailler à une concentration de 10 mM. A cette concentration à 0° le molybdate présente un effet solubilisant indiscutable de l'extrait au sulfate de protamine qui reprécipite par dilution dans des proportions beaucoup plus considérables en l'absence de molybdate qu'en sa présence.

1.2. Agents réducteurs des thiols

Ces agents présentent un effet synergique de celui du molybdate pour la protection de l'activité de liaison contre l'action de la chaleur. Cet effet, signalé dans le cytosol des thymocytes de souris (voir partie bibliographique II, 2.1.b) n'est pas observé dans le cytosol du foie de rat qui contient une activité réductrice endogène. Mais il existe sur du récepteur de foie de rat fractionné par précipitation par le sulfate de protamine. La mise en évidence et la discussion de cet effet sont traités plus loin à propos de nos essais de marquage du thiol essentiel à la liaison du stéroïde par le récepteur (voir Résultats IV-4). En pratique le maintien de l'activité de liaison exige l'addition d'agents réducteurs au cours du fractionnement. Nous utilisons couramment le β -mercaptoéthanol à la concentration de 20 mM ou le dithiothréitol à la concentration de 1 mM.

1.3. Glycérol

Le glycérol à la concentration de 10 à 50 % stabilise le récepteur non lié à l'hormone (Schaumburg 1972). Aussi, en pratique utilisons-nous une concentration de 10 à 20 % de glycérol dans nos tampons. Pour la conservation d'échantillons de cytosol ou d'extrait

au sulfate de protamine sous forme congelée à -70°C , nous portons cette concentration à 28 %. Une étude comparée des effets du glycérol et de l'éthylène glycol sur la stabilité du récepteur à la congélation nous a montré que le glycérol était préférable à l'éthylène glycol (tableau IX). C'est également le glycérol qui a été choisi comme agent antigel dans nos expériences d'alkylation du récepteur à température subzéro (voir infra Résultats IV).

1.4. Nature du tampon

Le Tris est couramment utilisé d'après la littérature, mais nous avons constaté que le tampon phosphate lui était préférable car il présente un léger effet stabilisant du récepteur non lié contre l'inactivation thermique, un peu comme le molybdate, mais sans montrer d'effet d'inhibition de la transformation du complexe glucocorticoïde-récepteur.

2 - FRACTIONNEMENT DU RECEPTEUR NON LIE A L'HORMONE

Nous avons appliqué plusieurs méthodes de fractionnement, chromatographiques ou non. A chaque fois les aspects qualitatifs et quantitatifs (rendement et taux de purification) du fractionnement ont été précisés. Dans le cas des séparations chromatographiques et en gradient de sucrose il est rapidement apparu indispensable, pour lever toute ambiguïté sur les positions précises et respectives du récepteur non lié et du complexe hormone-récepteur préformé, de recourir à l'utilisation d'un étalon interne consistant en une dose traceuse de récepteur incubé avec l'hormone radioactive. Ce traceur a été ajouté à l'échantillon de récepteur non incubé juste avant la mise en oeuvre de la séparation après laquelle les fractions obtenues bénéficient à la fois, d'une analyse directe de la radioactivité qu'elles contiennent pour localiser la position du complexe hormone récepteur, et d'une réincubation avec l'hormone radioactive en excès pour localiser celle du récepteur libre.

	Taux de glycérol ou d'éthylène glycol (en % v/v) dans l'échantillon					
	10	19	28	37	46	55
Activité récepteur en % du témoin						
1) Extrait sulfate de protamine						
- après une semaine à -70°C						
. dans le glycérol	100	107	123	128	145	138
. dans l'éthylène-glycol		124	119	124	91	36
- après deux semaines à -70°						
. dans le glycérol		101	112	111	102	106
. dans l'éthylène-glycol		94	91	97	80	31
2) Cytosol de thymus après deux semaines à -70°						
. dans le glycérol		94	102	96	102	87
. dans l'éthylène-glycol		86	93	81	69	38

TABLEAU IX - Effets comparés du glycérol et de l'éthylène-glycol sur la stabilité au froid du récepteur des glucocorticoïdes.

2.1. Précipitation par le sulfate de protamine

Cette technique simple et rapide permet, en présence de molybdate de purifier le récepteur 6 à 11 fois. Son rendement est excellent, puisqu'après réincubation de l'extrait avec la dexaméthasone tritiée on retrouve de 70 à 90 % de l'activité de liaison soumise au fractionnement. Les caractéristiques analytiques du complexe hormone récepteur formé avec cet extrait sont rigoureusement identiques à celles du complexe cytosolique.

2.2. Fractionnement par centrifugation en gradient de sucrose

a) Le récepteur cytosolique non lié soumis à une séparation par centrifugation en gradient de sucrose en présence de molybdate, d'agents réducteurs et de glycérol est obtenu avec un rendement très faible (10 à 12 %) en force ionique élevée (tampon phosphate 160 mM), mais plus acceptable en force ionique faible (33 % en tampon phosphate 20 mM). Le récepteur non lié sédimente à la même position (8S) que le complexe hormone récepteur préformé (figure 44).

b) L'application de ce type de fractionnement à l'extrait sulfate de protamine est détaillée sur la figure 45. Le tampon est ici du phosphate 20 mM pH 7,4 contenant du molybdate 10 mM, du β -mercaptoéthanol 20 mM et 10 % de glycérol. Un étalon interne de récepteur déjà incubé a été ajouté à l'échantillon. Il apparaît que les récepteurs liés et libres migrent rigoureusement à la même position. Le rendement moyen de récupération de l'activité de liaison déposée est de 27 % (n = 3) contre 76 % pour le complexe préincubé. Le taux de purification est faible, de l'ordre de 1 si on compte tout le pic 8S et de 2 sur les fractions du sommet du pic. La perte importante d'activité subie au cours du fractionnement efface pratiquement complètement la purification qu'on pouvait attendre de cette technique.

2.3. Fractionnement par chromatographie sur hydroxylapatite

La figure 46 résume une expérience typique où le récepteur non lié de l'extrait sulfate de protamine est chargé sur une colonne d'hydroxylapatite dans du tampon phosphate de potassium, puis élué

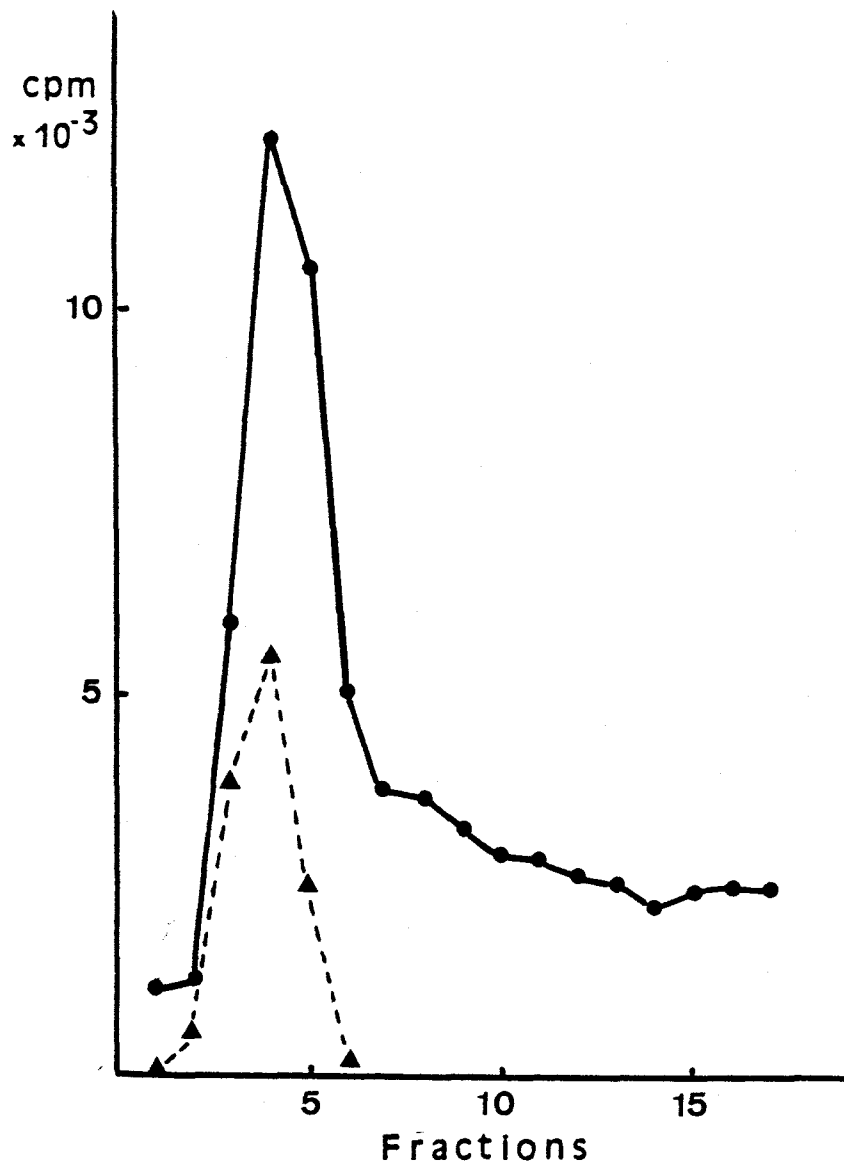


Figure 44 - Centrifugation en gradient de sucrose du récepteur cytosolique du foie de rat. Le cytosol et le gradient de sucrose sont préparés en tampon phosphate 20 mM, β -mercaptoéthanol 20 mM, molybdate de sodium 10 mM, glycérol 5 %, pH 7,4. Des aliquots de 200 μ l de cytosol, préincubés 6h à 0°C avec 30 nM de dexaméthasone [³H] ou non, sont déposés sur des tubes contenant un gradient linéaire de sucrose 5-20 % et mis à tourner à 55 000 rpm pendant 17h à 0°. Des fractions de 200 μ l sont recueillies et selon le cas, soit comptées (\blacktriangle ---- \blacktriangle), ou incubées avec la dexaméthasone [³H] pour localiser le récepteur libre (\bullet — \bullet).

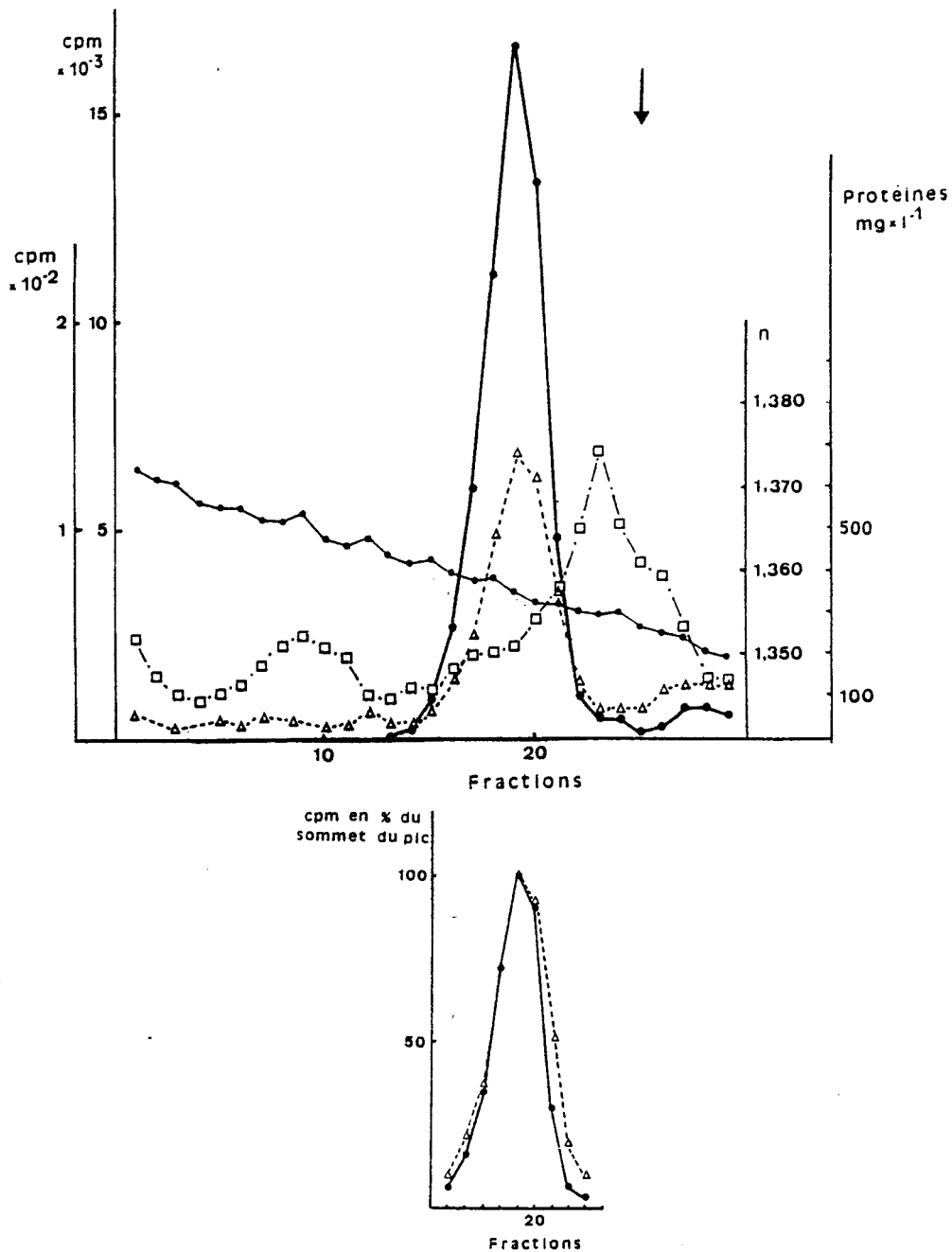


Figure 45 - Centrifugation en gradient de sucrose du récepteur partiellement purifié par précipitation au sulfate de protamine. 2 ml d'extrait sulfate de protamine sont supplémentés avec une dose traceuse du même extrait préincubé avec la dexaméthasone [^3H] et mis à centrifuger sur un gradient linéaire de sucrose 5-20 % (dépôt 0,7 ml x 3 sur des tubes de 13 ml, centrifugation 38 000 rpm x 17H à 0°)

a) Dans chaque fraction on mesure la radioactivité du récepteur préincubé (Δ ----- Δ , $\text{cpm} \times 10^{-2}$) et on dose le récepteur libre par post incubation avec la dexaméthasone [^3H] (\bullet — \bullet , $\text{cpm} \times 10^{-3}$). On détermine également le taux de protéines (\square — \square) et l'indice de réfraction (\bullet — \bullet). La flèche indique la position de sédimentation de la sérumalbumine (4,3 S).

b) Les valeurs de récepteur libre ou préincubé des différentes fractions sont exprimées en % de la valeur de leur sommet de pic respectif.

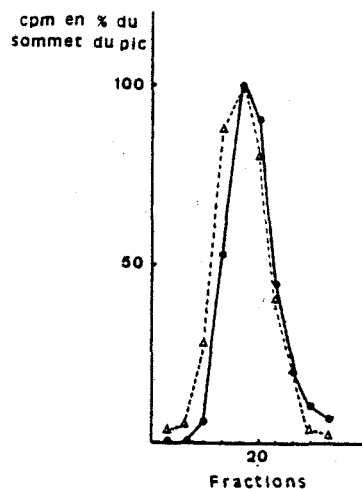
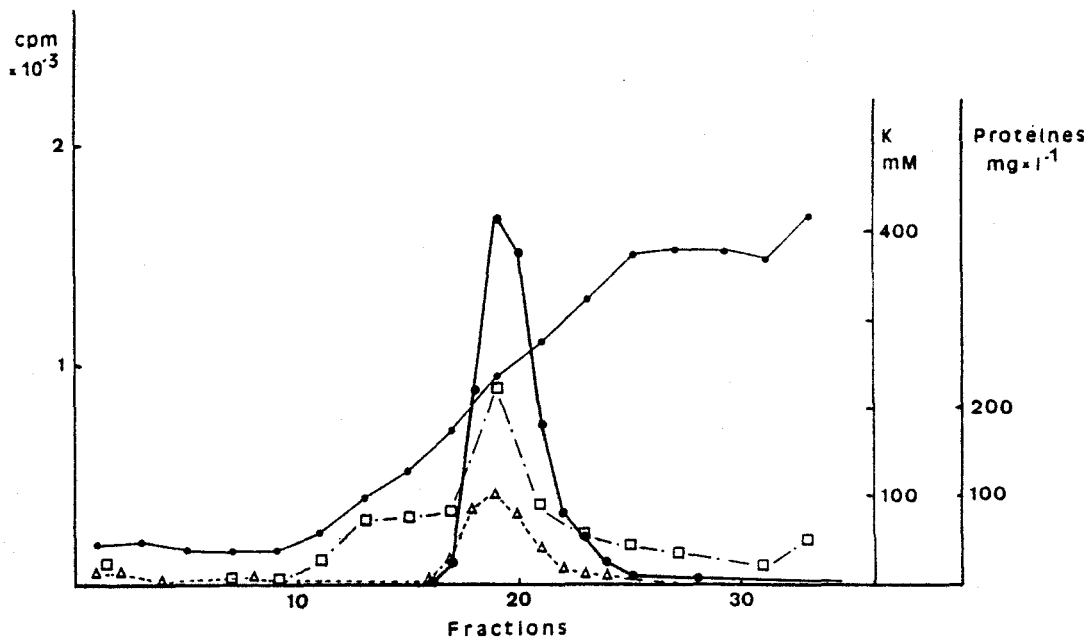


Figure 46 - Séparation du récepteur libre sur colonne d'hydroxylapatite. Un échantillon d'extrait sulfate de protamine est équilibré en tampon phosphate 20 mM, β -mercaptoéthanol 20 mM et molybdate 10 mM, pH 7,4. Il est chargé sur une colonne d'hydroxylapatite (2 ml) avec une dose traceuse de récepteur préincubé. L'éluion est réalisée avec un gradient de phosphate de potassium 20-250 mM.

a) dans chaque fraction on mesure la radioactivité du récepteur préincubé (Δ --- Δ) et on dose le récepteur libre (\bullet — \bullet) par post-incubation avec la dexaméthasone tritiée. La concentration en potassium (\bullet — \bullet) et en protéines (\square — \square) est également déterminée.

b) Comparaison des pics de récepteur préincubé et non incubé selon le même principe que dans la figure 45.

par un gradient de force ionique (tampon phosphate 20 à 250 mM). Ici encore le récepteur non lié est élué rigoureusement à la même position que le traceur incubé. Le rendement de récupération est excellent (92 % sur l'ensemble du pic), mais le taux de purification reste faible, de l'ordre de 2 fois, qu'on considère l'ensemble du pic ou seulement son sommet. Contrairement à ce qui était observé en sucrose, ici la majeure partie des protéines est éluee en même temps que le récepteur, ce qui explique à la fois l'excellent rendement et la faiblesse du taux de purification.

2.4. Fractionnement par chromatographie d'exclusion de taille

La séparation du récepteur par chromatographie d'exclusion de taille sur colonne haute performance du type TSK G 4000 SW (600 x 7,5 mm) est obtenue avec un rendement très satisfaisant (70 %) et un taux de purification significatif de 10 à 40 fois selon les fractions considérées. Le récepteur non lié sort, ici encore, exactement au même endroit que le complexe préincubé. La rapidité et la très bonne résolution offerte par la chromatographie d'exclusion de taille à haute performance est sans doute responsable de l'excellente purification obtenue avec cette technique. Si on combine à ce facteur, celui déjà apporté par la précipitation au sulfate de protamine, on arrive à un taux global de purification de l'ordre de 60 à 240 fois selon les fractions, ce qui est supérieur à la meilleure purification décrite à ce jour (Bernard 1984). Malheureusement du fait du coût des colonnes, elle reste essentiellement une technique analytique ou semi-préparative.

2.5. Fractionnement par chromatographie d'échange d'ions à haute performance.

Les résultats d'une expérience préliminaire montrant le fractionnement du récepteur non lié sur une colonne Ultropac TSK DEAE 545 sont représentés sur la figure 47. Le récepteur non incubé donne un pic majeur qui sort pratiquement au même endroit que le témoin préincubé. La signification de la différence d'une fraction d'éluion entre les deux sommets du pic reste à confirmer. Le rendement est ici de 47 %, et le taux de purification sur le sommet du pic de 6,6 fois.

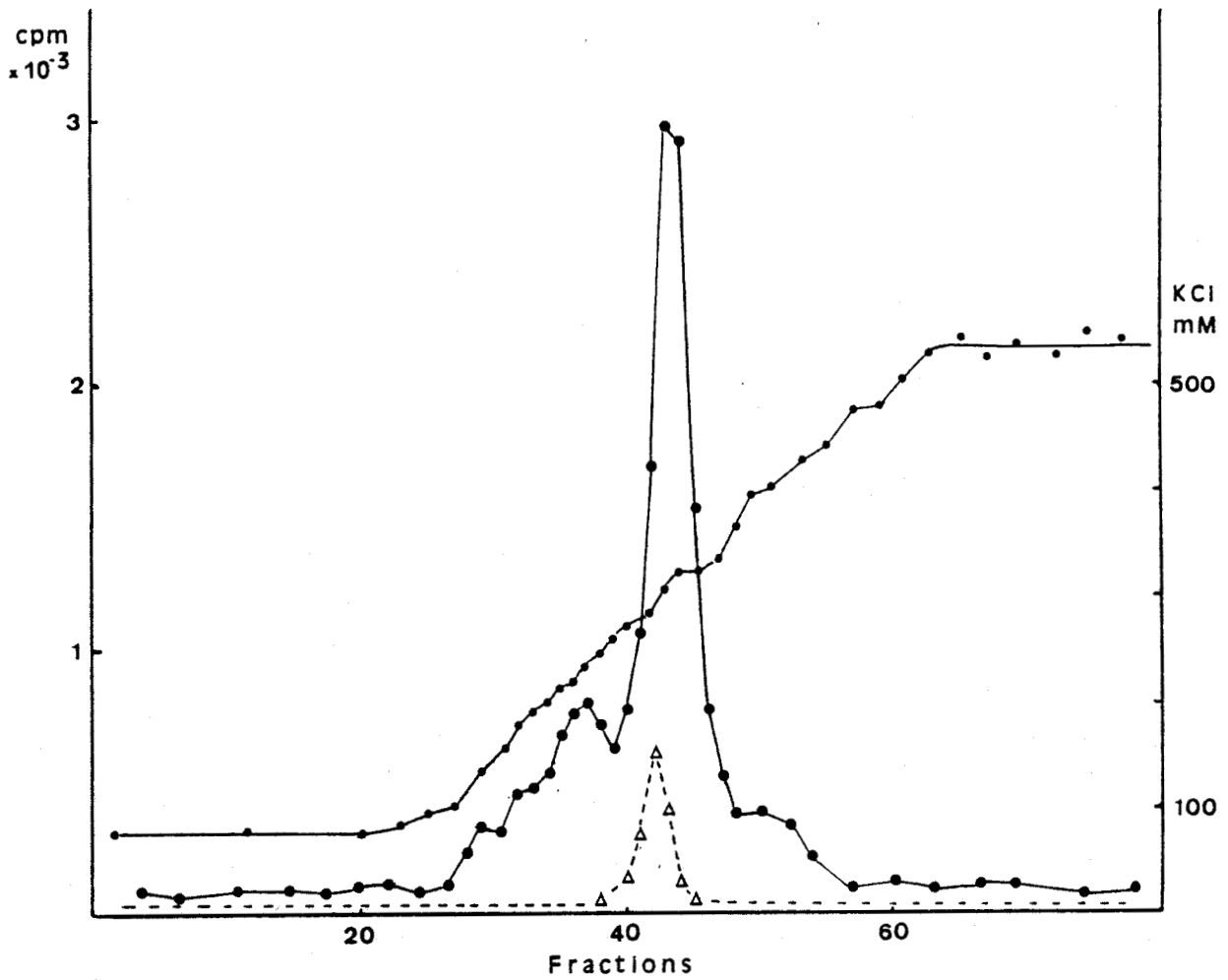


Figure 47 - Fractionnement du récepteur non lié par chromatographie d'échange d'ions à haute performance. Le principe est identique à celui de la figure 46 sauf que la séparation est effectuée sur une colonne d'échange d'ions TSK DEAE 545 (LKB) avec élution par un gradient linéaire de KCl (0-500 mM). On dose dans chaque fraction d'effluent de colonne le récepteur préincubé (Δ --- Δ), le récepteur libre (\bullet — \bullet) et le potassium (\bullet — \bullet).

2.6. Conclusion

Le récepteur non lié à l'hormone et stabilisé par le molybdate présente des propriétés physicochimiques pratiquement identiques à celles du complexe hormone récepteur manipulé dans les mêmes conditions. La liaison de l'hormone n'induit donc apparemment pas de changement décelable des propriétés et de la conformation de la protéine réceptrice. Si de tels changements existent, ils sont sans doute discrets. La poursuite du travail avec une technique à haute résolution comme la chromatographie d'échange d'ions à haute performance permettra peut-être d'individualiser des modifications subtiles échappant aux techniques plus conventionnelles.

Sur le plan de la purification partielle du récepteur non lié, il apparaît que la précipitation par le sulfate de protamine est la seule méthode simple permettant de fractionner des volumes importants de cytosol avec un bon rendement. Les techniques de chromatographie des protéines sur supports à haute performance ouvrent la voie à une purification plus poussée du récepteur non lié, mais elles restent pour l'instant difficilement applicables à des échantillons dépassant quelques millilitres. C'est donc en routine le cytosol ou l'extrait au sulfate de protamine qui nous ont servi de source de récepteur non lié pour nos études du site de liaison du récepteur.

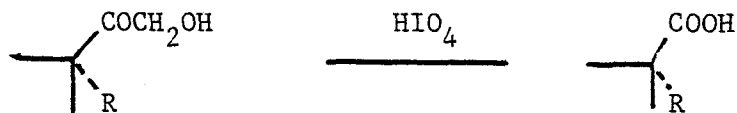
II - UTILISATION DES STEROIDES 17 β -CARBOXAMIDES POUR L'ETUDE DU SITE
DE LIAISON DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES

1 - SYNTHESE DES STEROIDES DES 17 β -CARBOXAMIDES

Les stéroïdes 17 β -carboxamides n'avaient reçu que fort peu d'attention jusqu'à nos travaux. La description de la préparation du 3 oxo Δ 4 etienamide ou 3-oxo-4-androstène-17 β -carboxamide par Barber en 1954 était restée sans suite. Cette molécule n'était d'ailleurs étudiée que comme sous-produit de la préparation de la 21-diazoprogestérone. Nous n'avons trouvé aucune mention d'une quelconque étude de l'activité biologique de ce produit ou de tout autre 17 β -carboxamide. Pourtant la purification de la transcortine humaine par un gel d'affinité contenant un dérivé carboxamide de l'acide 11 β -hydroxy-4-androstène-17 β -carboxylique (Le Gaillard 1974) nous a amené à penser que des produits similaires pourraient avoir une bonne affinité pour les protéines liant les glucocorticoïdes et être utiles dans une étude de la relation entre structure stéroïde et activité biologique. Les 17 β -carboxamides décrits dans ce travail ont été préparés à partir de divers glucocorticoïdes naturels et de synthèse après oxydation périodique en acide 17 β -carboxylique puis couplagé à diverses amines.

1.1. Préparation des acides 17 β -carboxyliques

Elle est très facile à réaliser par oxydation périodique pour les stéroïdes comportant en 17 β une chaîne latérale dihydroxyacétone ou 20 céto 21 hydroxy. Le carbone 21 est éliminé à l'état de formaldéhyde et la cétone en 20 est oxydée en groupe carboxylique.



R = H ou OH

Cette méthode est décrite depuis fort longtemps . Nous l'avons utilisée avec succès, avec des rendements supérieurs à 85 %,

pour l'oxydation de la corticostérone, du cortisol et de la prednisolone, selon le protocole de Mason (1937, 1938) et pour la dexaméthasone et la desoximetasone d'après une variante plus rapide (Glaxo brevet 1972). Remarquons que la méthode ne s'applique pas à des stéroïdes qui comportent un glycol 16α 17α , comme c'est le cas pour la triamcinolone. La présence de ce glycol entraîne une dégradation du cycle D de ce stéroïde en présence d'acide periodique. Nous avons essayé l'oxydation periodique sur l'acétonide de triamcinolone mais nous n'avons pu obtenir le dérivé 17β carboxylique de cette molécule par cette méthode.

1.2. Préparation des 17β -carboxamides (Formstecher 1980)

a) Echec de la méthode à la dicyclohexylcarbodiimide

La dicyclohexylcarbodiimide dont l'utilisation a été décrite pour la première fois par Sheehan et Hess (1955), est l'un des agents les plus utilisés en synthèse peptidique et pour quantité d'autres réactions de couplage. Il semblait logique d'y recourir en première intention pour le couplage des stéroïdes 17β -carboxyliques à des amines primaires. Les nombreux essais que nous avons réalisés avec cette méthode se sont révélés extrêmement décevants. La réaction de l'acide 11β -hydroxy-3-oxo-4-androstène- 17β -carboxylique (II_a) avec la propylamine en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ne nous a pas permis d'isoler le 17β -carboxamide attendu (IV_a) en quantités significatives (Figure 48). Que la réaction soit menée dans le chlorure de méthylène, le tétrahydrofurane ou le dioxanne, il y a toujours formation prédominante de N-acylurée (VI) sans aucune précipitation de dicyclohexylurée (DCU). Cependant, dans le chlorure de méthylène, le composé (IV_a) a été obtenu avec un rendement très faible et sa formation était précédée par l'apparition d'un composé transitoire et peu abondant observé sur les chromatographies en couche mince sur gel de silice utilisées pour suivre l'évolution de la réaction. Ce composé présente un R_F inférieur à celui de la N-acylurée (VI). A cause de la disparition rapide de la tache correspondant à ce produit après addition de propylamine, avec apparition

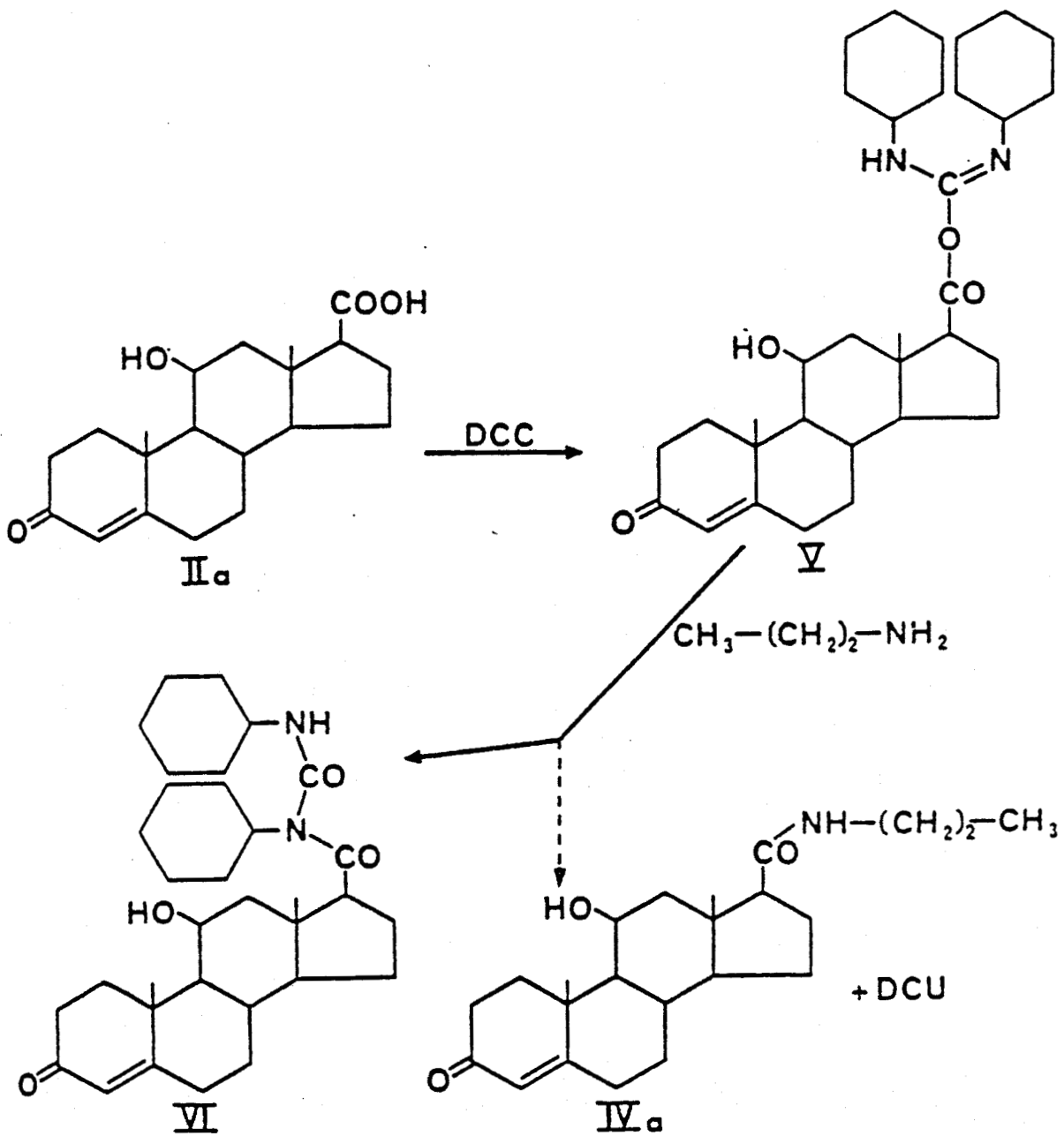


Figure 48 - Réaction d'un stéroïde 17β-carboxylique avec la dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et la propylamine.



concomitante du 17β carboxamide (IV_a) nous avons fait l'hypothèse que ce composé transitoire correspondait soit à la O-acylurée (V), soit à l'anhydride de l'acide 17β -carboxylique (II_a).

- En effet, le mécanisme généralement admis pour la réaction d'activation du carboxyl par la DCC est celui postulé par Khorana (1955) et représenté sur la figure 48 . La forme réactive serait la O-acylurée (V) qui peut soit réagir avec l'amine, soit se réarranger en N-acylurée (VI) stable et peu réactive, soit enfin réagir avec une nouvelle molécule d'acide (II_a) pour donner l'anhydride de cet acide et une molécule de DCU. Cet anhydride peut à son tour réagir avec l'amine pour donner l'amide (IV_a). Jusqu'à une date récente, aucune O-acylurée n'avait pu être isolée du fait de la réactivité extrême de ces composés. En 1978, Arendt a mis en évidence, par chromatographie, dans la réaction de la formylphénylalanine avec la DCC, un composé de R_F différent de l'anhydride, composé qui réagit lentement avec la formylphénylalanine pour donner l'anhydride et qui est aminolysé très rapidement par l'ester méthylique de la leucine pour donner un dipeptide. A partir de ces arguments chromatographiques, Arendt fait l'hypothèse que ce composé est la O-acylurée de la formylphénylalanine. Nous avons essayé pour notre part de purifier le composé transitoire observé dans notre cas. Après la mise au point analytique de la séparation des produits de réaction en chromatographie liquide haute pression sur gel de silice (Nucléosil 10) nous avons isolé ces produits par chromatographie préparative sous pression (Figure 49). Les composés obtenus ont été contrôlés en HPLC analytique et sur couche mince de gel de silice (Figure 50). Le produit (1) est pur et correspond à la N-acylurée ainsi que le confirme son spectre infra-rouge et la microanalyse élémentaire. L'interprétation du spectre infra-rouge nous a posé un petit problème pour l'attribution des bandes CO (Figure 51). Nous avons attribué la bande à 1710 cm^{-1} au CO en 20 du stéroïde en nous inspirant de Bellamy (1975) et la bande à 1635 cm^{-1} au CO de l'urée. Les autres bandes caractéristiques correspondent à la

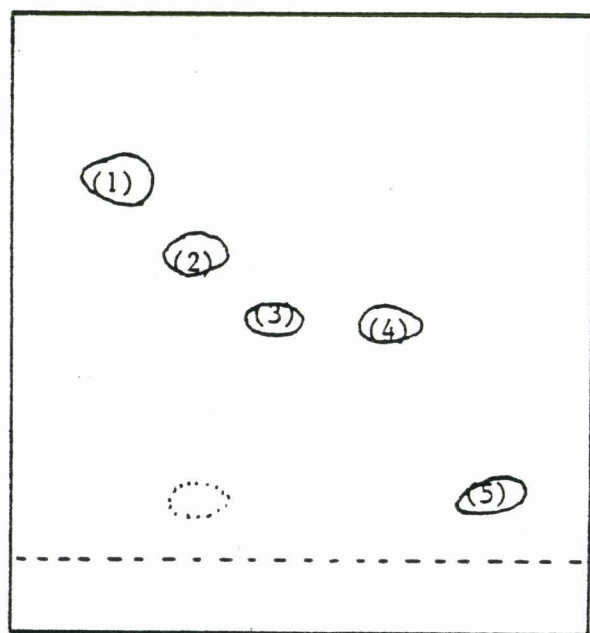


Figure 50 - Contrôle en chromatographie en couche mince
(gel de silice Merck F254, solvant dichlorométhane-acétone
8 : 1) des produits (1) et (2)

- (3) produit de la réaction de (2) avec de la benzylamine
(5 minutes à 0°)
- (4) témoin 17 β carboxamide résultant du couplage de (II_a)
avec la benzylamine
- (5) témoin (II_a)



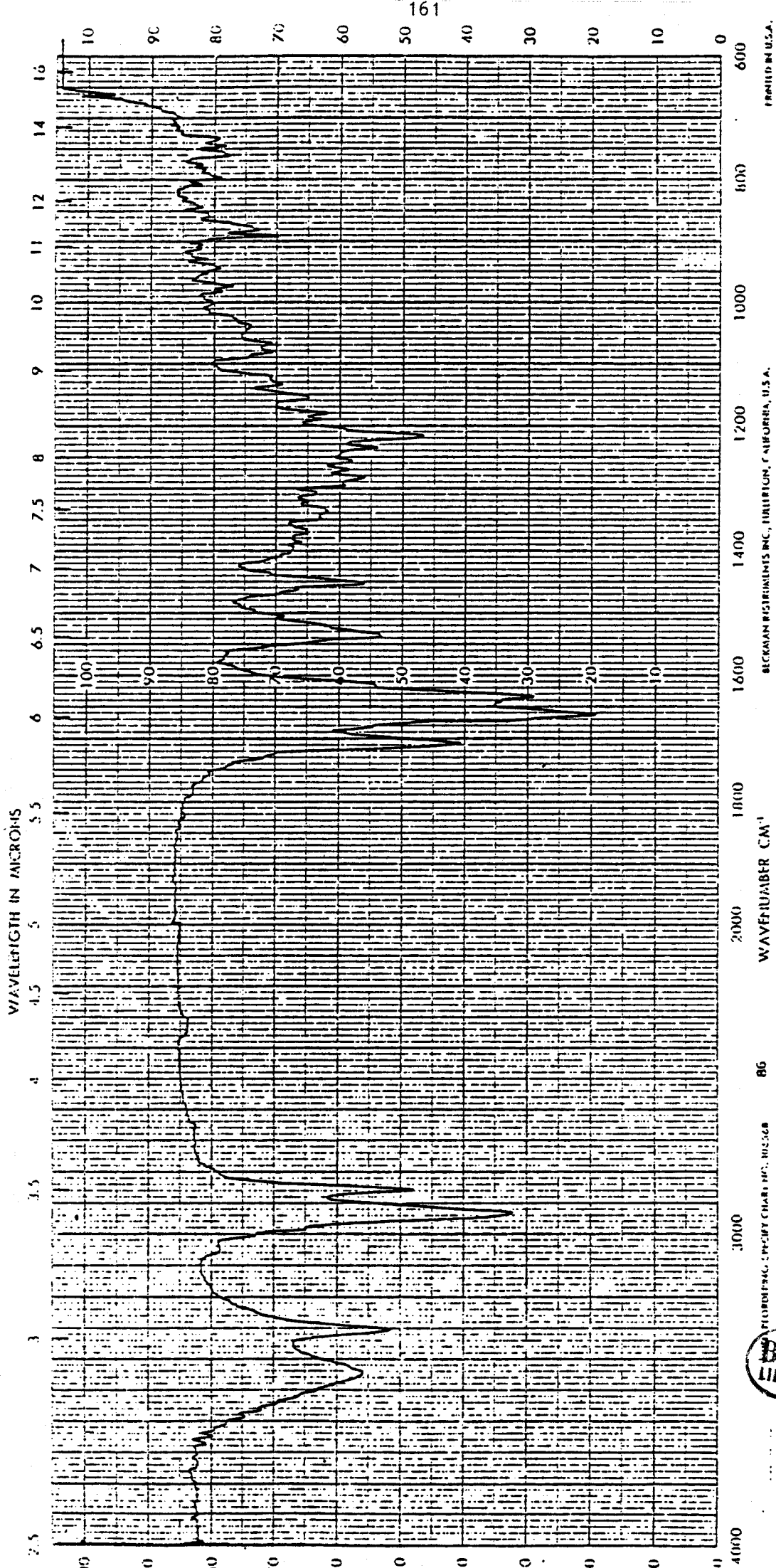
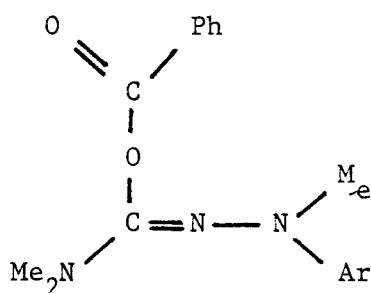


Figure 51 - Spectre infra-rouge (KBr) de la N-acylurée (VI)



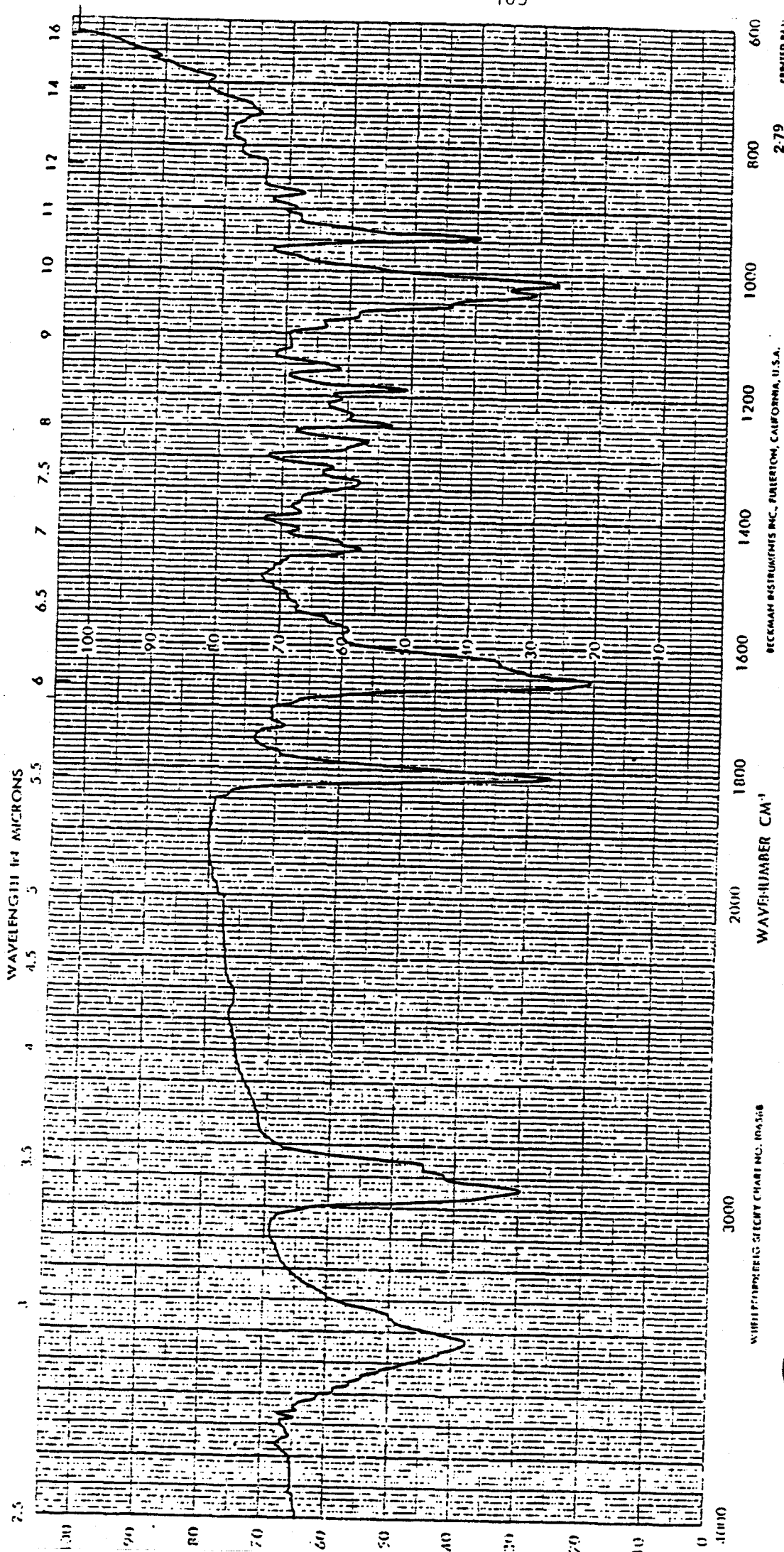
cétone en 3 à 1660 cm^{-1} et à une bande amide II à 1540 cm^{-1} . Le produit (2) n'est pas parfaitement pur, mais la réaction négative à la chaux sodée et la présence d'une bande d'absorption fine et intense à 1810 cm^{-1} en infra-rouge (Figure 52) sont beaucoup plus en faveur de l'anhydride (II_a) que de l'acylurée (V). Une étude cinétique de la réaction (II_a) + DCC suivie par spectrophotométrie infra-rouge en solution dans le chlorure de méthylène a montré d'autre part que cette bande apparaît dès la cinquième minute de réaction. L'étude du produit (2) par spectrométrie de masse en ionisation chimique (méthane) n'a pas permis de mettre en évidence de pic de masse correspondant à l'anhydride, mais ceci n'est pas étonnant du fait de la taille et de l'instabilité vraisemblable de cette molécule. Pour clore cette discussion sur le mécanisme réactionnel de la dicyclohexylcarbodiimide, signalons que récemment Hegarty (1980) est parvenu à isoler une O-acylisourée du type



Ar = 2-4 dinitrophénol

et à étudier la stabilité de ce produit en solution ainsi que la réaction intramoléculaire de transfert d'acyl sur l'azote adjacent. Il propose de transposer les résultats obtenus sur ce modèle à la réaction des acides carboxyliques avec les carbodiimides substitués.

- En conclusion, la méthode à la dicyclohexylcarbodiimide seule ne convient pas pour le couplage des amines aux stéroïdes 17β -carboxyliques. La prolongation de la réaction n'améliore pas les choses, au contraire, car après quelques heures à $+4^\circ$ et/ou en présence d'un



BECKMAN INSTRUMENTS INC., FULLERTON, CALIFORNIA, U.S.A.

PRINTED IN U.S.A.

Figure 52 - Spectre infra-rouge (KBr) du produit (2) anhydride probable de l'acide (II₈)

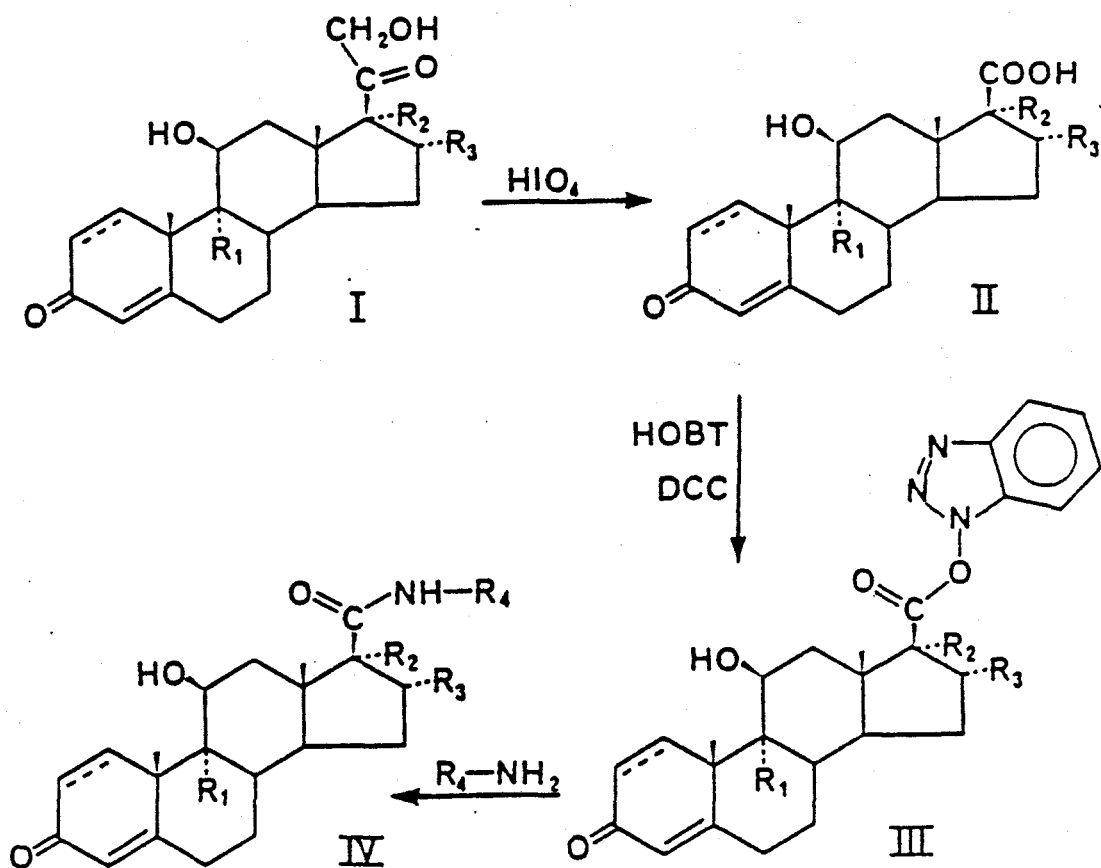


excès d'amine, la solution jaunit et dégage une odeur caractéristique. Ceci correspond très vraisemblablement à la formation d'une énamine par réaction de la fonction cétone en 3 du stéroïde avec l'amine primaire (Heyl 1953).

b) Méthode des esters activés à l'hydroxybenzotriazole

L'échec de la méthode à la dicyclohexylcarbodiimide et les conseils avisés d'un collègue chimiste nous ont amené à envisager l'utilisation du N-hydroxybenzotriazole (HOBT) comme agent de couplage. König et Geiger (1970) ont les premiers proposé l'utilisation de l'HOBT comme additif convenable à la méthode à la DCC en synthèse peptidique. Dans ce cas, la présence d'HOBT évite la formation de N-acylurée et autorise de bons rendements. Nous avons adopté leur procédure en deux étapes (Figure 53). L'activation du stéroïde 17 β -carboxylique est d'abord menée en présence d'un léger excès de DCC et d'HOBT et suivie en chromatographie sur couche mince. Une tache transitoire, très vraisemblablement l'anhydride de l'acide (II_a) est observée immédiatement et diminue rapidement au fur et à mesure que l'ester activé (III) apparaît. La N-acylurée (VI) n'est jamais obtenue.

La réaction est complète en quelques heures. Après élimination du précipité de DCU une quantité stoechiométrique d'amine est ajoutée. La formation de l'amide a lieu alors à une vitesse qui dépend de la nature de l'amine ; elle est habituellement complète après 12 à 24 heures à 4°. L'amide est obtenu avec un rendement de 60 à 75 %. Une température excessive doit être évitée pour prévenir la formation d'énamine en C₃. Au début nous évitions aussi d'utiliser un excès d'amine dans ce but. Mais à l'expérience, il nous est apparu que dans le cas de stéroïdes assez peu solubles dans le dichlorométhane et donc assez fortement dilués au moment du couplage, une quantité stoechiométrique d'amine aboutissait à une concentration faible de cette amine avec pour corollaire une vitesse d'aminolyse assez lente. Dans ce cas, la réduction du volume réactionnel après activation à l'HOBT et l'addition d'un excès important d'amine (10 fois) pendant une durée très brève (quelques minutes) à 0° suffit à produire une aminolyse complète de l'ester



Composé	N°	l ene	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Ia		-	H	H	H	
IIa		-	H	H	H	
IIIa		-	H	H	H	
IVa		-	H	H	H	(CH ₂) ₂ -CH ₃
Ib		-	H	OH	H	
IIb		-	H	OH	H	
IVb		-	H	OH	H	(CH ₂) ₂ -CH ₃
Ic		+	F	H	CH ₃	
IIc		+	F	H	CH ₃	
IVc		+	F	H	CH ₃	(CH ₂) ₂ -CH ₃
Id		+	F	OH	CH ₃	
IIId		+	F	OH	CH ₃	
IVd	= 2	+	F	OH	CH ₃	CH ₃
IVe	= 4	+	F	OH	CH ₃	(CH ₂) ₂ -CH ₃
IVf	= 7	+	F	OH	CH ₃	(CH ₂) ₅ -CH ₃
IVh	= 10	+	F	OH	CH ₃	CH ₂ -CH-(CH ₃) ₂
IVi	= 32	+	F	OH	CH ₃	(CH ₂) ₂ -NH-(CH ₂) ₂ -CH ₃
IVj	= 16	+	F	OH	CH ₃	CH ₂ -C ₆ H ₅
IVk	= 17	+	F	OH	CH ₃	(CH ₂) ₂ -C ₆ H ₅

Figure 53 - Méthode de couplage à l'HOBT. La numérotation arabe des composés renvoie au tableau XI.

activé (III) sans formation notable d'énamine. Ceci s'applique particulièrement aux stéroïdes 3-oxo-1-4-androstane-3,11-dione dont la cétone en 3 est nettement moins réactive que celle des 3-oxo-4-androstène. Cette variante a également été utilisée pour préparer des 17 β -carboxamides portant une fonction amine libre à partir de diamine en excès (pour éviter la formation de bistéroïdes par réaction des deux côtés de la diamine). Le solvant utilisé pour les réactions d'activation et de couplage est le dichlorométhane ou le tétrahydrofurane.

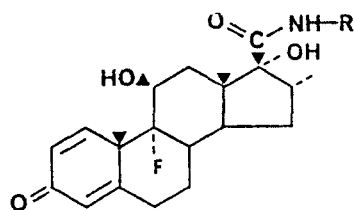
La méthode des esters activés à l'HOBt en présence de DCC apparaît ainsi tout à fait adaptée au couplage des stéroïdes 17 β -carboxyliques avec des amines primaires et nous a permis de préparer toute une série de dérivés 17 β -carboxamides. Les caractéristiques de certains d'entre eux sont résumées sur les tableaux X et XI. Pour tous ces produits à l'exception du dérivé 13, l'amine primaire correspondante était disponible sur le marché. L'isohexylamine nécessaire à la préparation du dérivé 13 a été préparée à partir de l'alcool isoamylique. La synthèse a comporté une première étape de préparation du chlorure d'isoamyle par action du chlorure de thionyle sur l'alcool isoamylique en présence de pyridine. Le chlorure d'isoamyle a ensuite conduit à l'isocapronitrile sous l'action du cyanure de potassium à chaud dans le diméthylsulfoxyde. L'isocapronitrile a enfin été hydrogéné dans une bombe d'hydrogénation en présence de nickel de Raney en solution dans l'alcool éthylique saturé en ammoniac pour éviter la formation d'amines secondaires. L'isohexylamine obtenue a été purifiée par distillation.

Les 17 β carboxamides ont été purifiés par recristallisation et soumis à une série de contrôles analytiques : chromatographie en couche mince dans deux systèmes différents, chromatographie liquide à haute pression sur colonne en phase inverse avec contrôle à 210 et 254 nm, spectrophotométrie infra-rouge et détermination du point de fusion. Tous les produits présentent d'après ces critères un taux de pureté supérieur à 97 %. Chaque fois qu'il existait un doute sur la nature du produit formé un contrôle par spectrométrie de masse a été effectué.

Compound	Melting Point	R_F		IR spectrum (KBr in cm^{-1})	Formula	Elemental analysis Calcd			Found		
		(E_1)	(E_2)			C	H	N	C	H	N
IVb	226	0.07	0.82		$\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{NO}_4$	70.92	9.06	3.60	70.71	9.05	3.47
IVc	247	0.17	0.83	1670, 1630, 1550	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{FNO}_3$	71.43	8.49	3.47	71.18	8.79	3.65
IVd 2	> 260	0.03	0.61	1670, 1630, 1540	$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{FNO}_4$	67.50	7.72	3.58	67.10	7.69	3.52
IVe 4	> 260	0.11	0.79	1670, 1650, 1530	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{FNO}_4$	68.71	8.17	3.34	68.88	8.28	3.18
IVf 7	229	0.25	0.84	1670, 1630, 1530	$\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{FNO}_4$	70.25	8.73	3.03	70.24	8.75	3.24
IVg 8	199	0.28	0.86	1670, 1630, 1525	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{FNO}_4$	71.53	9.21	2.78	71.25	9.01	2.79
IVh 10	> 260	0.58	0.92	1670, 1650, 1525	$\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{FNO}_4$	69.27	8.37	3.23	69.12	8.30	3.23
IVi 32	206 (decomp)	0.00	0.64	1670, 1620, 1520	$\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{FN}_2\text{O}_4$	67.51	8.50	6.06	67.81	8.92	5.85
IVj 16	> 260	0.21	0.83	1670, 1630, 1520	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{FNO}_4$	71.92	7.33	3.00	72.23	7.53	3.08
IVk 17	256	0.19	0.82	1670, 1630, 1525	$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{FNO}_4$	72.23	7.53	2.91	71.90	7.48	2.84

Mass spectrum (70 eV) m/e (rel. intensity) : IVd, 391(19), 371(11.8), 121(100) ; IVf, 461(24.9), 441(5), 121(100) ; IVh, 433(13.8), 413(9.3), 121(100) ; IVi, 463(1.7) ; 121(11.6), 72(100) ; IVj, 467(23), 447(4.8), 91(100).

TABLEAU X - Données analytiques concernant des stéroïdes 17β -carboxamides préparés comme (IVa).
(les symboles sont les mêmes que sur la figure 53 et le tableau XI).
D'après Formstecher (1980).



Composé de type VIII n°	R	Formule brute	Point de fusion	R _F		Spectre IR (KBr) en cm ⁻¹	Taux de pureté analytique en HPLC	
				E ₁	E ₂		210nm	254 nm
1	H	C ₂₁ H ₂₈ FNO ₄	> 260	0,06	0,52	1670, 1630, 1580	> 99	> 99
2	CH ₃	C ₂₂ H ₃₀ FNO ₄	> 260	0,11	0,73	1670, 1630, 1540	> 99	> 99
3	CH ₂ CH ₃	C ₂₃ H ₃₂ FNO ₄	> 260	0,21	0,82	1660, 1620, 1515	> 99	> 99
4	(CH ₂) ₂ -CH ₃	C ₂₄ H ₃₄ FNO ₄	> 260	0,32	0,85	1670, 1650, 1530	> 99	> 99
5	(CH ₂) ₃ -CH ₃	C ₂₅ H ₃₆ FNO ₄	> 260	0,41	0,87	1670, 1650, 1535	> 99	> 99
6	(CH ₂) ₄ -CH ₃	C ₂₆ H ₃₈ FNO ₄	252	0,46	0,88	1680, 1640, 1540	> 99	> 99
7	(CH ₂) ₅ -CH ₃	C ₂₇ H ₄₀ FNO ₄	229	0,52	0,87	1670, 1630, 1530	98	> 99
8	(CH ₂) ₈ -CH ₃	C ₃₀ H ₄₆ FNO ₄	192	0,56	0,87	1670, 1650, 1530	> 99	> 99
9	CH-(CH ₃) ₂	C ₂₄ H ₃₄ FNO ₄	> 260	0,34	0,86	1670, 1630, 1525	> 99	> 99
10	CH ₂ -CH-(CH ₃) ₂	C ₂₅ H ₃₆ FNO ₄	> 260	0,42	0,88	1670, 1650, 1525	> 99	> 99
11	C-(CH ₃) ₃	C ₂₅ H ₃₆ FNO ₄	> 260	0,56	0,82	1670, 1650, 1525	> 99	> 99
12	(CH ₂) ₂ -CH-(CH ₃) ₂	C ₂₆ H ₃₈ FNO ₄	> 260	0,47	0,91	1670, 1640, 1520	> 99	> 99
13	(CH ₂) ₃ -CH-(CH ₃) ₂	C ₂₇ H ₄₀ FNO ₄	> 260	0,51	0,89	1670, 1650, 1530	> 99	> 99
14	CH ₂ -C≡CH	C ₂₄ H ₃₀ FNO ₄	192	0,35	0,70	1670, 1630, 1520	98	> 99
15	CH ₂ -CH ₂ Cl	C ₂₃ H ₃₁ ClFNO ₄	256	0,32	0,82	1670, 1630, 1520	> 99	> 99
16	CH ₂ -C ₆ H ₅	C ₂₈ H ₃₄ FNO ₄	265	0,48	0,88	1670, 1630, 1520	> 99	> 99
17	(CH ₂) ₂ -C ₆ H ₅	C ₂₉ H ₃₆ FNO ₄	256	0,45	0,89	1670, 1630, 1525	> 99	> 99
18	-CH-(C ₆ H ₅)CH ₂ OH	C ₂₉ H ₃₆ FNO ₅	245	0,13	0,76	1670, 1630, 1520	> 99	> 99
19	-CH-(CH ₂ -C ₆ H ₅) COO CH ₃	C ₃₁ H ₃₈ FNO ₆	186	0,50	0,92	1720, 1660, 1630, 1490	> 99	> 99
20	CH ₂ -CH ₂ OH	C ₂₃ H ₃₂ FNO ₅	> 260	0,02	0,55	1670, 1620, 1535	> 99	> 99
21	CH ₂ -C≡N	C ₂₃ H ₂₉ FN ₂ O ₄	214	0,16	0,64	1670, 1630, 1510	> 99	> 99
22	CH-(CH ₂) ₅	C ₂₇ H ₃₈ FNO ₄	> 260	0,52	0,89	1670, 1630, 1525	> 99	> 99
23	CH ₂ -CH(OC ₂ H ₅) ₂	C ₂₇ H ₄₀ FNO ₆	180	0,30	0,90	1670, 1630, 1530	> 99	> 99
24	CH ₂ -COOCH ₃	C ₂₄ H ₃₂ FNO ₆	252	0,19	0,82	1750, 1665, 1620, 1520	> 99	> 99
25	CH ₂ -COOH	C ₂₃ H ₃₀ FNO ₆	> 260	0	0,04	1740, 1670, 1620, 1520	> 99	> 99
26	(CH ₂) ₅ -COOH	C ₂₇ H ₃₈ FNO ₆	décomposi- tion	0	0,09	1720, 1670, 1630, 1530	> 99	> 99
27	(CH ₂) ₂ -NH ₂	C ₂₃ H ₃₃ FN ₂ O ₄	> 260	0	0,30	1670, 1600, 1510	> 99	> 99
28	(CH ₂) ₄ -NH ₂	C ₂₅ H ₃₇ FN ₂ O ₄	décomposi- tion	0	0,38	1670, 1630, 1540	97	> 99
29	(CH ₂) ₆ -NH ₂	C ₂₇ H ₄₁ FN ₂ O ₄	230	0	0,56	1670, 1630, 1530	98	> 99
30	(CH ₂) ₈ -NH ₂	C ₂₉ H ₄₅ FN ₂ O ₄	250	0	0,67	1660, 1620, 1520	> 99	> 99
31	(CH ₂) ₉ -NH ₂	C ₃₀ H ₄₇ FN ₂ O ₄	218	0	0,71	1660, 1620, 1510	> 99	> 99
32	(CH ₂) ₂ -NH-(CH ₂) ₂ CH ₃	C ₂₆ H ₃₉ FN ₂ O ₄	206	0	0,75	1670, 1620, 1520	> 99	> 99
35	CH ₂ -C ₆ H ₄ -3OCH ₃	C ₂₉ H ₃₆ FNO ₅	216	0,43	0,89	1670, 1600, 1520	> 99	> 99
37	CH ₂ -C ₆ H ₄ -4NO ₂	C ₂₈ H ₃₃ FN ₂ O ₆	225	0,38	0,86	1670, 1620, 1530	> 99	> 99
39	3CH ₂ -C ₅ H ₄ N	C ₂₇ H ₃₃ FN ₂ O ₄	175	0	0,86	1670, 1630, 1520	> 99	> 99
40	4CH ₂ -C ₅ H ₄ N	C ₂₇ H ₃₃ FN ₂ O ₄	188	0	0,79	1660, 1610, 1510	> 99	> 99
41	CH ₂ -C ₁₀ H ₉ Fe	C ₃₂ H ₃₈ F Fe NO ₄	188	0,57	0,92	1660, 1610, 1500	> 99	> 99

TABLEAU XI - Données structurales et analytiques relatives à quelques 17β-carboxamides de la dexaméthasone.

2 - L'INTERACTION DES STEROIDES 17 β -CARBOXAMIDES AVEC LE RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES SE FAIT AU NIVEAU DU SITE DE LIAISON DU STEROIDE

Nous avons étudié l'interaction de divers 17 β -carboxamides radioactifs ou non, obtenus à partir de stéroïdes différents, avec le récepteur des glucocorticoïdes du rat surrénalectomisé. De plus, nous avons procédé à l'étude radiocristallographique de deux 17 β -carboxamides de la dexaméthasone. Le but de ces études préliminaires était de vérifier que le mode d'interaction des 17 β -carboxamides avec le récepteur était le même que celui du stéroïde parent, en dehors bien sûr de la région du site de liaison au stéroïde située en regard de la chaîne latérale 17 β , lieu de la modification structurale apportée au stéroïde. Cette vérification était importante pour la suite de l'investigation qui postule qu'une série homologue de 17 β -carboxamides préparés à partir du même stéroïde, la dexaméthasone, est un outil à même de nous fournir des renseignements sur la région précise du site de liaison du récepteur située en regard de la chaîne 17 β lors de son interaction avec la dexaméthasone, stéroïde agoniste de référence.

2.1. Le modèle expérimental

a) Choix du tissu source de récepteur

C'est un problème important. Nous avons initialement travaillé sur le foie, mais ce tissu apparaît comme un mauvais candidat pour la détermination des caractéristiques de liaison stéroïde-récepteur à glucocorticoïdes. En effet, le foie contient de la transcortine et des enzymes du métabolisme des stéroïdes. Ces diverses protéines interfèrent avec le récepteur pour la liaison du stéroïde testé, et l'importance de ces interférences dépend considérablement de la structure du stéroïde considéré. Un stéroïde comme le cortisol qui se lie très bien à la transcortine présente une affinité apparente (mesurée par compétition contre de l'acétonide de triamcinolone [^3H], spécifique du récepteur) plus faible dans le foie que dans un tissu dépourvu de transcortine. Le problème du métabolisme éventuel du stéroïde est également à considérer : dans du cytosol hépatique à 0°, la dégradation du cortisol est importante (Raynaud 1980). Ceci nous a amené à utiliser maintenant le thymus comme source de récepteur.

Ce tissu ne contient en effet pas de transcortine et n'est le siège d'apparemment aucun métabolisme des stéroïdes.

b) Caractéristiques principales du protocole expérimental

Les rats sont surrénalectomisés puis sacrifiés 3 à 6 jours plus tard (ils reçoivent de l'eau salée à 9 g/l durant ces quelques jours). Les foies sont prélevés, soigneusement rincés au tampon à 0° avant d'être homogénéisés. Le tampon contient du Tris (20 mM), du 2-mercaptoéthanol (20 mM), du molybdate de sodium (10 mM) et du glycérol (20 %). La présence de glycérol et surtout de mercaptoéthanol et de molybdate est justifiée par les propriétés stabilisatrices du récepteur de ces deux ingrédients (voir partie bibliographique II,2.1). L'homogénat est centrifugé une heure à 105 000 g à + 4°. Le surnageant obtenu constitue le cytosol. Celui-ci est utilisé le jour même, après réajustement du pH à 7,4 et dilution de façon à obtenir un milieu contenant 3 à 6 mg de protéines/ml. Les incubations avec les stéroïdes sont réalisées en double à 0°. Le dosage de l'activité de liaison est obtenu par une méthode au charbon dextran. Dans les conditions utilisées, le récepteur est stable au moins 24 heures à 0°.

2.2. Mode d'interaction des 17 β -carboxamides pour le récepteur d'après les études par compétition

a) Conditions expérimentales

Tous les produits ont été testés selon un protocole où des quantités croissantes de stéroïde à tester ont été ajoutées à des échantillons de cytosol en présence d'une concentration constante d'acétonide de triamcinolone [³H] (35 nM). Le degré de compétition a été mesuré après deux heures et dix neuf heures d'incubation pour la plupart des produits.

Un certain nombre de produits ont également bénéficié d'une étude de compétition à concentration constante de stéroïde compétiteur en présence d'une concentration variable en stéroïde de référence, avec représentation en double inverse. La durée des incubations était de deux heures dans ces expériences.

b) Résultats

Dans un premier temps nous avons comparé l'affinité des produits d'oxydation périodique de quatre glucocorticoïdes et de leurs dérivés 17 β -carboxamides obtenus par couplage avec la propylamine à l'affinité des stéroïdes de départ (Tableau XII). Il apparaît que l'affinité des glucocorticoïdes diminue considérablement après oxydation périodique en dérivé 17 β -carboxylique pour réaugmenter après greffage d'un bras aliphatique au moyen d'une liaison amide, sans toutefois atteindre l'affinité du produit de départ. Le rapport des affinités des stéroïdes de départ est grossièrement retrouvé chez leurs dérivés acides et amides, ce qui était logiquement attendu : les stéroïdes de synthèse présentant l'affinité la plus élevée pour le récepteur donne les dérivés amides les plus actifs. L'influence de la nature du stéroïde de départ a également été étudiée sur cinq dérivés carboxamides à la benzylamine obtenus à partir de stéroïdes différents (Tableau XIII). Ici encore le rapport des affinités des stéroïdes de départ est grossièrement retrouvé chez les 17 β -carboxamides. En particulier, l'effet défavorable de l'hydroxyl en 17 α est conservé malgré l'absence de carbone en position 21, ce qui est en faveur d'une influence spécifique de cet hydroxyl sur l'orientation de la cétone en 20 du même type que celle observée dans la série du prégnène (Rousseau 1977, voir partie bibliographique II, 1.2). D'autre part, les expériences de liaison menées à concentration variable de stéroïde radioactif de référence en l'absence ou en présence d'une concentration fixe de 17 β -carboxamide froid ont montré des courbes d'inhibition de liaison de type compétitif (figure 54). Ces résultats sont en faveur d'un mode d'interaction des 17 β -carboxamides avec le récepteur où la molécule de stéroïde se positionne dans le site de liaison d'une manière similaire à celle du stéroïde parent.

Série	Chaîne latérale					
	-COCH ₂ OH		-COOH		-CONH(CH ₂) ₂ CH ₃	
	K _A	%	K _A	%	K _A	%
Dexaméthasone	0,7.10 ⁸	100	< 10 ⁵		0,44.10 ⁷	100
Désoxymétasone	1,5.10 ⁸	214	< 10 ⁵		0,48.10 ⁷	110
Cortisol	0,136.10 ⁸	19	< 10 ⁵		0,091.10 ⁷	21
Corticostérone	0,104.10 ⁸	15	< 10 ⁵		0,024.10 ⁷	6

TABLEAU XII- Affinité comparée pour le récepteur du foie de rat de divers stéroïdes avant et après oxydation périodique en acide 17 β -carboxylique et greffage de la propylamine pour donner des dérivés 17 β -carboxamides.

	K _i μ M foie rat 2 h., 0°C	K _i μ M HTC 18 h., 0°C
DXB	0,11	0,27
DMB	0,06	0,20
Pred-B	0,33	2,5
DCAC-B	3,60	3,1
HCAC-B	0,46	1,34

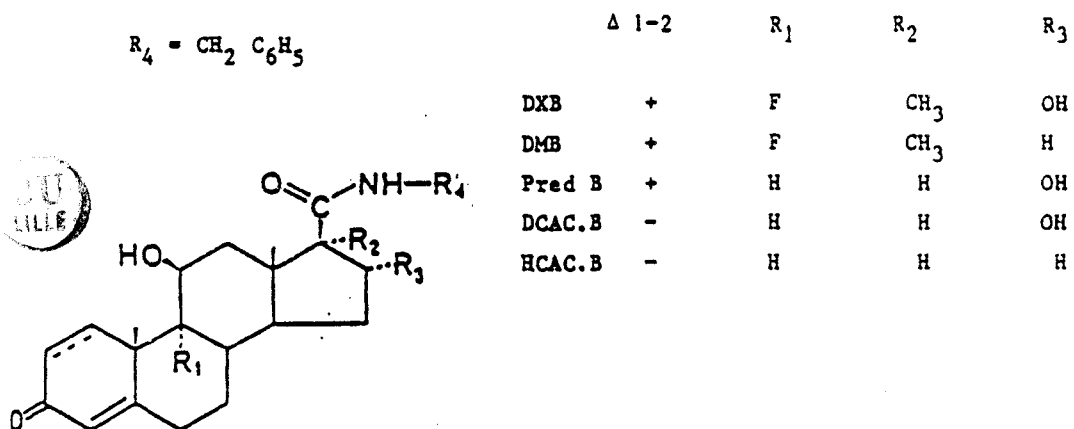


TABLEAU XIII- Affinité comparée pour le récepteur du foie de rat des cellules d'hépatome HTC de cinq 17 β -carboxamides obtenus à partir de stéroïdes différents et greffés avec la benzylamine.

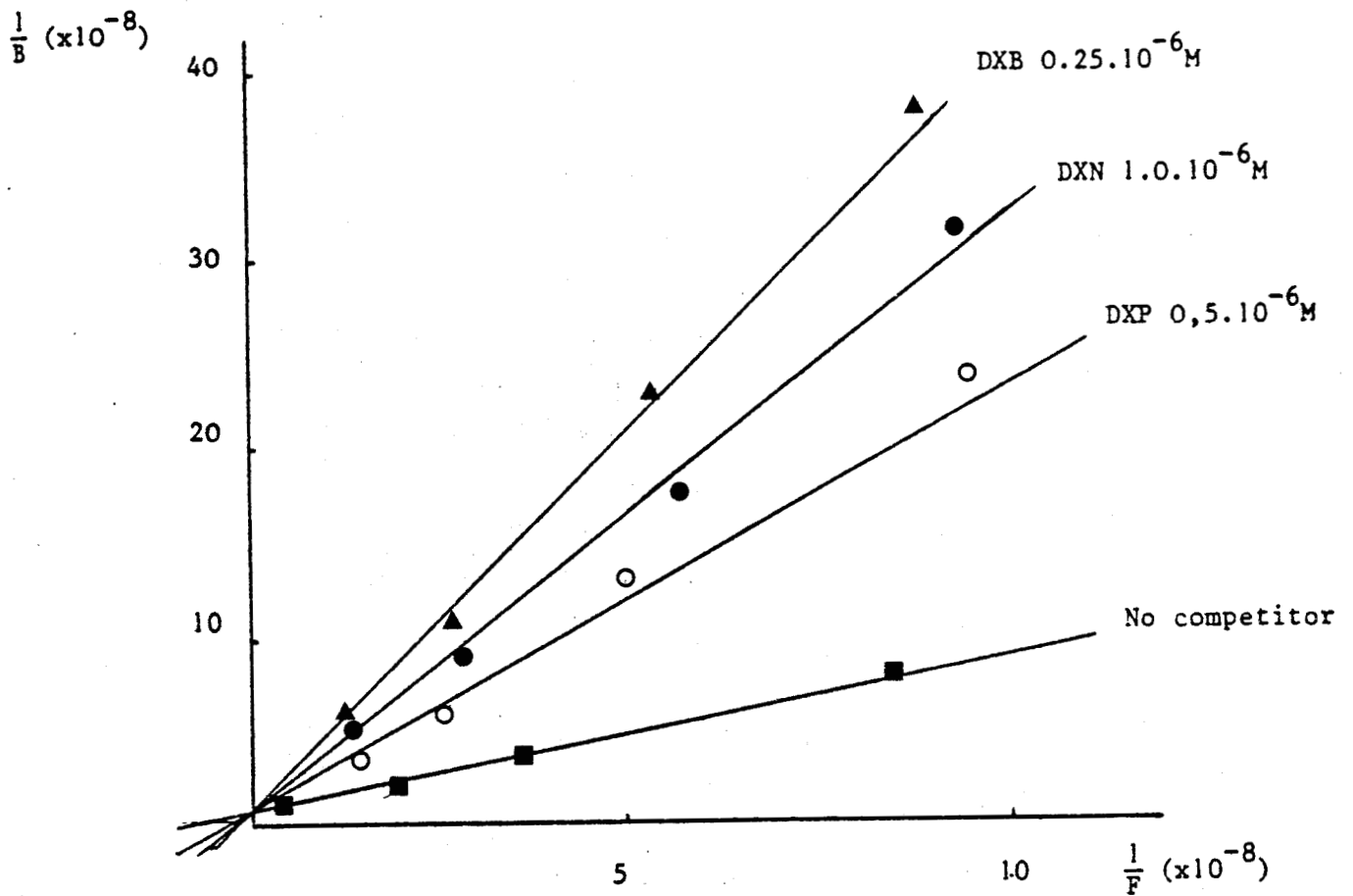


Figure 54 - Inhibition compétitive de la liaison de la $[^3\text{H}]$ Dexaméthasone au récepteur des glucocorticoïdes du foie de rat en présence de divers 17 β -carboxamides. Les notations DXP, DXN et DXB correspondent respectivement aux dérivés 4, 8 et 16 du tableau.



2.3. Interaction directe du récepteur avec un 17β -carboxamide tritié, le DXB (dérivé 16 du Tableau XI).

Nous rapportons ici des résultats préliminaires obtenus avec le DXB tritié à haute activité spécifique préparé par nos soins à partir de dexaméthasone tritiée du commerce. Cette préparation a nécessité des modifications du protocole de synthèse des 17β -carboxamides avec mise au point d'un protocole de séparation par chromatographie liquide à haute pression en phase inverse.

a) Constante de dissociation à l'équilibre

Elle a été mesurée à $0,07 \mu\text{M}$ après deux heures d'incubation à 0° (Figure 55). Cette valeur est en accord avec celle mesurée par compétition ($0,11 \mu\text{M}$). La liaison concerne un nombre de sites égal à celui mesuré avec la dexaméthasone tritiée.

b) Aspects cinétiques

La cinétique d'association est représentée sur la figure 56. La constante de vitesse d'association à 0° est voisine de $0,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ mn}^{-1}$, ce qui est tout à fait comparable aux valeurs obtenues pour les stéroïdes étudiés à ce jour (cf supra partie bibliographique, tableau II).

La cinétique de dissociation obtenue à 0° par addition d'un excès de DXB froid à un échantillon de cytosol préincubé deux heures avec du $[^3\text{H}]$ DXB, est représentée sur la figure 57. On observe une courbe de dissociation à deux pentes.

La première pente correspond à une constante de vitesse de dissociation de $28 \cdot 10^{-3} \text{ mn}^{-1}$, de l'ordre de celle qu'on observe pour la progestérone (cf supra tableau II). La deuxième pente est d'interprétation plus délicate. Il peut s'agir soit d'un artefact, soit d'une fraction de récepteur lié au $[^3\text{H}]$ DXB présent sous forme activée.

En conclusion, le DXB tritié se lie vraisemblablement au même site récepteur que la dexaméthasone ou l'acétonide de triamcinolone tritiés.

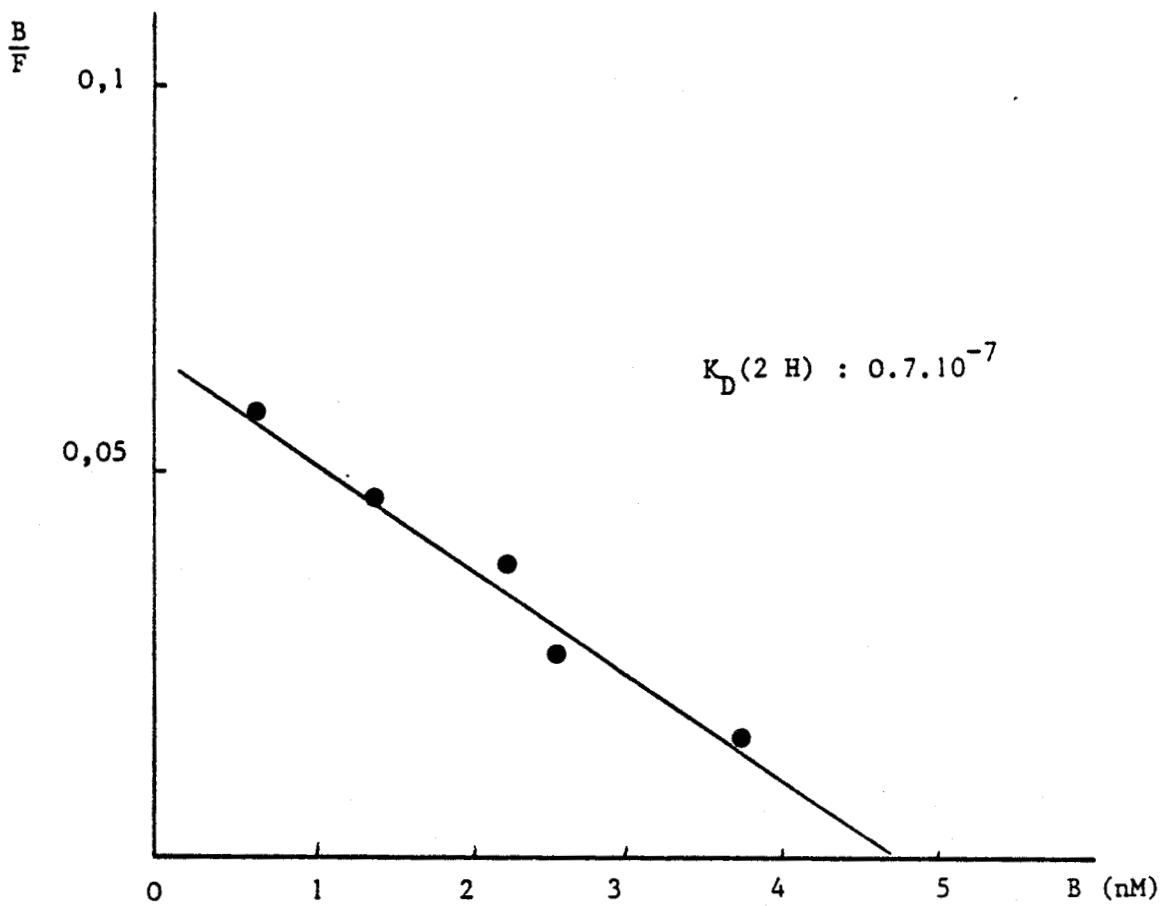


Figure 55 - Interaction $[^3\text{H}]$ DXB-récepteur hépatique du rat.
Diagramme de Scatchard après 2 h à 0° .



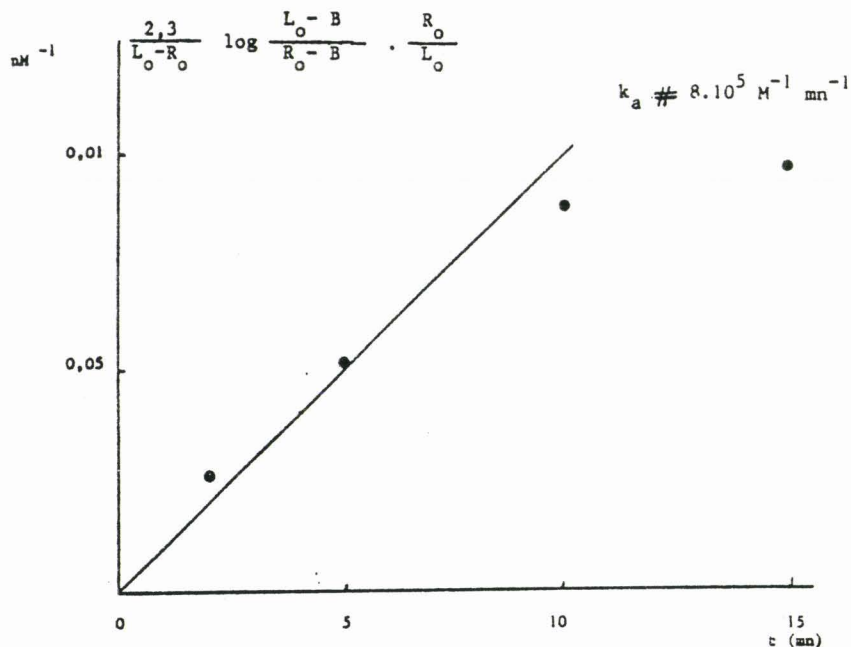


Figure 56 - Cinétique d'association du $[^3\text{H}]$ DXB 30 nM au récepteur hépatique du rat. Linéarisation.

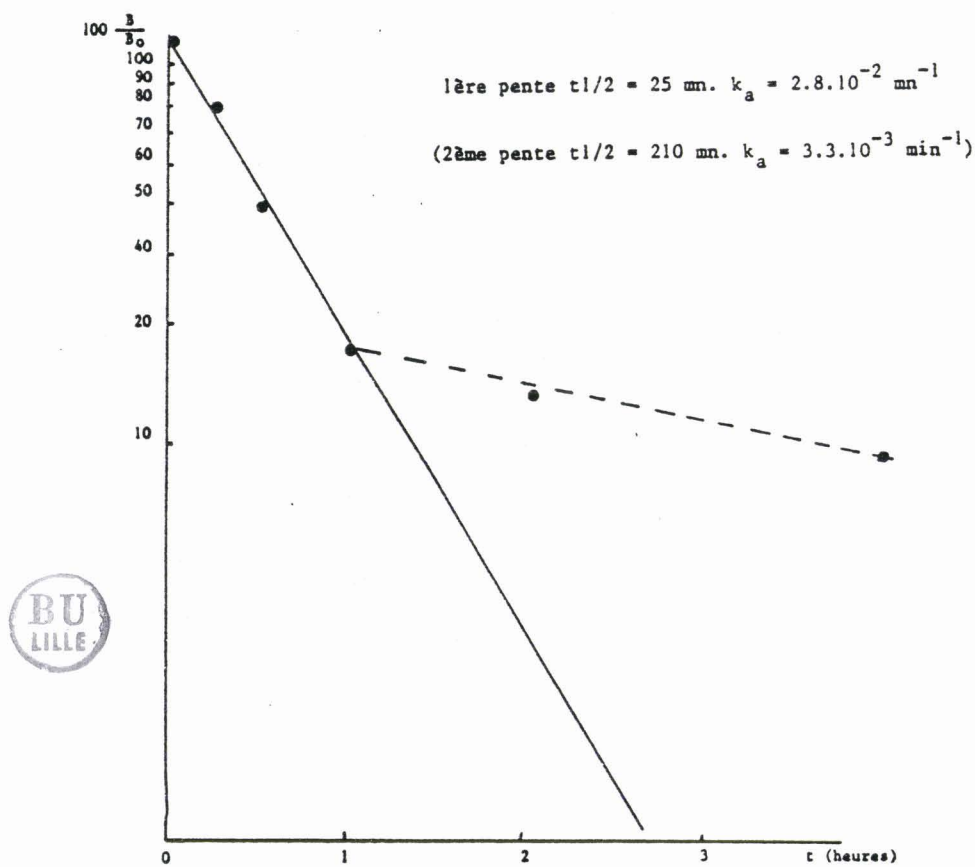
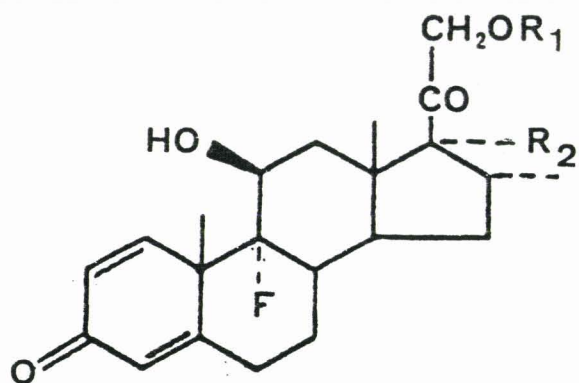


Figure 57 - Cinétique de dissociation du complexe $[^3\text{H}]$ DXB-récepteur.

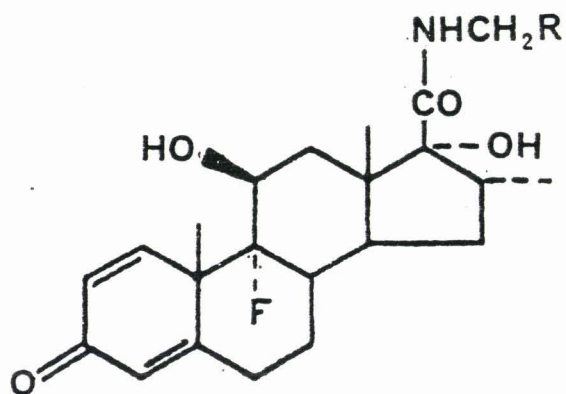
2.4. Structure radiocristallographique comparée de deux 17 β -carboxamides de la dexaméthasone et de la dexaméthasone

Nous avons étudié la **structure** cristallographique de deux 17 β -carboxamides dérivés de la dexaméthasone, les dérivés 4 et 16 du tableau XI, obtenus par couplage de la dexaméthasone oxydée respectivement avec la propylamine et la benzylamine (Figure 58). La structure tridimensionnelle de ces deux produits cristallisés dans le méthanol a été déterminée dans le laboratoire de cristallographie de l'Université de Lille I par L. Devos. Nous avons choisi de représenter les données de cette étude en suivant les recommandations de Duax (1975b) et d'exploiter de la même manière les résultats déjà publiés dans la littérature à propos de la structure de la dexaméthasone (Rohrer 1977) et de la 17 désoxyméthasone (Dupont 1974). La présentation standard recommandée par Duax permet en effet une comparaison facile et rapide de la structure de stéroïdes différents. Le détail de ces données est exposé en annexe avec la partie expérimentale. Nous discuterons ici les enseignements essentiels tirés de l'analyse comparative de la conformation des stéroïdes considérés.

a) La conformation générale d'un 17 β -carboxamide, le DXP, est illustrée par les deux ORTEP de la figure 59 tandis que la figure 60 montre les conformations respectives des quatre stéroïdes étudiés en projection sur un plan perpendiculaire au plan moyen des cycles B, C et D (plan moyen C₅-C₁₇). La forme générale des quatre molécules est très similaire avec un plan moyen parfaitement superposable et un cycle A pratiquement plan et incliné vers le bas. L'angle que fait le cycle A avec le plan moyen BCD est pratiquement le même dans le DXB, la dexaméthasone et la désoxyméthasone (tableau XIV) et la distance de l'oxygène 3 à ce plan moyen est presque identique pour les trois stéroïdes (2,18 à 2,24 Å). Le DXP se distingue par une inclinaison plus forte du cycle A vers le bas (50,4° contre 38°) ayant pour conséquence un éloignement considérable de l'oxygène 3 sous le plan moyen (- 3,12 Å). On peut cependant remarquer qu'une inclinaison forte du cycle A par rapport au plan moyen est également



R ₁	R ₂	Stéroïde
H	H	Désoxyméthasone
H	OH	Dexaméthasone
COCH ₃	OH	Acétate de dexaméthasone



R	Stéroïde
CH ₂ CH ₃	DXP (4)
C ₆ H ₅	DXB (16)



Figure 58 - Structure comparée de la dexaméthasone, de son 21 acétate de la désoxyméthasone et de deux 17β-carboxamides dérivés de la dexaméthasone.

(Note : dans ces deux derniers produits, le carbone 21 est remplacé par un atome d'azote et le n° 21 a été donné au carbone du méthyl en 16β.

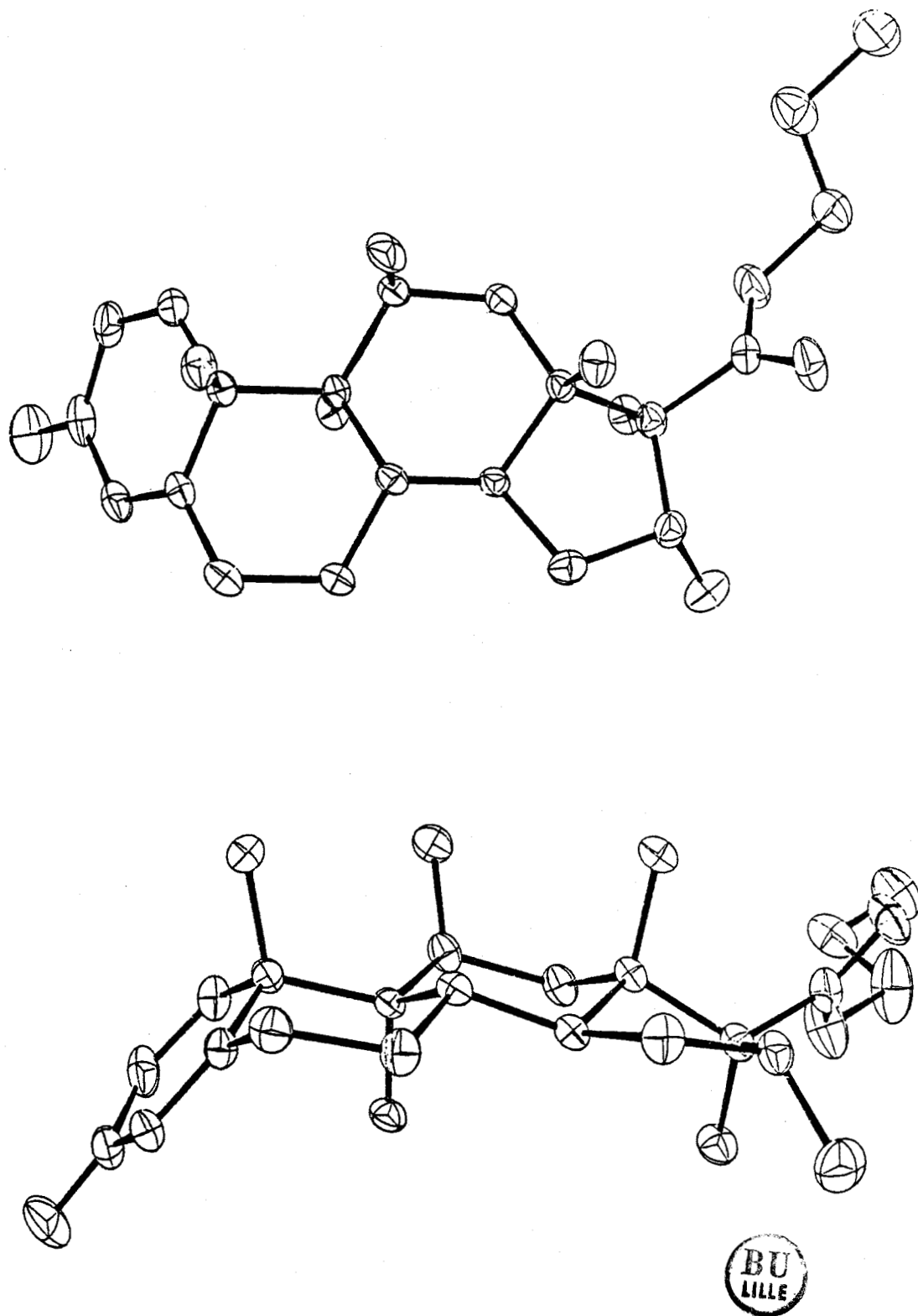


Figure 59 - Conformation générale du DXP. ORTEP de la molécule projetés selon Duax (1975b).

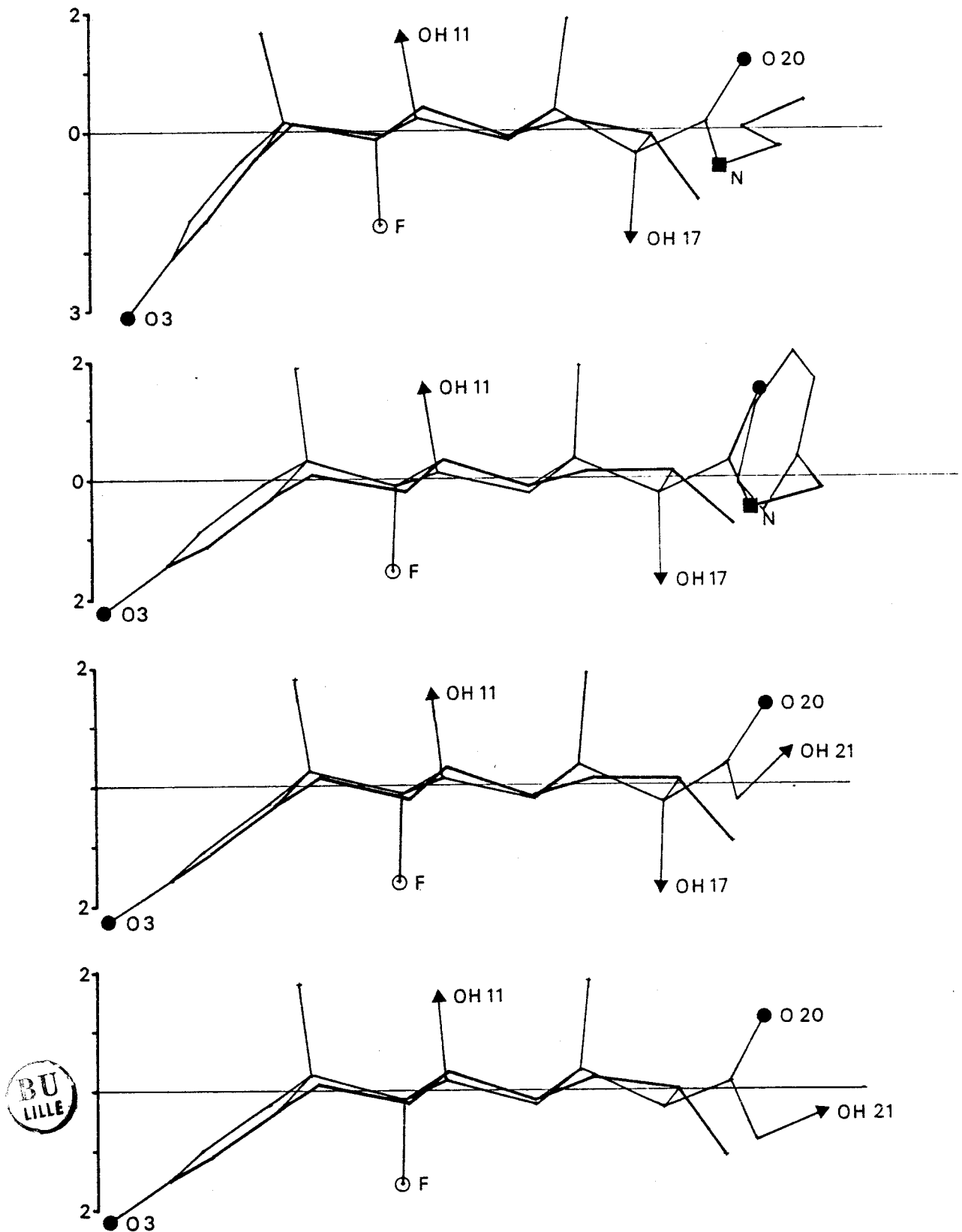


Figure 60 - Conformation comparée du DXP(a), du DXB(b), de la dexaméthasone (c) et de la désoximétasone (d). Projection sur le plan perpendiculaire au plan moyen $C_5 - C_{17}$ et à la direction $C_{12} - C_{14}$ (d'après Duax 1975b).

	STEROÏDE			
	Désoxyméthasone	Dexaméthasone	Acétate de Dexaméthasone	
		DXB	DXP	
Angle des plans moyens A/BCD (°)	- 36,4	- 37,4	- 37,6	- 50,4
Distance de O ₃ au plan moyen C ₅ C ₁₇ (Å)	- 2,19	- 2,24	- 2,57	- 3,12
Distance C ₃ C ₁₇ (Å)	8,30	8,31	8,27	7,92
Torsion C ₁₉ -C ₁₀ -C ₁₃ -C ₁₈ (°)	- 4,10	+ 0,45	- 6,6	- 0,28

TABLEAU XIV - Conformation générale comparée de deux carboxamides dérivés de la dexaméthasone (DXB et DXP) avec la dexaméthasone et la désoxyméthasone



observée dans l'acétate de dexaméthasone (O_3 à $-2,57 \text{ \AA}$ sous le plan, Terzis 1976) et dans le budesonide (O_3 à $-2,75 \text{ \AA}$ et angle A/BCD à $43,1^\circ$), un glucocorticoïde très actif présentant une double liaison en 1-2 (Albertsson 1978, voir aussi la figure 11).

La courbure générale du stéroïde est mesurée par la distance C_3-C_{17} qui apparaît remarquablement constante dans la dexaméthasone, son acétate, la désosimétasone et le DXB. Ici encore le DXP fait exception avec une courbure plus prononcée se traduisant par une distance C_3-C_{17} plus courte de $0,4 \text{ \AA}$. Cette courbure plus forte découle peut-être du système cristallin du DXP où des liaisons hydrogène intermoléculaires sont probablement engagées entre les OH 11 et 17 d'une même molécule et les oxygènes 3 et 20 de ses voisines. Le cycle D et le début de la chaîne latérale en 17 des quatre stéroïdes comparés apparaissent très superposables sur la figure 60. Enfin, la torsion de la molécule autour de son grand axe, mesurée par le "twist" des méthyles C_{18} et C_{19} (le pseudo angle de torsion $C_{19}C_{10}C_{13}C_{18}$) ne paraît pas subir de variation très significative (tableau XIV).

b) La conformation des cycles B, C et D est très voisine dans les quatre stéroïdes (tableaux XV et XVI). Les cycles B et C ont une conformation en chaise et le cycle D en enveloppe 13β avec une légère tendance à la déformation en demi-chaise $13\beta, 14\alpha$ pour la désosyméthasone et le DXP.

c) La chaîne latérale en 17 mérite une attention particulière car c'est à son niveau que se situe la différence de structure chimique entre les 17β -carboxamides et les stéroïdes de référence. La chaîne latérale des 17β -carboxamides commence avec le plan de la liaison amide comportant les carbones 17 et 20, l'oxygène 20, l'atome d'azote et le carbone 22 dont la disposition générale se rapproche de celle de la chaîne latérale de la dexaméthasone et de la désosyméthasone (figure 61). L'atome d'azote et le carbone 22 du 17β -carboxamide prennent la position occupée par le carbone et l'oxygène 21 de la dexaméthasone. Les angles de torsion impliquant les atomes de la chaîne latérale ont des valeurs très similaires dans les quatre stéroïdes et le plan moyen de la chaîne latérale est orienté de la même façon par rapport au plan moyen C_5C_{17} du noyau stéroïdien (tableau XVII).

Stéroïde	Cycle	Symétrie la moins bonne	Coefficient d'asymétrie	Symétrie la meilleure	Coefficient d'asymétrie	Angle de torsion moyen
Désoxyméthasone		ΔC_2^{5-6}	4,0	ΔC_S^7	0,9	54,5
Dexaméthasone	B	ΔC_S^7	3,0	ΔC_2^{5-6}	0,45	54,8
DXB		ΔC_2^{5-6}	9,0	ΔC_S^7	2,1	55,0
DXP		ΔC_2^{6-7}	11,7	ΔC_S^5	3,5	54,6
Désoxyméthasone		ΔC_S^8	9,3	ΔC_2^{9-11}	1,9	54,7
Dexaméthasone	C	ΔC_S^8	13,6	ΔC_2^{9-11}	1,2	53,5
DXB		ΔC_S^8	14,4	ΔC_2^{9-11}	1,7	53,1
DXP		ΔC_2^{8-9}	9,2	ΔC_S^{11}	2,3	53,4

TABLEAU XV - Conformation comparée des cycles B et C, distorsion autour de la structure en chaise dans deux 17 β -carboxamides et leurs stéroïdes de référence.

		Désoxyméthasone	Dexaméthasone	Dexaméthasone	DXB	DXP
Paramètres de pseudorotation (Altona 1968, Duax 1975b)	Δ	+ 18,8	+ 35,8	+ 26,3	+ 44,9	+ 22,6
	ϕ_{\max}	50,9	49	46,9	49,2	49,3
Paramètres d'asymétrie	ΔC_S^{13}	9,6	0,4		3,5	7,2
	ΔC_2^{13-14}	13,5			28,7	15,6
	ΔC_2^{13-17}				13,8	26,4

TABLEAU XVI- Conformation du cycle D

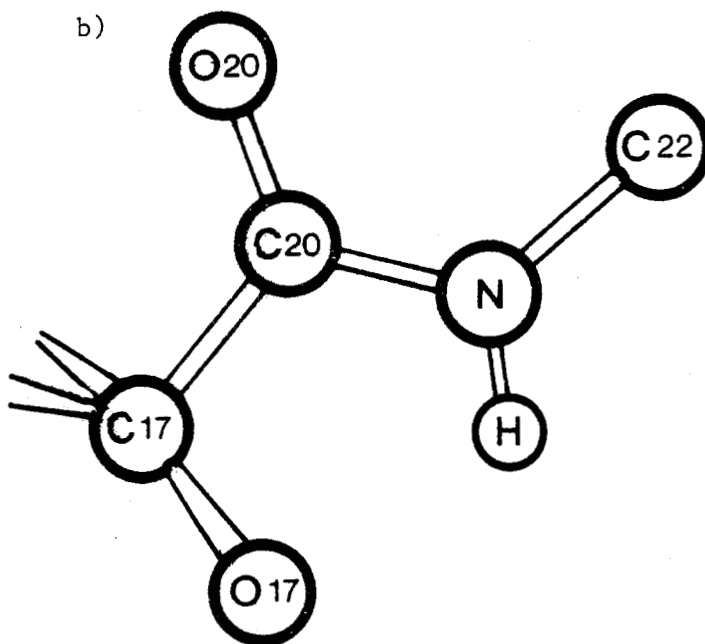
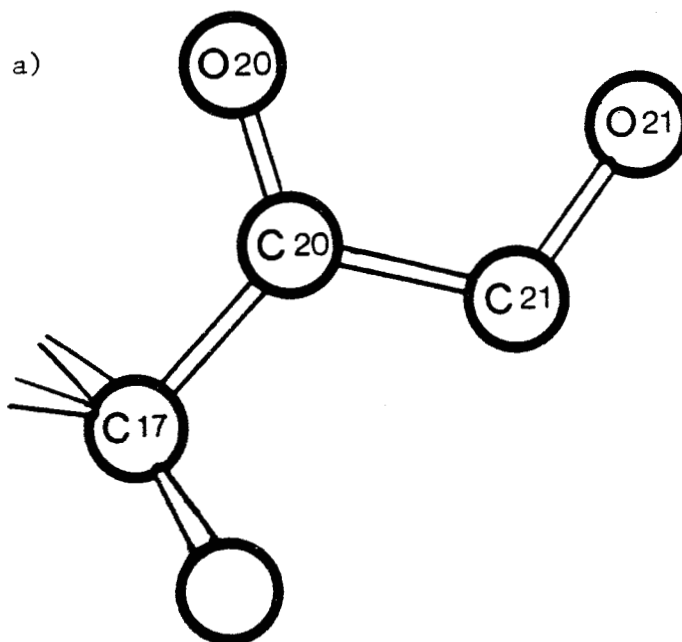


Figure 61 - Conformations respectives des chaînes latérales de la dexaméthasone (a) et du DXP (b) projetées sur le plan moyen de ces chaînes (plans $C_{17}C_{20}O_{20}C_{21}$ et $C_{17}C_{20}O_{20}N$ respectivement).

		Désoxy- méthasone	Dexamé- thasone	Acétate de dexa- méthasone	DXB	DXP
Angle de torsion	$C_{13}C_{17}C_{20}O_{20}$	74,4	90,5	86,2	77,3	82,7
	$C_{16}C_{17}C_{20}O_{20}$	-45,0	-23,6	-29,7	-37,5	-33,6
	$C_{13}C_{17}C_{20}C_{21}$	-103,5	-86,1	-95,0	-	-
	$C_{13}C_{17}C_{20}N$	-	-	-	-101,9	-97,0
	$C_{16}C_{17}C_{20}C_{21}$	137,1	159,8	149,1	-	-
	$C_{16}C_{17}C_{20}N$	-	-	-	143,4	146,7
	$O_{20}C_{20}C_{21}O_{21}$	4,65	-8,3	-	-	-
	$O_{20}C_{20}N C_{22}$	-	-	-	7,1	-4,8
	$C_{17}C_{20}C_{21}O_{21}$	-177,3	+ 168,5	-	-	-
	$C_{17}C_{20}N C_{22}$	-	-	-	-173,8	175,0
	$O_{17}C_{17}C_{20}C_{21}$		32,8			
	$O_{17}C_{17}C_{20}N$				20,9	24,0
<hr/>						
Angle du plan moyen de la chaîne latérale avec le plan C_5-C_{17}						
Plan	$C_{17}C_{20}O_{20}C_{21}$	66,7	53,5	-		
Plan	$C_{17}C_{20}O_{20}N$				64,6	56,3
<hr/>						
Distance des atomes au plan moyen de la chaîne latérale						
	O_{17}		-0,69		- 0,48	-0,56
	O_{21}	-0,07	+0,24			
	C_{22}				- 0,14	+0,11
<hr/>						

TABLEAU XVII - Conformation comparée de la chaîne latérale en 17β
de deux carboxamides de la dexaméthasone (DXP et DXB) avec la
dexaméthasone et la désoxyméthasone.

Le carbonyle de la liaison amide se projette au dessus du cycle D en éclipant pratiquement la liaison C₁₆C₁₇ comme le fait la cétone en 20 dans la dexaméthasone et la désoxyméthasone (Figure 62).

d) En conclusion, ainsi qu'on pouvait s'y attendre, les 17 β -carboxamides de la dexaméthasone présentent une conformation moléculaire très voisine de celle de la dexaméthasone. Ils interagissent probablement avec le récepteur de la même manière que la dexaméthasone pour ce qui est du cycle A, du noyau stéroïde et de ses substituants autres que la chaîne latérale. Au niveau de celle-ci, bien que sa nature soit profondément modifiée sur le plan chimique, l'orientation de départ est remarquablement conservée, en particulier pour le carbonyle en 20. On peut donc penser que les 17 β -carboxamides de la dexaméthasone vont se positionner dans le site de liaison du récepteur de la même façon que la dexaméthasone et que la variation de leur affinité de liaison avec la nature du radical substituant de l'azote s'explique par des différences d'interaction avec la même région du récepteur située en regard de la chaîne dihydroxyacétone des glucocorticoïdes actifs. Cette région, responsable pour une bonne part des effets agonistes de ces stéroïdes, (voir discussion dans la partie bibliographique II, 1.2 c)) peut ainsi être explorée avec une série homologue de 17 β -carboxamides de la dexaméthasone.

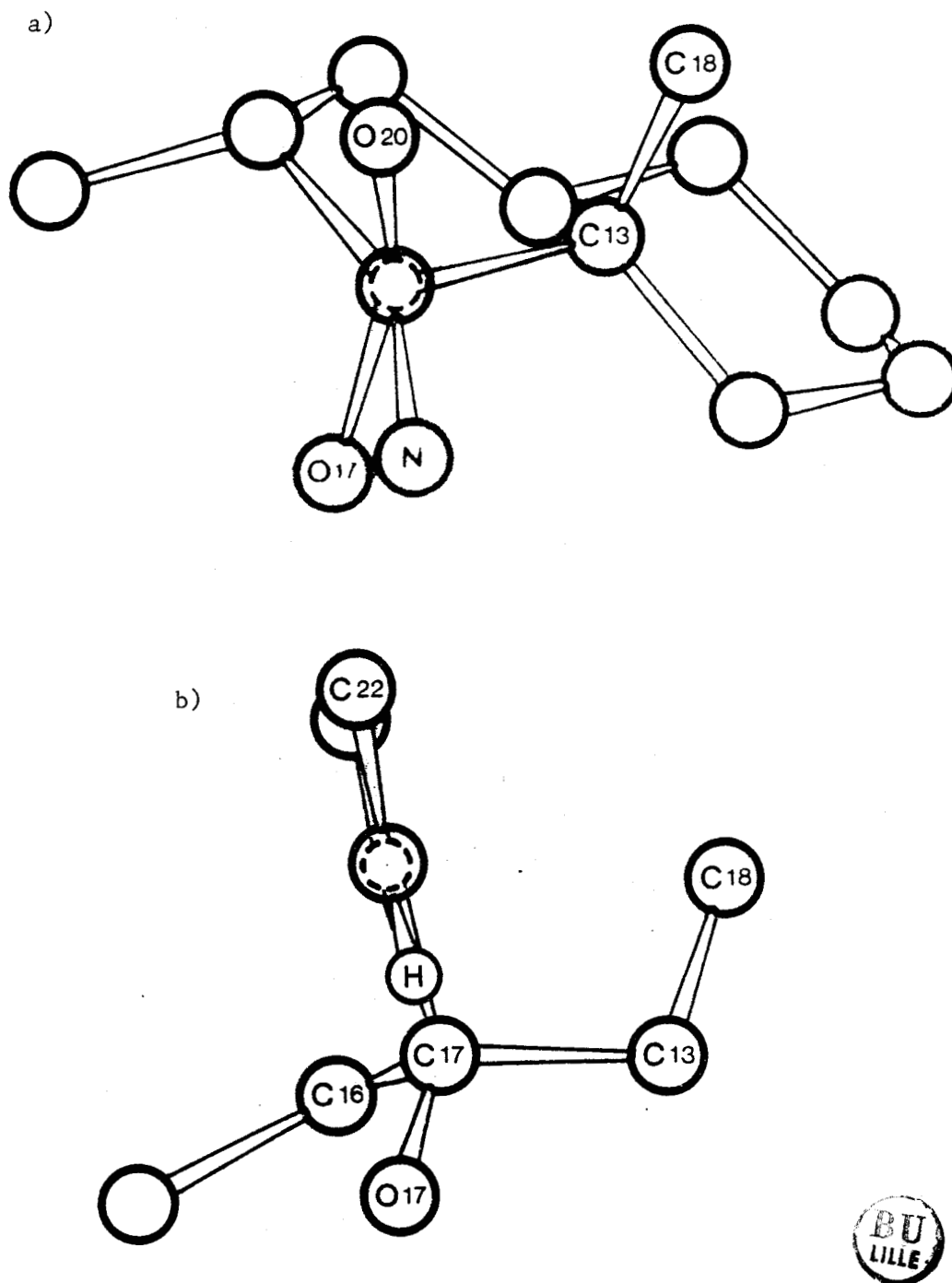


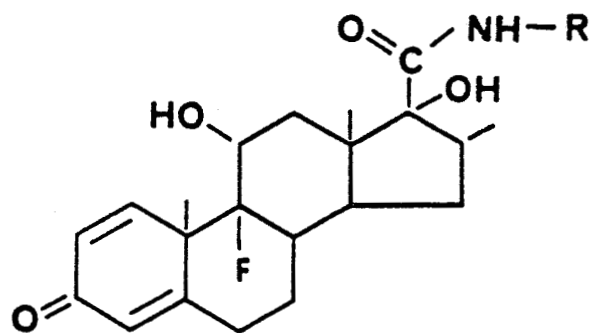
Figure 62 - Conformation de la chaîne latérale d'un 17 β -carboxamide, le DXP. Projections de Newman suivant C₂₀-C₁₇ (a) et N-C₂₀ (b).

3 - RELATION STRUCTURE-ACTIVITE DE LIAISON DES 17 β -CARBOXAMIDES DE LA DEXAMETHASONE

L'affinité pour le récepteur des glucocorticoïdes du thymus de rat surrénalectomisé a été mesurée pour une quarantaine de 17 β -carboxamides de la dexaméthasone synthétisés dans le laboratoire (Tableau XVIII). On peut classer ces produits en quatre catégories d'après la nature du substituant R porté par l'azote et distinguer les stéroïdes à chaîne latérale aliphatique linéaire ou ramifiée, portant une fonction ionisable ou non et les stéroïdes à chaîne latérale n'entrant pas dans ces trois premières catégories, en particulier ceux comportant un substituant aromatique. L'effet de la nature et de la longueur de la chaîne latérale sur l'affinité du 17 β -carboxamide obtenu a été exploré.

2.1. Stéroïdes à chaîne latérale linéaire aliphatique saturée

$R = - (CH_2)_n CH_3$ avec $n = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 8$ correspondant aux dérivés 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8. Quand on part du dérivé 1, la substitution de l'azote de l'amide primaire avec une chaîne aliphatique saturée de longueur croissante conduit d'abord à une amélioration de l'affinité (dérivés 2 et 3, figure 63) puis à une diminution marquée de celle-ci (dérivés 4 et 5) suivie par sa restauration (dérivés 6 et 7) puis par une nouvelle augmentation (dérivé 8). Ces résultats peuvent être expliqués en admettant que la liaison des 17 β -carboxamides au récepteur met en jeu dans la région 17 β une zone globalement hydrophobe avec une région un peu plus polaire au milieu de celle-ci, à une distance d'environ quatre liaisons carbonées de l'atome d'azote. Ainsi, un substituant hydrophobe de petite taille aurait un effet positif sur l'affinité du carboxamide, tandis qu'un substituant de taille moyenne montrerait un effet négatif car ses groupements méthylène additionnels interagissant avec la région polaire annuleraient l'effet positif sur l'affinité des premiers. L'allongement supplémentaire de la chaîne pourrait contrecarrer l'effet négatif du méthylène de la région médiane et conduire à des produits plus actifs.



Composé n°	R	Ki μM	Composé n°	R	Ki μM
1	H	1,19	24	$\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	0,21
2	$-\text{CH}_3$	0,31	25	$-\text{CH}_2-\text{COOH}$	6,67
3	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	0,26	26	$-(\text{CH}_2)_5-\text{COOH}$	1,55
4	$-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_3$	0,74	27	$-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}_2$	10,40
5	$-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_3$	0,96	28	$-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$	4,40
6	$-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_3$	0,76	29	$-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}_2$	0,46
7	$-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_3$	0,22	30	$-(\text{CH}_2)_8-\text{NH}_2$	0,30
8	$-(\text{CH}_2)_8-\text{CH}_3$	0,04	31	$-(\text{CH}_2)_9-\text{NH}_2$	0,16
9	$-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$	0,21	32	$-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_3$	7,86
10	$-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$	1,59	33	$-\text{CH}_2\text{CH}-(\text{CH}_2)_5$	1,05
11	$\text{C}-(\text{CH}_3)_3$	0,98	34	$-\text{CH}_2-(\text{C}_6\text{H}_4)_2\text{OCH}_3$	0,05
12	$(\text{CH}_2)_2-\text{CH}-(\text{CH}_3)_2$	2,57	35	$-\text{CH}_2-(\text{C}_6\text{H}_4)_3\text{OCH}_3$	0,04
13	$(\text{CH}_2)_3-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	1,53	36	$-\text{CH}_2-(\text{C}_6\text{H}_4)_4\text{OCH}_3$	0,14
14	$\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$	0,26	37	$-\text{CH}_2-(\text{C}_6\text{H}_4)_4\text{NO}_2$	0,16
15	$\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{Cl}$	0,38	38	$-\text{CH}_2-(\text{C}_6\text{H}_4)_4\text{Cl}$	0,05
16	$\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	0,14	39	$3\text{CH}_2-\text{C}_5\text{H}_4\text{N}$	0,43
17	$-(\text{CH}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_5$	1,06	40	$4\text{CH}_2-\text{C}_5\text{H}_4\text{N}$	0,30
18	$-\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)-\text{CH}_2\text{OH}$	0,25	41	$\text{CH}_2-\text{C}_{10}\text{H}_9\text{Fe}$	0,76
19	$-\text{CH}-(\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5)$ COOCH_3	0,51	42	$\text{CH}_2\text{C}=\text{CH}$ $\text{CH}=\text{CH}$ S	0,51
20	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$	0,21	43	$\text{CH}_2\text{C}=\text{CH}$ $\text{CH}=\text{CH}$ O	0,88
21	$-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{N}$	0,10			
22	$-\text{CH}-(\text{CH}_2)_5$	0,78			
23	$\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$	6,39			

TABLEAU XVIII-Affinité pour le récepteur des glucocorticoïdes de rat d'une série de 17 β -carboxamides de la dexaméthasone préparés au laboratoire (le dérivé 33 a été préparé à Nantes dans le laboratoire de P. Lustenberger, et l'aminométhylferrocène nécessaire à la préparation du dérivé 41 par l'équipe du Pr. Sergheraert de la Faculté de Pharmacie de Lille).

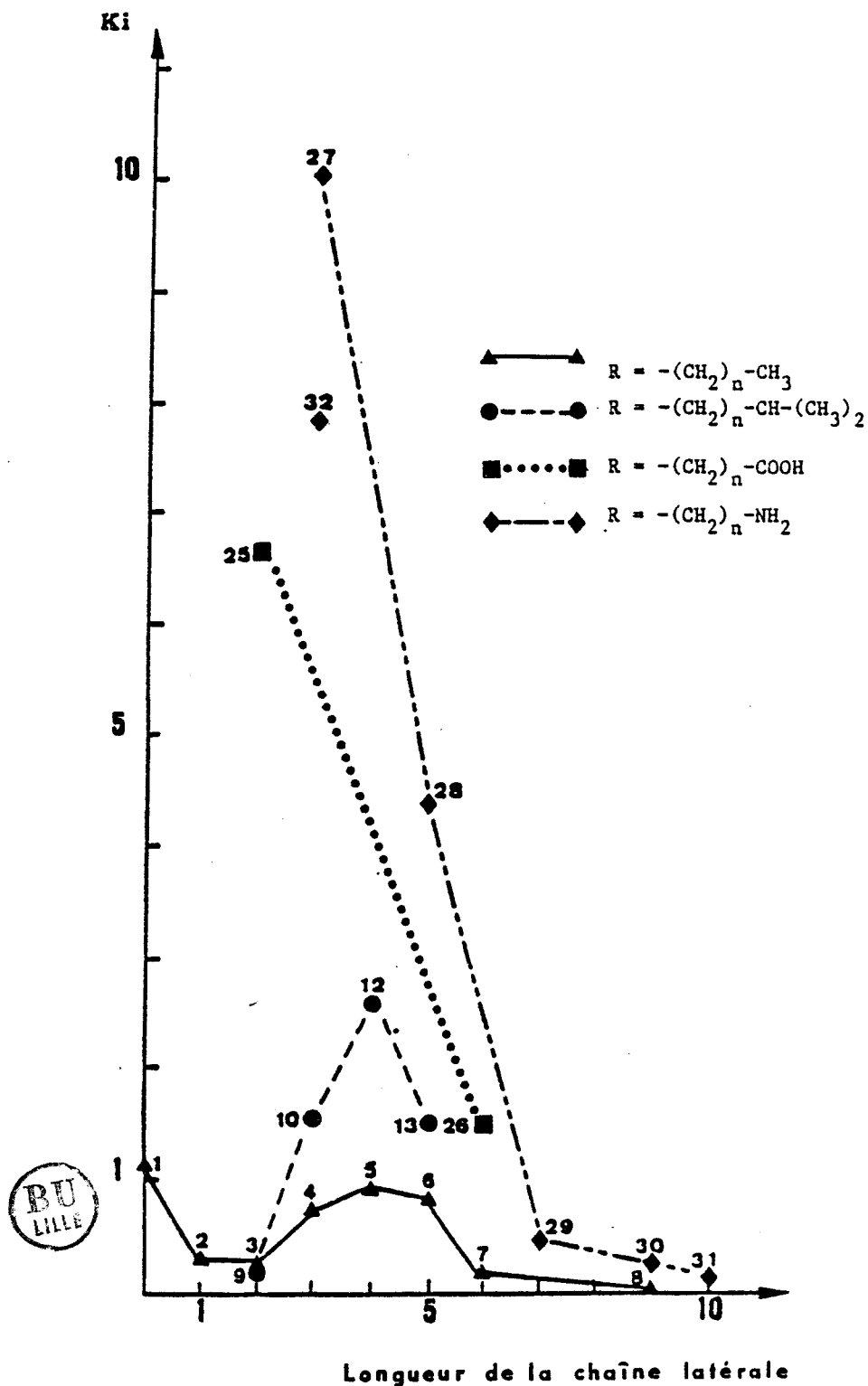


Figure 63 - Constante de dissociation à l'équilibre du complexe récepteur des glucocorticoïdes-17 β -carboxamide de la dexaméthasone en fonction de la longueur de la chaîne carbonée portée par l'atome d'azote (longueur exprimée en nombre d'atomes de carbone).

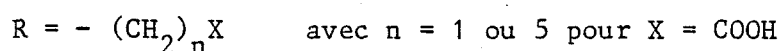
2.2. Stéroïdes à chaîne aliphatique saturée et ramifiée



correspondant aux dérivés 9, 10, 12 et 13.

En regard de la longueur de la chaîne principale, ces stéroïdes sont comparables aux dérivés 3, 4, 5 et 6 respectivement. Ici encore, la longueur de la chaîne montre un effet très important sur la constante de dissociation K_i : l'introduction d'une ramification à la fin de la chaîne n'apporte qu'une légère amélioration d'affinité dans le cas d'un dérivé à chaîne courte (dérivé 9) et une diminution considérable dans un dérivé de longueur de chaîne moyenne (dérivé 12). De plus, les courbes obtenues pour les dérivés linéaires et ramifiés ont la même forme et culminent pour la même longueur de chaîne. Enfin le rapport K_i du dérivé ramifié/ K_i du dérivé linéaire parent suit le même mouvement (Tableau XIX) : l'effet maximum apporté par la ramification est observé pour le dérivé 12 dont le stéroïde parent est le dérivé 5 qui montrait déjà l'affinité la plus faible dans la série linéaire. Ces résultats sont parfaitement en accord avec l'hypothèse précédente d'un site relativement polaire entouré par une zone hydrophobe dans la partie du site de liaison du récepteur qui fait face à la région 17β du stéroïde : comme prévu, l'augmentation de l'hydrophobicité en regard de la région polaire après l'addition d'un groupement méthyl résulte en une diminution d'affinité. Cependant, la possibilité d'un effet d'empêchement stérique ne peut être exclue en cas de composés à chaîne ramifiée.

2.3. Stéroïde à chaîne latérale aliphatique linéaire terminée par une fonction ionisable



dans les dérivés 25 et 26 ; $n = 2, 4, 6, 8, 9$ pour $X = NH_2$ dans les dérivés 27 à 31.

Ainsi que le montre la figure ⁶³ l'introduction d'un groupement ionisable conduit à des dérivés de très faible affinité quand elle est pratiquée sur une chaîne latérale courte ou de taille moyenne ($1 \leq n \leq 4$, dérivés 25, 27, 28). Quelle que soit la nature de la fonction ionisable, une affinité significative pour le récepteur

Homologues linéaires		Dérivés ramifiés		Rapport des K_i
n°	K_i (μM)	n°	K_i (μM)	
3	0,26	9	0,21	0,81
4	0,74	10	1,59	2,20
5	0,96	12	2,57	2,70
6	0,76	13	1,53	2,00

TABLEAU XIX - Comparaison des constantes de dissociation des stéroïdes 17 β -carboxamides linéaires et ramifiés homologues (numérotation identique à celle du tableau XVIII).

n'est observée que pour une chaîne plus longue ($n \geq 5$, dérivés 26, 29, 30 et 31). D'une manière claire, un groupement chargé exerce un effet globalement négatif sur l'affinité du dérivé qui le porte. Il est important de noter qu'aucun effet positif n'est observé dans la zone moyenne (dérivés 27 et 28) qui, bien qu'elle tolère mal les groupements hydrophobes (voir plus haut), ne semble pas pour autant accepter davantage les substituants ionisés. Et, si une zone relativement polaire existe effectivement sur la surface hydrophobe du site de liaison, elle n'est probablement pas ionisée. Il apparaît d'autre part que l'affinité augmente avec l'allongement de la chaîne latérale et l'éloignement de la charge, ce qui conduit à des dérivés présentant une affinité qui se rapproche de celle du dérivé aliphatique saturé parent. Cette observation suggère que cette série particulière de dérivés pourrait être utilisée comme jauge de profondeur du site de liaison du stéroïde. On peut raisonnablement penser que le récepteur des glucocorticoïdes, comme les autres protéines liant les stéroïdes, offre un site de liaison très hydrophobe, ne comportant pas de zone électriquement chargée. Ainsi, l'effet attendu d'une substitution du stéroïde avec une chaîne aliphatique terminée par un groupement ionisable est de conduire à des composés de très faible affinité tant que ce groupement ionisé et l'intérieur du site actif entrent en contact et ensuite à des dérivés de bonne affinité quand la chaîne devient assez longue pour permettre au groupement ionisé d'émerger de la crevasse de liaison. De ce point de vue, nos résultats démontrent que le site de liaison lui-même s'étend à une distance d'au moins cinq chaînons carbonés à partir de l'atome d'azote et suggèrent qu'au-delà de cette distance la chaîne latérale du stéroïde et les berges du site de liaison peuvent encore interagir puisqu'un effet négatif modéré du groupement ionisable sur l'affinité persiste encore (dérivés 29, 30 et 31 comparés avec les dérivés parents 7 et 8). Cependant nous gardons à l'esprit que dans la série aliphatique linéaire saturée un repliement de la chaîne peut avoir lieu et que nos résultats exprimés en "nombre de

liaisons carbonées" ne correspondent pas vraiment à une mesure de longueur. Le repliement de la chaîne le long des berges hydrophobes du site de liaison pourrait rendre compte de l'augmentation d'affinité observée en passant des dérivés 7 et 29 aux dérivés 8 et 31 respectivement. Mais la distance nécessaire pour sortir du site de liaison lui-même n'est probablement pas inférieure à six chaînons carbonés car nous avons montré que la chromatographie d'affinité du récepteur des glucocorticoïdes utilisant des stéroïdes 17 β -carboxamides liés à des billes de sépharose ne peut être pratiquée qu'avec une mauvaise efficacité avec une chaîne à six carbonés et donne des résultats bien meilleurs avec une chaîne à neuf carbonés (Lustenberger 1981). Ainsi, une chaîne à six carbonés correspond apparemment à la taille minimale requise pour obtenir la liaison du récepteur à un 17 β -carboxamide lié à un substituant très volumineux (la bille du gel) et le repliement de la chaîne est peu vraisemblable dans ce cas. La distance entre le carboxyl du dérivé 26 et le carbone 17 a été mesurée à 10 Å avec un modèle de Dreiding (en pleine extension de la chaîne). Ce résultat contraste avec les 3,8 Å d'extension de la chaîne dihydroxyacétone normale de la dexaméthasone. Ainsi, la crevasse de liaison au stéroïde apparaît d'une profondeur surprenante dans la région 17 β , et s'étend bien au-delà des limites d'un glucocorticoïde de taille standard. Des résultats similaires ont été obtenus par Defaye (1980) dans le cas de la transcortine humaine étudiée par résonance paramagnétique électronique d'analogues du cortisol portant un radical nitroxyde libre à l'extrémité d'une chaîne 17 β de longueur variable. Cet auteur a montré que le marqueur de spin est en rotation libre seulement quand la distance entre le groupement nitroxyde et le carbone 17 dépasse 15 Å. Ainsi, la région 17 β du site actif de deux protéines liant les glucocorticoïdes semble beaucoup plus vaste que le noyau stéroïde lui-même puisque la distance entre le carbone 3 et le carbone 17 des glucocorticoïdes communs est d'environ 8,2 Å.

D'autre part, l'importance cruciale de la position du groupement ionisé sur la chaîne aliphatique des dérivés 17 β -carboxamides ressort de l'étude du dérivé 32. Dans ce dérivé la chaîne aliphatique

montre la même longueur que dans le dérivé 26, mais le groupement ionisé est situé à l'intérieur de la chaîne, à la même position que dans le dérivé 27. Comme attendu, l'affinité du dérivé 32 est extrêmement faible, bien plus proche de celle du dérivé 27 que du dérivé 26 : une chaîne hydrophobe assez longue ne peut pas contre-carrer l'effet d'un groupement ionisé si ce dernier tombe à l'intérieur du site de liaison au stéroïde. Au contraire, la suppression de la charge du dérivé 25 par estérification conduit à un dérivé de bonne affinité (dérivé 24).

3.4. Autres dérivés

Ils sont moins faciles à classer. On peut cependant avancer les commentaires suivants :

- dans la série linéaire à chaîne courte homologue du dérivé 4, l'introduction d'une insaturation améliore considérablement l'affinité (dérivé 14), de même que le remplacement du méthyle par un atome de chlore (dérivé 15), une fonction alcool (dérivé 20) ou un nitrile (dérivé 21). Ces effets proviennent sans doute de phénomènes d'interaction de nature électronique avec le récepteur ou peut-être d'une liaison hydrogène dans le cas de l'hydroxyle du dérivé 21. Cependant, le dérivé 23 avec sa structure ramifiée encombrante et ses deux oxygènes de la fonction acétal présente une affinité très médiocre. Les phénomènes d'encombrement stériques introduits par la cyclisation expliquent sans doute aussi la faible affinité du dérivé 22 par rapport au dérivé parent 7. L'affinité de 22 est en fait très proche de celle des dérivés 4 et 5 auxquels il doit ressembler par son extension à partir de l'azote, ce qui confirme les résultats discutés précédemment dans les paragraphes 2.1 et 2.2.
- l'introduction d'un substituant aromatique améliore considérablement l'affinité dans le dérivé 16. Le rôle crucial de la structure benzénique est clairement démontré par la comparaison du dérivé 16 au dérivé 33, son homologue à noyau cyclohexyl totalement saturé dont l'affinité est près de 8 fois plus faible. La position du noyau aromatique dans

la chaîne latérale apparaît également déterminante puisque le passage du dérivé 16 au dérivé 17, qui correspond à un simple décalage d'un chaînon carboné de ce noyau au large de l'atome d'azote de la chaîne latérale, se traduit également par une perte d'affinité d'un facteur 8. A l'évidence un facteur stérique intervient ici, de même probablement que dans l'explication de la faible affinité du dérivé 19. L'effet bénéfique du radical benzyl est perdu si on le combine avec une substitution amenant une chaîne polaire dans le dérivé 18. Ce produit présente une affinité qui n'est en rien supérieure à celle du dérivé polaire parent, et notablement inférieure à celle du dérivé 16. Il n'y a pas d'effet additif positif des deux substituants, et même plutôt un effet négatif en faveur encore une fois de contraintes stériques. La substitution du noyau aromatique du dérivé 16 augmente l'affinité du dérivé obtenu quand le substituant est un groupement méthoxy en position méta ou para ou un chlore en para, tandis que le paranitro dérivé présente au contraire une affinité un peu plus faible que le produit parent. Des résultats obtenus ultérieurement dans le laboratoire ont montré également une augmentation d'affinité par substitution en para par le fluor ou le brome, tandis que le remplacement du noyau benzénique par des cycles isostères comme le noyau de la pyridine (dérivés 39 et 40) ou celui du thiophène (dérivé 42) ou du furfural (dérivé 43) s'accompagnait d'une baisse sensible d'affinité (Lefebvre 1984). L'utilisation du dérivé ferrocényl (dérivé 41) est particulièrement intéressante. Il s'agissait avec ce produit de structure aromatique rappelant celle du benzène, mais d'une épaisseur beaucoup plus grande, avec ses deux cycles accolés reliés par l'atome de fer (figure 64) de tester si le mode d'interaction du phényl du dérivé 16 avec le récepteur se fait par contact d'une seule des deux faces du cycle ou par les deux faces. Dans le premier cas, correspondant à l'absence de facteur d'empêchement stérique, l'affinité des deux produits devrait être similaire, tandis que dans le second, l'épaisseur considérable du substituant ferrocényl devrait l'empêcher de se positionner correctement dans la crevasse ou la poche de liaison et résulter en une diminution considérable de l'affinité. C'est cette dernière éventualité qui semble vérifiée expérimentalement.

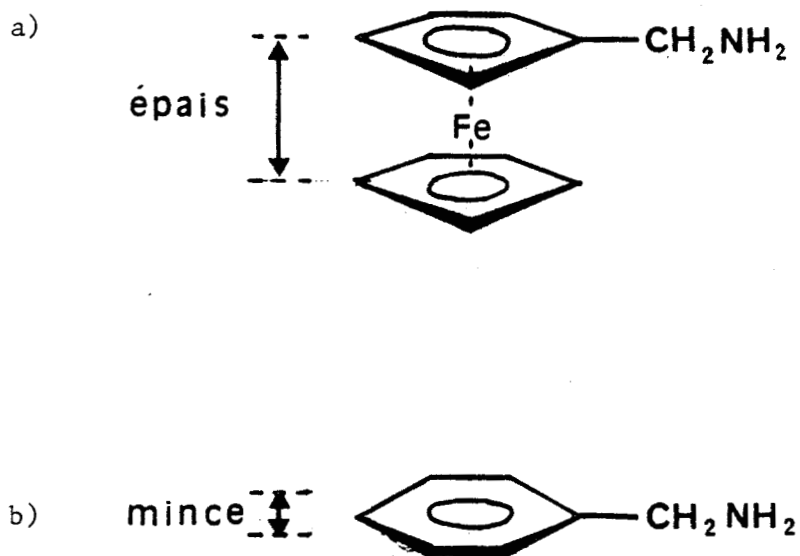


Figure 64 - Structure et épaisseur comparée du cycle de la benzylamine b) et de son homologue dérivé du ferrocène a).



3.5. Conclusion

L'utilisation d'une série homogène de dérivés stéroïdiens, les 17 β -carboxamides de la dexaméthasone a permis d'obtenir un certain nombre de renseignements intéressants sur le site de liaison du récepteur des glucocorticoïdes :

- ce site apparaît globalement hydrophobe dans la région correspondant à la chaîne 17 β , région qui semble étonnamment profonde et vaste, s'étendant sur près de 10 Å.
- à l'intérieur de cette région hydrophobe et à environ 2,4 Å du carbone 22 du 17 β -carboxamide (qui se positionne probablement comme l'oxygène 21 de la dexaméthasone d'après les données cristallographiques évoquées précédemment au paragraphe 2.4) il existe une zone moins hydrophobe comportant probablement un acide aminé aromatique (Figures 65 et 66). Cet acide aminé aromatique est sans doute très voisin de l'acide aminé impliqué dans la reconnaissance et la liaison par le récepteur de la chaîne latérale dihydroxyacétone de la dexaméthasone, c'est-à-dire le carbonyle 20 et surtout l'hydroxyle 21. L'acide aminé aromatique du site suspecté ici est probablement différent de cet acide aminé impliqué dans une liaison hydrogène avec l'hydroxyle 21, à moins qu'il ne s'agisse d'une tyrosine capable de contracter à la fois des liaisons hydrogène sur son substituant phénolique et des interactions aromatiques de type $\pi \cdot \pi$ par son noyau benzénique. Rappelons que c'est dans la région 17 β que se trouverait également la cystéine essentielle à la liaison du stéroïde au récepteur des glucocorticoïdes d'après les résultats obtenus par l'alkylation de celui-ci avec le 21 mésylate de dexaméthasone (voir partie bibliographique II, 2.1b). Cette cystéine serait donc dans un environnement hydrophobe comportant un acide aminé aromatique.

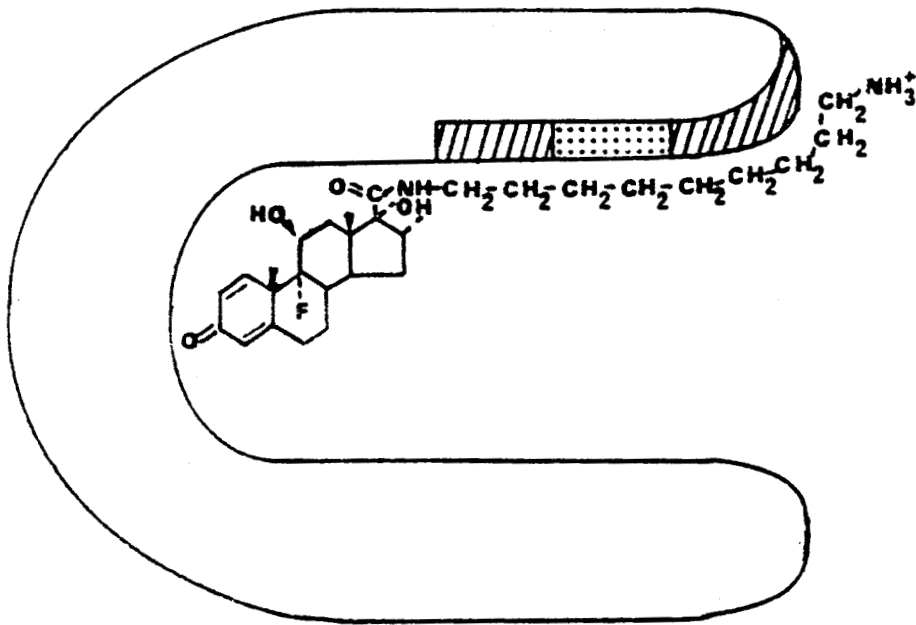


Figure 65 - Carte hypothétique de la région du récepteur des glucocorticoïdes située en regard de la chaîne latérale des 17 β -carboxamides dérivés de la dexaméthasone.



Zone hydrophobe



Zone moins hydrophobe comportant sans doute un acide aminé aromatique.

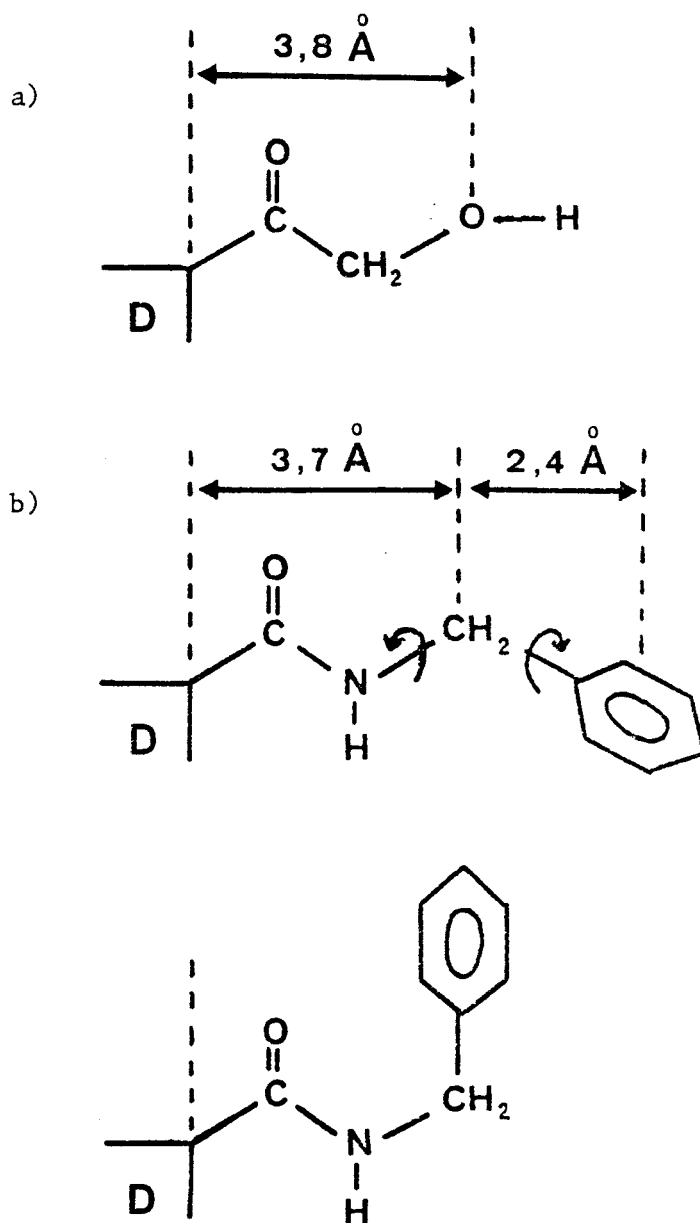


Figure 66 - Géométrie comparée de la chaîne latérale 17β de la dexaméthasone a) et du DXB b). La liaison amide est trans et plane et son orientation probable par rapport au cycle D similaire à celle de la chaîne hydroxy-acétone de la dexaméthasone. Les degrés de liberté de l'orientation de la chaîne du DXB correspondent donc essentiellement aux rotations autour des axes de liaison $N-C_{22}$ et $C_{22}-C_{23}$. Deux des nombreuses conformations possibles sont représentées.

4 - DISCUSSION DES RESULTATS EN REGARD DE L'ACTIVITE ANTIGLUCOCORTICOÏDE DES 17 β -CARBOXAMIDES DE LA DEXAMETHASONE

Nous avons montré, avec le groupe de Rousseau à Bruxelles, que les 17 β -carboxamides de la dexaméthasone constituent une nouvelle classe d'antiglucocorticoïdes (Rousseau 1979, figure 67 et tableau XX). Ces produits se sont révélés antiglucocorticoïdes sur tous les modèles cellulaires dans lesquels ils ont été testés, cellules d'hépatome de rat (Rousseau 1979, Baumann 1983, Danhaive 1986), thymocytes de souris (Duval 1984), cellules hémopoïétiques de moelle de souris (Greenberger J.S., Communication personnelle) et cellules humaines (MCF 7 (Rocheffort H., Communication personnelle). Aucun de ces produits ne présente malheureusement d'activité antiglucocorticoïde significative in vivo. In vitro ils se montrent soit agonistes partiels, soit antagonistes purs selon la nature du substituant de l'azote. Contrairement aux dérivés de la progestérone et au RU 486, les 17 β -carboxamides de la dexaméthasone portent une fonction hydroxyle en 11 β et leur structure générale en dehors de la chaîne 17 β est celle d'un parfait agoniste. Ils se rangent dans la catégorie des antiglucocorticoïdes obtenus par modification de cette chaîne latérale 17 β avec les dérivés 21 mésylate décrits par Simons (1980c, 1981) et les 17, 21 acétonide décrits par Rousseau (1983). La région 17 β du stéroïde apparaît donc importante à la fois pour la liaison du stéroïde au récepteur et pour le déclenchement de la réponse biologique. La perte de cette activité chez les 17 β carboxamides s'explique sans doute par la perte de l'hydroxyle en 21 et des interactions normales de l'extrémité de la chaîne latérale avec le récepteur. L'introduction d'un substituant aromatique de la série du dérivé 16 augmente à la fois l'affinité des 17 β -carboxamides pour le récepteur et leur activité antiglucocorticoïde. A ce propos, il n'est pas indifférent de remarquer qu'un certain nombre d'antiglucocorticoïdes non stéroïdiens présentent une structure comportant des cycles aromatiques et sont très susceptibles d'interagir avec des acides aminés aromatiques par transfert de charge (voir partie bibliographique II, 1.2b, figure 17).

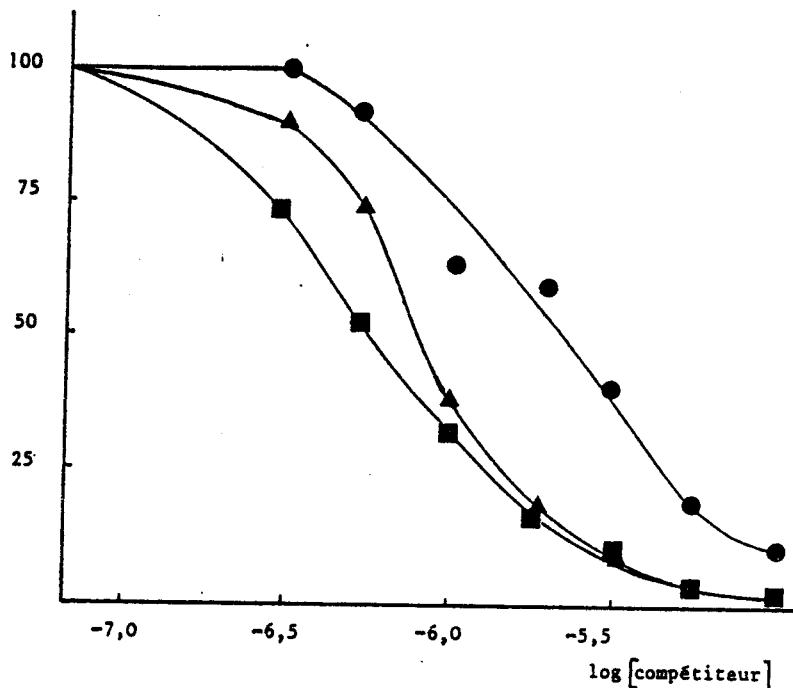


Figure 67 - Activité antiglucocorticoïde de trois 17β-carboxamides dans des cellules d'hépatome de rat. Courbe dose-effet d'inhibition d'induction de la TAT par la dexaméthasone 25 nM (d'après Rousseau 1979)

■ , DXB ; ▲ , DXH ; ● , DMP.

Stéroïde N°	Activité d'induction de la TAT en %		Affinité pour le récepteur des cellules HTC K _i (μM)
	Seul à 10 ⁻⁵ M	En présence de Dex. 25.10 ⁻⁹ M	
DXNH ₂ 1	0,3	74,3	1,76
DXP 4	0	16,2	2,60
DXH 6	0,5	3,9	1,16
DX _i P 9	6,5	28	0,39
DX _i B 10	0,9	31	2,01
DXB 16	4,7	10-20	0,27
DXPhe 17	0,3	47,7	1,74
DXN 8	1,0	43	17,5
DXEtOH 20	3,0	85	0,80
DXPy 14	7,9	48,5	0,90
DMP	0,5	8,2	1,0
DMB	1	3,8	0,20
HCACB	0,4	81,3	1,34
DCACP	2	64,3	27,0
DCACB	1	33,5	3,1
Pred B	0,7	18,4	2,5

TABLEAU X.X - Activité antiglucocorticoïde des stéroïdes 17β-carboxamides vis-à-vis de l'induction de la TAT dans les cellules HTC. Cette induction est exprimée en % de la valeur d'un témoin incubé avec 25 nM de dexaméthasone.

Les acides aminés mis en jeu dans la liaison particulière des carboxamides au récepteur seraient donc probablement impliqués à la fois dans la liaison du stéroïde et l'activation du complexe stéroïde récepteur, ce qui leur confère un intérêt supplémentaire.

III - PREPARATION DE STEROIDES BIFONCTIONNELS POUR L'ETUDE DU NOMBRE DE SITES DE LIAISON DU RECEPTEUR

1 - PRINCIPE

Un problème encore mal éclairci à propos de la structure du récepteur des glucocorticoïdes est celui du nombre de sites de liaison au stéroïde, accessibles dans les différentes formes moléculaires qu'il présente en fonction des conditions expérimentales (force ionique du tampon et température essentiellement). On distingue en effet, d'après leurs paramètres hydrodynamiques, deux formes principales du récepteur des glucocorticoïdes : la forme de haut poids moléculaire de constante de sédimentation 8S et de rayon de Stokes 7 à 8 nm, et la forme de plus faible poids moléculaire de constante de sédimentation 4S et de rayon de Stokes 5 nm. La première est stabilisée par le molybdate et correspond au complexe hormone récepteur non transformé tandis que la seconde constitue le récepteur transformé (voir partie bibliographique, II, 2.2.a). La forme 4S est souvent considérée comme un monomère ne portant qu'un seul site de liaison du stéroïde, tandis que le doute subsiste à propos de la forme 8S présentée par certains comme un homopolymère résultant de l'assemblage de quatre sous-unités liantes identiques et par d'autres, de plus en plus nombreux, comme une structure hétérooligomérique ne comportant qu'une seule unité liante et au moins une, et plutôt deux ou trois sous-unités protéiques différentes de l'unité liante, telles que la protéine 90K de choc thermique. Nous avons pensé que des stéroïdes bifonctionnels, constitués de deux molécules de stéroïde reliées par un bras espaceur, pourraient offrir un outil intéressant pour savoir si le nombre de sous-unités liantes présentes dans le complexe de haut poids moléculaire est ou non supérieur à un. En effet, l'utilisation de tels stéroïdes bifonctionnels capables de se lier à deux sites de liaison en même temps devrait conduire dans un cas à la formation de dimères de récepteurs et dans l'autre à une polymérisation de celui-ci avec formation d'agrégats de très haut poids moléculaire (Figure 68).

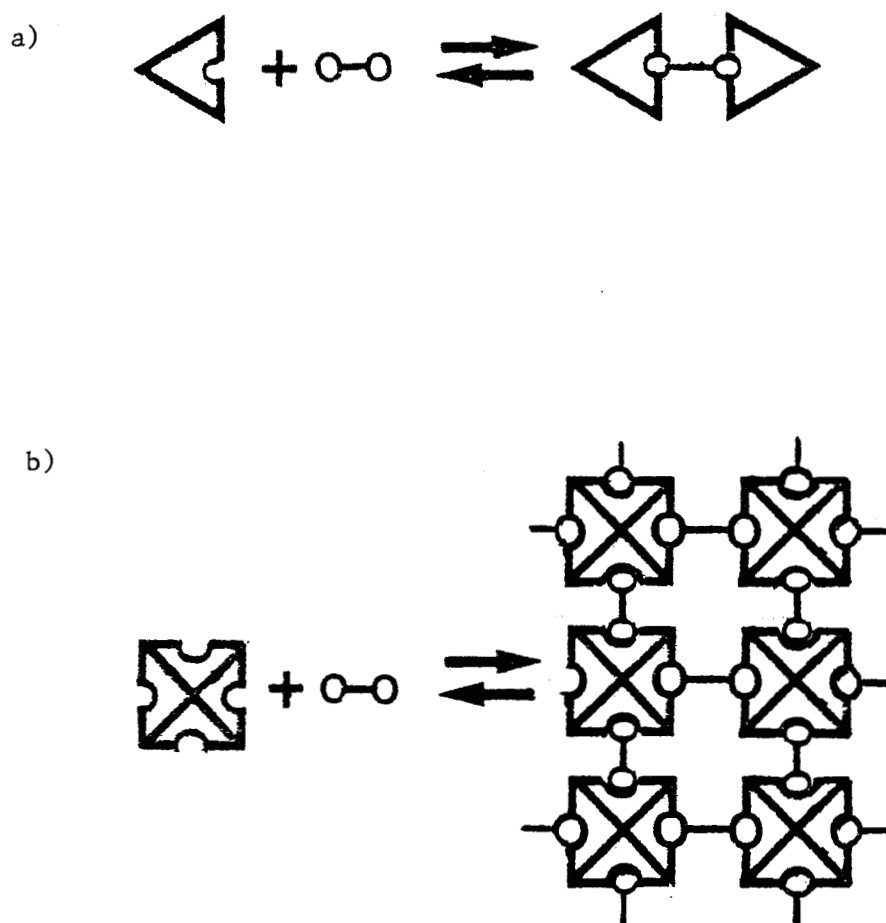


Figure 68 - Principe de l'utilisation des stéroïdes bifonctionnels pour la détermination de l'existence d'un seul a) ou de plusieurs b) sites de liaison au stéroïde sur le récepteur.

Ces produits pourraient également être utilisés comme jauge de profondeur du site de liaison au stéroïde : en faisant varier progressivement la longueur du bras reliant les deux stéroïdes ou devrait déterminer la plus petite longueur nécessaire à la liaison simultanée de deux molécules de récepteur sur une même molécule de stéroïde bifonctionnel, longueur a priori égale au double de la profondeur du site. Une telle approche n'a jamais été appliquée aux récepteurs des stéroïdes. Elle nous a paru séduisante, mais elle nécessite de disposer d'abord de stéroïdes bifonctionnels ayant une très bonne affinité pour le récepteur. C'est donc à la conception et à la préparation de telles molécules que nous nous sommes d'abord attachés, en commençant par la série des 17β -carboxamides qui nous avait jusque là réservé davantage de satisfactions que de déboires.

2 - PREPARATION DE STEROIDES BIFONCTIONNELS ET MESURE D'AFFINITE POUR LE RECEPTEUR

2.1. Biscarboxamides de la dexaméthasone

En première intention, fort de notre expérience de ces produits, et compte-tenu de l'affinité appréciable de dérivés à chaîne aliphatique longue comme le dérivé 8 du tableau XVIII ($K_i = 0,05 \mu M$), nous nous sommes tournés vers la synthèse des divers bis 17β -carboxamides de la dexaméthasone représentés sur la figure 69. Les dérivés I, II et III sont d'une préparation rapide et facile en une seule étape à partir de la dexaméthasone oxydée. Ils présentent l'inconvénient de comporter un bras relativement court et très hydrophobe, aussi avons nous préparé également certains des autres produits IV à VIII dont la chaîne est plus longue et un peu plus polaire, mais dont la préparation requiert un nombre plus élevé d'étapes. Le dérivé V est ainsi préparé par couplage de diaminohexane en excès à la dexaméthasone oxydée, puis réaction du carboxamide à fonction amine libre obtenu avec l'anhydride succinique et enfin couplage du dérivé acide obtenu avec une nouvelle molécule de carboxamide à fonction amine libre. Dans le cas du dérivé VIII, le diamino-2-propanol est d'abord greffé à ses deux extrémités avec l'acide aminohexanoïque dont la fonction amine a

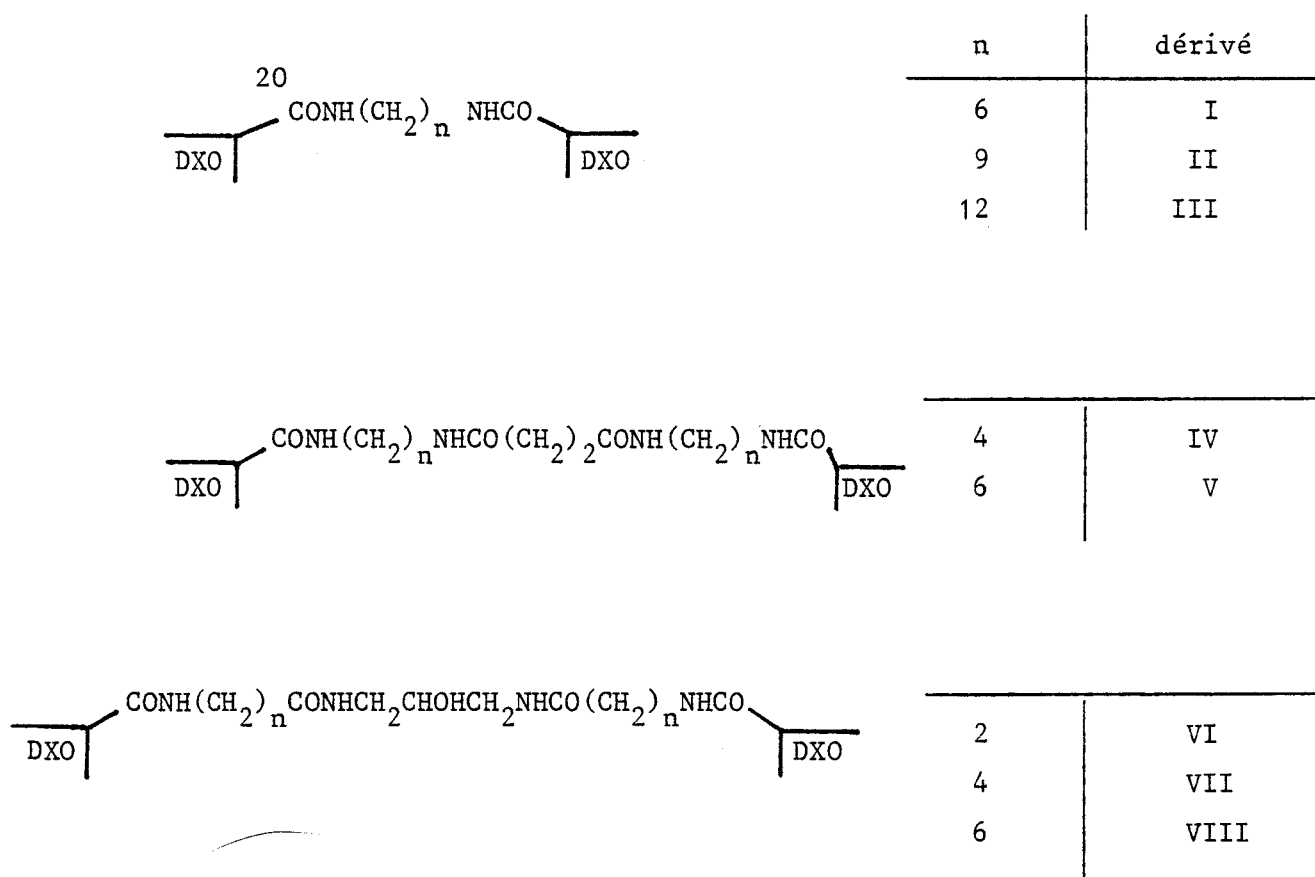


Figure 69 - 17 β -carboxamides bifonctionnels à bras variable en longueur et en polarité. La notation DXO désigne le squelette de la dexaméthasone oxydée en acide 17 β -carboxylique.



préalablement été protégée par un groupement N-t-Boc (N-terbutoxy-carbonyl). La protection est ensuite coupée et le bras libre mis à réagir avec un excès de dexaméthasone oxydée activée à l'hydroxy-benzotriazole en présence de dicyclohexylcarbodiimide. Le dérivé III a également été préparé sous forme radioactive à haute activité spécifique en microméthode à partir de la dexaméthasone tritiée du commerce (40 Ci mmol^{-1}). L'affinité pour le récepteur de plusieurs de ces composés a été testée sur les produits froids par compétition de liaison avec la dexaméthasone tritiée. Elle apparaît malheureusement assez faible pour tous les produits testés, de l'ordre de 0,5 à 1 μM . Une affinité aussi faible rend impossible le travail dans les conditions stoechiométriques imposées par le principe de l'étude. En effet, pour obtenir que le bifonctionnel réagisse avec deux sites de liaison au stéroïde, il ne faut pas qu'il se trouve en excès par rapport au nombre de sites de liaison présents dans le milieu, mais il faut cependant que sa concentration soit si possible supérieure ou égale à son K_i pour garantir une liaison efficace. Or en pratique, la concentration des sites de liaison en récepteur est de 0,01 μM dans le cytosol du foie de rat et d'environ 0,05 à 0,07 μM dans les préparations les plus concentrées d'extrait au sulfate de protamine de récepteur libre (non lié à l'hormone) que nous ayons pu obtenir. L'affinité de nos bifonctionnels apparaît ainsi à l'évidence un ordre de grandeur trop faible pour que ces produits puissent être utilisés dans des conditions satisfaisantes. L'étude en HPLC d'exclusion de taille sur colonne TSK G 4000 SW du complexe dérivé III radioactif à haute activité spécifique-récepteur a malheureusement confirmé nos craintes. Aucune polymérisation ni dimérisation du récepteur n'a pu être mise en évidence. La faible activité de liaison observée a toujours été retrouvée vers 7-8 nm, zone d'élution normale du complexe dexaméthasone tritiée-récepteur et des complexes obtenus avec les carboxamides monofonctionnels 8 et 16 du tableau XVII, également préparés sous forme radioactive à haute activité spécifique par nos soins. Nous avons alors décidé d'abandonner les 178-carboxamides pour d'autres

dérivés plus prometteurs.

2.2. Esters en 21 de la dexaméthasone ou de l'acétonide de triamcinolone

Le recours à des esters de stéroïdes en 21 nécessite un contrôle soigneux des conditions expérimentales, et en particulier de la stabilité de la molécule d'ester dans les milieux biologiques. Aussi avons nous d'abord fait des essais préliminaires vérifiant la stabilité et l'affinité pour le récepteur des acétates de dexaméthasone et de triamcinolone.

a) Acétates de la dexaméthasone et de l'acétonide de triamcinolone

Ces dérivés (IX et X de la figure 70), sont très faciles à préparer par réaction de l'anhydride acétique sur le stéroïde de départ correspondant en milieu pyridine à chaud (70°C). Le rendement est quasi quantitatif. Des dérivés radioactifs d'activité spécifique variée ont été également préparés en microméthode. Nous avons étudié leur stabilité dans le cytosol natif et dans nos préparations concentrées de récepteur libre (extrait sulfate de protamine). Après une nuit à 0° dans le cytosol, l'hydrolyse de l'acétate de dexaméthasone est beaucoup plus importante (33 à 50 %) que celle de l'acétate d'acétonide de triamcinolone (moins de 10 %), ainsi que l'atteste les contrôles de l'état du stéroïde par chromatographie en couche mince. De plus, dans de l'extrait sulfate de protamine ajusté à pH 6,6 l'hydrolyse du dérivé de l'acétonide de triamcinolone tombe à moins de 2 %. La mesure de l'affinité de ce dernier dérivé pour le récepteur apparaît ainsi possible. Elle a été réalisée soit par compétition avec du dérivé X froid, soit par mesure directe de l'interaction de ce dérivé radioactif à haute activité spécifique (40 Ci mmol⁻¹). Nous avons observé après interaction avec le récepteur du dérivé X tritié et séparation du pic récepteur 7 nm en HPLC d'exclusion de taille que ce pic contenait une proportion majeure d'acétate (62 %) mais que la présence d'acétonide de triamcinolone provenant de l'hydrolyse de X était loin d'être négligeable (38 %).

Stéroïde	Nature du stéroïde de départ	Dérivé
$\text{Stéroïde} - \text{COCH}_2\text{OCOCH}_3$	Dexaméthasone	IX
	Acétonide de triamcinolone	X
$\text{TA} - \text{COCH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	n	Dérivé
$\text{TA} - \text{COCH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$		XI
$\text{TA} - \text{COCH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$	3	XII
	6	XIII
$\text{TA} - \text{COCH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{COOCH}_2\text{CO} - \text{TA}$		XIV
$\text{TA} - \text{COCH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{COOCH}_2\text{CO} - \text{TA}$		XV
		XVI

Figure 70 - Esters mono et bifonctionnels de la dexaméthasone et de l'acétonide de triamcinolone. La notation TA désigne le squelette de l'acétonide de triamcinolone.

Du fait de sa très forte affinité pour l'acétonide de triamcinolone, le récepteur concentre ce stéroïde dans ses sites de liaison, ce qui fausse les mesures d'affinité, même avec un taux d'hydrolyse globale inférieur à 2 %. La constante de dissociation apparente du complexe dérivé X-récepteur est ainsi de 0,04 μM tandis que sa valeur corrigée s'élève à 0,1-0,3 μM . Bien que non satisfaisante, cette valeur, meilleure que celle du meilleur des carboxamides bifonctionnels a justifié d'aller plus loin dans la série des esters d'acétonide de triamcinolone.

b) Esters d'acétonide de triamcinolone bifonctionnels

Les dérivés XI à XVI (Figure 70) ont été préparés. La première étape de la synthèse consiste à chaque fois en la préparation de l'hémisuccinate XI à partir de l'anhydride succinique dans les mêmes conditions (milieu pyridine à chaud) que pour la préparation des dérivés IX et X. Le rendement est excellent. Le dérivé XI est ensuite couplé à la n-propylamine, au diaminopropane ou au diamino-hexane en excès pour donner les dérivés XII à XIV. Un couplage en conditions stoechiométriques avec le diaminopropane ou le diamino-propanol-2 conduit aux dérivés XV et XVI. Le rendement de préparation des produits froids est de l'ordre de 14 à 50 % selon les produits. Il est plus faible pour les produits radioactifs XII et XV préparés en microméthode à partir de l'acétonide de triamcinolone à haute activité spécifique (25 Ci.mmol⁻¹).

L'interaction des produits XII et XV avec le récepteur a été étudiée. Le dérivé XII forme un complexe de haut poids moléculaire avec le récepteur détectable en HPLC en présence de molybdate (7-8 nm). L'affinité corrigée, déduite de l'analyse du taux d'hydrolyse observé dans cette expérience (17 %) est de 0,14 μM . Malheureusement, le dérivé XV ne donne qu'une liaison très faible et les premiers lots de ce produit se sont révélés inutilisables.

Les problèmes liés à l'hydrolyse des esters de la triamcinolone et leur affinité encore insuffisante pour le récepteur, nous ont conduit à explorer d'autres modes de préparation des stéroïdes bifonctionnels.

2.3. Ethers de la dexaméthasone

L'introduction d'une liaison éther en 21 sur la désoxycorticostérone par Failla (1975) pour la préparation d'un gel d'affinité utilisable pour la purification du récepteur des glucocorticoïdes laissait supposer qu'une substitution de cette nature restait compatible avec une affinité acceptable pour le récepteur. Nous avons donc préparé quelques 21 éthers de la dexaméthasone, dérivés monofonctionnels à chaîne de longueur variable (Figure 71). Le protocole de synthèse est simple, il comporte la préparation du 21 mésylate de dexaméthasone, puis la réaction de celui-ci avec le phénate de sodium pour donner le dérivé XVII ou le sel de sodium du parahydroxybenzoate de méthyle pour donner le précurseur du dérivé XVIII qui est ensuite obtenu après saponification de ce précurseur et couplage de la propylamine sur le carboxyle libéré. Le dérivé XVII présente un K_d pour le récepteur de l'ordre de $0,1 \mu\text{M}$ tandis que l'affinité chute malheureusement de manière significative pour le dérivé XVIII. Cette voie de synthèse ne paraît donc pas plus encourageante que les précédentes.

2.4. Dérivés à chaîne longue apparentés à l'acétonide de triamcinolone

L'exceptionnelle affinité de l'acétonide de triamcinolone et d'un dérivé de la même famille comportant un substituant plus encombrant sur le glycol $16\alpha 17\alpha$, le budésone (voir partie bibliographique II, 1.2b et la figure 11) nous a conduit à synthétiser le dérivé XIX à partir de l'acétonide de triamcinolone du commerce, selon le protocole décrit sur la figure 72 . Malheureusement, une fois encore, l'affinité pour le récepteur du dérivé XIX s'est révélée trop faible pour laisser espérer une solution à notre problème.

3 - CONCLUSION - PERSPECTIVE : UNE NOUVELLE APPROCHE DU PROBLEME, LE STEROIDE LESTE.

Après ces nombreux essais, tous négatifs, couronnant une activité de synthèse chimique pourtant foisonnante et débridée, l'heure de la réflexion et des révisions déchirantes a bien évidemment fini

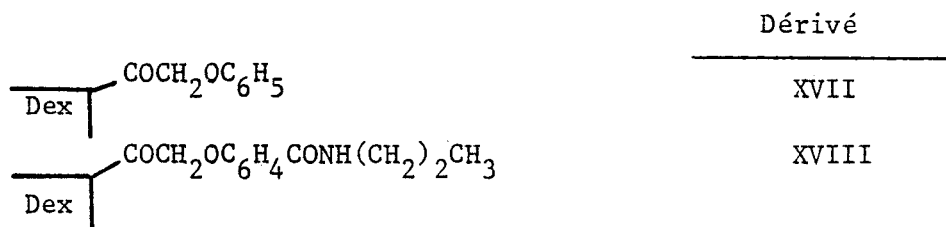


Figure 71 - 21 éthers de la dexaméthasone (Dex) monofonctionnels

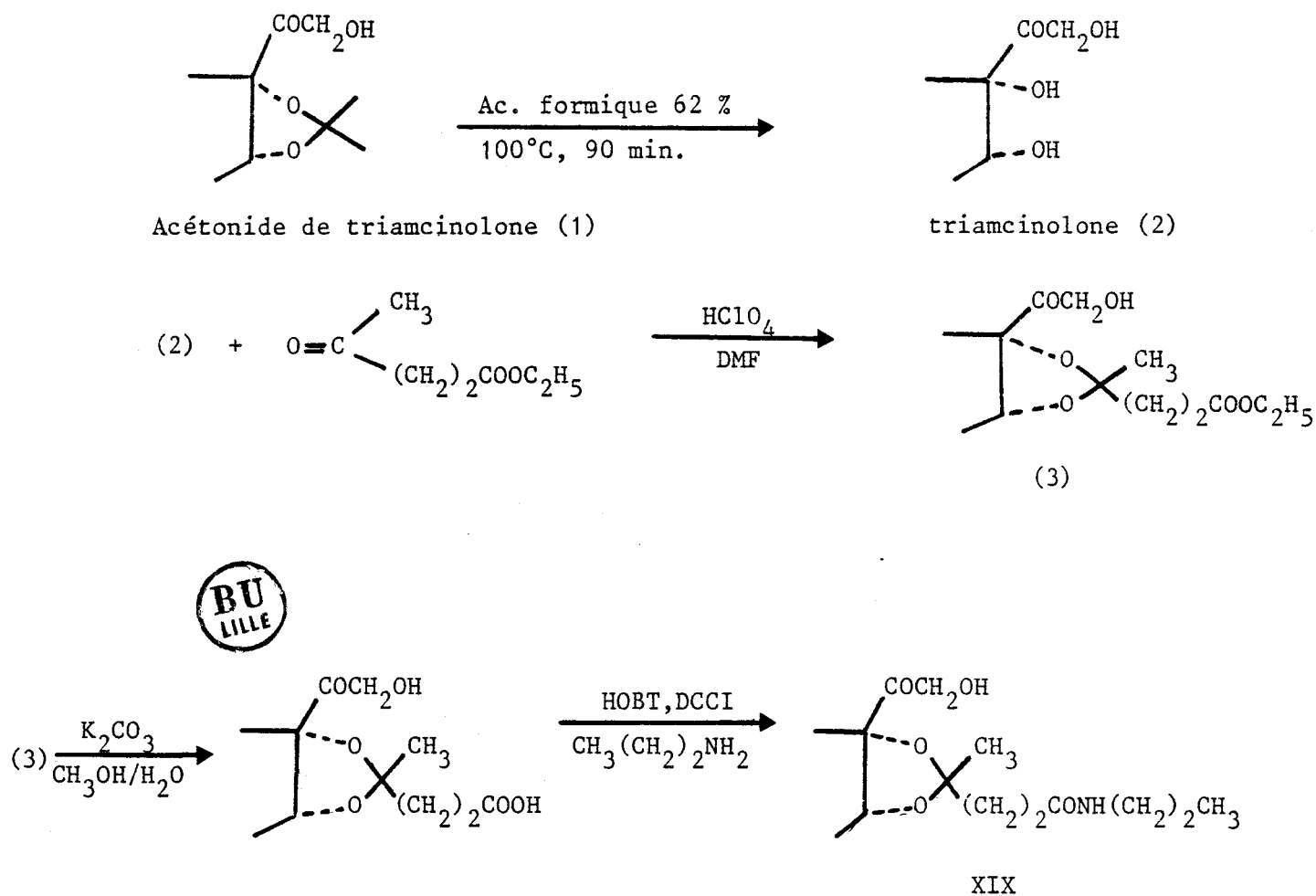


Figure 72 - Préparation d'un dérivé de substitution à chaîne longue sur le glycol 16 α 17 α de la triamcinolone.

par sonner. Il a bien fallu admettre qu'aucune solution apparente n'existait au problème que nous nous étions à nous mêmes posé. Nous nous sommes alors interrogés sur la façon dont nous avons posé ce problème et sur la nature de la question que nous souhaitions adresser au système expérimental en posant le principe de notre démarche. Nous voulions en fait formuler deux questions distinctes qui étaient : peut-on compter le nombre de sites de liaison du stéroïde accessibles sur les diverses formes moléculaires du récepteur et, plus accessoirement, peut-on mesurer la profondeur de ces sites de liaison. La première question est sans conteste la plus intéressante sur le plan de ses implications quant à la fonction du récepteur, car elle ouvre une voie originale d'approche de la structure du complexe récepteur oligomérique non transformé. La seconde, plus contingente, est en fait la première à laquelle nous avons pensé, suivant le fil naturel de nos premières études de relation structure-activité des 17 β -carboxamides et de leurs implications sur la structure du site de liaison. Pris dans cette approche, nous avons d'emblée songé à des stéroïdes bifonctionnels utilisés comme agents de réticulation d'une seule population de sites, les sites de liaison au récepteur, et nous avons vu, presque aussitôt, mais dans un deuxième mouvement, leur intérêt pour la numération des sites de liaison. Cependant, notre réflexion, suffisamment critique pour mesurer d'emblée les contraintes imposées par une telle approche, à savoir l'obligation de recourir à des stéroïdes bifonctionnels présentant une affinité suffisante pour pouvoir être utilisés en conditions stoechiométriques, n'a pas su d'emblée remettre en cause le modèle qu'elle venait de s'offrir en pâture et introduire la nouvelle interrogation qui s'imposait à la constatation de ces contraintes et qui était naturellement : ces contraintes sont-elles contingentes à la démarche expérimentale choisie ? si oui, y-a-t-il une autre manière, plus pertinente de poser les mêmes questions au système expérimental ? Or, la réponse à ces deux questions est oui, à l'évidence pour la première, après réflexion pour la seconde. En effet, en centrant cette fois notre réflexion sur le problème essentiel de la stoechiométrie de la liaison stéroïde récepteur, il nous est rapidement apparu que ce

qui empêchait toute mesure directe de cette stoechiométrie par les méthodes de détermination des paramètres hydrodynamiques des complexes hormone-récepteur était l'énorme différence de poids moléculaire entre le stéroïde et la macromolécule qui le fixe. Le supplément de poids introduit par la fixation d'une ou plusieurs molécules de stéroïde sur le récepteur est ainsi totalement imperceptible par les méthodes actuelles de mesure. Mais nous avons pensé aussitôt que la situation serait toute différente si l'on disposait d'un stéroïde beaucoup plus lourd, un stéroïde lesté dont la fixation au récepteur s'accompagnerait d'une augmentation significative et bien définie du poids moléculaire du complexe formé. Ce lest devrait être tel qu'on puisse différencier les formes obtenues par fixation d'une, deux, trois ou quatre molécules de stéroïde lesté. Un bon choix du lest et la résolution offerte par une technique telle que la chromatographie d'exclusion de taille à haute performance devraient autoriser cette détermination. Le lest à trouver doit être une macromolécule hydrosoluble et monofonctionnelle, à greffer au stéroïde pour former une entité ne comportant qu'une seule molécule de stéroïde par molécule de lest, ce qui à notre sens exclut le recours à la sérumalbumine ou aux autres supports macromoléculaires fréquemment utilisés pour la fixation des petits ligands. C'est pourquoi nous avons pensé à l'utilisation d'une molécule d'anticorps ou plus exactement des fragments Fab d'un anticorps antistéroïde. Ces fragments Fab d'une masse moléculaire parfaitement définie ont une affinité très élevée pour le stéroïde contre lequel ils sont dirigés et ne présentent qu'un seul site de liaison pour celui-ci, au contraire de l'anticorps natif. Nous nous proposons donc de les utiliser avec nos stéroïdes 17 β -carboxamides bifonctionnels selon le schéma de la figure 73 . L'anticorps au contraire du récepteur, peut sans difficulté être obtenu en concentration micromolaire et il peut présenter pour le stéroïde greffé une affinité extrêmement élevée. La préparation d'un complexe stable Fab stéroïde bifonctionnel peut donc être envisagée avec confiance. Ce stéroïde lesté pourrait ensuite être utilisé en excès pour saturer

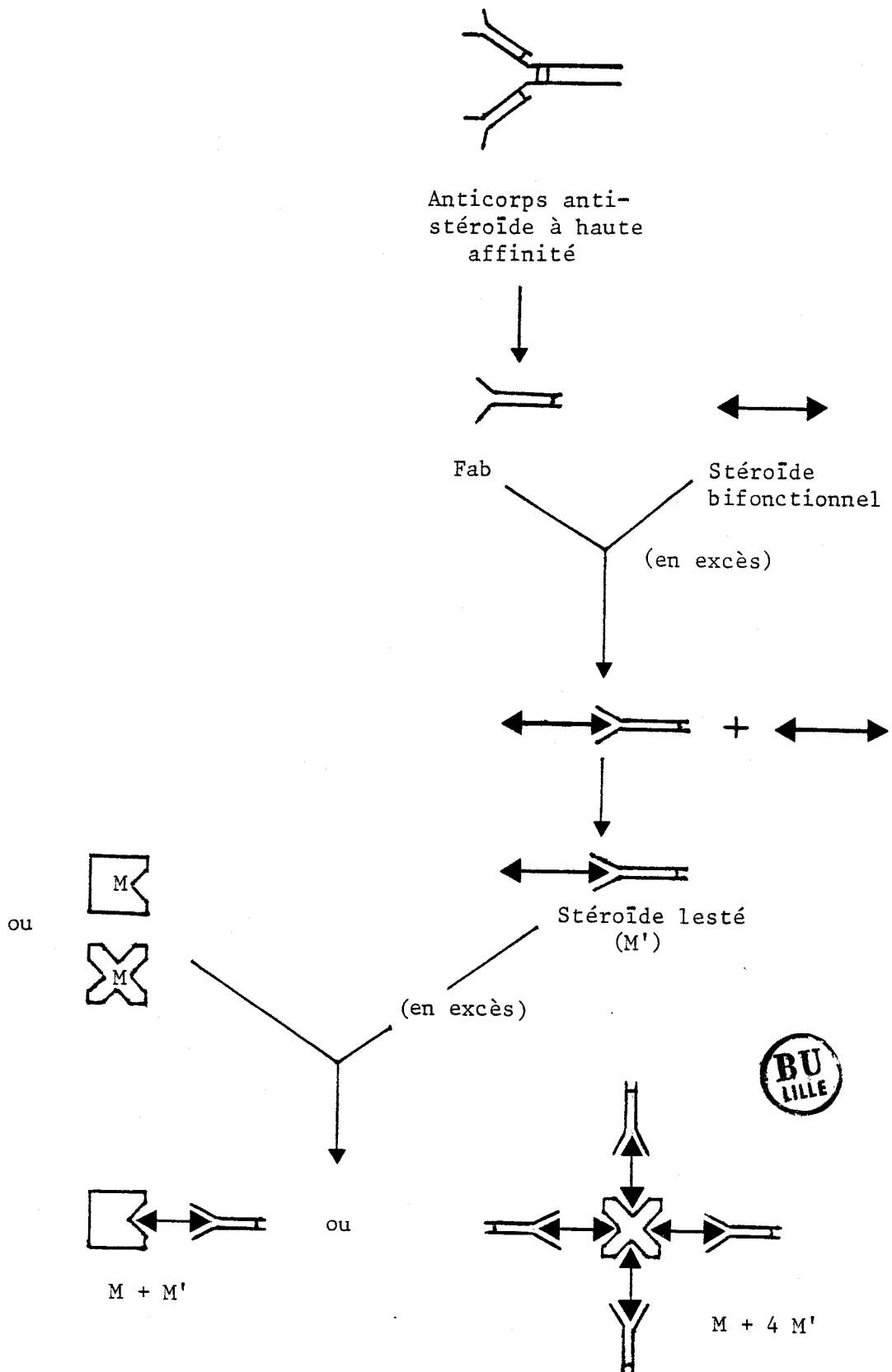


Figure 73 - Principe de l'utilisation d'un anticorps anti-stéroïde et d'un stéroïde bifonctionnel pour l'obtention de stéroïde lesté et la numération des sites de liaison au stéroïde du récepteur.

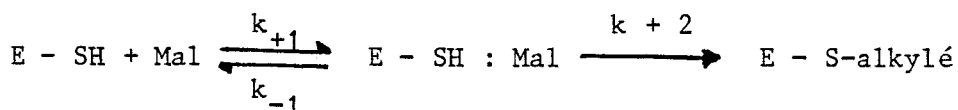
les sites de liaison du récepteur. La démarche proposée a le mérite majeur de nous affranchir de la nécessité d'obtenir un bifonctionnel à très haute affinité pour le récepteur. L'affinité modérée de nos 17 β -carboxamides est en effet suffisante, nous l'avons vu, pour former un complexe stable avec le récepteur, détectable sans problème en chromatographie d'exclusion de taille. Cette nouvelle approche fait maintenant l'objet du travail de thèse de l'un de nos étudiants.

IV - UTILISATION DE N-ALKYL ET N-ARYLMALEIMIDES POUR L'EXPLORATION
DE L'ENVIRONNEMENT DU THIOL DU RECEPTEUR ESSENTIEL A LA LIAISON
DU STEROIDE

1 - PRINCIPE

Nous avons vu précédemment que l'existence d'un thiol essentiel à la liaison des stéroïdes au récepteur des glucocorticoïdes est bien documentée (partie bibliographique II, 2.1b). Les arguments en faveur de l'implication d'une cystéine dans la liaison stéroïde-récepteur sont indirects et résultent de l'observation de l'effet stabilisant de l'activité de liaison du récepteur libre présenté par les agents réducteurs des thiols et de l'effet inactivant présenté au contraire par divers réactifs spécifiques des thiols libres, dont la N-éthylmaléimide. La fixation préalable du stéroïde protège le site de liaison contre l'effet de ces réactifs, ce qui laisse penser que la cystéine essentielle pourrait se trouver dans le site de liaison lui-même. Aucune étude directe de cette cystéine n'a encore été pratiquée sur le récepteur purifié, et son identification absolue reste à réaliser. On ne sait pas davantage si cette cystéine essentielle à la liaison est unique ou si elle est voisine d'une autre cystéine avec laquelle elle pourrait former un pont disulfure. C'est pourquoi, tenant compte de la difficulté à purifier le récepteur des glucocorticoïdes, nous avons tenté d'obtenir des précisions sur l'environnement de cette cystéine essentielle en utilisant une série de N-alkylmaléimides selon l'approche décrite par Heitz (1968). Cet auteur a en effet montré que la nature du radical porté par une maléimide N-substituée pouvait conditionner la cinétique d'interaction de ce réactif des thiols avec la cystéine essentielle portée par divers enzymes. Il observe ainsi que la vitesse apparente d'inactivation par les N-alkylmaléimides de l'alcool déshydrogénase de levure augmente considérablement avec la longueur de la chaîne aliphatique substituant de l'azote de la maléimide, alors que cette vitesse est inchangée

dans le cas de la glucose-6-phosphate déshydrogénase de levure. Pour expliquer cette observation il propose que la cinétique d'alkylation d'un groupement thiol essentiel porté par une protéine ait lieu selon le processus en deux étapes suivant :



La première étape est réversible et consiste en la liaison de la maléimide dans le site actif au voisinage du thiol à alkyler. Cette étape est gouvernée par l'affinité de la maléimide pour ce site et c'est à son niveau que se situe le rôle déterminant du substituant porté par l'azote dont l'effet sera fonction de la nature du site actif et de sa géométrie. La seconde étape consiste en l'alkylation du thiol par la maléimide. Elle est gouvernée par la constante de vitesse k_{+2} , n'intéresse que la double liaison réactive de la maléimide et le groupement thiol, et ne dépend donc pas de la nature du substituant de l'azote. Heitz a d'ailleurs vérifié que la vitesse d'alkylation par les N-alkylmaléimides de petites molécules comme la cystéine ou le glutathion, dont le thiol est parfaitement accessible, est la même quel que soit le substituant de l'atome d'azote de la maléimide. La théorie de ce modèle d'allure michaelienne conduit à l'expression de la vitesse d'inactivation de l'enzyme à thiol selon l'équation :

$$v = k_{+2} \frac{E_T \text{ Mal}}{K + \text{Mal}}$$

où E_T et Mal désignent les concentrations en enzyme total et en maléimides, et $K = \frac{k_{+2} + k_{-1}}{k_{+1}}$ qu'on assimile à K_D en considérant que $k_{+2} \ll k_{-1}$. Quand la concentration en maléimide est très élevée et largement supérieure à K_D la vitesse d'alkylation de l'enzyme par la maléimide tend vers sa valeur maximale

$$v = k_{+2} E_T$$

qui est la même pour toutes les maléimides, le site de liaison étant

saturé par le réactif et k_{+2} ne dépendant pas de la nature du substituant de la maléimide. Au contraire, quand la concentration en maléimide est inférieure à K_D alors la vitesse d'alkylation de l'enzyme devient :

$$v = \frac{k_{+2}}{K_D} \text{ Mal} \cdot E_T = k_{app} \text{ Mal} \cdot E_T$$

(k_{app} = constante de vitesse d'alkylation apparente)

Cette vitesse est proportionnelle à la concentration en maléimide et surtout à $1/K_D$ constante d'affinité de la maléimide considérée pour le site entourant la cystéine essentielle. C'est dans ces dernières conditions que les maléimides N-substituées ont été utilisées pour l'exploration de l'environnement du thiol essentiel de divers enzymes. Le substituant employé est généralement une chaîne aliphatique de longueur croissante dont l'hydrophobicité augmente avec l'addition de chaque méthylène supplémentaire. Un effet positif de l'augmentation de la longueur de cette chaîne sur la vitesse d'inactivation a été observé par le groupe d'Anderson dans le cas de plusieurs enzymes : l'alcool déshydrogénase de levure (Heitz 1968), la D-aminoacide-oxydase (Fonda 1969), la L β -glycérophosphatedéshydrogénase de muscle de lapin (Anderson 1970a), la papaïne (Anderson 1970b) et la lacticodéshydrogénase (Anderson 1974). Des résultats similaires ont été rapportés par d'autres auteurs pour la luciférase bactérienne (Nicoli 1974). Dans tous ces cas, une augmentation considérable (de 10 à 2000 fois selon l'enzyme considéré) de la constante de vitesse d'inactivation apparente a été observée après allongement de la chaîne latérale depuis la N-éthyl jusqu'à la N-octyl, la N-nonyl ou la N-décylmaléimide. En conséquence, un environnement hydrophobe a été postulé pour le thiol essentiel de ces enzymes. A l'inverse, aucun effet significatif de l'allongement de la chaîne n'a été observé sur la vitesse d'inactivation de la glucose-6-phosphate déshydrogénase ou de la 6-phosphogluconate déshydrogénase de levure (Heitz 1968, Noble 1977). Ce résultat suggère que le

sulfhydryle essentiel de ces enzymes est bien exposé au milieu extérieur et se trouve dans une région relativement polaire de la protéine. Tous ces résultats ont été établis sur des protéines enzymatiques purifiées à homogénéité et bien caractérisées.

Nous avons décidé d'essayer de transposer cette approche si fructueuse dans le cas des enzymes à l'étude du récepteur des glucocorticoïdes peu ou pas fractionné, car, nous l'avons vu précédemment, la purification du récepteur sous forme libre est extrêmement difficile.

2 - SYNTHÈSE DES MALEIMIDES ET DES SUCCINIMIDES N-SUBSTITUÉS

Cette synthèse qui utilise des protocoles simples bien décrits dans la littérature n'a pas posé de problèmes particuliers.

2.1. Synthèse des maléimides N-substitués (Figure 74)

Elle a été réalisée selon le protocole en deux étapes utilisé par Heitz (1968). La préparation des acides N-alkyl ou N-aryl maléimiques est obtenue par action de l'anhydrique maléique sur l'amine primaire dans l'acide acétique glacial. Le rendement est quantitatif. La cyclisation de l'acide maléamique en maléimide est obtenue par chauffage. Cette étape est d'un rendement très inférieur à la précédente car le chauffage favorise à la fois la cyclisation en maléimide et la polymérisation du produit en résine inutilisable. En pratique, la cyclisation est réalisée en même temps que la distillation sous vide de la maléimide qui est ainsi soustraite au milieu réactionnel dès sa formation, ce qui augmente le rendement. Toute la série des N-alkyl-maléimides à chaîne linéaire de la N-propyl à la N-nonylmaléimide ainsi que la N-benzylmaléimide ont été préparées de cette manière. Les contrôles analytiques usuels, détermination du point de fusion, étude du spectre infra-rouge et contrôle de pureté par chromatographie en couche mince ont été pratiqués (Tableau XX).

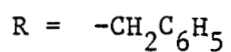
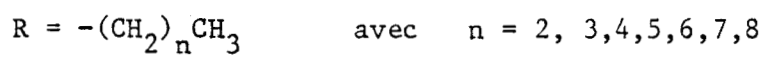
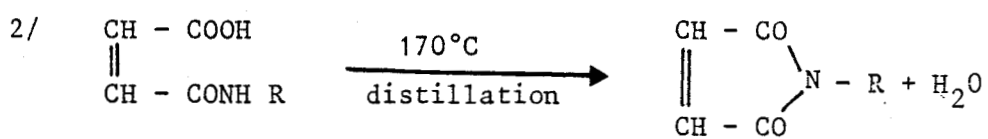
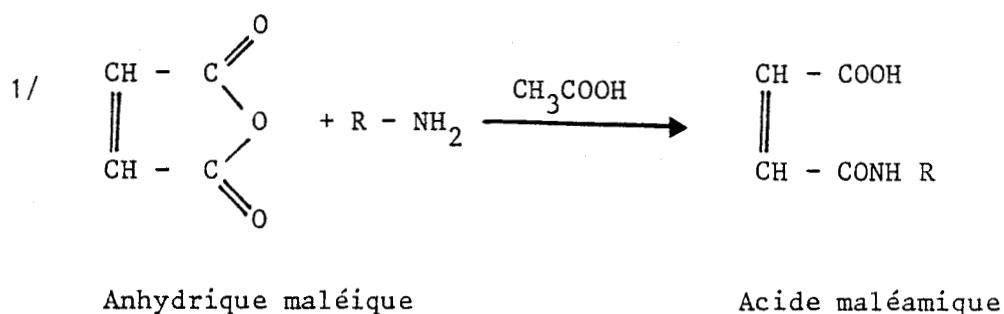


Figure 74 - Synthèse des maléimides N-substitués

	Substituant R	n-butyl	n-pentyl	n-hexyl	n-nonyl	benzyl
	Acides maléamiques	F (°C) littérature	80	72	78	78-80
F (°C) expérimental		80-81	72-73	78-79	78-80	137
rendement (%)		67	83	95	96	96
maléimides	F (°C) littérature	liq	liq	liq	45-47	66-68
	F (°C) expérimental	liq	liq	liq	<50	67-69
	rendement (%)	15	28	18	20	22

Tableau XXI - Préparation des acides maléamiques N-substitués et des maléimides correspondantes. Point de fusion et rendement de synthèse.



2.2. Synthèse des N-alkylsuccinimides

Nous avons suivi le protocole en une étape de Rice (1954). L'anhydride succinique est mélangé à l'amine, le mélange est chauffé à 160°C et distillé sous vide. L'identification et le contrôle de pureté des produits découlent de la mesure de leur point d'ébullition et surtout de leur densité et de leur indice de réfraction.

3 - PURIFICATION PARTIELLE DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES

Du fait de son contenu élevé en groupes thiols endogènes libres, le cytosol du foie de rat n'apparaissait pas très indiqué pour l'étude du récepteur des glucocorticoïdes à l'aide de réactifs des thiols comme les maléimides. En effet, des concentrations en thiols libres totaux comprises entre 1,6 et 2,5 mM ont été mesurées dans le cytosol concentré (contenant 25 à 35 mg de protéines et 10 à 15 pmoles de récepteur des glucocorticoïdes par millilitre) préparé dans un tampon ne contenant pas de thiols. De plus, les deux tiers environ de ces groupes thiols endogènes sont toujours liés à des macromolécules après gel-filtration sur une colonne de Sephadex G25. Ainsi, dans un milieu aussi riche en groupements sulfhydryles que le cytosol, apparaissait-il illusoire d'espérer observer une cinétique d'inactivation du récepteur de pseudo-ordre un avec les différentes N-alkylmaléimides à comparer, car les fonctions thiols portées par les protéines autres que le récepteur allaient très vraisemblablement interférer de manière intense en consommant la majeure partie du réactif des thiols ajouté au milieu réactionnel. Une purification partielle du récepteur non lié était donc tout à fait souhaitable pour obtenir des préparations enrichies en récepteur et déplétées en fonctions thiols portées par des protéines interférentes. Ceci a été obtenu par précipitation du récepteur cytosolique libre par le sulfate de protamine en présence de molybdate de sodium (Lustenberger 1981). Les contenus respectifs en récepteur et en thiols liés à des protéines du cytosol et de l'extrait sulfate de protamine fournis par une expérience représentative sont résumés sur le tableau XXII .

	Cytosol	Extrait de sulfate de protamine
Groupements thiols (μ mole/mg de protéine)	0,080	0,059
Récepteur des glucocorticoïdes (pmole/mg de protéine)	0,40	3,5
Groupements thiols/ récepteur	$0,2 \cdot 10^6$	$0,017 \cdot 10^6$
Taux de purification du récepteur	1	8,8
Rendement d'activité récepteur	100	90

TABLEAU XXII - Contenu comparé en récepteur des glucocorticoïdes et en groupements thiols liés à des macromolécules (protéines) du cytosol natif et de l'extrait au sulfate de protamine. (la détermination des groupements thiols libres a été réalisée après gel-filtration de l'échantillon sur colonne d'ultrogel ACA 202 pour enlever les dérivés de faible poids moléculaire portant des thiols).

Comme attendu, la purification de 8,8 fois du récepteur apportée par l'étape de précipitation est concomitante de l'élimination de plus de 90 % des thiols interférents. Ainsi, par cette procédure, des extraits contenant le récepteur et tout à fait utilisables pour notre étude ont-ils pu être préparés aisément et avec un très bon rendement.

4 - NECESSITE DE LA STABILISATION DU RECEPTEUR LIBRE SOUS UNE FORME HOMOGENE AVANT L'INACTIVATION PAR LA MALEIMIDE

Dans nos expériences préliminaires, le récepteur des glucocorticoïdes obtenu par extraction au sulfate de protamine (en tampon phosphate 160 mM de pH 7,4 contenant du β -mercaptoéthanol 20 mM, du molybdate de sodium 10 mM et 10 % de glycérol) était désalé sur une colonne d'Ultrogel ACA 202 équilibrée avec du phosphate 20 mM, pH 7,4, dans le but d'enlever le β -mercaptoéthanol et le molybdate avant l'étape d'alkylation. La maléimide était ensuite ajoutée au milieu d'incubation pour une durée variable à 0°C et la réaction était ensuite arrêtée par l'addition d'un large excès de β -mercaptoéthanol. L'activité de liaison était finalement mesurée dans les différents échantillons par incubation avec la dexaméthasone tritiée. Les résultats d'une expérience typique utilisant la N-éthylmaléimide et la N-nonylmaléimide sont montrés sur la figure 75. Avec ces deux composés l'effet d'inactivation du récepteur est clairement dépendant de la dose de maléimide. De plus, la N-nonylmaléimide apparaît considérablement plus active que la N-éthylmaléimide, provoquant une inactivation quasi immédiate des deux tiers des sites récepteurs. Cependant, pour les deux maléimides aucune cinétique de pseudo-ordre un n'est observée : une inactivation rapide du récepteur a lieu pendant les premières secondes, suivie par une diminution beaucoup plus lente de l'activité de liaison. Un tel aspect "biphasique" des courbes cinétiques peut suggérer l'existence d'au moins deux populations différentes de récepteur des glucocorticoïdes dans le milieu d'incubation, population caractérisée par deux vitesses très différentes de réaction avec les maléimides. Ainsi avons-nous été amené à formuler l'hypothèse suivante :

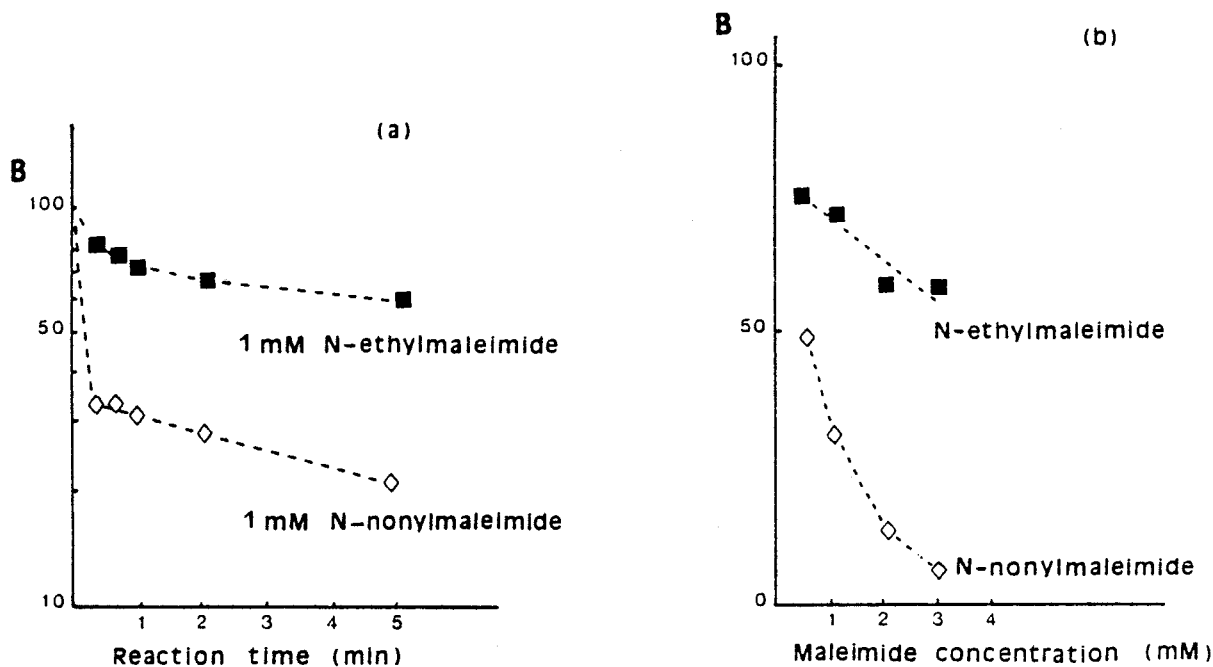
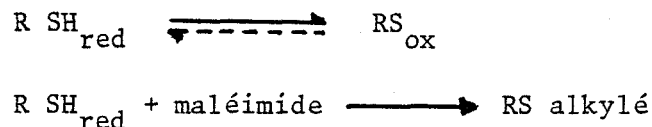


Figure 75 - Inactivation du récepteur non lié par la N-éthylmaléimide ou la N-nonylmaléimide à 0°C. De l'extrait au sulfate de protamine du cytosol de foie de rat est soumis à une gel-filtration sur une colonne d'ACA 202 équilibrée en tampon phosphate de potassium 20 mM (pH 7,4). La N-éthyl ou la N-nonylmaléimide est ensuite rapidement mélangée avec l'échantillon de récepteur. Après des temps de réaction variés, du β -mercaptoéthanol est ajouté à la concentration finale de 50 mM, et l'activité de liaison spécifique de la dexaméthasone (B) est déterminée dans chaque échantillon. Elle est exprimée en pourcentage d'un contrôle non traité par les maléimides.

a) Cinétique de l'inactivation du récepteur par la N-éthyl ou la N-nonylmaléimide 1 mM.

b) Relation dose-effet. L'activité résiduelle est mesurée après une durée d'alkylation de une minute.

le récepteur libre réduit pourrait subir une oxydation assez rapide après l'élimination du β -mercaptoéthanol par gel-filtration pour donner le récepteur libre oxydé, qui s'opposant sur ce point à la forme réduite, réagirait très lentement avec le réactif des thiols :



La compétition entre les deux phénomènes, oxydation et alkylation, pourrait rendre compte des résultats observés : avec la N-éthyl-maléimide l'étape d'alkylation pourrait être lente et la plus grande partie du récepteur échapperait à cette inactivation en subissant de manière prépondérante l'oxydation ; d'un autre côté, la N-nonyl-maléimide, montrant une bien plus grande vitesse d'alkylation que la N-éthylmaléimide, pourrait inactiver de manière prépondérante le récepteur avant qu'il ne soit oxydé. Dans les deux cas le récepteur oxydé, normalement incapable de lier le stéroïde, serait ramené à la forme réduite liante par le β -mercaptoéthanol ajouté en excès pour stopper l'action de la maléimide. Des arguments puissants en faveur de cette hypothèse sont fournis par les résultats présentés sur le tableau XXIII, qui montre que, après gel-filtration enlevant tout agent réducteur de l'extrait sulfate de protamine qui contient le récepteur libre, seulement 12 % de l'activité initiale de liaison sont mesurables en l'absence d'addition de thiols. Cependant l'addition de dithiothréitol 2 mM au milieu réactionnel entraîne une restauration partielle de cette activité, tandis que le molybdate 10 mM, inefficace seul, montre un effet synergique de celui du dithiothréitol et conduit à une restauration complète de l'activité de liaison. De plus, l'association molybdate-dithiothréitol apparaît remarquablement efficace contre l'inactivation du récepteur causée par la chaleur, que le dithiothréitol seul était incapable de prévenir. Des agents

	A) Sans chauffage		B) Avec chauffage	
	cpm/mg de protéine	%	cpm/mg de protéine	%
- Extrait sulfate de protamine	6842	100	6842	100
- Gel-filtration en tampon phosphate				
pic exclu	865	12	334	5
+ MoO ₄ 10 mM	922	13	420	6
+ DTT 2 mM	4891	73	1274	19
+ DTT 2 mM et MoO ₄ 10 mM	6495	95	7055	103

TABLEAU XXIII- Effet de l'élimination du β -mercaptoéthanol et du molybdate sur l'activité de liaison de la [³H] dexaméthasone du récepteur des glucocorticoïdes après fractionnement par le sulfate de protamine.

L'extrait sulfate de protamine du foie de rat est soumis à une gel-filtration sur une colonne d'Ultrogel ACA 202 équilibrée en tampon phosphate 160 mM, pH 7,4. Le pic exclu contenant le récepteur est supplémenté ou non en dithiothréitol (2 mM, ou en molybdate (10 mM), ou avec les deux, et ensuite incubé avec de la dexaméthasone tritiée 30 nM. L'activité de liaison spécifique est déterminée par une méthode au charbon actif. Toutes les manipulations sont faites à 0°C, sauf en B, où le récepteur non lié est chauffé une heure à 23°C après l'addition de dithiothréitol et/ou de molybdate, et avant l'incubation avec la dexaméthasone.

réducteurs comme l'acide ascorbique ou l'arsénite de sodium, dont Le Gaillard (1978) a rapporté qu'ils empêchaient l'oxydation du thiol accessible de la transcortine humaine, se sont montrés sans effet dans le cas du récepteur des glucocorticoïdes du foie de rat. De même, l'addition d'EDTA en concentration millimolaire où l'élimination soigneuse de l'oxygène dissous dans le tampon de gel-filtration sont apparus sans effet protecteur sur l'activité de liaison du récepteur. Toutes ces observations suggèrent clairement qu'il existe une oxydation rapide et réversible du thiol essentiel du récepteur, oxydation qui n'est empêchée que par les agents réducteurs forts comme le β -mercaptoéthanol ou le dithiothréitol. Aussi, pour stabiliser au mieux le récepteur libre dans sa forme réduite jusqu'à l'addition de la maléimide, avons-nous décidé de pratiquer la gel-filtration en présence de molybdate de sodium 10 mM et d'une concentration minimale de dithiothréitol de 1 mM. Cette concentration élevée de thiols exogènes peut être immédiatement réduite au moment du départ de la procédure d'alkylation en diluant l'échantillon avec la solution de maléimide, et des concentrations finales en thiols libres de 50 μ M ont été ainsi facilement obtenues. De plus, nous avons vérifié par spectrophotométrie à 305 nm que l'alkylation du dithiothréitol était quasiment instantanée en présence d'un excès de maléimide (complète en moins de 5 secondes à 0°C).

Cette procédure nous a permis d'obtenir une inactivation plus complète du récepteur avec les diverses N-alkylmaléimides. Cependant, à 0°C en tampon phosphate (pH 7,4), les alkylmaléimides à longue chaîne réagissaient encore trop rapidement pour permettre une étude cinétique précise. Aussi avons-nous eu recours à l'abaissement du pH et de la température pour ralentir le processus d'alkylation du récepteur. Comme espéré, la diminution du pH de 7,4 à 6,6 a résulté en une augmentation de la demi-vie du récepteur en présence de N-éthylmaléimide 3 mM (de 10 à 45 minutes à -12°C). D'une manière similaire, le travail à une température inférieure à zéro en présence de glycérol 40 % comme agent antigel a conduit à un ralentissement de la cinétique d'inactivation et a probablement contribué aussi à la

stabilisation du récepteur. La figure 76 montre les cinétiques d'inactivation de pseudo-ordre un obtenues à -12°C avec la N-éthyl et la N-nonylmaléimide.

5 - COMPARAISON DE LA VITESSE DE REACTION DE DIVERSES N-ALKYL-MALEIMIDES AVEC LE RECEPTEUR LIBRE. EFFICACITE PARTICULIERE DE LA N-BENZYLMALEIMIDE.

En tampon phosphate pH 6,6 à -12°C , la N-nonylmaléimide réagit au moins quatre vingt dix fois plus vite que la N-éthylmaléimide à la même concentration (figure 76): la demi-vie est de moins de trente secondes pour le récepteur non lié en présence de N-nonylmaléimide contre quarante cinq minutes avec la N-éthylmaléimide. La figure 77 illustre l'effet de l'allongement de la longueur de la chaîne aliphatique des N-alkylmaléimides sur leur réactivité à l'égard du récepteur non lié. L'évolution du taux de récepteur résiduel après l'action à -12°C et pH 6,6 d'une série de N-alkylmaléimides à chaîne aliphatique linéaire saturée de longueur croissante est représentée en fonction de la longueur de cette chaîne linéaire. Toutes les maléimides ont été utilisées à la même concentration de 3,0 mM pendant une minute et demie. Ce temps d'incubation a été choisi car il correspond pour pratiquement tous les composés testés à des conditions de vitesse initiale, dans lesquelles la cinétique d'inactivation se rapproche le plus d'un phénomène de pseudo-ordre un. A l'évidence, l'efficacité des N-alkylmaléimides augmente considérablement avec la longueur de la chaîne alkyle. Ainsi, nos résultats obtenus avec le récepteur des glucocorticoïdes sont parfaitement compatibles avec le modèle à deux étapes proposé par Heitz et Anderson (1968) et discuté précédemment (paragraphe 1 de ce chapitre). La première étape de liaison de la maléimide au récepteur semble impliquer une région non polaire du récepteur. Le complexe maléimide-récepteur serait ainsi stabilisé par des interactions hydrophobes, et une plus grande concentration de ce complexe serait obtenue avec les dérivés à longue chaîne. Un environnement hydrophobe n'est pas

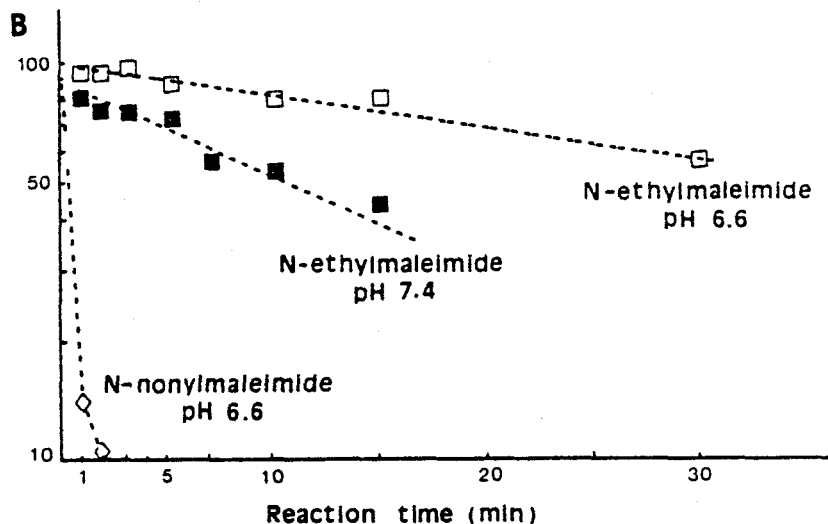


Figure 76 - Cinétique d'inactivation du récepteur des glucocorticoïdes libre par la N-éthyl ou la N-nonylmaléimide à -12°C . L'extrait sulfate de protamine est équilibré en tampon phosphate de potassium 20 mM (pH 7,4 ou 6,6), dithiothréitol 1 mM, molybdate de sodium 10 mM, contenant 40 % de glycérol, puis refroidi à -12°C . La N-éthyl ou la N-nonylmaléimide est ensuite ajoutée rapidement à la concentration finale de 3 mM. L'alkylation est mesurée à -12°C et terminée après un temps variable par l'addition de β -mercaptoéthanol (concentration finale 50 mM), et le dosage de l'activité de liaison de la dexaméthasone tritiée est ensuite effectué à 0°C . L'activité de liaison spécifique, B, est exprimée en pourcentage d'un contrôle non traité par la maléimide.

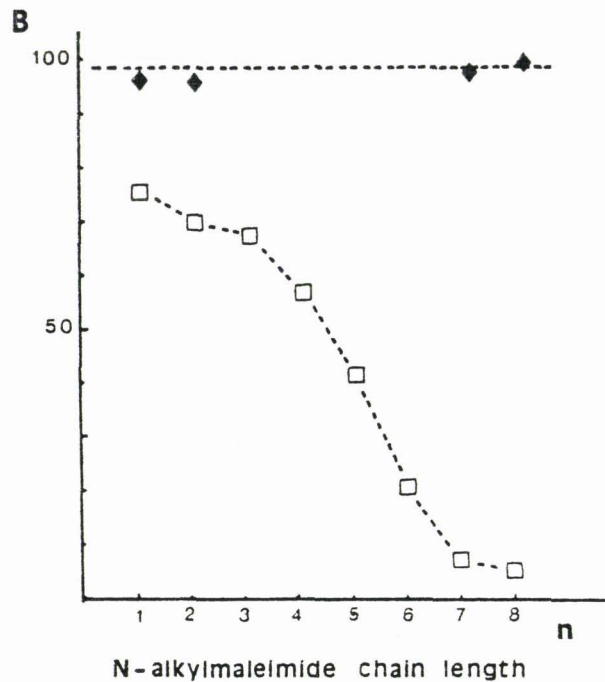


Figure 77 - Efficacité comparée de diverses N-alkylmaléimides vis-à-vis de l'inactivation du récepteur des glucocorticoïdes libres. L'extrait sulfate de protamine contenant le récepteur équilibré en tampon phosphate de potassium 20 mM, molybdate 10 mM, dithiothréitol 1 mM, glycérol 10 %, pH 6,6 est dilué dix fois dans le même tampon contenant 40 % de glycérol et refroidi à -12°C . Après stabilisation de la température, des N-alkylmaléimides de longueur variable (n = nombre de méthylène sur la chaîne alkyl $\text{R} = (\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$) sont ajoutées à la concentration finale de 3 mM. 1,5 minute plus tard, l'alkylation est stoppée par addition de β -mercaptoéthanol. L'activité récepteur résiduelle B est ensuite déterminée et exprimée en pourcentage d'un contrôle non traité par la maléimide (□ ---- □). Des échantillons de contrôle sont d'abord incubés avec la dexaméthasone [^3H] 30 nM pendant 19 heures à 0° avant d'être alkylés de la même façon que les autres par les maléimides 3 mM à -12°C pendant 1,5 minute, puis d'être dosés par le charbon dextran (◆ ----- ◆).



inattendu dans le cas d'un thiol localisé au voisinage de, ou dans la crevasse de liaison au stéroïde du récepteur, qui est très probablement non polaire. Un bon argument en faveur de la localisation de ce thiol dans le site de liaison lui-même est l'effet protecteur contre l'inactivation par les maléimides de la préincubation du récepteur avec l'hormone. Le complexe [³H] dexaméthasone-récepteur préformé ne subit pas de diminution significative de son activité de liaison par rapport à l'échantillon de contrôle quand il est incubé avec les diverses N-alkylmaléimides 3 mM pendant une minute et demie à - 12°C (figure 77). L'effet protecteur de la liaison préliminaire de la dexaméthasone sur le récepteur est d'ailleurs très bien documenté dans le cas de l'inactivation par la N-éthylmaléimide (Rees 1975, Young 1975 et Kalimi 1980). Dans l'expérience rapportée sur la figure 77 , la N-éthylmaléimide apparaît un peu plus efficace que dans le cas de la figure 76 (76 % d'activité résiduelle après une minute et demie contre 90 %). Une telle discordance est expliquée par le fait que les deux expériences ont été réalisées sur des lots distincts d'extrait de sulfate de protamine présentant une légère différence de stabilité. Cependant, l'effet majeur de la longueur de la chaîne alkyle a toujours été observé quand l'expérience de la figure 77 a été répétée (cinq fois).

La N-benzylmaléimide présente également une activité remarquable d'inactivation du récepteur non lié à l'hormone. Nous n'avons pas pu l'utiliser à la même concentration de 3 mM que les N-alkylmaléimides car , à cette concentration, ce réactif entraîne une augmentation considérable de la valeur des contrôles de liaison non spécifique du stéroïde tritié. Aussi a-t-il été employé à une concentration comprise entre 2,1 et 2,5 mM. A cette concentration, l'activité résiduelle de liaison observée après un temps de contact de une minute et demie à - 12°C et à pH 6,6 est de 40 à 60 % selon les expériences (Figure 78). Dans ces mêmes expériences utilisant les mêmes préparations de récepteur, la courbe d'inactivation de l'activité de liaison par les N-alkylmaléimides présentait un aspect nettement plus biphasique que dans la figure 77 avec une augmentation du taux d'inactivation très peu sensible et même parfois une diminution de ce taux quand la chaîne alkyl passe de deux à quatre chaînons

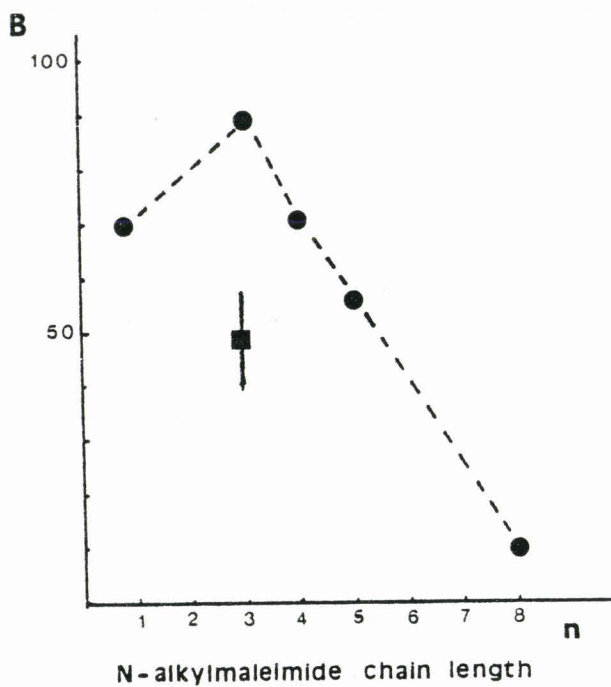


Figure 78 - Effet de la N-benzylmaléimide sur l'activité de liaison du récepteur des glucocorticoïdes libre. Les conditions sont en tout point comparables à celles de la figure 77, sauf que la N-benzylmaléimide est utilisée à une concentration de 2,2 à 2,5 mM contre 3 mM pour les N-alkylmaléimides, et que la concentration en dithiothréitol est de 1 mM.

N-alkylmaléimides de longueur de chaîne croissante (●-----●), N-benzylmaléimide (■), point placé au niveau de la position correspondant à la N-butylmaléimide.



carbonés, suivie secondairement d'une augmentation rapide de ce taux d'inactivation avec l'allongement supplémentaire de la chaîne au-delà de cinq chaînons. Il est à noter que dans les expériences résumées sur la figure 78, la concentration initiale des N-alkylmaléimides était de 3 mM contre 2,1 à 2,5 mM pour la N-benzylmaléimide et ceci au cours de l'alkylation d'échantillons contenant du dithiothréitol 1 mM, soit une concentration en thiols endogènes de 2 mM. La concentration en thiols protéiques de ces échantillons étant négligeable (de l'ordre de 0,05 mM) et l'alkylation du dithiothréitol par les maléimides étant quasi instantanée, il est vraisemblable que l'alkylation du récepteur s'est faite avec une concentration effective de maléimide active de l'ordre de 1 mM pour les N-alkylmaléimides et de 0,1 à 0,5 mM pour la N-benzylmaléimide. Le rapport de ces concentrations effectives probables met davantage en lumière l'efficacité particulière de la N-benzylmaléimide par rapport à la N-butylmaléimide dont elle partage l'encombrement stérique pour ce qui est de la longueur de la chaîne (en pleine extension pour la N-butylmaléimide), mais qu'elle surclasse largement sur le plan de la vitesse d'inactivation du récepteur. Ces résultats suggèrent que l'environnement immédiat du thiol essentiel à la liaison du stéroïde présente une affinité particulière pour les dérivés aromatiques et pourrait donc comporter un acide aminé également aromatique pouvant interagir par ses électrons π avec les électrons π du noyau de la benzylmaléimide. De tels résultats ne sont pas sans rappeler ceux que nous avons obtenus avec les dérivés 17 β -carboxamides de la dexaméthasone (voir précédemment dans la partie résultats II-3). Nous y reviendrons dans la discussion générale de la partie V de ce chapitre.

6 - INTERACTION AVEC LE RECEPTEUR DE N-ALKYLMALÉIMIDES INACTIVÉES PAR LE β -MERCAPTOETHANOL

Un argument supplémentaire en faveur du modèle à deux étapes impliquant une interaction non covalente entre la chaîne alkyle des dérivés maléimides et le site de liaison au glucocorticoïde du récepteur est fourni par le résultat d'expériences réalisées

avec des N-alkylmaléimides pré-traitées avec un excès de β -mercapto-éthanol (figure 79). A une concentration de 3 mM, ces maléimides inactivées sont encore capables d'inhiber complètement la liaison de la dexaméthasone tritiée au récepteur. Cet effet n'est observé qu'avec les maléimides à longue chaîne, c'est-à-dire les dérivés les plus hydrophobes obtenus à partir des maléimides les plus réactives. De plus, cet effet apparaît non covalent, puisque l'élimination par gel-filtration des maléimides inactivées résulte en la réapparition complète de l'activité de liaison. Nous avons bien sûr vérifié qu'avec toutes les N-alkylmaléimides actives utilisées précédemment, aucune réversibilité n'était obtenue après gel-filtration, quel qu'ait été le temps d'incubation avec la maléimide. Dans ce cas, la liaison covalente semble établie. Ainsi donc les résultats décrits sur la figure 79 peuvent être expliqués par l'existence d'une compétition entre la dexaméthasone tritiée et les maléimides inactivées pour la liaison au récepteur. Ces dérivés non stéroïdiens présentent probablement une très faible affinité pour le récepteur quand la chaîne alkyle est courte, mais l'allongement de la chaîne entraînerait une augmentation progressive de l'affinité avec un K_i devenant inférieur à 3 mM et autoriserait alors une compétition efficace à cette concentration.

7 - COMPETITION ENTRE LA N-NONYLSUCCINIMIDE ET LA DEXAMETHASONE TRITIEE POUR LA LIAISON AU RECEPTEUR

L'hypothèse précédente est renforcée par des expériences de compétition à 0°C entre la dexaméthasone tritiée et la N-nonylsuccinimide, un autre dérivé de maléimide dépourvu de toute activité alkylante et dont la structure présente une similitude extrêmement étroite avec la N-nonylmaléimide. Un diagramme en coordonnées double inverses (figure 80) suggère clairement que la N-nonylsuccinimide inhibe la liaison de la dexaméthasone tritiée à une population homogène de sites récepteurs d'une manière compétitive. A l'inverse la N-éthylsuccinimide à une concentration inférieure à 5 mM ne montre aucune inhibition compétitive de la liaison

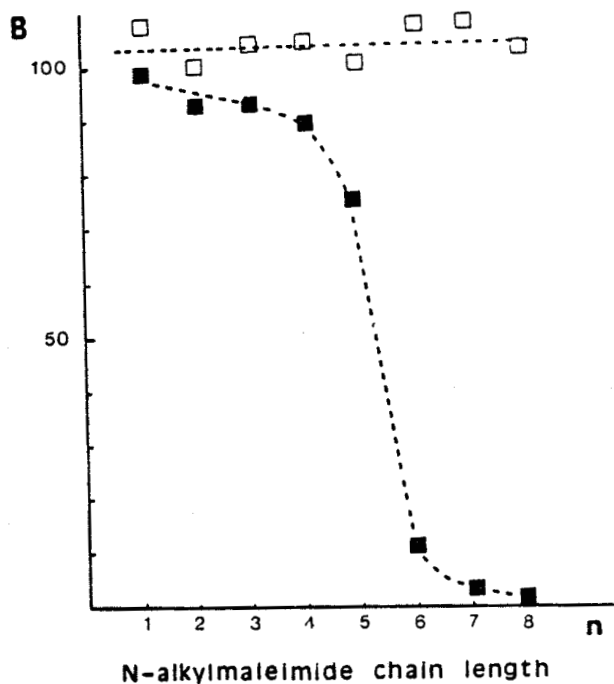


Figure 79 - Effet des N-alkylmaléimides préalablement inactivées par le β -mercaptoéthanol sur l'activité de liaison du récepteur. La procédure est la même que dans la figure 77 sauf que le β -mercaptoéthanol et les N-alkylmaléimides sont mélangées avec le milieu d'incubation avant l'addition du récepteur. Les concentrations finales en β -mercaptoéthanol et en maléimide sont de 50 et de 3 mM respectivement. Après dix minutes, les échantillons de récepteur sont dilués avec ce milieu et deux minutes plus tard l'incubation avec la dexaméthasone tritiée est lancée soit immédiatement (■-----■), soit après gel-filtration sur une colonne d'Ultrogel ACA 202 (□-----□). La liaison observée B est exprimée en pourcentage d'un contrôle non traité avec les maléimides.

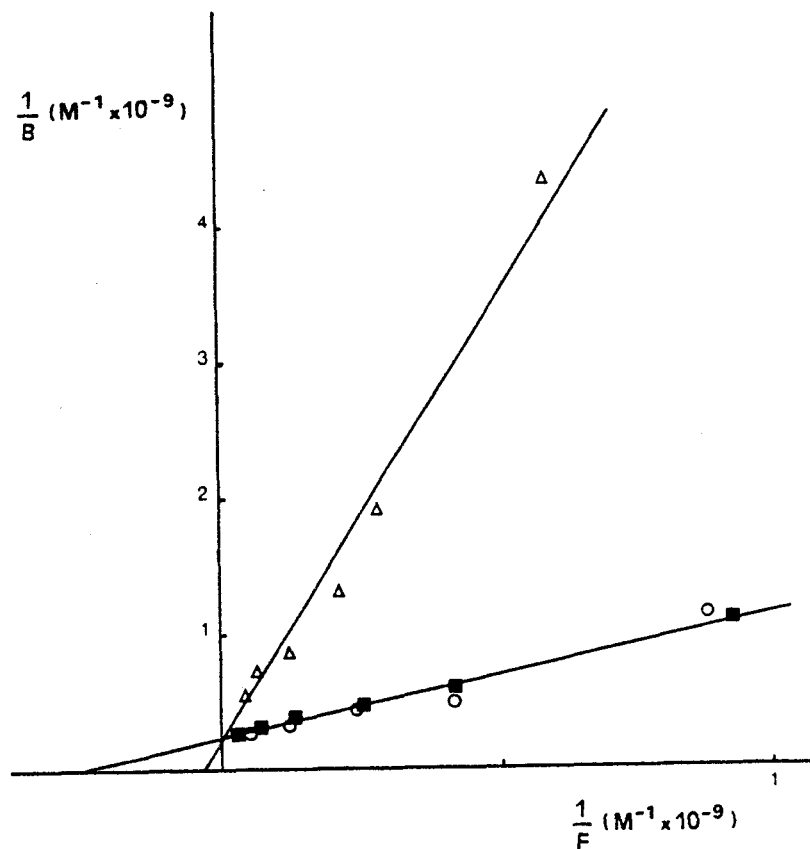


Figure 80 - Effet des N-alkylsuccinimides sur la liaison au récepteur des glucocorticoïdes. L'extrait sulfate de protamine est incubé avec la dexaméthasone [^3H] pendant 19h à 0°C , et la liaison spécifique au récepteur des glucocorticoïdes est déterminée en double par le dosage au charbon dextran. Diagramme en coordonnées double-inverses de la liaison spécifique B de la dexaméthasone [^3H] à différentes concentrations (F), en présence ou en absence d'une concentration constante de succinimide : Δ , N-nonylsuccinimide 3 mM, \circ , N-éthylsuccinimide 3 mM, \blacksquare , pas de succinimide.

de la dexaméthasone tritiée. Le K_i apparent de la N-nonylsuccinimide est d'environ 0,5 à 1 mM (moyenne de trois expériences), ce qui est en bon accord avec les résultats obtenus précédemment avec la N-nonylmaléimide 3 mM inactivée par le β -mercaptoéthanol.

8 - DISCUSSION

Nous avons réalisé dans ce travail la première tentative de caractérisation de l'environnement du thiol essentiel à la liaison du stéroïde sur le récepteur des glucocorticoïdes. Nos conditions de travail étaient loin des conditions idéales réunies par ceux qui ont utilisé les N-alkylmaléimides sur les enzymes, à savoir, disposer d'une protéine purifiée et bien caractérisée dont le site actif contient une cystéine essentielle bien définie. Nous avons cependant réussi à appliquer avec succès leur approche à l'étude du récepteur des glucocorticoïdes. Cette réussite n'a cependant été obtenue qu'au prix de précautions expérimentales particulières comportant essentiellement le maintien du groupement thiol du centre actif sous forme réduite jusqu'à l'instant même de l'alkylation par la maléimide et le recours à une température de travail très inférieure à 0°C. La lourdeur de ce système expérimental, qui a demandé beaucoup d'efforts de mise au point, est telle que nous n'avons pas jugé utile de pousser très loin les études cinétiques et la mesure précise des constantes de vitesse d'alkylation apparente de pseudo-ordre un, ainsi que le calcul de la constante de dissociation du complexe formé par le récepteur avec chacune des maléimides testées. Nous avons préféré aller à l'essentiel pour montrer l'effet indiscutable de la longueur de la chaîne alkyle sur la vitesse d'inactivation du récepteur à partir de mesures effectuées dans des conditions standardisées où toutes les maléimides étaient testées en parallèle après une durée d'incubation identique avec le même lot de récepteur. La validité de l'approche expérimentale ayant été largement étayée par les études antérieures, il nous a paru plus important d'insister sur nos conditions expérimentales particulières et sur la mise en évidence de la localisation probable de la cystéine essentielle dans le site

de liaison par nos expériences de compétition utilisant les maléimides inactivées par le β -mercaptoéthanol ou les succinimides N-substitués. Nous pensons avoir apporté sur ce dernier point des arguments, certes indirects, mais solides, qui s'articulent d'ailleurs d'une manière fort heureuse non seulement avec les résultats apportés par l'étude menée précédemment sur les 17β -carboxamides de la dexaméthasone, mais aussi avec les données les plus récentes de la littérature, ainsi que nous allons le voir.

V - SYNTHESE DES RESULTATS OBTENUS AVEC LES 17 β -CARBOXAMIDES
ET LES MALEIMIDES N-SUBSTITUEES - COMPARAISON AUX DONNEES
DE LA LITTERATURE

Nous avons vu dans la partie bibliographique que d'après Simons (1981) la cystéine essentielle à la liaison du stéroïde au récepteur est alkylée par le 21 mésylate de dexaméthasone et se trouverait dans le site de liaison au niveau de la région du récepteur faisant face à la chaîne latérale 17 β du stéroïde (voir figure 33, page 98). Nos propres résultats suggèrent que cette cystéine est dans un environnement hydrophobe au voisinage d'un acide aminé aromatique. D'autre part, la région faisant face à la chaîne 17 β du stéroïde apparaît, d'après les données acquises avec les 17 β -carboxamides (voir page 198), comporter un acide aminé aromatique situé dans un environnement hydrophobe. La position de cet acide aminé aromatique par rapport au cycle D et à la chaîne latérale est telle qu'il est probablement voisin de la cystéine essentielle à la liaison si celle-ci interagit avec la chaîne dihydroxyacétone et en particulier le carbonyl en 20 comme le suppose Simons. La publication récente de la séquence de l'ADN complémentaire du récepteur des glucocorticoïdes humain puis de celui du rat (voir partie bibliographique II,3.2.b et les figures 38, 38bis et 39 page 130 à 132) apporte des éléments très intéressants qui s'accordent parfaitement avec nos résultats et les conclusions que nous nous sommes autorisés à en tirer. En effet, il apparaît clairement que c'est la région C-terminale qui est responsable de la liaison au stéroïde. L'homologie de séquence est pratiquement complète entre les récepteurs du rat et de l'homme dans cette région. De plus, dans le cas du récepteur humain Hollenberg a montré que seule la forme α de l'ADN complémentaire, codant pour une séquence C-terminale globalement hydrophobe contenant en particulier une cystéine, pouvait conduire à l'expression d'une protéine liant les glucocorticoïdes, ainsi que l'ont établi clairement des expériences de transfection cellulaire (figure 39, page 132). Cette séquence correspond aux 49 aminoacides de la partie C-terminale du récepteur humain.

La même séquence est retrouvée à une seule exception près (un changement ASN \rightarrow THR, respectivement en position 734 et 752 des deux récepteurs considérés) en position C-terminale du récepteur du rat. Cette séquence comporte une seule cystéine (en 736 sur le récepteur humain et en 754 chez le rat) encadrée par une tyrosine et une phénylalanine. La prévision de la structure secondaire de la région C-terminale du récepteur du rat par les méthodes de Chou et Fasman (1974) et de Garnier (1978) montre qu'elle comporte une alternance probable de domaines en hélice α et en feuillet β . L'étude plus précise de la région encadrant la cystéine essentielle montre que celle-ci se trouve à la jonction probable d'une hélice α (le programme de Garnier semble moins fiable pour la prédiction des coudes β que celui de Chou et Fasman) et d'une structure en feuillet β (Tableau XXIV et figure 81).

Nous avons vérifié avec des modèles de Dreiding du peptide Tyrosyl-cystéinyl-phénylalanine et du DXB, qu'une interaction du thiol de la cystéine avec la cétone en 20 du stéroïde était parfaitement compatible avec la superposition des cycles aromatiques du benzyl du DXB et de la tyrosine ou de la phénylalanine. De même la N-benzylmaléimide après alkylation du thiol de la cystéine peut-elle interagir par son noyau aromatique avec le noyau correspondant de l'un des deux aminoacides voisins de la cystéine. Ces résultats sont parfaitement compatibles avec tout le travail qui précède. A défaut d'apporter la preuve que la cystéine en question est bien la cystéine essentielle du centre actif du récepteur, ils fournissent un faisceau de présomptions suffisamment concordantes pour penser que cette éventualité est extrêmement probable. Il est inutile d'ajouter que la constatation que les données de la séquence du DNA complémentaire du récepteur autorisaient des conclusions allant dans le même sens que nos propres hypothèses a été pour nous un moment de grande satisfaction intellectuelle. La justification complète de nos efforts ne sera bien sûr apportée qu'après confirmation définitive de l'identité de la cystéine essentielle, travail auquel nous espérons contribuer.

Acide aminé n°	Méthode de				Garnier				Méthode de Chou & Fasman			
	Paramètres de conformation				Structure prévue				Structure prévue			
	PH	PE	PT	PC	H	E	T	C	H	E	T	C
Val	212	-7	-135	-90	H					E		
Val	207	-12	-110	-90	H				H			
Glu	184	-35	-47	-114	H				H			
Asn	153	-51	-3	-74	H				H			
750 Leu	140	-52	32	-10	H					E		
Leu	120	-32	79	35	H					E		
Thr	95	23	118	52			T		H			
Tyr	88	75	104	4			T		H			
754 Cys	97	124	69	-52		E				E		
Phe	101	146	35	-91		E				E		
Gln	90	122	-11	-65		E				E		
Thr	67	83	-2	-8		E				E		
Phe	61	1	2	-26	H				H			
Leu	62	-87	9	15	H				H			
760 Asp	50	-104	119	67			T		H			
Lys	46	-88	120	117			T					C
Thr	39	-67	98	157				C				C
Met	33	-37	22	109				C				C

TABLEAU XXIV - Structure secondaire probable de la région entourant la cystéine 754 du récepteur des glucocorticoïdes du rat en utilisant les programmes de calcul de Garnier (1978, *J. Mol. Biol.* **120**, 97-120) et de Chou et Fasman (1974, *Biochemistry* **13**, 211-245). Le code est H pour hélice α , E pour feuillet plissé β , T pour coude β et C pour structure aléatoire. Les paramètres de probabilité respective des différentes conformations pour chaque acide aminé sont indiqués pour le programme de Garnier.

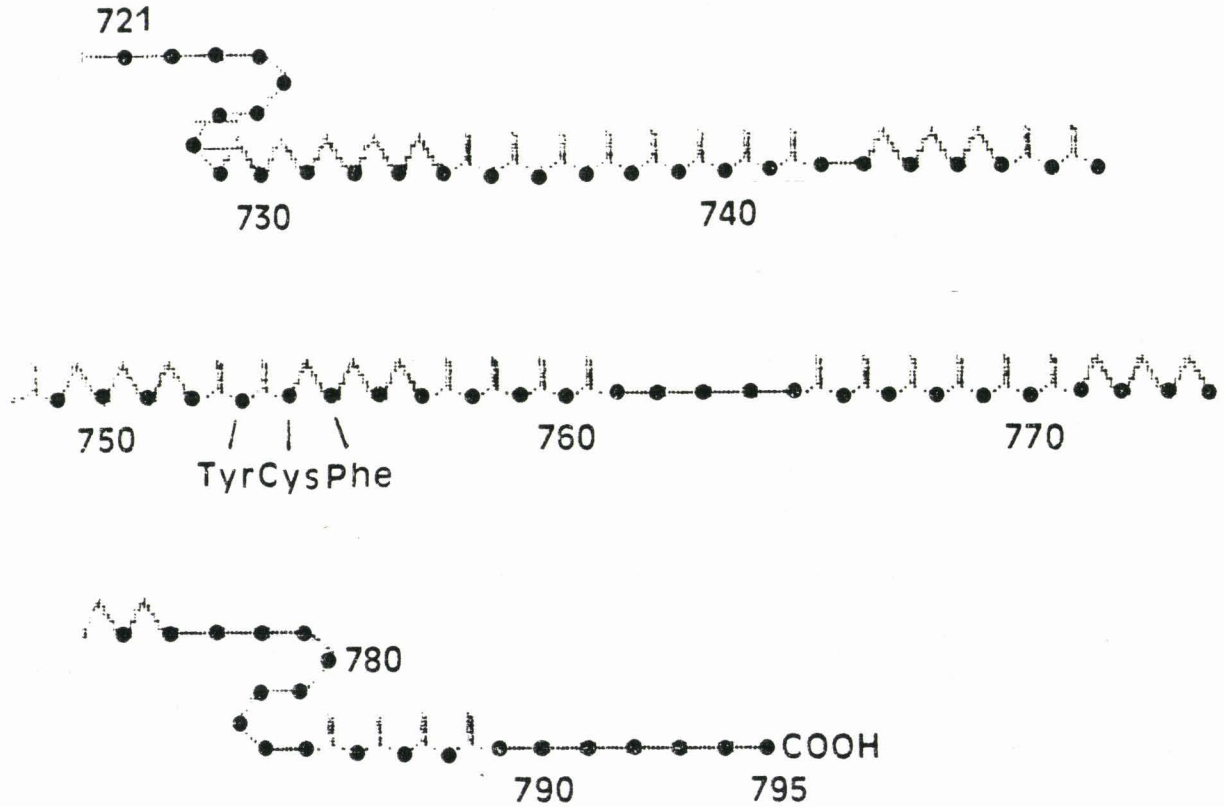


Figure 81 - Structure secondaire probable de la région C-terminale (résidus 721 à 795) du récepteur des glucocorticoïdes du rat. Application de la méthode de Chou et Fasman (1974, *Biochemistry* 13, 211-222 et 222-245) à la séquence en amino-acides publiée par Miesfeld (1986). La position du peptide Tyr-Cys-Phe contenant la seule cystéine de la région est indiquée.

VI - CONCLUSION - PERSPECTIVES

Nous pensons avoir montré clairement dans ce travail que l'étude du site de liaison aux stéroïdes du récepteur des glucocorticoïdes à l'aide de sondes moléculaires diverses, stéroïdiennes ou non, réagissant de manière covalente ou non, peut conduire à des résultats très intéressants, même quand elle est pratiquée sur un récepteur peu ou pas purifié. C'est pourquoi les travaux rapportés dans cette thèse ont connu et connaissent encore de nombreux prolongements directs dans notre laboratoire au sein de l'équipe qui nous entoure. C'est ainsi que :

. Une intéressante étude de corrélation structure-activité quantitative concernant les 17 β -carboxamides de la dexaméthasone a été menée par Pierrette Maes.

. Le développement d'une série de 17 β -carboxamides tertiaires a été réalisé par Philippe Lefebvre, dans l'espoir, malheureusement déçu, d'obtenir des dérivés antiglucocorticoïdes plus actifs. Un des produits obtenus présente cependant des propriétés très intéressantes de stabilisation du récepteur sous forme non transformée de haut poids moléculaire in vitro. Son utilisation, conjointement à celle du RU 486, ouvre des perspectives prometteuses pour la compréhension du mécanisme de l'activité antiglucocorticoïde.

. L'approche par le stéroïde lesté est en plein développement et plusieurs anticorps antidexaméthasone ont été préparés, caractérisés et purifiés par Hocine Hammadi et Noureddine Bouzerna. La préparation de fragments Fab est en cours.

. Ces mêmes anticorps ont été utilisés pour l'approche anti-idiotypique qui, après bien des efforts des mêmes collaborateurs, vient d'aboutir à l'obtention d'un anticorps anti-idiotypique réagissant à la fois contre le premier anticorps ayant servi à déclencher sa production et contre le récepteur des glucocorticoïdes du foie de rat.

. L'étude des thiols du récepteur s'est poursuivie avec la démonstration par Viviane Dumur et Thierry Idziorek de la possibilité de retenir le récepteur lié sur une colonne portant un thiol activé immobilisé. D'autre part, Stéphane Blicq a appliqué les maléimides N-substitués à la caractérisation du thiol essentiel à la transformation du complexe glucocorticoïde-récepteur. Son environnement apparaît différent de celui du site de liaison. Des effets particulièrement intéressants ont été observés avec la benzylmaléimide qui présente une activité un peu similaire à celle du molybdate : stabilisation partielle du récepteur libre contre l'inactivation à la chaleur, maintien sous forme de haut poids moléculaire du complexe glucocorticoïde-récepteur et inhibition de la transformation.

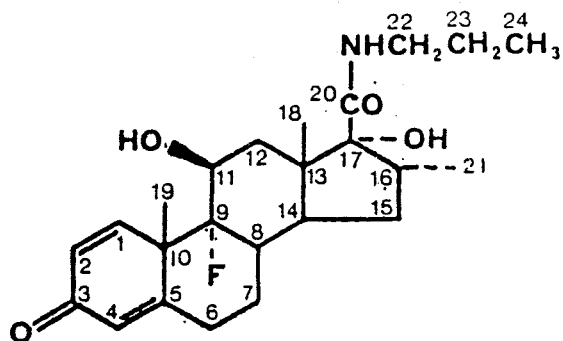
Tous ces nouveaux résultats constituent une justification supplémentaire de nos travaux personnels. D'autre part, l'étude menée sur les 17 β -carboxamides a conduit également à la mise au point d'un gel d'affinité efficace pour la purification du récepteur des glucocorticoïdes. Cette purification se poursuit dans le laboratoire avec pour objectif l'obtention d'anticorps spécifiques, l'étude de l'arrangement en sous-unités du récepteur non transformé et celle de la transformation de ce complexe sous forme liée à un agoniste ou à un antagoniste. Ces travaux font respectivement l'objet des efforts de Claude Richard, Bernard Sablonnière et Pierre-Marie Danzé. Enfin la collaboration se poursuit avec l'équipe de Patrick Lustenberger, et les groupes de Guy Rousseau et Joseph Martial à Bruxelles et Liège, et celui du Professeur Etienne Baulieu à Bicêtre.

Beaucoup d'inconnues persistent à propos de la structure et de la fonction des récepteurs des hormones stéroïdes. La biologie moléculaire a réussi une percée très importante en nous livrant la séquence de l'ADN complémentaire codant pour ces protéines. Mais elle ne peut nous fournir la structure tridimensionnelle ni éclairer les mécanismes d'interaction et de régulation fonctionnelle de ces macromolécules. La biochimie des protéines, à condition qu'on la pratique en utilisant

toutes les ressources des techniques modernes, a certainement encore beaucoup à nous apprendre à propos de ces molécules au rôle essentiel dans l'organisme.

ANNEXE : DONNEES RADIOCRISTALLOGRAPHIQUES
COMPLETES DU DXP ET DU DXB, DEUX
17 β -CARBOXAMIDES DERIVES DE LA DEXAMETHASONE
(présentées selon DUAX 1975b)

N-propyl, 9 α -fluoro, 11 β , 17 α -dihydroxy, 16 α -méthyl, 1,4-androstadiène,
17 β -carboxamide (DXP)



1)

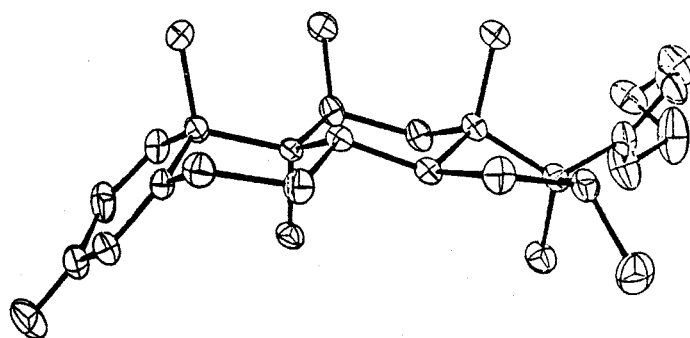
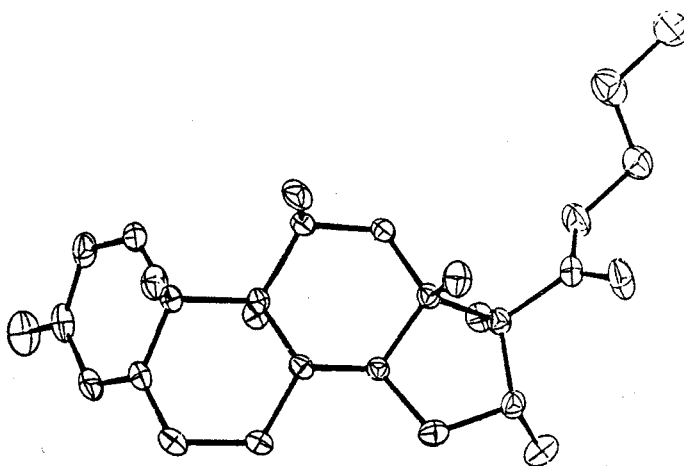
Données cristallographiques

Formule brute $C_{24}H_{34}F_1N_1O_4$
 P.M. 419,5
 Système cristallin monoclinique
 Groupe spatial $P2_1$
 Densité mesurée -
 Densité calculée 1,28
 Volume de la maille $1092,3 \text{ \AA}^3$
 Z (molécules par maille) 2

Dimensions de la maille

a	15,169	α	90,000
b	11,336	β	100,294
c	6,456	γ	90,000

Réflexions observées : 2150



BU
LILLE

2) Géométrie moléculaire

Coordonnées atomiques

	X/A	Y/B	Z/C		X/A	Y/B	Z/C
C ₁	0,4114	0,8590	0,3368	C ₁₈	0,1036	0,5715	- 0,1024
C ₂	0,4887	0,8682	0,4656	C ₁₉	0,3608	0,8637	- 0,0471
C ₃	0,5659	0,7886	0,4372	C ₂₁	0,1867	0,1918	0,0386
C ₄	0,5571	0,7282	0,2439	C ₂₀	0,0338	0,3881	0,1460
C ₅	0,4801	0,7212	0,1070	C ₂₂	- 0,0798	0,4020	0,3779
C ₆	0,4704	0,6454	- 0,0854	C ₂₃	- 0,1039	0,5185	0,4545
C ₇	0,4027	0,5475	- 0,0684	C ₂₄	- 0,2002	0,5254	0,4847
C ₈	0,3143	0,5927	- 0,0137	O ₃	0,6369	0,8004	0,5654
C ₉	0,3285	0,6790	0,1718	O ₁₁	0,1993	0,7978	0,0860
C ₁₀	0,3951	0,7815	0,1425	O ₁₇	0,1773	0,3606	0,3505
C ₁₁	0,2402	0,7171	0,2383	O ₂₀	- 0,0213	0,3753	- 0,0152
C ₁₂	0,1797	0,6114	0,2710	F	0,3743	0,6159	0,3506
C ₁₃	0,1664	0,5226	0,0903	N	0,0123	0,3973	0,3372
C ₁₄	0,2593	0,4894	0,0432	NH	0,0607	0,4019	0,4367
C ₁₅	0,2410	0,3845	- 0,1060				
C ₁₆	0,1628	0,3173	- 0,0324				
C ₁₇	0,1350	0,3957	0,1438				

Noyau stéroïdien

Cycle A		Cycle B		Cycle C		Cycle D	
Distances interatomiques (Å)							
C ₁ -C ₂	1,314	C ₅ -C ₆	1,495	C ₉ -C ₁₁	1,540	C ₁₃ -C ₁₄	1,540
C ₂ -C ₃	1,451	C ₆ -C ₇	1,529	C ₁₁ -C ₁₂	1,546	C ₁₄ -C ₁₅	1,525
C ₃ -C ₄	1,467	C ₇ -C ₈	1,535	C ₁₂ -C ₁₃	1,527	C ₁₅ -C ₁₆	1,554
C ₄ -C ₅	1,336	C ₈ -C ₉	1,531	C ₁₃ -C ₁₄	1,540	C ₁₆ -C ₁₇	1,560
C ₅ -C ₁₀	1,512	C ₉ -C ₁₀	1,573	C ₈ -C ₁₄	1,521	C ₁₃ -C ₁₇	1,573
C ₁ -C ₁₀	1,515	C ₅ -C ₁₀	1,512	C ₈ -C ₉	1,531	C ₁₃ -C ₁₇	

Angles de liaison		ESD =					
C ₁₀ C ₁ C ₂	124,4	C ₈ C ₉ C ₁₀	112,4	C ₁₁ C ₁₂ C ₁₃	114,0	C ₁₆ C ₁₇ C ₁₃	103,2
C ₁ C ₂ C ₃	121,7	C ₉ C ₁₀ C ₅	105,5	C ₉ C ₁₁ C ₁₂	112,8	C ₁₄ C ₁₃ C ₁₇	98,3
C ₂ C ₃ C ₄	116,8	C ₁₀ C ₅ C ₆	115,2	C ₈ C ₉ C ₁₁	112,9	C ₁₅ C ₁₄ C ₁₃	104,2
C ₃ C ₄ C ₅	122,1	C ₅ C ₆ C ₇	109,0	C ₉ C ₈ C ₁₄	108,0	C ₁₄ C ₁₅ C ₁₆	104,6
C ₄ C ₅ C ₁₀	122,8	C ₆ C ₇ C ₈	113,5	C ₈ C ₁₄ C ₁₃	114,9	C ₁₅ C ₁₆ C ₁₇	105,4
C ₁ C ₁₀ C ₅	111,7	C ₇ C ₈ C ₉	112,8	C ₁₂ C ₁₃ C ₁₄	108,1		
C ₁ C ₁₀ C ₉	110,0	C ₁₀ C ₉ C ₁₁	115,9	C ₁₂ C ₁₃ C ₁₇	116,1		
C ₄ C ₅ C ₆	121,9	C ₇ C ₈ C ₁₄	109,8	C ₈ C ₁₄ C ₁₅	119,6		

Angles de torsion

C ₁₀ C ₁ C ₂ C ₃	- 3,10	C ₁₀ C ₅ C ₆ C ₇	- 60,5	C ₁₄ C ₈ C ₉ C ₁₁	- 54,0	C ₁₇ C ₁₃ C ₁₄ C ₁₅	48,3
C ₁ C ₂ C ₃ C ₄	7,26	C ₅ C ₆ C ₇ C ₈	50,4	C ₈ C ₉ C ₁₁ C ₁₂	50,3	C ₁₃ C ₁₄ C ₁₅ C ₁₆	-33,9
C ₂ C ₃ C ₄ C ₅	- 4,72	C ₆ C ₇ C ₈ C ₉	- 48,1	C ₉ C ₁₁ C ₁₂ C ₁₃	- 49,0	C ₁₄ C ₁₅ C ₁₆ C ₁₇	5,14
C ₃ C ₄ C ₅ C ₁₀	- 1,95	C ₇ C ₈ C ₉ C ₁₀	51,1	C ₁₁ C ₁₂ C ₁₃ C ₁₄	50,6	C ₁₅ C ₁₆ C ₁₇ C ₁₃	24,6
C ₄ C ₅ C ₁₀ C ₁	5,84	C ₈ C ₉ C ₁₀ C ₅	- 55,5	C ₁₂ C ₁₃ C ₁₄ C ₈	- 57,9	C ₁₄ C ₁₃ C ₁₇ C ₁₆	-44,1
C ₂ C ₁ C ₁₀ C ₅	- 3,34	C ₆ C ₅ C ₁₀ C ₉	62,1	C ₈ C ₉ C ₁₄ C ₁₃	59,7		

Extra-nucléaire

Distances		Angles		Angles de torsion			
		Oxygènes		Oxygènes	Fluor		
C_3O_3	1,235	$C_2C_3O_3$	122,2	$C_1C_2C_3O_3$	- 174,8	$C_7C_8C_9F$	- 62,1
$C_{11}O_{11}$	1,403	$C_4C_3O_3$	121,0	$C_5C_4C_3O_3$	177,3	$C_{14}C_8C_9F$	59,4
$C_{17}O_{17}$	1,430	$C_9C_{11}O_{11}$	106,6	$C_8C_9C_{11}O_{11}$	- 75,2	$C_1C_{10}C_9F$	- 60,9
$C_{13}C_{18}$	1,529	$C_{12}C_{11}O_{11}$	113,7	$C_{10}C_9C_{11}O_{11}$	56,5	$C_5C_{10}C_9F$	59,7
$C_{10}C_{19}$	1,552	$C_{13}C_{17}O_{17}$	110,9	$C_{13}C_{12}C_{11}O_{11}$	72,6	$C_{19}C_{10}C_9F$	179,4
$C_{16}C_{21}$	1,519	$C_{16}C_{17}O_{17}$	112,8	$C_{12}C_{13}C_{17}O_{17}$	- 38,0	$C_{12}C_{11}C_9F$	- 65,2
				$C_{14}C_{13}C_{17}O_{17}$	77,0	$O_{11}C_{11}C_9F$	169,4
				$C_{18}C_{13}C_{17}O_{17}$	-165,2		
chaîne 178		Méthyles		$C_{15}C_{16}C_{17}O_{17}$	- 95,1	jonctions inter-cycles	
$C_{17}C_{20}$	1,540	$C_{12}C_{13}C_{18}$	111,1	$C_{21}C_{16}C_{17}O_{17}$	29,4	$C_2C_1C_{10}C_9$	113,5
$C_{20}O_{20}$	1,222	$C_{14}C_{13}C_{18}$	112,7			$C_3C_4C_5C_6$	-177,4
$C_{20}N$	1,336	$C_{17}C_{13}C_{18}$	110,0	Méthyles		$C_4C_5C_6C_7$	115,3
NC_{22}	1,469	$C_1C_{10}C_{19}$	106,7	$C_{11}C_{12}C_{13}C_{18}$	- 73,6	$C_4C_5C_{10}C_9$	-113,7
$C_{22}C_{23}$	1,479	$C_5C_{10}C_{19}$	109,1	$C_8C_{14}C_{13}C_{18}$	65,3	$C_6C_5C_{10}C_1$	-178,4
$C_{23}C_{24}$	1,511	$C_9C_{10}C_{19}$	114,0	$C_{15}C_{14}C_{13}C_{18}$	- 67,5	$C_6C_7C_8C_{14}$	-168,6
		$C_{15}C_{16}C_{21}$	113,4	$C_{16}C_{17}C_{13}C_{18}$	73,8	$C_7C_8C_{14}C_{13}$	-177,0
Fluor		$C_{17}C_{16}C_{21}$	113,3	$C_2C_1C_{10}C_{19}$	122,5	$C_7C_8C_{14}C_{15}$	- 51,8
C_9F_9	1,428	chaîne 178		$C_4C_5C_{10}C_{19}$	123,6	$C_9C_8C_{14}C_{15}$	-175,2
		$C_{13}C_{17}C_{20}$	113,2	$C_6C_5C_{10}C_{19}$	- 60,7	$C_7C_8C_9C_{11}$	-175,5
		$C_{16}C_{17}C_{20}$	112,0	$C_8C_9C_{10}C_{19}$	64,2	$C_{14}C_8C_9C_{10}$	172,6
		$O_{17}C_{17}C_{20}$	104,9	$C_{11}C_9C_{10}C_{19}$	- 67,7	$C_{11}C_9C_{10}C_1$	52,0
		$C_{17}C_{20}N$	114,3	$C_{14}C_{15}C_{16}C_{21}$	-119,3	$C_{11}C_9C_{10}C_5$	172,6
		$C_{17}C_{20}O_{20}$	122,0	$C_{13}C_{17}C_{16}C_{21}$	149,1	$C_1C_{10}C_9C_8$	-176,1
		$NC_{20}O_{20}$	123,7	chaîne 178		$C_{12}C_{11}C_9C_{10}$	-178,1
		$C_{20}NC_{22}$	124,4	$C_{12}C_{13}C_{17}C_{20}$	79,7	$C_{11}C_{12}C_{13}C_{17}$	159,8
		$NC_{22}C_{23}$	113,1	$C_{14}C_{13}C_{17}C_{20}$	-165,4	$C_{12}C_{13}C_{14}C_{15}$	169,3
		$C_{22}C_{23}C_{24}$	113,1	$C_{18}C_{13}C_{17}C_{20}$	- 47,5	$C_{17}C_{13}C_{14}C_8$	-178,9
		Fluor		$C_{15}C_{16}C_{17}C_{20}$	146,8	$C_{12}C_{13}C_{17}C_{16}$	-159,0
		$C_8C_9F_9$	107,0	$C_{21}C_{16}C_{17}C_{20}$	- 88,8	$C_8C_{14}C_{15}C_{16}$	-164,0
		$C_{10}C_9F_9$	103,7	$C_{13}C_{17}C_{20}N$	- 97,0		
		$C_{11}C_9F_9$	103,7	$C_{16}C_{17}C_{20}N$	146,7		
				$O_{17}C_{17}C_{20}N$	24,0		
				$C_{13}C_{17}C_{20}O_{20}$	82,7		
				$C_{16}C_{17}C_{20}O_{20}$	- 33,6		
				$O_{17}C_{17}C_{20}O_{20}$	-156,3		
				$C_{17}C_{20}NC_{22}$	175,0		
				$C_{20}NC_{22}C_{23}$	-111,1		
				$NC_{22}C_{23}C_{24}$	176,8		
				$O_{20}C_{20}NC_{22}$	- 4,7		

3) Analyse conformationnelle

3.1. Conformation générale

- Plan moyen BCD (C₅-C₁₇)

. distances des atomes par rapport à ce plan (en Å)

<u>Atomes du plan</u>		<u>Autres atomes</u>	
C ₅	- 0,46	C ₁	- 0,49
C ₆	0,13	C ₂	- 1,49
C ₇	- 0,07	C ₃	- 2,12
C ₈	0,38	C ₄	- 1,50
C ₉	- 0,15	C ₁₈	1,86
C ₁₀	0,14	C ₁₉	1,65
C ₁₁	0,21	C ₂₁	- 1,18
C ₁₂	- 0,15	C ₂₀	0,13
C ₁₃	0,34	C ₂₂	- 0,29
C ₁₄	- 0,11	C ₂₃	0,06
C ₁₅	0,18	C ₂₄	0,48
C ₁₆	- 0,08		
C ₁₇	- 0,38		
		O ₃	- 3,12
		O ₁₁	1,57
		O ₁₇	- 1,78
		O ₂₀	1,14
		N	- 0,62

La chaîne latérale est pratiquement dans le plan moyen

- Plan moyen A C₁C₂C₃C₄C₅C₁₀Distances des atomes à ce plan

C ₁	+ 0,006	O ₃	- 0,114
C ₂	+ 0,035		
C ₃	- 0,044		
C ₄	+ 0,010		
C ₅	+ 0,032		
C ₁₀	- 0,039		

Angle A/BCD - 50,43 Å

- Twist C₁₉ - C₁₀..... C₁₃ - C₁₈ : - 0,28 Å

3.2. Etude des différents cycles

Cycle A : - plan
 - distance au plan moyen $C_1 C_2 C_3 C_4 C_5 C_{10}$

C_1	+ 0,006	O_3	- 0,114
C_2	+ 0,035		
C_3	- 0,044		
C_4	+ 0,010		
C_5	+ 0,032		
C_{10}	- 0,039		

Cycle B : - chaise $\Delta C_2^{7-8} = 3,6$
 symétrie miroir $\Delta C_S^5 = 3,5$ et $\Delta C_2^{6-7} = 11,7$

angle de torsion moyen : 54,6

- plan moyen $C_6 C_7 C_9 C_{10}$

C_5	- 0,69
C_6	- 0,03
C_7	0,03
C_8	0,61
C_9	- 0,01
C_{10}	0,01

Cycle C : - chaise

symétrie miroir $\Delta C_S^{11} = 2,3$ et $\Delta C_2^{11-15} = 2,8$
 $\Delta C_2^{8-9} = 9,4$

angle de torsion moyen : 53,4

- Plan moyen $C_8 C_{11} C_{12} C_{14}$

C_8	0,03
C_9	- 0,65
C_{11}	- 0,05
C_{12}	0,05
C_{13}	0,69
C_{14}	- 0,02

Cycle D	- enveloppe 13 β	$\Delta C_S^{13} = 7,2$
	symétrie $\Delta = 22,6^\circ$	$\Delta \frac{13-14}{2} = 15,6$
	$\phi_m = 49,3$	
	- plan moyen $C_{14}C_{15}C_{16}C_{17}$	
	C_{13}	0,74
	C_{14}	- 0,01
	C_{15}	0,03
	C_{16}	- 0,04
	C_{17}	0,02

3.3. Chaîne latérale

- Plan moyen $C_{17}C_{20}O_{20}N$

C_{17}	+ 0,000
C_{20}	- 0,002
O_{20}	+ 0,001
N	+ 0,001
NH	- 0,05
C_{22}	+ 0,11
O_{17}	- 0,56

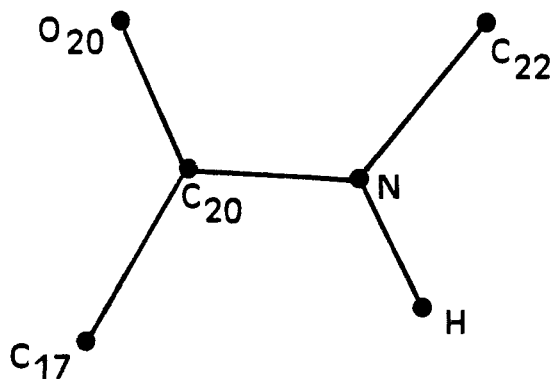
- angle dièdre de ce plan avec le plan moyen BCD
123,7°

angle dièdre avec le plan $C_{14}C_{15}C_{16}C_{17}$: 50,5°

- angle de torsion

$C_{13}C_{17}C_{20}O_{20}$	82,7
$C_{16}C_{17}C_{20}O_{20}$	- 33,6
$C_{13}C_{17}C_{20}N$	- 97,0
$C_{16}C_{17}C_{20}N$	146,7
$C_{17}C_{20}NC_{22}$	175,0
$O_{20}C_{20}NC_{22}$	- 4,8
$O_{20}C_{20}N NH$	176,6
$C_{17}C_{20}N NH$	- 3,7

- O_{20} par rapport à C_{13} : synclinal
- C_{22} par rapport à O_{20} : synperiplanar



Liaison amide plane et trans

NH O₁₇ : 2,00 Å

mais O₁₇ n'est pas dans le plan

3.4. Jonction entre les cycles

- Angles dièdres à la jonction des cycles

Plan	Composition	Angles	
A	C ₁ C ₂ C ₄ C ₅	A/A-B	176,6
A-B	C ₁ C ₅ C ₆ C ₁₀	A-B/B	123,1
B	C ₆ C ₇ C ₉ C ₁₀	B/B-C	136,2
B-C	C ₇ C ₈ C ₉ C ₁₁	B-C/C	129,0
C	C ₈ C ₁₁ C ₁₂ C ₁₄	C/C-D	134,1
C-D	C ₁₂ C ₁₃ C ₁₄ C ₁₅	C-D/D	133,8
D	C ₁₃ C ₁₅ C ₁₆ C ₁₇	C/C-D'	100,2
D'	C ₁₄ C ₁₅ C ₁₆ C ₁₇	C-D'/D'	116,7
C-D'	C ₁₂ C ₁₃ C ₁₄ C ₁₇		

- Configuration des jonctions intercycles

A/B	plane	$P_1 = 5,8 + 62,1 = 67,9$
B/C	trans	$T_2 = 51,1 + 54,0 = 105,1$
C/D	trans	$T_3 = 57,9 + 48,3 = 106,2$

3.5. Substituants

- Orientation des groupements fonctionnels

Substituant	Orientation	Distance au plan C ₅ -C ₁₇	Angle sous tendu avec C ₅ -C ₁₇
C ₁₈	β axial	1,86	+ 81,9
C ₁₉	β axial	1,65	+ 76,6
C ₂₁		- 1,18	- 46,5
F	α axial	- 1,58	- 86,2
O ₃	equatorial	- 3,12	- 53,7
O ₁₁	β axial	+ 1,57	+ 75,6
O ₁₇	α axial	- 1,78	- 78,1
O ₂₀		+ 1,14	+ 55,8
N		- 0,62	
NH			

- Distances interatomiques entre groupements fonctionnels

O ₃ O ₁₁	6,80	C ₁₈ C ₁₉	5,08	F O ₃	4,49
O ₃ O ₁₇	8,48	C ₁₈ C ₂₁	4,53	F O ₁₁	3,55
O ₃ O ₂₀	11,12	C ₁₉ C ₂₁	8,11	F O ₁₇	4,16
O ₁₁ O ₁₇	5,27	N O ₃	10,38	F O ₂₀	6,63
O ₁₁ O ₂₀	5,81	N O ₁₁	5,74	F C ₁₈	4,62
O ₁₇ O ₂₀	3,48	N O ₁₇	2,52	F C ₁₉	3,79
O ₃ C ₁₈	8,85	N O ₂₀	2,26	F C ₂₁	5,76
O ₃ C ₁₉	5,27	N C ₁₈	3,91	C ₃ C ₁₇	7,92
O ₃ C ₂₁	9,87	N C ₁₉	8,17		
O ₁₁ C ₁₈	3,09	N C ₂₁	4,24		
O ₁₁ C ₁₉	2,84	N F	6,01		
O ₁₁ C ₂₁	6,88	N NH	0,89		
O ₁₇ C ₁₈	3,79	NH O ₃	9,79		
O ₁₇ C ₁₉	7,03	NH O ₁₁	5,60		
O ₁₇ C ₂₁	2,80	NH O ₁₇	2,00		
O ₂₀ C ₁₈	3,04	NH O ₂₀	2,98		
O ₂₀ C ₁₉	8,05	NH C ₁₈	4,13		
O ₂₀ C ₂₁	3,74	NH C ₁₉	7,94		
		NH C ₂₁	4,21		
		NH F	5,46		

4) Géométrie intermoléculaire

- Ponts hydrogène envisageables

$$- O_3 - O_{17} = 2,86 \text{ \AA}$$

$$O_3 - H_{17} = 2,08 \text{ \AA}$$

$$- O_{11} - O_{20} = 2,80 \text{ \AA}$$

$$H_{11} - O_{20} = 2,02$$

- Disposition des molécules dans le cristal.

Elle est représentée sur la figure

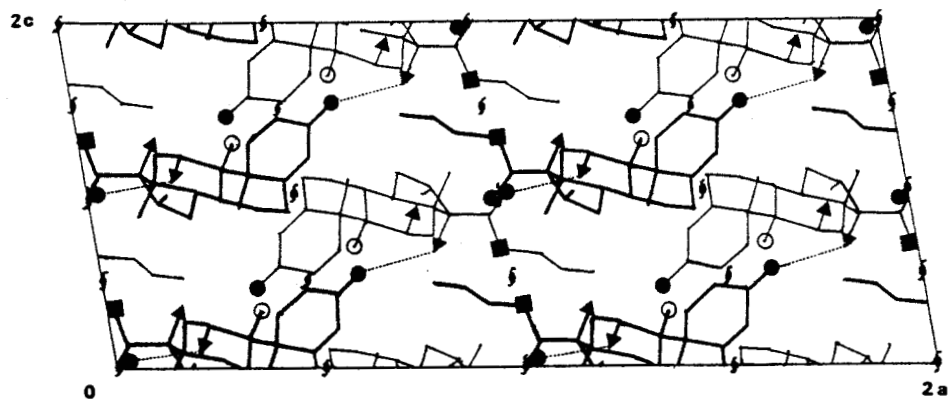
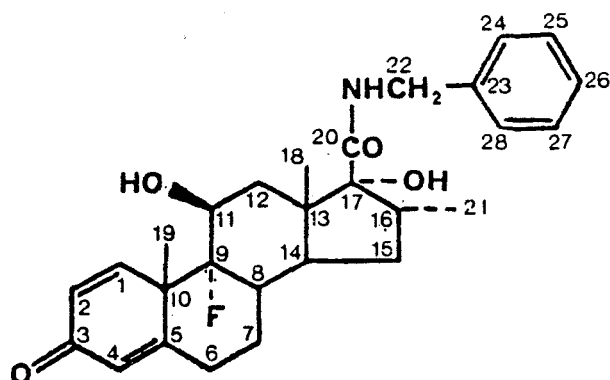


Figure 82 - Arrangement des molécules de DXP dans la maille cristalline (projections sur les plans perpendiculaires aux axes de la maille ; ξ et \downarrow , axes de rotation-translation parallèles à l'axe oc de la maille).

BU
LILLE

N-benzyl, 9 α -fluoro, 11 β , 17 α -dihydroxy, 16 α -méthyl,
1,4-androstadiène, 17 β -carboxamide



1)

Données cristallographiques

Formule brute $C_{28}H_{34}F_1N_1O_4 \cdot CH_3OH$
 Poids moléculaire 467,5 + 32,04
 Système cristallin monoclinique
 Groupe spatial $P2_1$
 Densité mesurée
 Densité calculée 1,24₀₃
 Volume de la maille 1341,0 Å³
 Z (molécules par maille) 2

Dimensions de la maille

a	13,962	α	90,000
b	15,831	β	93,997
c	6,082	γ	90,000

Réflexions observées : 2247 dont
21 rejetées

2) Géométrie moléculaire

Coordonnées atomiques

	X/A	Y/B	Z/C		X/A	Y/B	Z/C
C ₁	0,1437	0,4004	0,7298	C ₁₈	0,3601	0,6837	1,0612
C ₂	0,0780	0,3542	0,6211	C ₁₉	0,1581	0,4478	1,1149
C ₃	- 0,0238	0,3734	0,6256	C ₂₀	0,4341	0,8785	0,7711
C ₄	- 0,0494	0,4452	0,7564	C ₂₁	0,2461	0,9376	0,8287
C ₅	0,0159	0,4914	0,8743	C ₂₂	0,5750	0,8450	0,5569
C ₆	- 0,0112	0,5643	1,0171	C ₂₃	0,6451	0,7739	0,5464
C ₇	0,0423	0,6453	0,9583	C ₂₄	0,7086	0,7534	0,7256
C ₈	0,1510	0,6319	0,9450	C ₂₅	0,7764	0,6895	0,7061
C ₉	0,1697	0,5562	0,7946	C ₂₆	0,7805	0,6461	0,5074
C ₁₀	0,1226	0,4735	0,8751	C ₂₇	0,7170	0,6666	0,3281
C ₁₁	0,2747	0,5471	0,7315	C ₂₈	0,6493	0,7305	0,3476
C ₁₂	0,3206	0,6317	0,6694	O ₃	- 0,0868	0,3295	0,5234
C ₁₃	0,3058	0,7023	0,8383	O ₁₁	0,3270	0,5034	0,9047
C ₁₄	0,1964	0,7103	0,8553	O ₁₇	0,2928	0,8058	0,5331
C ₁₅	0,1834	0,7950	0,9739	O ₂₀	0,4769	0,8374	0,9479
C ₁₆	0,2717	0,8495	0,9181	F	0,1195	0,5741	0,5871
C ₁₇	0,3267	0,7945	0,7575	N	0,4755	0,8159	0,5797
				C ₂₉	0,5385	0,5224	0,7105
				O ₂₉	0,5186	0,4917	0,8452

Noyau stéroïdien

Cycle A		Cycle B		Cycle C		Cycle D	
C_1-C_2	1,315	C_5C_6	1,509	C_9C_{11}	1,546	$C_{13}C_{14}$	1,544
C_2-C_3	1,455	C_6C_7	1,538	$C_{11}C_{22}$	1,542	$C_{14}C_{15}$	1,532
C_3-C_4	1,446	C_7C_8	1,539	$C_{12}C_{13}$	1,542	$C_{15}C_{16}$	1,560
C_4-C_5	1,338	C_8C_9	1,541	$C_{13}C_{14}$	1,544	$C_{16}C_{17}$	1,551
C_5-C_{10}	1,516	C_9C_{10}	1,560	C_8C_{14}	1,520	$C_{13}C_{17}$	1,574
C_1-C_{10}	1,497	C_5C_{10}	1,516	C_8C_9	1,541		

Angles de liaison

ESD = 0,3

$C_{10}C_1C_2$	124,6	$C_8C_9C_{10}$	111,9	$C_{11}C_{12}C_{13}$	112,9	$C_{16}C_{17}C_{13}$	102,3
$C_1C_2C_3$	121,4	$C_9C_{10}C_5$	106,2	$C_9C_{11}C_{12}$	113,4	$C_{14}C_{13}C_{17}$	98,4
$C_2C_3C_4$	117,0	$C_{10}C_5C_6$	115,3	$C_8C_9C_{11}$	115,0	$C_{15}C_{14}C_{13}$	104,9
$C_3C_4C_5$	122,6	$C_5C_6C_7$	111,0	$C_9C_8C_{14}$	109,5	$C_{14}C_{15}C_{16}$	104,9
$C_4C_5C_{10}$	122,2	$C_6C_7C_8$	113,2	$C_8C_{14}C_{13}$	113,0	$C_{15}C_{16}C_{17}$	105,1
$C_1C_{10}C_5$	112,1	$C_7C_8C_9$	110,3	$C_{12}C_{13}C_{14}$	106,7		
$C_1C_{10}C_9$	111,0	$C_{10}C_9C_{11}$	115,3	$C_{12}C_{13}C_{17}$	115,3		
$C_4C_5C_6$	122,6	$C_7C_8C_{14}$	110,0	$C_8C_{14}C_{15}$	118,8		

Angles de torsion

$C_{10}C_1C_2C_3$	- 2,89	$C_{10}C_5C_6C_7$	- 54,6	$C_{14}C_8C_9C_{11}$	- 47,3	$C_{17}C_{13}C_{14}C_{15}$	+ 45,8
$C_1C_2C_3C_4$	+ 0,45	$C_5C_6C_7C_8$	+ 48,9	$C_8C_9C_{11}C_{12}$	+ 43,2	$C_{13}C_{14}C_{15}C_{16}$	- 27,0
$C_2C_3C_4C_5$	+ 1,85	$C_6C_7C_8C_9$	- 51,1	$C_9C_{11}C_{12}C_{13}$	- 48,5	$C_{14}C_{15}C_{16}C_{17}$	- 3,5
$C_3C_4C_5C_{10}$	- 1,72	$C_7C_8C_9C_{10}$	+ 57,4	$C_{11}C_{12}C_{13}C_{14}$	+ 56,9	$C_{15}C_{16}C_{17}C_{13}$	+ 31,8
$C_4C_5C_{10}C_1$	- 0,49	$C_8C_9C_{10}C_5$	- 59,3	$C_{12}C_{13}C_{14}C_8$	- 63,7	$C_{14}C_{13}C_{17}C_{14}$	- 47,1
$C_2C_1C_{10}C_5$	+ 2,87	$C_6C_5C_{10}C_9$	+ 58,6	$C_9C_8C_{14}C_{13}$	+ 58,9		

Extra nucléaire

Distances		Angles		Angles de torsion	
		Oxygènes		Oxygènes	
C ₃ O ₃	1,241	C ₂ C ₃ O ₃	121,4	C ₁ C ₂ C ₃ O ₃	+ 179,8
C ₁₁ O ₁₁	1,420	C ₄ C ₃ O ₃	121,6	C ₅ C ₄ C ₃ O ₃	- 177,4
C ₁₇ O ₁₇	1,424	C ₉ C ₁₁ O ₁₁	108,0	C ₈ C ₉ C ₁₁ O ₁₁	- 83,9
C ₁₃ C ₁₈	1,535	C ₁₂ C ₁₁ O ₁₁	113,8	C ₁₀ C ₉ C ₁₁ O ₁₁	+ 48,7
C ₁₀ C ₁₉	1,562	C ₁₃ C ₁₇ O ₁₇	111,1	C ₁₃ C ₁₂ C ₁₁ O ₁₁	+ 75,4
C ₁₆ C ₂₁	1,530	C ₁₆ C ₁₇ C ₁₆	112,8	C ₁₂ C ₁₃ C ₁₇ O ₁₇	- 39,6
				C ₁₄ C ₁₃ C ₁₇ O ₁₇	+ 73,4
				C ₁₈ C ₁₃ C ₁₇ O ₁₇	- 168,0
				C ₁₅ C ₁₆ C ₁₇ O ₁₇	- 87,6
				C ₂₁ C ₁₆ C ₁₇ O ₁₇	+ 38,2
				Méthyles	
Chaîne 17B		Méthyles		Méthyles	
C ₁₇ C ₂₀	1,544	C ₁₂ C ₁₃ C ₁₈	111,6	C ₁₁ C ₁₂ C ₁₃ C ₁₈	- 66,8
C ₂₀ O ₂₀	1,231	C ₁₄ C ₁₃ C ₁₈	112,8	C ₈ C ₁₄ C ₁₃ C ₁₈	+ 59,3
C ₂₀ N	1,335	C ₁₇ C ₁₃ C ₁₈	111,3	C ₁₅ C ₁₄ C ₁₃ C ₁₈	- 71,5
N C ₂₂	1,480	C ₁ C ₁₀ C ₁₉	106,7	C ₁₆ C ₁₇ C ₁₃ C ₁₈	+ 71,4
C ₂₂ C ₂₃	1,496	C ₅ C ₁₀ C ₁₉	107,4	C ₂ C ₁ C ₁₀ C ₁₉	- 114,5
C ₂₃ C ₂₄	1,395	C ₉ C ₁₀ C ₁₉	113,5	C ₄ C ₅ C ₁₀ C ₁₉	+ 116,4
C ₂₄ C ₂₅	1,395	C ₁₅ C ₁₆ C ₂₁	114,4	C ₆ C ₅ C ₁₀ C ₁₉	- 63,1
C ₂₅ C ₂₆	1,395	C ₁₇ C ₁₆ C ₂₁	113,6	C ₈ C ₉ C ₁₀ C ₁₉	+ 58,4
C ₂₆ C ₂₇	1,395	Chaîne 17B		C ₁₁ C ₉ C ₁₀ C ₁₉	- 75,5
C ₂₇ C ₂₈	1,395	C ₁₃ C ₁₇ C ₂₀	114,3	C ₁₄ C ₁₅ C ₁₆ C ₂₁	- 128,8
C ₂₈ C ₂₃	1,395	C ₁₆ C ₁₇ C ₂₀	110,5	C ₁₃ C ₁₇ C ₁₆ C ₂₁	+ 157,5
Fluor		C ₂₀ C ₁₇ O ₁₇	106,1	Chaîne 17B	
C ₉ F ₉	1,429	C ₁₇ C ₂₀ N	115,0	C ₁₂ C ₁₃ C ₁₇ C ₂₀	+ 80,4
		C ₁₇ C ₂₀ O ₂₀	121,2	C ₁₄ C ₁₃ C ₁₇ C ₂₀	- 166,6
		NC ₂₀ O ₂₀	123,8	C ₁₈ C ₁₃ C ₁₇ C ₂₀	- 48,0
		C ₂₀ NC ₂₂	122,5	C ₁₅ C ₁₆ C ₁₇ C ₂₀	+ 153,9
		NC ₂₂ C ₂₃	113,0	C ₂₁ C ₁₆ C ₁₇ C ₂₀	- 80,4
		C ₂₂ C ₂₃ C ₂₄	121,6	C ₁₃ C ₁₇ C ₂₀ N	- 101,9
		C ₂₂ C ₂₃ C ₂₈	118,3	C ₁₆ C ₁₇ C ₂₀ N	+ 143,4
		C ₂₄ C ₂₃ C ₂₈	120,0	O ₁₇ C ₁₇ C ₂₀ N	+ 20,9
		C ₂₃ C ₂₄ C ₂₅	120,0	C ₁₃ C ₁₇ C ₂₀ O ₂₀	+ 77,3
		C ₂₄ C ₂₅ C ₂₆	120,0	C ₁₆ C ₁₇ C ₂₀ O ₂₀	- 37,5
		C ₂₅ C ₂₆ C ₂₇	120,0	O ₁₇ C ₁₇ C ₂₀ O ₂₀	- 160,0
		C ₂₆ C ₂₇ C ₂₈	120,0	C ₁₇ C ₂₀ NC ₂₂	- 173,8
		C ₂₇ C ₂₈ C ₂₃	120,0	O ₂₀ C ₂₀ NC ₂₂	7,1
		Fluor		C ₂₀ NC ₂₂ C ₂₃	- 103,0
		C ₈ C ₉ F ₉	106,1	NC ₂₂ C ₂₃ C ₂₄	104,7
		C ₁₀ C ₉ F ₉	104,6	NC ₂₂ C ₂₃ C ₂₈	- 78,5
		C ₁₁ C ₉ F ₉	102,4	C ₂₂ C ₂₃ C ₂₄ C ₂₅	176,7
				C ₂₈ C ₂₃ C ₂₄ C ₂₅	0,0
				C ₂₃ C ₂₄ C ₂₅ C ₂₆	0,0
				C ₂₄ C ₂₅ C ₂₆ C ₂₇	0,0
				C ₂₅ C ₂₆ C ₂₇ C ₂₈	0,0
				C ₂₆ C ₂₇ C ₂₈ C ₂₃	0,0
				C ₂₇ C ₂₈ C ₂₃ C ₂₂	- 176,8
				C ₂₇ C ₂₈ C ₂₃ C ₂₄	0,0
				Jonctions intercycles	
				C ₂ C ₁ C ₁₀ C ₉	+121,4
				C ₃ C ₄ C ₅ C ₆	+177,7
				C ₄ C ₅ C ₆ C ₇	+126,0
				C ₄ C ₅ C ₁₀ C ₉	-121,9
				C ₆ C ₅ C ₁₀ C ₁	-180,0
				C ₆ C ₇ C ₈ C ₁₄	-172,1
				C ₇ C ₈ C ₁₄ C ₁₃	-179,7
				C ₇ C ₈ C ₁₄ C ₁₅	- 56,2
				C ₇ C ₈ C ₉ C ₁₁	-168,5
				C ₁₄ C ₈ C ₉ C ₁₀	+178,6
				C ₁₁ C ₉ C ₁₀ C ₁	+ 44,7
				C ₁₁ C ₉ C ₁₀ C ₅	+166,7
				C ₁ C ₁₀ C ₉ C ₈	+178,6
				C ₁₂ C ₁₁ C ₉ C ₁₀	+175,8
				C ₁₁ C ₁₂ C ₁₃ C ₁₇	+165,0
				C ₁₂ C ₁₃ C ₁₄ C ₁₅	+165,5
				C ₁₇ C ₁₃ C ₁₄ C ₈	+176,6
				C ₁₂ C ₁₃ C ₁₇ C ₁₆	-160,1
				C ₈ C ₁₄ C ₁₅ C ₁₆	-154,4
				C ₉ C ₈ C ₁₄ C ₁₅	-177,6

3) Analyse conformationnelle

3.1. Conformation générale

- Plan moyen BCD (C_5-C_{17})

. Distance des atomes par rapport à ce plan :

Atomes du plan		Autres atomes			
C_5	- 0,31	C_1	- 0,11	O_3	- 2,18
C_6	+ 0,08	C_2	- 0,88	O_{11}	+ 1,45
C_7	- 0,22	C_3	- 1,45	O_{17}	- 1,69
C_8	+ 0,32	C_4	- 1,13	O_{20}	+ 1,38
C_9	- 0,13	C_{18}	+ 1,87	N	- 0,52
C_{10}	+ 0,32	C_{19}	+ 1,86	F	- 1,56
C_{11}	+ 0,11	C_{21}	- 0,79		
C_{12}	- 0,26	C_{20}	+ 0,27		
C_{13}	+ 0,34	C_{22}	- 0,22		
C_{14}	- 0,17	C_{23}	+ 0,33		
C_{15}	+ 0,12	C_{24}	+ 1,68		
C_{16}	+ 0,10	C_{25}	+ 2,14		
C_{17}	- 0,28	C_{26}	+ 1,24		
		C_{27}	- 0,11		
		C_{28}	- 0,57		

Chaîne latérale : son début est dans le plan moyen

- Plan moyen A $C_1 C_2 C_3 C_4 C_5 C_{10}$

Distances des atomes à ce plan

C_1	- 0,018	O_3	+ 0,038
C_2	+ 0,008		
C_3	+ 0,008		
C_4	- 0,014		
C_5	+ 0,005		
C_{10}	+ 0,011		

Angle A/BCD : - 37,64°

- Twist $C_{19}-C_{10} \dots C_{13}-C_{18}$: - 6,6°

3.2. Etude des différents cycles

Cycle A : - plan

- distance au plan moyen $C_1 C_2 C_3 C_4 C_5 C_{10}$

C_1	- 0,018	C_3	+ 0,038
C_2	+ 0,008		
C_3	+ 0,008		
C_4	- 0,014		
C_5	+ 0,005		
C_{10}	+ 0,011		

Cycle B :- chaise

 $\Delta C_2^{6-7} = 2,6$
 symétrie miroir $\Delta C_S^7 = 2,1$ et $\Delta C_2^{5-6} = 9,0$

Angle de torsion moyen = 55,0

- plan moyen $C_6 C_7 C_9 C_{10}$

C_5	- 0,642
C_6	- 0,038
C_7	+ 0,039
C_8	+ 0,660
C_9	- 0,038
C_{10}	+ 0,038

Cycle C - chaise

 $\Delta C_S^{11} = 6,9$
 symétrie axiale $\Delta C_2^{9-11} = 1,65$ et $\Delta C_S^8 = 14,4$

angle de torsion moyen = 53,1

- plan moyen $C_8 C_{11} C_{12} C_{14}$

C_8	+ 0,034
C_9	- 0,549
C_{11}	- 0,033
C_{12}	+ 0,035
C_{13}	+ 0,736
C_{14}	- 0,035

Cycle D	- enveloppe 13 β	$\Delta C_S^{13} = 3,5$
	Symétrie $\Delta = + 44,9$	$\Delta C_S^{14} = 38,2$
	$\phi_m = 49,2$	$\Delta C_2^{13-14} = 28,7$
	- plan moyen $C_{14}C_{15}C_{16}C_{17}$	$\Delta C_2^{13-17} = 13,8$
	C_{13}	+ 0,744
	C_{14}	+ 0,014
	C_{15}	- 0,021
	C_{16}	+ 0,021
	C_{17}	- 0,014

3.3. Chaîne latérale

- Plan moyen	$C_{17}C_{20}O_{20}N$
C_{17}	+ 0,001
C_{20}	- 0,004
O_{20}	+ 0,002
N	+ 0,001
C_{22}	- 0,139
O_{17}	- 0,476

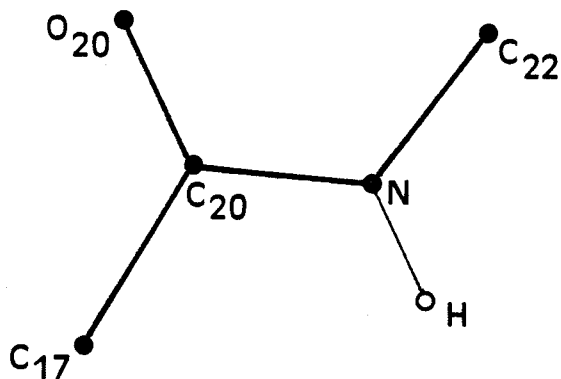
- Angle dièdre de ce plan avec le plan moyen BCD

115,4

- Angle de torsion

$C_{13}C_{17}C_{20}O_{20}$	+ 77,3
$C_{16}C_{17}C_{20}O_{20}$	- 37,5
$C_{13}C_{17}C_{20}N$	- 101,9
$C_{16}C_{17}C_{20}N$	+ 143,4
$C_{17}C_{20}NC_{22}$	- 173,8
$O_{20}C_{20}NC_{22}$	7,1

- O_{20} par rapport à C_{13} : synclinal
 C_{22} par rapport à O_{20} : synperiplanar



liaison amide plane et trans

3.4. Jonctions entre les cycles

- Angles dièdres à la jonction des cycles

Plan	Composition	Angles	
A	$C_1 C_2 C_3 C_4 C_5 C_{10}$	A/A-B	$178,7^\circ$
A-B	$C_1 C_5 C_6 C_{10}$	A-B/B	$127,6^\circ$
B	$C_6 C_7 C_9 C_{10}$	B/B-C	$135,0$
B-C	$C_7 C_8 C_9 C_{11}$	B-C/C	$132,9$
C	$C_8 C_{11} C_{12} C_{14}$	C/C-D	$132,7$
C-D	$C_{12} C_{13} C_{14} C_{15}$	C-D/D	$136,7$
D	$C_{13} C_{15} C_{14} C_{17}$	C/C-D'	$165,5$
D'	$C_{14} C_{15} C_{16} C_{17}$	C-D'/D'	$167,0$
C-D'	$C_{12} C_{13} C_{14} C_{17}$		

- Configuration des jonctions entre cycles

A/B	plane	$P_1 = 0,49^\circ + 58,6^\circ$	$= 59,1^\circ$
B/C	trans	$T_2 = 57,5 + 47,3$	$= 104,7$
C/D	trans	$T_3 = 63,7 + 45,8$	$= 109,5$

3.5. Substituants

- Orientation des groupements fonctionnels

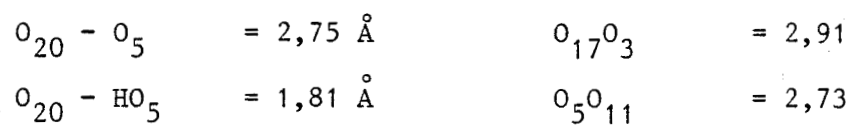
Substituant	Orientation	Distance au plan C ₅ -C ₁₇	Angle sous tendu avec C ₅ -C ₁₇
C ₁₈	β axial	+ 1,87 Å	+ 86,4°
C ₁₉	β axial	+ 1,86	+ 82,1°
C ₂₁	α	- 0,79	- 35,9
F	α axial	- 1,56	- 86,4
O ₃	equatorial	- 2,18	- 35,8
O ₁₁	β axial	+ 1,45	+ 70,5
O ₁₇	α axial	- 1,69	- 81,8
O ₂₀		+ 1,38	+ 63,8
N		- 0,52	

- Distances interatomiques entre groupements fonctionnels

O ₃ O ₁₁	6,66	C ₁₈ C ₁₉	4,70	FO ₃	4,82
O ₃ O ₁₇	9,21	C ₁₈ C ₂₁	4,51	FO ₁₁	3,55
O ₃ O ₂₀	11,41	C ₁₉ C ₂₁	8,06	FO ₁₇	4,42
O ₁₁ O ₁₇	5,30			FO ₂₀	6,75
O ₁₁ O ₂₀	5,69	NO ₃	10,98	FC ₁₈	4,61
O ₁₇ O ₂₀	3,51	NO ₁₁	5,77	FC ₁₉	3,79
		NO ₁₇	2,55	FC ₂₁	6,17
O ₃ C ₁₈	8,84	NO ₂₀	2,26		
O ₃ C ₁₉	5,13	NC ₁₈	4,03	C ₃ C ₁₇	8,28
O ₃ C ₂₁	10,69	NC ₁₉	8,14		
O ₁₁ C ₁₈	3,03	NC ₂₁	4,12		
O ₁₁ C ₁₉	2,90	NF	6,28		
O ₁₁ C ₂₁	6,98				
O ₁₇ C ₁₈	3,81				
O ₁₇ C ₁₉	7,01				
O ₁₇ C ₂₁	2,86				
O ₂₀ C ₁₈	3,04				
O ₂₀ C ₁₉	7,72				
O ₂₀ C ₂₁	3,62				

4) Géométrie intermoléculaire

- Ponts hydrogène



- Disposition des molécules dans le cristal : figure 83.

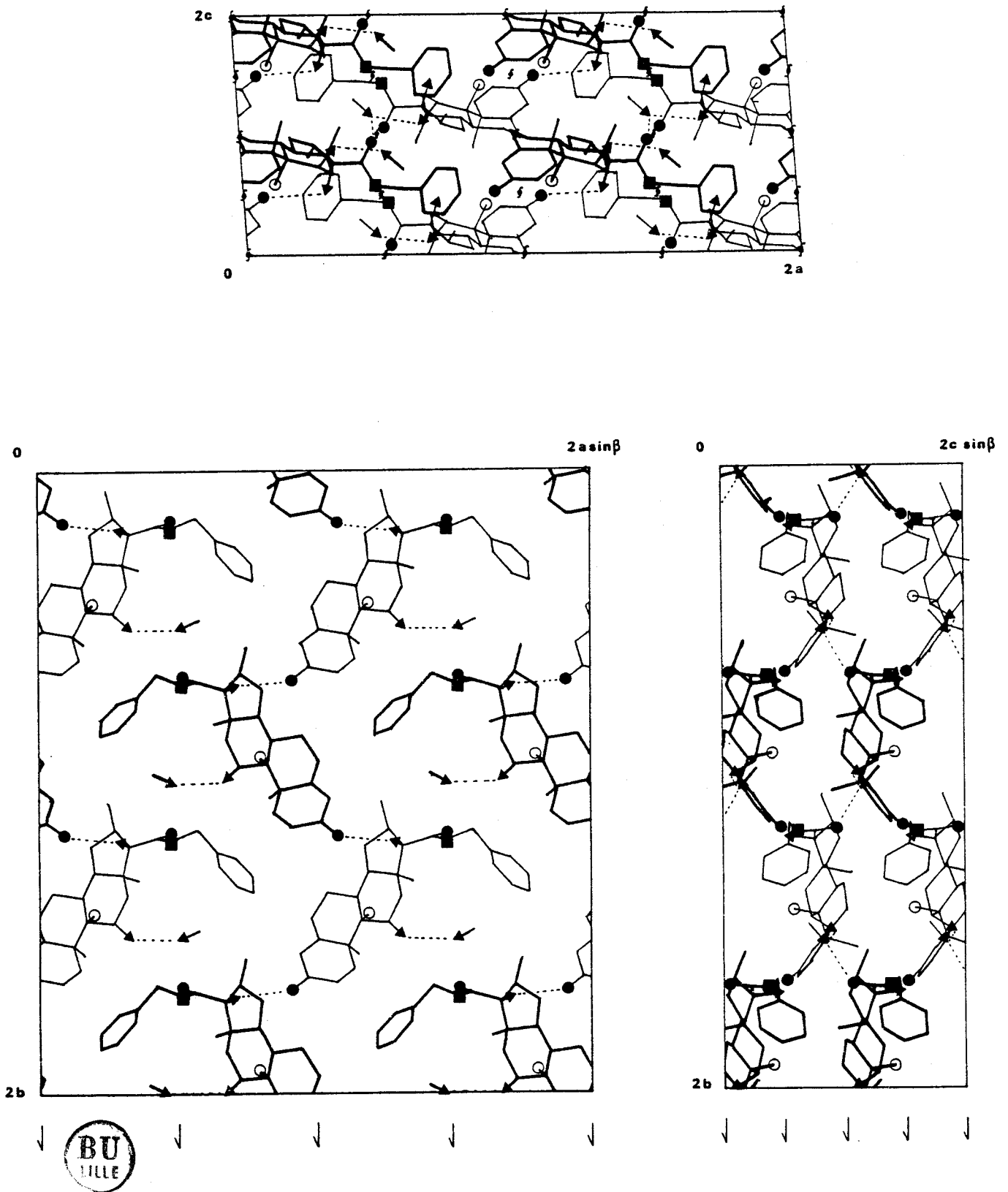


Figure 83 - Arrangement des molécules de DXB et de méthanol dans la maille cristalline (la liaison hydrogène entre l'hydroxyle du méthanol et l'hydroxyle en 11 du stéroïde est indiquée par un pointillé et les conventions de projection sont les mêmes que pour le DXP, figure 82).

APPENDICE TECHNIQUE

1 - Préparation des stéroïdes 17 β -carboxamides

1.1. Matériel et contrôles analytiques

Les spectres infra-rouge ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Beckman Acculab 1. Les chromatographies en couche mince ont été réalisées sur des plaques prêtes à l'emploi de gel de silice 0,25 mm F₂₅₄ (Merck). Deux systèmes solvants ont été utilisés :

E₁ : chlorure de méthylène-acétone (8/1) et

E₂ : chloroforme-méthanol (4/1) en atmosphère saturée en ammoniac.

Les contrôles analytiques en chromatographie liquide haute pression ont été réalisés sur un appareil Waters (pompe 6000A, injecteur universel U6K et détecteur UV à 254 nm, modèle 440) sur des colonnes garnies dans le laboratoire à l'aide d'un appareil à remplir les colonnes (Chromatem). Les supports utilisés sont le Nucléosil 10 (10 μ) pour la chromatographie en phase normale et le Nucléosil 10 C₁₈ (10 μ) pour la chromatographie en phase inverse. La chromatographie préparative a été réalisée sur un chromatographe haute pression Waters (Prep 500). Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil de Reichert et sont non corrigés. Les analyses élémentaires ont été réalisées par le CNRS (Villeurbanne). Les spectres de masse ont été obtenus sur un spectrographe Riber Mag 10-10 à l'Université des Sciences de Lille. Les stéroïdes proviennent de chez Steraloids (corticostérone, cortisol) et Roussel-Uclaf (dexaméthasone, désoximetasone). Les stéroïdes tritiés à haute activité spécifique (40 Ci mmol⁻¹) proviennent de chez Amersham (Amersham, Royaume-Uni).

1.2. Oxydation périodique des stéroïdes

a) Dexaméthasone et désoximetasone (d'après un brevet GLAXO 1972)

A 6,28g (16 mM) de dexaméthasone dissous dans 320 ml de méthanol on ajoute 96 ml d'acide périodique 10 %. La réaction est complète après 3 heures d'agitation à température ambiante. L'évolution de la réaction est suivie par chromatographie en couche mince (gel de silice 60 F₂₅₄, 0,25 mm, Merck) dans le système solvant dichlorométhane/acétone (4/1)

avec visualisation des taches sous lumière ultra-violette à 254 nm. Après évaporation sous vide à 60°C, le précipité est lavé à l'eau distillée (40 ml) puis séché 15h à 70°C. De la poudre sèche dissoute dans 1 litre d'acétate d'éthyle, la dexaméthasone oxydée est extraite 4 fois par 200 ml de bicarbonate de soude 0,6 M. Les phases bicarbonatées recueillies sont immédiatement acidifiées par HCl 1N car le stéroïde oxydé est instable en solution alcaline. Précipité lors de l'acidification, le stéroïde oxydé est lavé par quelques ml d'eau distillée, séché à 70°C puis contrôlé par chromatographie en couche mince dans le système solvant donné ci-dessus. Le rendement réactionnel avoisine 90 %.

b) Cortisol, corticostérone, désoxycorticostérone et prednisolone

L'oxydation est réalisée selon le protocole de Mason (1937, 1938) 12 mmoles (4,15 g) de corticostérone sont dissoutes dans 960 ml d'éthanol absolu par agitation magnétique dans un erlen de 2 litres. On y ajoute successivement sous agitation : 570 ml d'acide periodique 0,025 M, 18 ml d'acide sulfurique 5N et 360 ml d'eau distillée. On laisse 15 heures sous agitation à 20°C, puis on concentre par évaporation sous vide à 40°C (évaporateur rotatif Büchi) par fractions de 500 ml ramenées à 50 ml. Le précipité formé est recueilli dans un entonnoir à verre fritté n° 2 et lavé par quelques ml d'eau distillée. Il est séché sous vide. La poudre sèche est redissoute dans 1500 ml d'éther éthylique. La solution obtenue est extraite par 3 fois 500 ml de soude 0,01 M. Les phases sodiques sont acidifiées immédiatement par addition de 5 ml d'HCl 1M pour chaque extrait sodique de 500 ml et le précipité formé est recueilli et lavé par quelques ml d'eau distillée, puis séché. Dans le cas du cortisol, l'acide formé ne précipite pas ou peu et il est nécessaire de concentrer la solution par évaporation sous vide pour obtenir la précipitation. Les produits obtenus sont contrôlés par chromatographie en couche mince. Le rendement est excellent (80 %).

1.3. Préparation des 17 β -carboxamides à partir des acides 17 β -carboxyliques (Formstecher 1980b)

Les préparations de quelques dérivés sont données à titre

d'exemple. Les formules des produits correspondants peuvent être retrouvées sur les figures 48 et 53.

a) N-(11 β -hydroxy-3-oxo-4-androstène-17 β -carbonyl)-N,N'-dicyclohexylurée (VI) : exemple de N-acylurée

A une suspension de 332 mg (1 mmole) de l'acide dérivé de la corticostérone (IIa figure 48) dans 50 ml de chlorure de méthylène sont ajoutés 227 mg (1,1 mmole) de DCC. Après une heure à température ambiante, la solution est concentrée sous pression réduite. Le produit brut contenant (VI) est dissous dans l'acétate d'éthyle et extrait deux fois au bicarbonate de sodium 0,1 M, à l'HCl 1N et à l'eau. La phase acétate d'éthyle, après séchage sur Na₂SO₄ anhydre est évaporée pour donner 310 mg (57 %) de la N-acylurée (VI) : T_F 232°C, R_F (E₁) 0,43 ; ir (KBr) 1710 (CO N CONH), 1660 (3 CO), 1635 (CO N CO NH), 1540 (amide II) cm⁻¹.

Anal. calc pour C₃₃H₅₀N₂O₄ : C, 73,56 ; H, 9,36 ; N : 5,20 ;
Mes. : C, 72,86 ; H, 9,02 ; N, 5,10.

b) Benzotriazol-1'-yl 11 β -hydroxy-3-oxo-4-androstène-17 β -carboxylate (III_a) : ester activé à l'hydroxybenzotriazole (1 mmole)

A une solution de 332 mg de l'acide (II_a) dans 150 ml de tétrahydrofurane sont ajoutés 227 mg (1,1 mmole) de DCC et 203 mg (1,5 mmole) d'HOBt.

Après une nuit à 4°C, le précipité de DCU est éliminé et le solvant est évaporé à sec. Le produit brut est chromatographié sur une colonne de gel de silice en dichlorométhane-acétone (8/1) pour fournir l'ester activé (III_a) : T_f 218°C ; R_f (F₁) 0,64 ; ir (KBr) 1830 ; 1655 cm⁻¹ ; spectre de masse (70 eV) m/e (intensité rel) 449 (2,3), 315 (100) 269 (97) et 227 (33) (Figures 84, 85 et 86).

Anal. calc pour C₂₆H₃₁N₃O₄ : C, 69,46 ; H, 6,95 ; N, 9,35
Mes. C, 69,01, H, 7,15 ; N, 8,95.

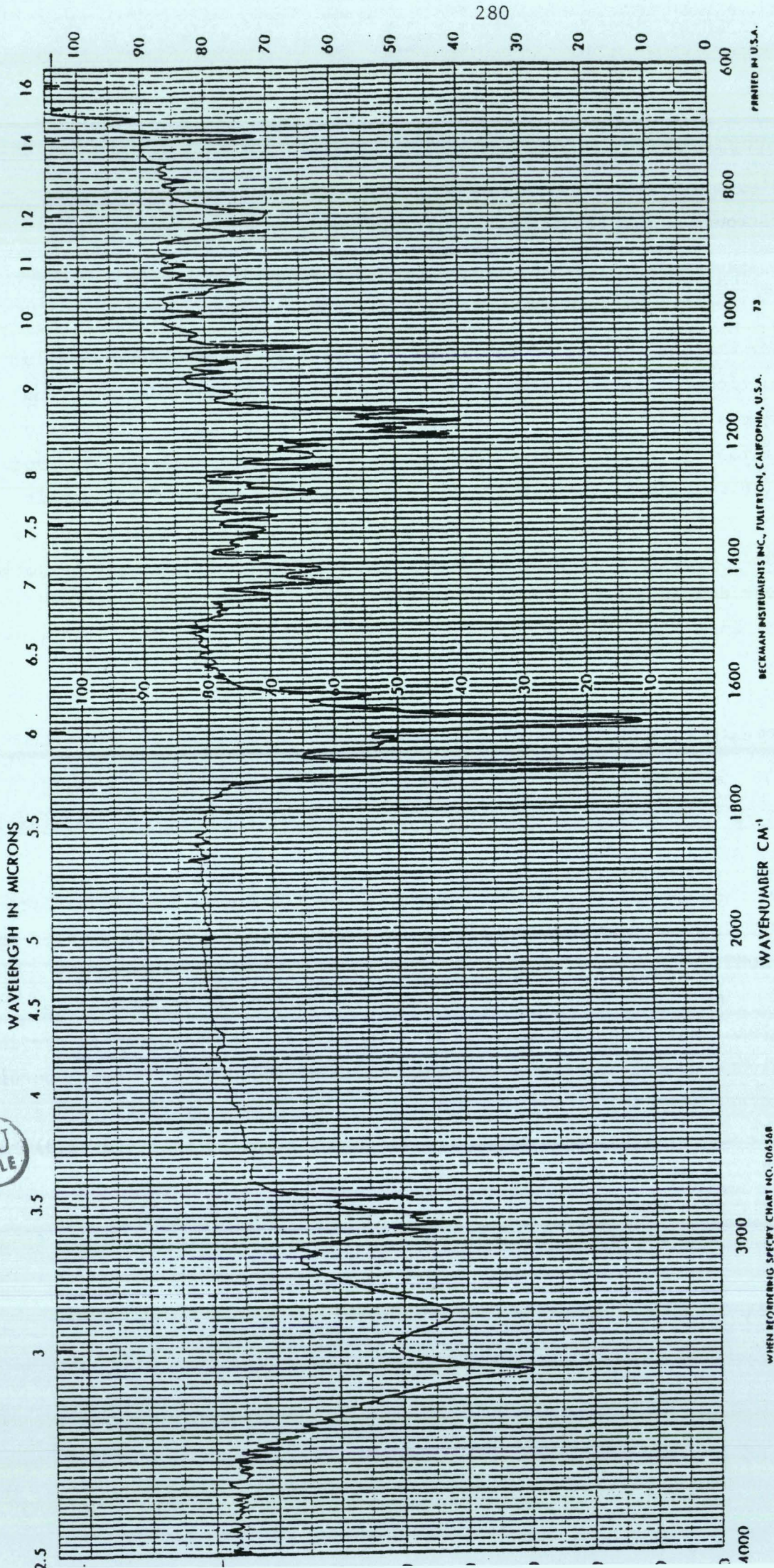


Figure 84 - Spectre infra-rouge (KBr) de l'acide (II_a)

PRINTED IN U.S.A.

BECKMAN INSTRUMENTS INC., FULLERTON, CALIFORNIA, U.S.A.

WAVENUMBER CM^{-1}

WHEN RECORDING SPECTRY CHART NO. 1065AR

4000

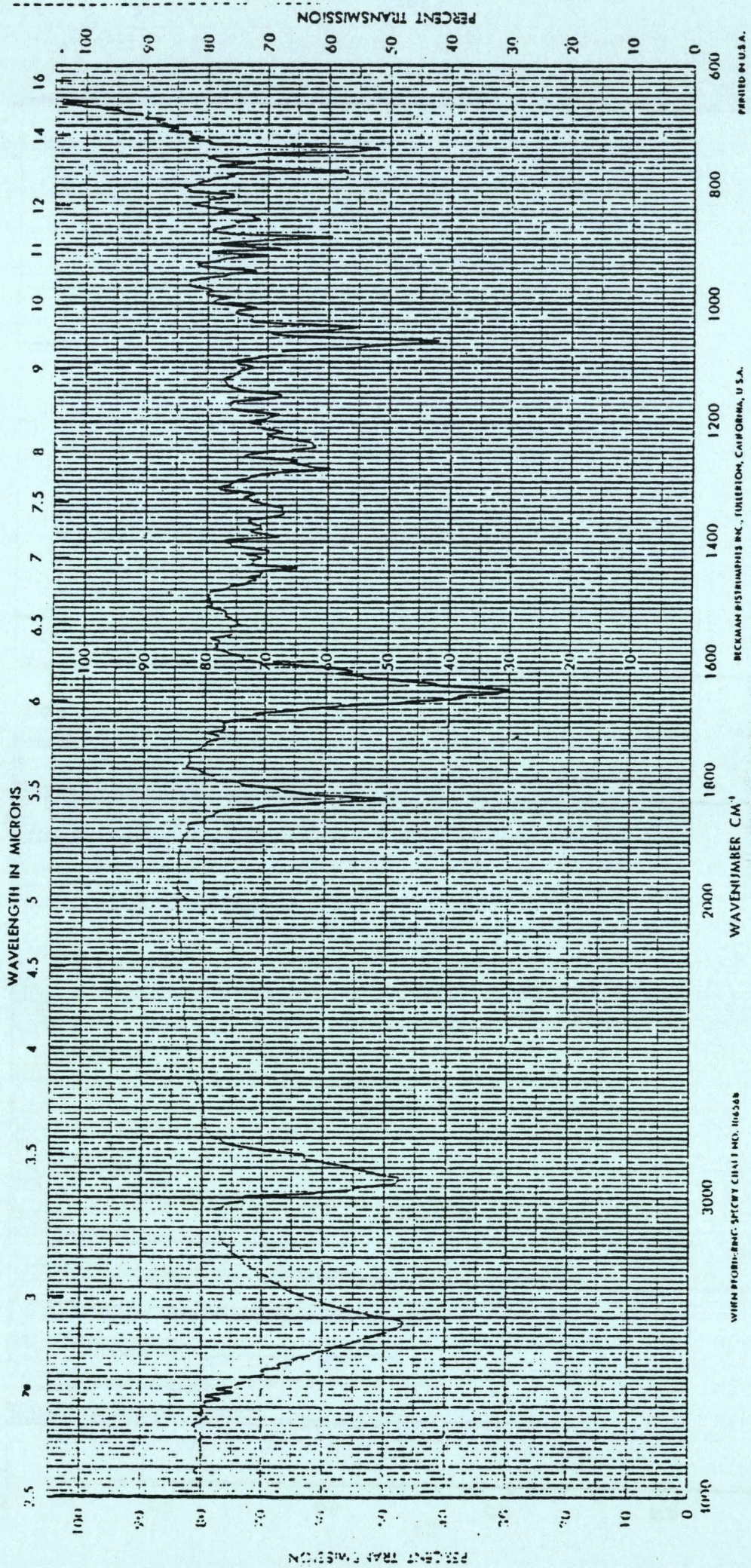


Figure 85 - Spectre infra-rouge (KBr) de l'ester activé (III)



HCACBT 14

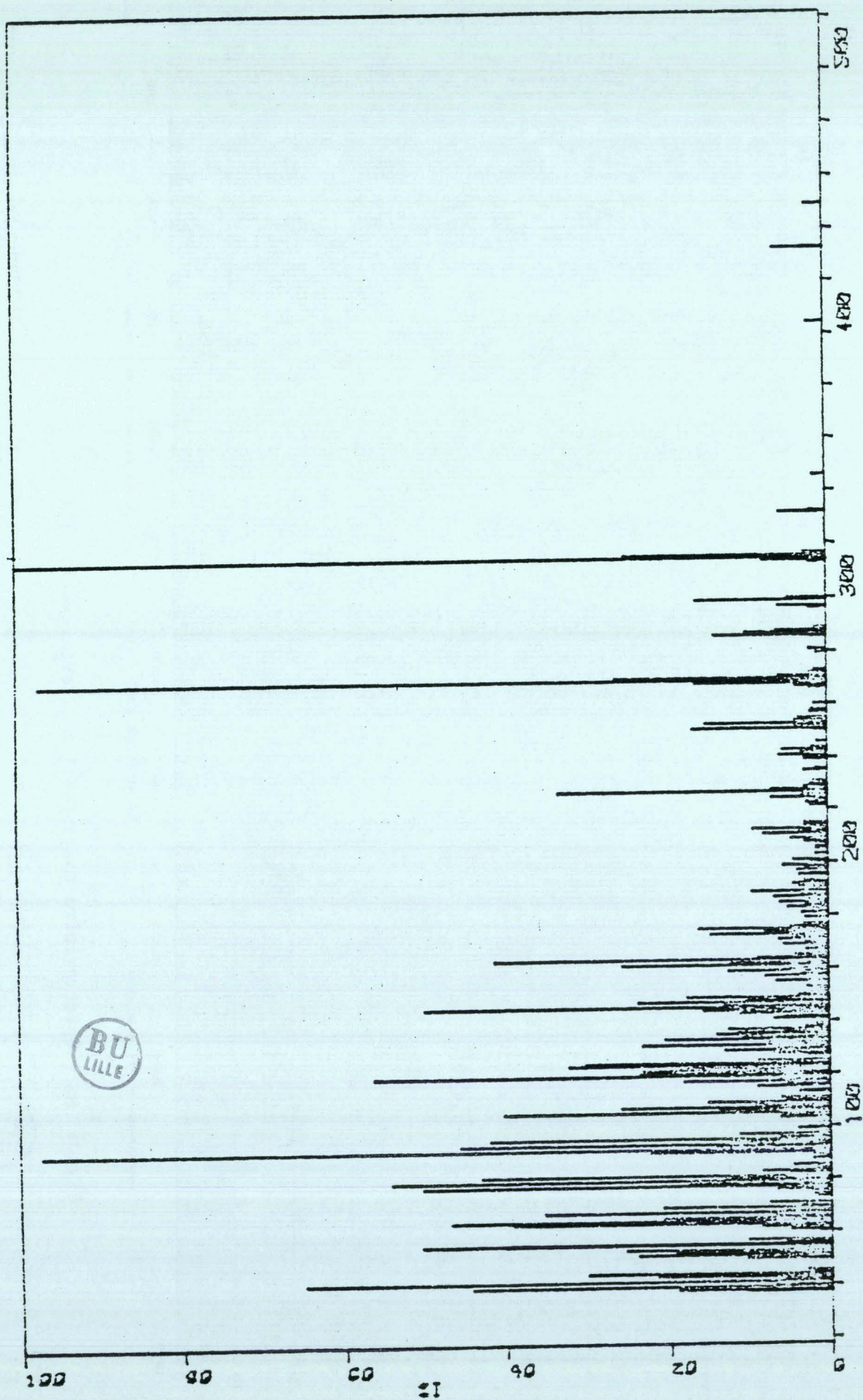


Figure 86 - Spectre de masse de l'ester activé (III)

c) N-propyl 11 β -hydroxy-3-oxo-4-androstène-17 β -carboxamide (IV_a) :
exemple de 17 β -carboxamide.

Une solution de 332 mg (1 mmole) de l'acide (II_a), 227 mg de DCC et 203 mg d'HOBt dans 20 ml de tétrahydrofurane fraîchement distillé, est agitée une nuit à 4°C. Le précipité de DCU est éliminé par filtration et 420 μ l (5 mmoles) de propylamine sont ajoutés au filtrat. Après 10 minutes à 4° et contrôle de l'évolution de la réaction par CCM, la solution est extraite par du bicarbonate de sodium 0,1 M, de l'HCl 1N et lavée deux fois à l'eau. La phase organique séchée, est ensuite évaporée à sec. La recristallisation du produit brut est obtenue dans un mélange méthanol-acétate d'éthyle et donne 235 mg (63 %) de composé (IV_a) : T_f : 145°C, R_F (E₁) 0,15, (E₂) 0,85 ; ν (KBr) 1660, 1535 cm⁻¹ ; spectre de masse (70 e/ V) m/e (intensité rel.) 373 (18,7), 335 (34,1) 232 (15,5), 218 (70,1), 114 (100) (figures 87 et 88).

Anal. calc pour C₂₃H₃₅NO₃ : C, 73,96 ; H, 9,44 ; N, 3,75
Mes. C, 73,49 ; H, 9,12 ; N, 3,68).

Tous les dérivés 17 β -carboxamides décrits dans ce mémoire ont été préparés de la même manière, sauf les composés comportant une charge positive (dérivés 27 à 32 du tableau XI et 39 et 40 du tableau XVIII où la phase HCl 1N contenant le produit désiré sous forme de chlorhydrate est amenée à pH 10 par addition de soude et réextraite par du chlorure de méthylène. Dans le cas des 17 β -carboxamides bifonctionnels les plus simples, le stéroïde activé a été ajouté à la diamine en excès 2 fois molaire, de façon à obtenir une réaction stoechiométrique avec les fonctions amines. Chaque fois que nécessaire les produits obtenus ont été repurifiés par chromatographie préparative haute pression. Ceci a été le cas des produits difficiles à recristalliser après purification par simple extraction. La pureté des produits a été contrôlée en HPLC analytique à 210 et 254 nm. Le contrôle à 210 nm permet mieux de détecter la présence de contaminants tels que la DCU, la DCC et l'hydroxybenzotriazole.

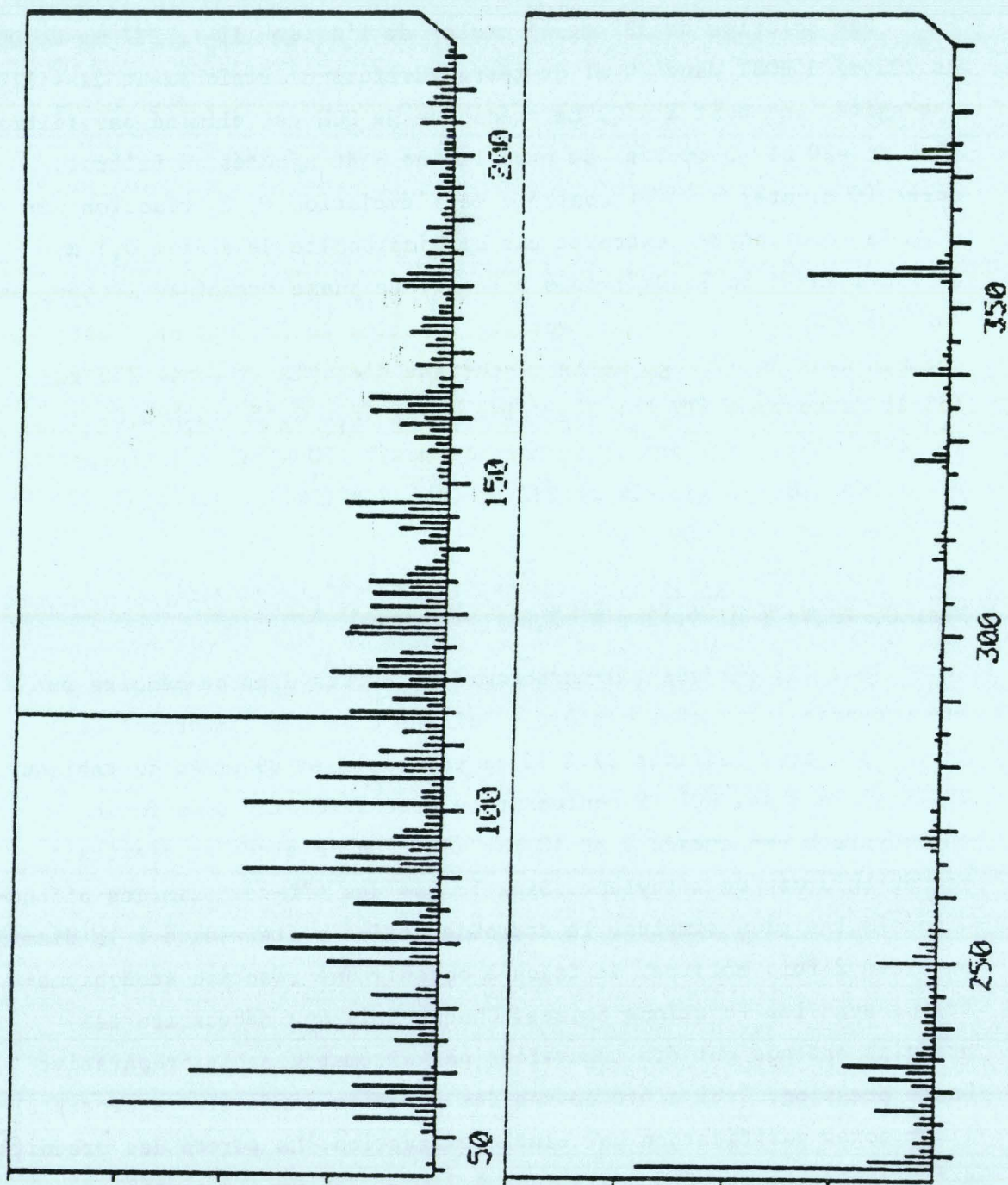
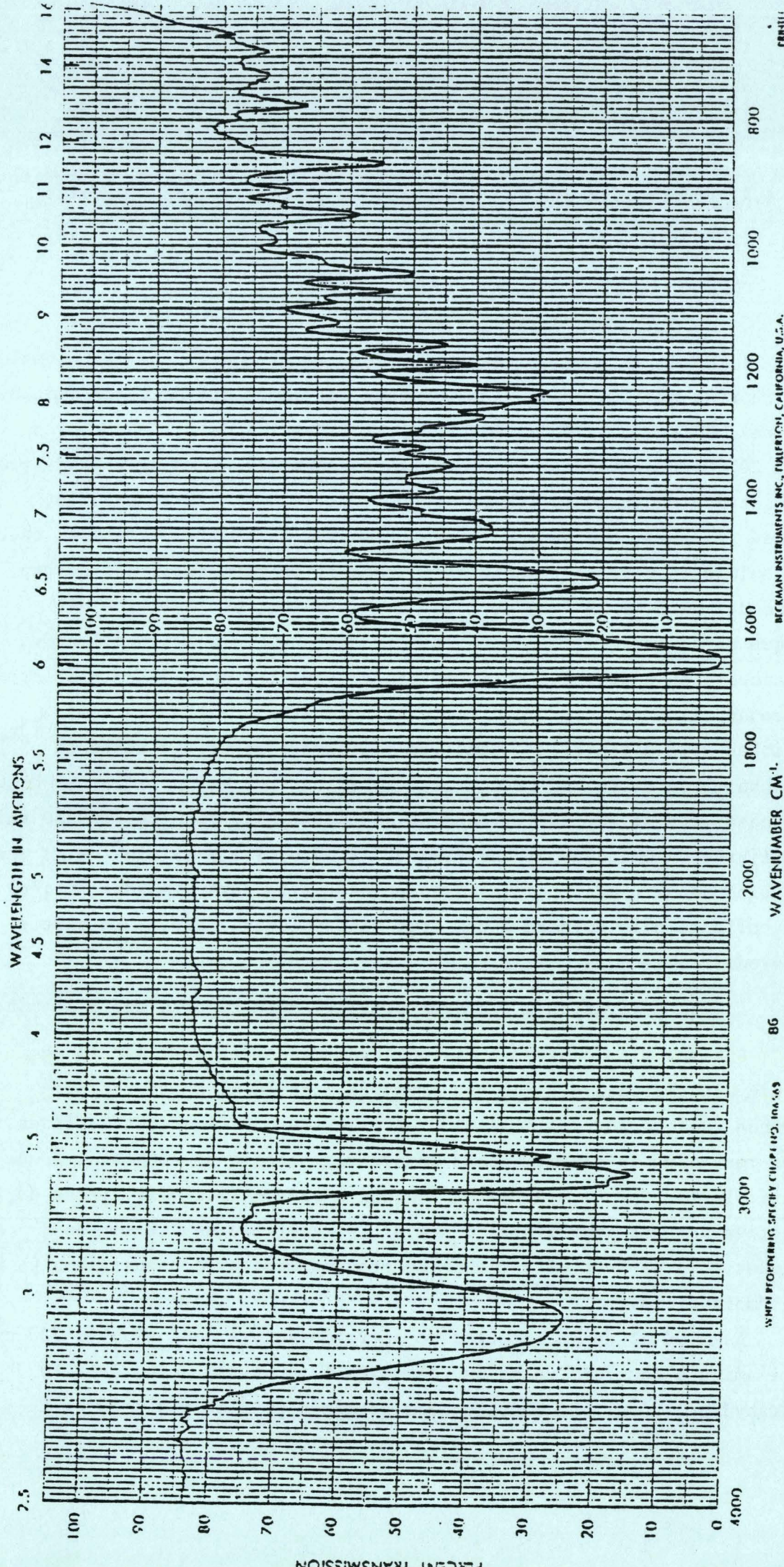


Figure 87 - Spectre de masse du 17 β carboxamide (IVa)



WAVENUMBER CM⁻¹ 86 BECKMAN INSTRUMENTS INC., FULLERTON, CALIFORNIA, U.S.A. PERM 11

Figure 88 - Spectre infra-rouge (KBr) du 17 β carboxamide (IV_a)



1.4. Préparation des 17β -carboxamides tritiés à haute activité spécifique.

Nous ne donnerons qu'un exemple de préparation

a) Oxydation périodique

1 mCi de $[1,2(n)-^3\text{H}]$ dexaméthasone, 40 Ci mmole^{-1} , soit 25 nmoles, est reprise par 100 μl de méthanol dans une minifiole conique (microvial Pierce). On y ajoute 30 μl d'acide périodique 1 % dans l'eau. Après 5h à 20° , la réaction est complète et le rendement avoisine 75 % d'après le contrôle effectué en CCM sur un aliquot (0,5 μl) de la solution déposé en parallèle avec un échantillon témoin traité de la même façon. Le couloir de chromatographie de l'échantillon radioactif est découpé en bandes de 5 mm le long de l'axe de migration, et la silice de chaque bande est grattée et récupérée dans une fiole à scintillation à laquelle on ajoute 0,5 ml de méthanol avant les 4 ml de scintillateur. La répartition de la radioactivité est comparée à celle des spots visibles sous ultra-violet dans les couloirs témoins. Le reste de l'échantillon de dexaméthasone oxydée radioactive est purifié par HPLC en phase inverse sur une colonne de Nucléosil C18, 10 μ (4,7 x 250 mm) équilibrée en mélange méthanol/eau (55 : 55 v/v) à $2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ sous une pression de 3000 psi. Le pic correspondant à la dexaméthasone oxydée est collecté puis évaporé à sec sous vide puis sous azote. La pureté du produit obtenu est vérifiée en CCM et en HPLC.

b) Activation à l'hydroxybenzotriazole et couplage à l'amine

Une solution contenant 24 mg d'hydroxybenzotriazole et 18 mg de dicyclohexylcarbodiimide est préparée dans 10 ml de tétrahydrofurane fraîchement distillé. 100 μl de cette solution sont utilisés pour reprendre la dexaméthasone oxydée radioactive et séchés dans une minifiole conique fermée par un bouchon à visser (minivial Pierce de 1,0ml). L'activation est poursuivie 16 h à 0° . Un contrôle en CCM sur un aliquot (0,5 μl) est effectué comme précédemment avec comparaison à un témoin froid.

Aux 100 μl de la solution de stéroïde activé sont ajoutés 330 nmoles de l'amine à coupler, sous un volume de 13,5 μl (dilution dans le tétrahydrofurane). La réaction est terminée en 3 heures à 20°C . Le

17 β -carboxamide est purifié par HPLC en phase inverse sur la même colonne que précédemment. La composition du solvant est ajustée d'après une mise au point préalable sur du 17 β -carboxamide froid. Le pic de 17 β -carboxamide chaud est repéré par sa position dans le chromatogramme et son absorbance à 254 nm. Trois préparations du même 17 β -carboxamide froid sont menées en parallèle de la préparation du produit chaud et dans des conditions rigoureusement identiques. Elles servent à étalonner le système et à vérifier l'optimisation des conditions de purification. Le produit radioactif est enfin injecté et le pic de 17 β -carboxamide collecté, puis évaporé et contrôlé sur le plan analytique. Le couplage de l'amine doit intervenir rapidement après activation de l'acide car l'ester activé à l'HOBT ne semble pas stable au-delà de 24h.

2 - Préparation de dérivés stéroïdiens divers

2.1. Esters acétiques et hémisuccinate de dexaméthasone ou d'acétonide de triamcinolone

La préparation est très simple et très rapide : 1 mmole de stéroïde et 1 mmole d'anhydride acétique ou succinique sont mélangés dans 5 à 10 ml de pyridine fraîchement distillée. Le mélange est porté à 80°C pendant 4 h. La réaction est quantitative d'après le contrôle en CCM. Le mélange est évaporé à sec sous vide, repris dans du chlorure de méthylène et lavé 3 fois à l'eau acidulée. La phase organique est évaporée et le résidu sec est recristallisé dans le méthanol.

- La préparation de dérivés radioactifs à haute activité spécifique est réalisée comme dans l'exemple suivant :

200 μ Ci de [1,2,4(n)-³H] acétonide de triamcinolone, 6,25 Ci. mmol⁻¹, soit 32 nmoles, sont évaporés à sec dans un microvial Pierce et repris par 20 μ l d'une solution d'anhydride succinique à 4 mg/ml dans de la pyridine distillée, soit 800 nmoles. Le flacon est bouché et placé à 80° pendant une nuit. L'ester radioactif obtenu est purifié par chromatographie en couche mince de silice sur plaques Merck F254 (0,25 mm) en utilisant le mélange solvant chloroforme/méthanol (4 : 1 v/v) en atmosphère saturée d'ammoniaque. Le rendement est de 48 %.

2.2. Dérivés mono et bifonctionnels de l'hémisuccinate de triamcinolone.

Les procédures mises en oeuvre sont très semblables à celles employées pour les 17β -carboxamides : activation de la fonction carboxylique à l'HOBt en présence de DCC et couplage à l'amine ou à la diamine selon le cas.

2.3. Préparation des 21 éthers de la dexaméthasone :

Elle comporte :

- la préparation du 21 mésylate de dexaméthasone : 1 mmole de dexaméthasone (393 mg) est dissoute dans 2,5 ml de pyridine distillée. Le mélange est refroidi à 0°C et on y ajoute 1,02 mmole de chlorure de mésyle (80 μ l). Après 1 heure d'agitation à 0°C, la solution est diluée à l'eau glacée et le précipité obtenu est filtré sur entonnoir à verre fritté n° 2, lavé avec quelques ml d'eau distillée, puis séché sous vide. Le rendement est de 82 % et la pureté du produit est contrôlée en CCM (mélange dichlorométhane/acétone 4/1).
- la réaction du mésylate de dexaméthasone (1 mmole) avec le phénate de sodium en léger excès (1,2 mmoles) est obtenue en milieu diméthylformamide (2 ml) à chaud (à reflux). La réaction est suivie en CCM (solvant chloroforme/méthanol 4:1 atmosphère saturée d'ammoniaque). Quand elle est complète le milieu réactionnel est dilué à l'eau froide et le précipité obtenu récupéré par filtration (fritté n° 3) et lavé à l'eau. Le phénate de dexaméthasone est purifié par recristallisation dans le méthanol.
- le couplage au paracarboxyméthylphénolate de sodium est obtenu dans des conditions similaires. Après saponification de la liaison ester dans des conditions usuelles, la propylamine est couplée au produit obtenu en utilisant le procédé d'activation du carboxyl à l'HOBt en présence de DCC.

2.4. Dérivé $16\alpha 17\alpha$ de la triamcinolone

- Hydrolyse de l'acétonide de triamcinolone du commerce : 2,8 mmoles d'acétonide de triamcinolone (1,21 g) sont dissoutes dans 80 ml d'acide formique à 55 % dans l'eau (50 ml d'acide formique 88 % plus

30ml d'eau) et portées à 100° au bain-marie pendant 90 min. Le liquide est refroidi puis évaporé sous vide à 50°C. Le résidu est repris et lavé dans le chloroforme à froid. La réaction est complète et le rendement de 70 %.

- Couplage de la triamcinolone au lévulinate d'éthyle (procédure inspirée d'un brevet Sigma Tau Industrie Ger. Off. 2,318,767 Chem. Abstract 80 (1974) 27428j) : 515 mg de triamcinolone sont repris dans 5 ml de diméthylformamide avec 10 ml de lévulinate d'éthyle. On y ajoute 5 ml d'acide perchlorique à 70 %. Après 72h à 20°C, l'évolution de la réaction est contrôlée en HPLC sur colonne de Nucléosil C18 10 μ (4,7 x 250 mm) équilibrée en méthanol/eau (65 : 35 v/v) avec détection à 254 nm. Le milieu réactionnel est dilué à 250 ml avec de l'eau et extrait au dichlorométhane (4 fois 50 ml). La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec. Le produit de couplage est purifié par chromatographie sur une colonne (4 x 40 cm) de silice greffée, phase inverse C18 70 μ (Waters), équilibrée en mélange méthanol/eau (65 : 35 v/v) à un débit de 1,8 ml min⁻¹. Des fractions de 9 ml sont recueillies et la densité optique à 254 nm est enregistrée. Les fractions correspondant au produit de couplage sont regroupées et évaporées. Le rendement est de 30 à 40 %.

- Saponification du produit de couplage triamcinolone-lévulinate d'éthyle :

Elle est pratiquée dans les conditions usuelles : 208 mg de produit du couplage précédent, 66 mg de carbonate de potassium, 16 ml de méthanol et 4 ml d'eau sont mélangés. Le mélange est mis à reflux 1h puis acidifié à l'HCl 1N de façon de ramener le pH à 2. Le produit est alors extrait par 3 fois 20 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique est extraite au bicarbonate de sodium 0,6 M, et l'extrait obtenu est à nouveau acidifié et réextrait à l'acétate d'éthyle. Cette dernière phase organique est lavée à l'eau acidulée, séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec. L'acide libre est obtenu avec un rendement de 63 %.

- Couplage à la propylamine

L'acide précédent est activé à l'HOBT et à la DCC dans le tétrahydrofurane, comme décrit pour les carboxamides et couplé à la propylamine en excès 5 fois molaire. La pré-purification usuelle donne un rendement de 70 % d'un produit contenant des impuretés d'après le contrôle en HPLC. La purification finale est donc effectuée en HPLC en phase inverse Nucléosil C18, 10 μ avec un mélange méthanol/eau (42 : 58, v/v). Le rendement final est de 16 %.

3) Préparation des maléimides et des succinimides N-substitués

3.1. Acide N-alkylmaléamique

50 mmol d'anhydride maléique, 50 mmol de l'amine considérée (n-alkylamine ou benzylamine) et 83 ml d'acide acétique glacial sont mélangés pendant une heure à 20°C. La majeure partie de l'acide acétique est ensuite évaporée sous vide à 60°C (Appareil Büchi). La solution très huileuse obtenue est diluée avec 250 ml d'eau distillée glacée pour faire précipiter l'acide maléamique. Le précipité est recueilli sur entonnoir à verre fritté n° 2 avec un peu d'eau glacée puis essoré et mis à sécher dans un dessiccateur sous vide contenant du P₂O₅. Le contrôle des produits obtenus est réalisé en CCM sur plaque de Silice Merck F 254 (0,25 mm).

3.2. Maléimides N-substitués (d'après Heitz 1968)

La cyclisation des acides maléamiques est obtenue à chaud dans le ballon d'un petit appareil de distillation plongé dans un bain d'huile. On chauffe progressivement au début pour obtenir la fusion de l'acide puis on pratique une distillation sous vide en augmentant progressivement la température. L'eau distille d'abord, puis à une température plus élevée, sous un vide de bonne qualité (p < 10 mm Hg) obtenu avec une pompe à palettes, la maléimide distille à son tour. Il est très important de mettre l'acide sec directement dans le ballon du montage de distillation et de chauffer légèrement, sinon il se forme des résines et le contenu du ballon prend rapidement un aspect goudronneux. C'est pourquoi la cyclisation préalable à 170-180° pendant 2 heures, avant la distillation, est à proscrire. Le rendement reste

néanmoins faible, de 15 à 30 %, voir tableau XXI.

3.3. Succinimides N-substituées (Rice 1954)

Leur préparation est très simple : l'anhydride succinique est mélangé à l'amine en conditions stoechiométriques, puis chauffé à 160°C et distillé sous vide. Le rendement est ici excellent.

4) Préparation des extraits biologiques

4.1. Tampons

Les tampons suivants ont été utilisés :

Tampon A : Tris/HCl 20 mM (utiliser impérativement du Trizma R Sigma), $MgCl_2$ 3 mM, Na_2MoO_4 10 mM, β -mercaptoéthanol 20 mM, glycérol 10 %, pH 7,4 à 0°C.

Tampon B : Phosphate de potassium 160 mM, Na_2MoO_4 10 mM, β -mercaptoéthanol 20 mM, glycérol 10 %, pH 7,4 à 0°C.

Tampon C : le même que B avec du phosphate de potassium 20 mM.

Tampon D : Phosphate de potassium 50 mM, Na_2MoO_4 10 mM, β -mercaptoéthanol 20 mM, pH 7,4 à 0°C.

Tampon E : le même que B, mais sans glycérol.

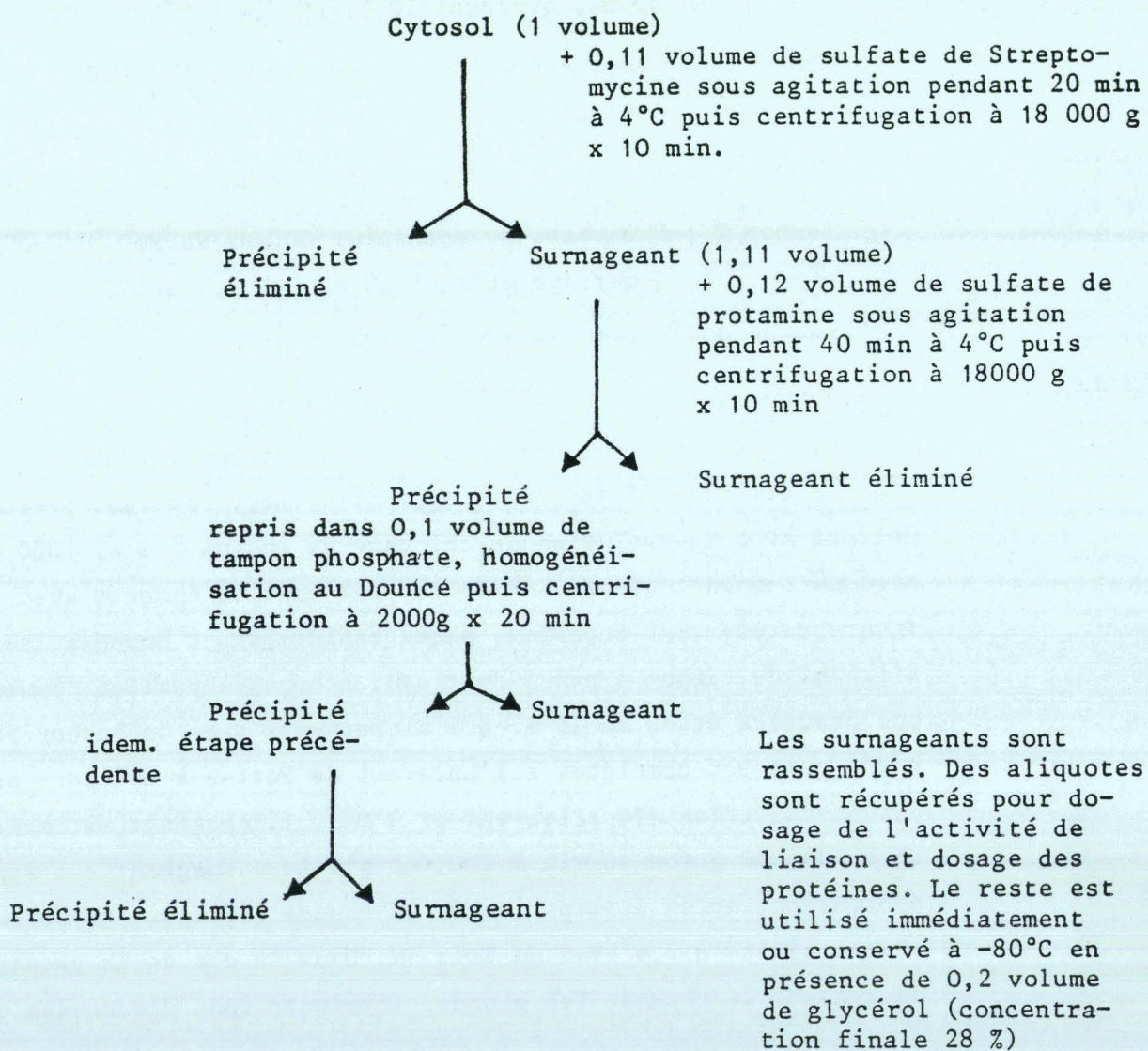
4.2. Cytosol

Des rats Wistar mâles (250 g) sont surrénalectomisés 3 à 5 jours avant d'être sacrifiés par décapitation. Leur foie est prélevé et perfusé avec une solution de chlorure de sodium à 9 p. 1000 puis avec du tampon A glacé. Les foies sont ensuite éponnés avec du papier (genre essuie-tout Sopalín), pesés rapidement et homogénéisés à raison d'1,5 ml de tampon A par g de tissu. L'homogénéisation commence par une première étape de 10 s. à l'ultraturax dans un bécher refroidi à 0°, puis est complétée à l'appareil de Potter à cylindre de verre et piston de téflon (10 aller-retour à 0°). L'homogénat est centrifugé 2h à 105 000 g (ou 40 min à 200 000 g). Le surnageant est récupéré par aspiration, après élimination de la couche lipidique supérieure, et son pH est ajusté à 7,4 avec du Tris 1M. Dans le cas de la préparation de cytosol de thymus, les glandes thymiques sont disséquées et prélevées

avant d'être pesées puis homogénéisées dans du tampon C à 0°C. Les cytosols sont utilisés soit immédiatement, soit conservés congelés à -70°C.

4.3. Extrait sulfate de protamine (d'après Govindan 1978)

Il est obtenu à partir du cytosol de foie en utilisant des solutions de sulfate de streptomycine (Merck) à 10 % dans l'eau distillée et de sulfate de protamine (Merck) à 0,75 % également dans l'eau distillée (dissoudre à chaud) selon le protocole suivant :



5) Détermination de l'activité de liaison des stéroïdes

Les échantillons contenant l'activité récepteur à mesurer (cytosol ou extrait au sulfate de protamine) sont incubés en double à 0° avec la dexaméthasone tritiée à une concentration de 30 nM en routine pour déterminer le nombre total de sites. Après 19h la radioactivité liée est mesurée par adsorption du stéroïde libre par une solution de charbon dextran : 200 µl d'incubat sont mélangés dans un tube de 4,5 ml à fond conique avec 100 µl d'une suspension de charbon activé (Norit A) à 3 % comportant 0,3 % de dextran. Après 10s d'agitation au Vortex, le mélange est laissé 15 min à 0° puis centrifugé 5 min à 4800 rpm. 150 µl de surnageant sont prélevés pour le comptage de la radioactivité liée totale. La liaison non spécifique est appréciée dans des tubes témoins où l'incubation est menée en parallèle, en présence d'un excès 1000 fois de dexaméthasone froide. Chaque point de mesure est la moyenne de quatre déterminations (incubation en double et charbon en double). Le cytosol est utilisé pur ou dilué selon le cas ; l'extrait au sulfate de protamine est généralement dilué au 1/20.

La mesure de l'affinité des stéroïdes non radioactifs pour le récepteur est réalisée par des expériences de compétition vis-à-vis de la liaison de la dexaméthasone comme décrit précédemment (Formstecher 1980a, Maes 1983).

6) Centrifugation en gradient de sucrose

Les gradients de sucrose linéaire (5-20 %) sont préparés en tampon B ou C à l'aide d'un formeur de gradient à deux chambres et coulés à 0°C dans des tubes pollyallomère de 4,4 ml. Les échantillons (200 µl) sont déposés sur ces gradients et les tubes sont centrifugés à 55 000 rpm et à 2°C pendant 17h dans un rotor SW 60 (Beckman) Des fractions de 200 µl sont collectées après perçage du fond du tube et comptées. Les coefficients de sédimentation sont déterminés d'après Martin et Ames (1962, J. Biol. Chem. 236, 1372-1282) en utilisant la catalase (11,3 S), l'aldolase (7,8 S), et la sérumalbumine bovine (4,3 S) comme étalons.

7) Chromatographie à haute performance

7.1. Matériel

Le système chromatographique utilisé comporte deux pompes 6000 A, un injecteur U6K équipé d'une boucle de 2 ml, un spectrophotomètre 480 LC et un programmeur de solvant 660. Tout ce matériel provient de la firme Waters (Milford, MA., USA). La récupération des fractions est assurée à l'aide d'un collecteur programmable, modèle 201 (Gilson, France). L'enregistrement de la densité optique et éventuellement de la pression en sortie de pompe est pratiqué sur un enregistreur à deux canaux (LKB). Les colonnes utilisées pour la chromatographie d'exclusion de taille des protéines sont des modèles TSK G3000 SW et TSK G4000 SW (7,5 x 600 mm) de chez LKB. La chromatographie d'échange d'ions des protéines est faite sur une colonne Ultropac TSK 545 DEAE (LKB). Les colonnes de silice phase greffée (250 x 4,7 mm) sont remplies au laboratoire avec du Nucléosil C18, 10 μ (Macherey Nagel). Cette phase stationnaire a été au préalable persilylée par traitement à l'hexaméthylidisilazane (HMDS) et au chlorure de triméthylsilane (TMS Cl) dans la pyridine à chaud (2h à 60°C et 3h à 100°C) pour bloquer tous les groupements silanols résiduels (Mc Call, J.M. 1975, J. Med. Chem. 18, 549). Le remplissage d'une colonne de 250 x 4,7 mm nécessite 2,7 g de phase stationnaire mis en suspension dans 25 ml de n-butanol et dégazé aux ultra-sons, et s'effectue à l'aide d'un poste de remplissage Chromatem sous 300 à 400 bars de pression avec un mélange méthanol/eau (50 : 50). Tous les solvants utilisés en HPLC sont filtrés sur filtre Millipore 0,45 μ et dégazés aux ultra-sons avant usage.

7.2. Chromatographie d'exclusion de taille du récepteur

Elle est pratiquée sur des échantillons de 0,5 ml de cytosol ou d'extrait sulfate de protamine injectée sur des colonnes TSK G 3000 SW ou TSK G 4000 SW équilibrées en tampon E à 0°C. La colonne est immergée dans un réservoir d'eau glacée. Le débit est de 0,5 ml.min⁻¹ et la pression de 300 à 400 psi (2,9 à 3,5 MPa). La calibration des rayons de Stokes utilise les étalons suivants : thyroglobuline (8,5 nm),

β -galactosidase (6,9 nm), sérumalbumine bovine (3,5 nm), ovalbumine (13,0 nm) et chymotrypsinogène (2,0 nm). Les courbes de standardisation sont représentées selon Porath (1963 Pure Appl. Chem. 6, 233-241).

7.3. Chromatographie d'échange d'ions du récepteur

L'échantillon à fractionner, préalablement équilibré en tampon D est injecté sur la colonne Ultropac TSK 545 DEAE équilibrée dans le même tampon à 0°C et immergée dans de l'eau glacée. Le débit est de 0,5 ml.min⁻¹ et la pression de 1,73 MPa. Après un lavage de 20 min, l'éluion est lancée avec un gradient de KCl de 0 à 0,5 M dans le tampon D. Des fractions de 0,5 ml sont collectées pour le dosage de la radioactivité, des protéines et de la concentration en potassium.

8) Divers

La méthode de Bensadoun et Weinstein (1976) a été utilisée pour le dosage des protéines tandis que les fonctions thiols étaient déterminées par le DTNB (Ellman 1959). La radioactivité a été mesurée sur un compteur à scintillation liquide Intertechnique SL 4000 dans de l'Aqualyte (Baker Chemicals) avec une efficacité de comptage de 35 % pour le tritium. Les températures inférieures à zéro ont été produites à l'aide d'un cryostat Huber HS 40. Le potassium est dosé par spectrophotométrie de flamme.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

	Pages
I - <u>FIGURES</u>	
A) PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Mécanisme d'action des hormones glucocorticoïdes au niveau des cellules cibles	6
2. Modèle de la transformation des complexes glucocorticoïde-récepteur proposé par Vedeckis (1985)	17
3. Modèle cinétique de la transformation des complexes glucocorticoïde-récepteur selon Munck (1984)	19
4. Les 3 modèles de distribution intra-cellulaire des récepteurs des hormones stéroïdes (Clark 1984)	22
5. Vue schématique de l'interaction hypothétique de 2 monomères du récepteur des glucocorticoïdes avec leur site de liaison situé sur le LTR de MMTV.	27
6. Cycle cellulaire du récepteur : modèle cinétique de Munck (1984)	30
7. Cycle cellulaire du récepteur : modèle à l'équilibre de Raaka (1983)	30
8. Relation entre taux d'occupation des récepteurs des glucocorticoïdes et réponse cellulaire	33
9. Variation d'énergie durant la liaison de l'acétonide de triamcinolone (H) au récepteur (R) des glucocorticoïdes et la transformation du complexe (d'après Milgrom 1981)	51
10. Un exemple de courbes de compétition entre des stéroïdes compétiteurs froids et un ligand de référence, la dexaméthasone tritiée, pour la liaison au récepteur des glucocorticoïdes	53
11. Structure de divers stéroïdes ayant une bonne affinité pour le récepteur des glucocorticoïdes.	54
12. Structure de quelques phénylpyrazolo-stéroïdes ayant une forte affinité pour le récepteur des glucocorticoïdes.	58
13. Structure du RU 486 et de quelques stéroïdes apparentés (Teutsch 1984)	60
14. Visualisation de la taille de la poche hydrophobe en regard du carbone 11 dans les dérivés p.tertiobutylphényl(a) et phenoxyphenyl(b) apparenté au RU 486.	61
15. Stéroïdes à chaîne latérale 17 β modifiée se liant au récepteur des glucocorticoïdes.	62

16. Stéroïdes sans chaîne latérale 17 β et cependant capables de se lier avec une bonne affinité au récepteur des glucocorticoïdes	64
17. Divers ligands non stéroïdiens capables de se lier au récepteur des glucocorticoïdes.	66
18. Direction des liaisons hydrogène observées dans des stéroïdes du type glucocorticoïde.	70
19. Conformations du cycle A observées à partir de la comparaison de 94 stéroïdes 4ène - 3one.	71
20. Superposition de deux conformations cristallographiques distinctes du cortisol et de celle du 9 α -fluorocortisol	71
21. Distance entre les points hypothétiques de liaison du cortisol et du 9 α -fluorocortisol au récepteur.	74
22. Conformations cristallines et calculées par le programme GEMO du RU 2323, un stéroïde 3oxo-4,9,11 triène.	74
23. Géométrie de la chaîne latérale C17.	77
24. Superposition des structures de plusieurs antiglucocorticoïdes sur celle de la dexaméthasone.	79
25. Comparaison de la conformation et de la capacité à contracter des liaisons hydrogène de la dexaméthasone et de son dérivé antiglucocorticoïde 17,21 spiro (ou oxetanone).	79
26. Modèle d'interaction entre le glucocorticoïde, son récepteur et la double hélice d'ADN.	80
27. Structure cristalline d'un complexe moléculaire entre la 11 désoxycorticostérone et l'adénine.	80
28. Schéma proposé par l'interaction glucocorticoïde-récepteur puis récepteur-glucocorticoïde et DNA par Sluysen (1983)	82
28bis. Stéroïdes utilisés pour le marquage du récepteur des glucocorticoïdes par photoaffinité.	85
29. Divers stéroïdes modifiés en position 21 et testés comme marqueurs d'affinité potentiels du récepteur des glucocorticoïdes.	87
30. Principe de l'approche antiidiotypique.	89
31. Dérivé de la triamcinolone utilisé pour la préparation d'anticorps antiidiotypiques.	89
32. Structure des différents gels portant des fonctions thiols activées utilisés pour immobiliser le récepteur des glucocorticoïdes.	96
33. Structure et mécanisme de liaison du mésylate de dexaméthasone sur le récepteur des glucocorticoïdes.	98
34. Modèle hypothétique d'interaction du molybdate avec le récepteur des glucocorticoïdes.	107
35. Modèle moléculaire des récepteurs stéroïdiens d'après Sherman (1983a)	113

36. Modèle moléculaire de Vedeckis (1983b)	113
37. Organisation en domaines fonctionnels du monomère de récepteur des glucocorticoïdes selon Gustafsson (1986) et Vedeckis (1985a)	122
38. ADN complémentaire et séquence protéique du récepteur humain des glucocorticoïdes d'après Hollenberg (1985)	130
38bis. ADN complémentaire et séquence protéique du récepteur des glucocorticoïdes chez le rat d'après Miesfeld (1986)	131
39. Comparaison des 2 formes α et β d'ADN complémentaires correspondant à la partie C-terminale du récepteur des glucocorticoïdes humain d'après Hollenberg (1985)	132
40. Domaines dans la structure primaire du récepteur des glucocorticoïdes et homologie de séquence avec le produit de v-erb-A et les gènes homéotiques.	132
41. Homologie de séquence en acides aminés de la région riche en cystéine, lysine et arginine des récepteurs humains des oestrogènes et des glucocorticoïdes, du récepteur de la progestérone de la poule, et du produit de l'oncogène v-erb-A.	133
42. Alignement schématique des séquences des récepteurs des oestrogènes humains et de poulet, du récepteur humain des glucocorticoïdes et du produit de l'oncogène v-erb-A.	134
B) RESULTATS PERSONNELS	
43. Evolution de la littérature concernant les récepteurs stéroïdiens	140
44. Centrifugation en gradient de sucrose du récepteur cytosolique libre du foie de rat	149
45. Centrifugation en gradient de sucrose du récepteur libre partiellement purifié par précipitation au sulfate de protamine.	150
46. Fractionnement du récepteur libre sur colonne d'hydroxylapatite.	151
47. Fractionnement du récepteur libre par chromatographie d'échange d'ions à haute performance.	153
48. Réaction d'un stéroïde 17 β -carboxylique avec la dicyclohexylcarbodiimide et la propylamine.	157
49. Séparation par HPLC des produits (1) et (2)	159
50. Contrôle en chromatographie en couche mince des produits (1) et (2)	160
51. Spectre infra-rouge (KBr) de la N-acylurée.	161
52. Spectre infra-rouge (KBr) du produit (2) anhydride probable de l'acide (IIa).	163
53. Méthode de couplage à l'HOBT.	165



54. Inhibition compétitive de la liaison de la [^3H] dexaméthasone au récepteur des glucocorticoïdes du foie de rat en présence de divers 17 β -carboxamides. 173
55. Interaction [^3H] DXB-récepteur hépatique du rat. Diagramme de Scatchard après 2h à 0°. 175
56. Cinétique d'association du [^3H] DXB 30 nM au récepteur hépatique du rat. Linéarisation. 176
57. Cinétique de dissociation du complexe [^3H] DXB-récepteur. 176
58. Structure comparée de la dexaméthasone, de son 21 acétate, de la désoxyméthasone et de deux 17 β -carboxamides dérivés de la dexaméthasone. 178
59. Conformation générale du DXP. ORTEP de la molécule projetés selon Duax (1975b) 179
60. Conformation générale comparée du DXP, du DXB, de la dexaméthasone et de la désoximétasone. 180
61. Conformations respectives des chaînes latérales de la dexaméthasone et du DXP projetées sur le plan moyen de ces chaînes. 184
62. Conformation de la chaîne latérale d'un 17 β -carboxamide, le DXP. Projections de Newman suivant C₂₀ - C₁₇ (a) et N - C₂₀ (b). 187
63. Constante de dissociation à l'équilibre du complexe récepteur des glucocorticoïdes-17 β -carboxamide de la dexaméthasone en fonction de la longueur de la chaîne carbonée portée par l'atome d'azote. 190
64. Structure et épaisseur comparée du cycle de la benzylamine et de son homologue dérivé du ferrocène. 197
65. Carte hypothétique de la région du récepteur des glucocorticoïdes située en regard de la chaîne latérale de 17 β -carboxamides dérivés de la dexaméthasone. 199
66. Géométrie comparée de la chaîne latérale 17 β de la dexaméthasone et du DXB. 200
67. Activité antiglucocorticoïde de trois 17 β -carboxamides dans des cellules d'hépatome de rat. 202
68. Principe de l'utilisation des stéroïdes bifonctionnels pour la détermination de l'existence d'un seul ou de plusieurs sites de liaison au stéroïde sur le récepteur. 206
69. 17 β -carboxamides bifonctionnels à bras variable en longueur et en polarité. 208
70. Esters mono et bifonctionnels de la dexaméthasone et de l'acétonide de triamcinolone. 211
71. Ethers de la dexaméthasone. 214

72. Préparation d'un dérivé de substitution à chaîne longue sur le glycol 16 α 17 α de la triamcinolone.	214
73. Principe de l'utilisation d'un anticorps anti-stéroïde et d'un stéroïde bifonctionnel pour l'obtention de stéroïde lesté et la numération des sites de liaison au stéroïde du récepteur.	217
74. Synthèse des maléimides N-substituées.	223
75. Inactivation du récepteur non lié par la N-éthylmaléimide ou la N-nonylmaléimide à 0°C.	228
76. Cinétique d'inactivation du récepteur des glucocorticoïdes libre par la N-éthyl ou la N-nonylmaléimide à - 12°C.	233
77. Efficacité comparée de diverses N-alkylmaléimides vis-à-vis de l'inactivation du récepteur des glucocorticoïdes libre.	234
78. Effet de la N-benzylmaléimide sur l'activité de liaison du récepteur des glucocorticoïdes libre.	236
79. Effet des N-alkylmaléimides préalablement inactivées par le β -mercaptoéthanol sur l'activité de liaison du récepteur.	239
80. Effet des N-alkylsuccinimides sur la liaison au récepteur des glucocorticoïdes.	240
81. Structure secondaire probable de la région C-terminale du récepteur des glucocorticoïdes du rat. Application de la méthode de Chou et Fasman.	246
82. Arrangement des molécules de DXP dans la maille cristalline	263
83. Arrangement des molécules de DXB dans la maille cristalline.	274
84. Spectre infra-rouge de l'acide 17 β -carboxylique (II _a)	280
85. Spectre infra-rouge de l'ester activé (III)	281
86. Spectre de masse de l'ester activé (III)	282
87. Spectre de masse du 17 β -carboxamide (IV _a)	284
88. Spectre infra-rouge du 17 β -carboxamide (IV _a)	285

II - TABLEAUX

A) PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I - Hypothèses concernant le mécanisme moléculaire par lequel les complexes stéroïde-récepteur stimulent la transcription des gènes qu'ils contrôlent.	29
II - Paramètres d'interaction de divers stéroïdes avec le récepteur des glucocorticoïdes selon le modèle bimoléculaire simple.	41
III - Constante d'interaction stéroïde-récepteur des glucocorticoïdes d'après le modèle michaelien.	43
IV - Paramètres d'interaction de divers stéroïdes antagonistes, agonistes partiels et agonistes purs avec le récepteur des glucocorticoïdes du thymus de rat.	45
V - Principaux paramètres thermodynamiques de l'interaction glucocorticoïde-récepteur d'après la littérature.	48
VI - Effet des substituants des stéroïdes à noyau 3,20 dioxo-4-pregnène (progestérone) sur leur affinité pour le récepteur des glucocorticoïdes.	56
VII - Stratégie employée pour le clonage et l'étude des cDNA codant pour les récepteurs des hormones stéroïdes.	126

B) RESULTATS PERSONNELS

VIII - Effet du molybdate sur la stabilisation du récepteur des glucocorticoïdes du foie de rat lié à l'hormone ou non et partiellement purifié ou non.	144
IX - Effets comparés du glycérol et de l'éthylèneglycol sur la stabilité au froid du récepteur des glucocorticoïdes.	147
X - Données analytiques concernant des stéroïdes 17 β -carboxamides.	167
XI - Données structurales et analytiques relatives à quelques 17 β -carboxamides de la dexaméthasone.	168
XII - Affinité comparée pour le récepteur du foie de rat de divers stéroïdes avant et après oxydation périodique en acide 17 β -carboxylique et greffage de la propylamine pour donner des dérivés 17 β -carboxamides.	172
XIII - Affinité comparée pour le récepteur du foie de rat des cellules d'hépatome HTC de cinq 17 β -carboxamides obtenus à partir de stéroïdes différents et greffés avec la benzylamine.	172
XIV - Conformation générale comparée de deux carboxamides dérivés de la dexaméthasone (DXB et DXP) avec la dexaméthasone et la désoximétasone.	181
XV - Conformation comparée des cycles B et C, distorsion autour de la structure en chaise dans deux 17 β -carboxamides et leurs stéroïdes de référence.	183

XVI - Conformation du cycle D.	183
XVII - Conformation comparée de la chaîne latérale en 17 β de deux carboxamides de la dexaméthasone (DXP et DXB) avec la dexaméthasone et la désoximétasone.	185
XVIII - Affinité pour le récepteur des glucocorticoïdes de rat d'une série de 17 β -carboxamides de la dexaméthasone préparés au laboratoire.	189
XIX - Comparaison des constantes de dissociation des stéroïdes 17 β -carboxamides linéaires et ramifiés homologues.	192
XX - Activité antiglucocorticoïde des stéroïdes 17 β -carboxamides vis-à-vis de l'induction de la TAT dans les cellules HTC.	202
XXI - Préparation des acides maléamiques N-substitués et des maléimides correspondantes.	224
XXII - Contenu comparé en récepteur des glucocorticoïdes et en groupements thiols liés à des macromolécules du cytosol natif et de l'extrait au sulfate de protamine.	226
XXIII - Effet de l'élimination du β -mercaptoéthanol et du molybdate sur l'activité de liaison de la [³ H] dexaméthasone du récepteur des glucocorticoïdes après fractionnement par le sulfate de protamine.	230
XXIV - Structure secondaire probable de la région entourant la cystéine 754 du récepteur des glucocorticoïdes du foie de rat.	245

RESUME

Les caractéristiques du site de liaison du récepteur des glucocorticoïdes du rat ont été étudiées en utilisant plusieurs approches distinctes. La comparaison des propriétés physico-chimiques du récepteur non lié à l'hormone, et stabilisé par le molybdate, à celles du complexe hormone-récepteur n'a pas montré de différences significatives. L'utilisation d'une série homogène de dérivés de la dexaméthasone modifiés dans la même région du stéroïde, les 17 β -carboxamides, a permis de préciser les propriétés du site de liaison du récepteur dans la région faisant face à la chaîne latérale du stéroïde. Cette région est étendue, globalement hydrophobe et comporte probablement un acide aminé aromatique à environ 2,4 Å de l'oxygène 21 du stéroïde. La synthèse de près de 50 dérivés 17 β -carboxamides radioactifs ou non est décrite tandis que la structure moléculaire de deux d'entre eux est étudiée par radiocristallographie. La synthèse d'une série de stéroïdes bifonctionnels utilisables pour la détermination du nombre de sites de liaison portés par le récepteur transformé ou non est décrite ainsi que les résultats de la caractérisation préliminaire de l'interaction de ces produits avec le récepteur. Enfin, la synthèse et l'utilisation d'une série de maléimides N-substituées pour l'exploration de l'environnement du thiol essentiel à la liaison du stéroïde sont rapportées. Cet environnement apparaît globalement hydrophobe avec probablement présence d'un acide aminé aromatique au voisinage immédiat de la cystéine essentielle. Les résultats fournis par l'utilisation des maléimides et des stéroïdes 17 β -carboxamides sont comparés entre eux et aux données récentes de la littérature concernant la localisation probable de la cystéine essentielle dans le site de liaison lui-même et la séquence en aminoacides du récepteur déduite de l'étude du DNA complémentaire de l'ARN-messager codant pour lui. Un excellent accord semble exister entre ces divers résultats puisque l'on trouve dans la partie C-terminale de cette séquence une cystéine située dans une région très hydrophobe et essentielle à la liaison du stéroïde et que cette cystéine est encadrée par deux acides aminés aromatiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, A.C. and Bird, C.C. (1982)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 106, 1056-1061.
- Agarwal, M.K. and Cayanis, F. (1986)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 136, 470-475.
- Albertsson, J., Oskarsson, A. and Svensson, C. (1978)
Acta Cryst. B34, 3027-3036.
- Alexis, M.N., Djordevic-Markovic, R. and Sekeris, C.E. (1983)
J. Steroid Biochem. 18, 655-663.
- Allera, A., Rao, G.S. and Breuer, H. (1980)
J. Steroid Biochem. 12, 259-266.
- Allinger, N.L. and Darooge, M.A. (1961)
J. Amer. Chem. Soc. 83, 4256-4258.
- Altona, C., Geise, H.J. and Romers, C. (1968)
Tetrahedron 24, 13-32.
- Anderson, B.M., Kim, S.J. and Wang, C.N. (1970a)
Arch. Biochem. Biophys. 138, 66-72.
- Anderson, B.M. and Vasini, E.C. (1970b)
Biochemistry 9, 3348-3352.
- Anderson, E.E. and Tymoczko, J.L. (1985)
J. Steroid Biochem. 23, 299-306.
- Andreasen, P.A. (1982a)
J. Steroid Biochem. 17, 577-579.
- Andreasen, P.A. (1982b)
Moll. Cell. Endocrinol. 28, 563-586.
- Antakly, T. and Eisen, H. (1984)
Endocrinology 115, 1984-1989.
- Aranyi, P. (1979)
Biochim. Biophys. Acta, 584, 529-537.

- Aranyi, P. and Naray, A. (1980)
J. Steroid Biochem. 12, 267-272.
- Aranyi, P. (1983a)
Eur. J. Biochem. 129, 549-554.
- Aranyi, P., Naray, A., Ninh, N.V., Fekete, G., Toth, J. and
Horvath, I. (1983b)
Steroids 42, 409-415.
- Aranyi, P. (1984a)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 119, 64-68.
- Aranyi, P. (1984b)
Eur. J. Biochem. 138, 89-92.
- Arendt, A., Kolodziejczyk, A.M. (1978)
Tetrahedron Lett. 40, 3867-3868.
- Atger, M. and Milgrom, E. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 4758-4762.
- Bailly, A., Le Fevre, B., Savouret, J.F. and Milgrom, E. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 2729-2734.
- Baker, M.E. and Fanestil, D.D. (1977)
Nature 269, 810-812.
- Baker, M.E., Vaughn, D.A. and Fanestil, D.D. (1980)
J. Steroid Biochem. 13, 993-995.
- Banerji, A. and Kalimi, M. (1981)
Steroids 37, 409-421.
- Barber, W. and Ehrenstein, M. (1954)
J. Org. Chem. 19, 1758-1765.
- Barnett, C.A., Schmidt, T.J. and Litwack, G. (1980)
Biochemistry 19, 5446-5455.
- Barnett, C.A., Speck, L. and Litwack, G. (1983)
Eur. J. Biochem. 134, 231-235.

- Barrack, E.R. and Coffey, D.S. (1983)
in *Biochemical Actions of Hormones*, vol. X, Academic Press p. 23-90.
- Baulieu, E.E., Atger, M., Best-Belpomme, M., Corvol, P., Courvalin, J., Mester, J., Milgrom, F., Robel, P., Rochefort, H. and De Catalogne, D. (1975)
Vit. Horm. 33, 649-736.
- Baulieu, E.E. (1978)
Mol. Cell. Endocrinol. 12, 247-254.
- Baumann, H., Firestone, G.L., Burgess, T.L., Gross, K.W., Yamamoto, K.R. and Held, W.A. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 563-570.
- Baxter, J.D. and Tomkins, G.M. (1971)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 932-937.
- Beato, M., Brandle, W., Biesewig, D. and Sekeris, C.E. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 208, 125-136.
- Beato, M., Von der Ahe, D., Cato, A.C.B., Janick, S., Krauter, P., Scheidereit, C., Suske, G., Wenz, M., Westphal, H.M. and Willmann, T. (1986)
in *Glucocorticoid Hormone : mechanisms of action*, Ed. by Y. Sakamoto and F. Isohashi, Springer-Verlag, Berlin, p. 97-116.
- Bell, P.A. and Munck, A. (1973)
Biochem. J. 136, 97-107.
- Bell, P.A. and Jones, T.R. (1978)
in *Glucocorticoid Action and Leukaemia*, Proc. 7th Tenovus workshop, Cardiff, Ed. P.A. Bell and N.M. Borthwick - Alpha Omega Publishing, Cardiff pp. 1-14.
- Bell, P.A. and Jones, T.R. (1979)
in *Antihormones* Ed. M.K. Agarwal, Elsevier, Amsterdam, pp. 35-50.
- Bell, P.A. and Jones, T.R. (1982)
in *Hormone antagonists*, Ed. M.K. Agarwal, Walter de Gruyter, Berlin, pp. 391-405.

- Bell, P.A., Weatherill, P.J. and Jones, T.R. (1986)
J. Steroid Biochem. 24, 57-62.
- Bellamy, L.J. (1975)
The Infrared Spectra of Complex Molecules
Third Edition, Chapman and Hall, Ed., London, p. 247.
- Ben-Or, S. and Chrambach, A. (1983)
Arch. Biochem. Biophys. 221, 341-353.
- Bensadoun, A. and Weinstein, D. (1976)
Anal. Biochem. 70, 241-250.
- Berg, J.M. (1986)
Nature 319, 264-265.
- Bernard, P.A. and Joh, T.H. (1984)
Arch. Biochem. Biophys. 229, 466-476.
- Bhacca, N.S., Giannini, D.D., Jankowski, W.S. and Wolff, M.E. (1973)
J. Am. Chem. Soc. 95, 8421-8426.
- Bishop, J.M. (1986)
Nature 321, 112-133.
- Bloom, E., Matulich, D.T., Lan, N.C., Higgins, S.J., Simons, S.J.
and Baxter, J.D. (1980) J. Steroid Biochem. 12, 175-184.
- Bodine, P.V., Schmidt, T.J. and Litwack, G. (1984)
J. Steroid Biochem. 20, 683-689.
- Bodwell, J.E., Holbrook, N.J. and Munck, A. (1984)a
Biochemistry 23, 1392-1398.
- Bodwell, J.E., Holbrook, N.J. and Munck, A. (1984)b
Biochemistry 23, 4237-4242.
- Bodwell, J.E., Holbrook, N.J. and Munck, A. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 2601-2604.
- Bourgeois, S., Pfahl, M. and Baulieu, E.E. (1984)
Embo J. 3, 751-755.

- Bucourt, R., Cohen, N.C. and Lemoine, G. (1975)
Bull. Soc. Chim. France, 903-907.
- Cake, M.H. and Litwack, G. (1975)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 828-834.
- Cake, M.H. and Litwack, G. (1978)a
Eur. J. Biochem. 82, 97-103.
- Cake, M.H., Di Sorbo, D.M. and Litwack, G. (1978)b
J. Biol. Chem. 253, 4886-4891.
- Cardo, P.P., Gambetti, M., Vignale, B. and Divano, M.C. (1983)
Eur. J. Biochem. 137, 173-178.
- Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.A. and Wrangé, O. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 497, 507.
- Carlstedt-Duke, J., Wrangé, O., Dahlberg, E., Gustafsson, J.A.
and Högberg, B. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 1537.
- Carlstedt-Duke, J., Okret, S., Wrangé, O. and Gustafsson, J.A. (1982)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4260-4264.
- Carlstedt-Duke, J., Wrangé, O., Okret, S. and Gustafsson, J.A. (1984)
Biochem. Pharmacol. 33, 913-916.
- Carlstedt-Duke, J. and Gustafsson, J.A. (1985)
in Grem Symposium Glucocorticoids Today. Mechanisms of action and
topical therapy. Eds : J.L. Junien, F. Russo-Marie and J. Buré.
Excerpta Medica, Elsevier, Amsterdam, pp 26-37.
- Carter-Su, C. and Pratt, W.B. (1984)
The receptors, ed. P.M. Conn, vol. 1, Academic Press, pp. 541-585.
- Catelli, M.G., Binart, N., Jung-Testas, I., Renoir, J.M., Baulieu, E.E.
Feramisco, J.R. and Welch, W.J. (1985)
Embo J. 4, 3131-3135.

- Cayanis, E., Rajogopalan, R., Cleveland, W.L., Edelman, I. and Erlanger, B.F. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 5094-5103.
- Chambon, P., Dierich, A., Gaub, M.P., Jakowlev, S., Jongstra, J., Krust, A., Le Pennec, J.P., Oudet, P. and Reudelhuber, T. (1984)
Progr. Horm. Res. 40, 1-42.
- Chong, M.T. and Lippman, M.E. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 2996-3002.
- Chrousos, G.P., Vingerhoeds, A., Brandon, D., Eil, C., Pugeat, M., De Vroede, M., Loriaux, D.L. and Lipsett, M.B. (1982)a
J. Clin. Invest. 69, 1261-1268.
- Chrousos, G.P., Saver, M.A., Loriaux, D.L. and Cutler, G.B. (1982)b
Steroids 40, 425-431.
- Cidlowski, J.A. and Thanassi, J.W. (1979)
Biochemistry 18, 2378-2384.
- Cidlowski, J.A. (1980)
Biochemistry 19, 6162-6170.
- Cidlowski, J.A. and Currie, R.A. (1982)
J. Steroid Biochem. 17, 277-280.
- Cidlowski, J.A. (1984)a
Biochim. Biophys. Acta 800, 258-268.
- Cidlowski, J.A. and Richon, V. (1984)b
Endocrinology 115, 1588-1597.
- Clark, C.R. (1984)
Trends Biochem. Sci. 9, 207-208.
- Cohen, N.C. (1971)
Tetrahedron 27, 789-797.
- Cole, W.G. and Williams, D.M. (1968)
J. Chem. Soc. (C) 1849-1852.

- Cole, W.G. and Williams, D.H. (1970)
J. Chem. Soc. (B), 748-752.
- Conneely, O.M., Sullivan, W.P., Toft, D.O., Birnbaumer, M., Cook, R.C.
Maxwell, B.L., Zarucki-Schultz, T., Greene, G.L., Schrader, W.T.
and O'Malley, B.W. (1986)
Science 233, 767-770.
- Coty, W.A. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 8035-8037.
- Dahlberg, E., Thalen, A., Brattsand, R., Gustafsson, J.A.,
Johansson, U., Roempke, K. and Saartok, T. (1984)
Mol. Pharmacol. 25, 70-78.
- Dahmer, M.K., Housley, P.R. and Pratt, W.B. (1984)
Ann. Rev. Physiol. 46, 67-81.
- Danhaive, P.A. and Rousseau, G.G. (1986)
J. Steroid Biochem. 24, 481-487.
- Danzé, P.M. (1983)
Thèse Médecine, Lille.
- Danzé, P.M., Formstecher, P., Richard, C. and Dautrevaux, M. (1986)
Biochim. Biophys. Acta, in press.
- Dausse, J.P., Duval, D. and Meyer, P. (1977)
Mol. Pharmacol. 13, 948-955.
- Debuire, B., Henry, C., Benaïssa, M., Biserte, G., Claverie, J.M.,
Saule, S., Martin, P. and Stehelin, D. (1984)
Science 224, 1456-1459.
- Defaye, G., Basset, M., Monnier, N. and Chambaz, E.M. (1980)
Biochim. Biophys. Acta 623, 280-294.
- Delaroff, V., Dupuy, N., Nedelec, L. and Legrand, M. (1979)
Tetrahedron 35, 2681-2692.
- Delettre, J., Mornon, J.P., Lepicard, G., Ojasoo, T. and Raynaud, J.P. (1980)
J. Steroid Biochem. 13, 45-59.

- Dellweg, H.G., Hotz, A., Mugele, K. and Gehring, U. (1982)
Embo J. 1, 285-289.
- De Ryck, L.M.H., Ross, J.B.A., Petra, P.H. and Gurrpide, E. (1985)
J. Steroid; Biochem. 23, 145-152.
- Dideberg, O., Dupont, L. and Campsteyn, H. (1975)
J. Steroid Biochem. 7, 757-760.
- Di Sorbo, D.M., Phelps, D.S. and Litwack, G. (1980)
Endocrinology 106, 922-929.
- Di Sorbo, D.M. and Litwack, G. (1982)
in Biochemical Actions of Hormones. Ed.: G. Litwack, vol. IX.
Academic Press, New-York, pp. 205-219.
- Dolan, K.P., Diaz-Gil, J.J. and Litwack, G. (1980)
Arch. Biochem. Biophys. 201, 476-485.
- Dougherty, J.J., Puri, R.K. and Toft, D.O. (1985)
Trends Pharmacol. Sci. 83-85.
- Duax, W.L., Weeks, C.M., Rohrer, D.C., Osawa, Y. and Wolff, M.C. (1975)a
J. Steroid Biochem. 6, 195-200.
- Duax, W.L. and Norton, D.A. (1975)b
Atlas of Steroid Structure, vol. I. Plenum Press, New-York.
- Duax, W.L., Weeks, C.M. and Rohrer, D.C. (1976)
Rec. Progr. Horm. Res. 32, 81-116.
- Duax, W.L., Cody, V. and Hazel, J. (1977)
Steroids 30, 471-480.
- Duax, W.L., Cody, V., Griffin, J.F., Tohrer, D.C. and Weeks, C.M. (1978)a
J. Tox. Environ. Health 4, 205-227.
- Duax, W.L., Cody, V., Griffin, J., Hazel, J. and Weeks, C.M. (1978)b
J. Steroid Biochem. 9, 901-907.
- Duax, W.L., Griffin, J.F. and Rohrer, D.C. (1981)
J. Amer. Chem. Soc. 103, 6705-6712.

- Duax, W.L., Griffin, J.F., Rohrer, D.C. and Weeks, C.M. (1982)
in Hormone antagonists. Ed.: M.K. Agarwal, Walter de Gruyter,
Berlin, pp. 3-24.
- Duax, W.L. and Griffin, J.F. (1984)
in Adrenal Steroid Antagonism. Ed.: M.K. Agarwal, Walter de Gruyter,
Berlin, pp. 15-41.
- Dunaway, H.E., Hutchens, T.W. and Besch, P.G. (1985)
J. Chromatogr. 327, 221-235.
- Dunkerton, L.V., Markland, F.S. and Li, M.P. (1982)
Steroids 39, 1-6.
- Dupont, L., Dideberg, O. and Campsteyn, H. (1974)
Acta Cryst. B30, 514-516.
- Duval, D., Durant, S. and Homo-Delarche, F. (1984)
J. Steroid Biochem. 20, 283-287.
- Economilis, I.V. and Rousseau, G.G. (1985)
FEBS Lett. 181, 47-52.
- Eger, C.H., Greiner, M.J. and Norton, D.A. (1971)
Steroids 18, 231-249.
- Eisen, H.J. (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3893-3897.
- Eisen, H.J., Schleenbaker, R.E. and Simons, S.S. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 12920-12925.
- Eisen, L.P., Reichman, M.E., Thompson, E.B., Gametchu, B., Harrison, R.W.
and Eisen, H.J. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 11805-11810.
- Eisen, L.P., Harrison, R.W. and Harmon, J.M. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 3725-3731.
- Eliard, P.H. and Rousseau, G.G. (1984)
Biochem. J. 218, 395-404.
- Eliard, P.H., Marchan, M.J., Rousseau, G.G., Formstecher, P.,
Mathy-Hartert, M., Belayew, A. and Martial, J.A. (1985)
DNA 4, 409-417.

- Ellman, G.L. (1959)
Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77.
- Failla, D., Tomkins, G.M. and Santi, D.V. (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3849-3852.
- Feldman, D. (1978)
Biochem. Pharmacol. 27, 1187-1191.
- Fonda, M.L. and Anderson, B.M. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 666-674.
- Formstecher, P. (1980)a
Mémoire pour l'obtention du DERBH, Lille.
- Formstecher, P., Lustenberger, P. and Dautrevaux, M. (1980)b
Steroids 35, 265-272.
- Formstecher, P., Lustenberger, P. and Dautrevaux, M. (1981)
in Protides of the Biological Fluids, vol. 29. Ed. : H. Peeters,
1981, Pergamon Press, Oxford, pp. 393-396.
- Formstecher, P., Dumur, V., Idziorek, T., Danzé, P.M., Sablonnière, B.,
and Dautrevaux, M. (1984)
Biochim. Biophys. Acta 802, 306-313.
- Formstecher, P., Lefebvre, P. and Dautrevaux, M.
Poster présenté au Symposium sur les Antistéroïdes, Marbella,
Septembre 1986).
- Francke U. and Gehring, U. (1980)
Cell 22, 657-664.
- Franceschi, R.T. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2327-2341.
- Gametchu, B. and Harrison, R.W. (1984)
Endocrinology 114, 274-279.
- Gardner, D.G. and Wittliff, J.L. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 320, 617-627.

- Gasc, J.M., Renoir, J.M., Radanyi, C., Joab, I., Tuohimaa, P.
and Baulieu, E.E. (1984)
J. Cell Biol. 99, 1193-1201.
- Gehring, U. and Hotz, A. (1983)
Biochemistry 22, 4013-4018.
- Gehring, U. and Arndt, H. (1985)a
FEBS Lett. 179, 138-142.
- Gehring, U., Segnitz, B., Foellmer, B. and Francke, U. (1985)b
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3751-3755.
- Genard, P. (1976)
J. Steroid Biochem. 7, 497-500.
- Giannini, D.D., Kollman, P.A., Bhacca, N.S. and Wolff, M.E. (1974)
J. Am. Chem. Soc. 96, 5462-5466.
- Giorgi, E.P. and Stein, W.D. (1981)
Endocrinology 108, 688-697.
- Glaxo (brevet)
Fr 72 01852, Jan. 20, 1972.
- Godeau, J.F., Schorderet-Slatkine, S., Hubert, P. and Baulieu, E.E. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2353-2357.
- Goidl, J.A., Cake, M.H., Dolan, K.P., Parchman, L.G. and Litwack, G. (1977)
Biochemistry 16, 2125-2130.
- Gomez-Sanchez, E.P., Gomez-Sanchez, C.E. and Ferris, M.W. (1983)
J. Steroid Biochem. 19, 1819-1822.
- Govindan, M.V. and Sekeris, C.E. (1978)
Eur. J. Biochem. 89, 95-104.
- Govindan, M.V. (1979)
J. Steroid Biochem. 11, 323-332.
- Govindan, M.V. and Manz, B. (1980)a
Eur. J. Biochem. 108, 47-53.

- Govindan, M.V. (1980)b
Exp. Cell Res. 127, 293-297.
- Govindan, M.V., Devil, M., Green, S., Gronemeyer, H. and Chambon, P. (1985)
Nucleic Acids Res. 10, 8293-8304.
- Grandberg, P.J. and Ballard, P.L. (1977)
Endocrinology 100, 1160-1168.
- Grandics, P., Gasser, P.L. and Litwack, G. (1982)
Endocrinology 111, 1731-1733.
- Grandics, P., Miller, A., Schmidt, T.J. and Litwack, G. (1984)a
Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 59-65.
- Grandics, P., Miller, A., Schmidt, T.J., Mittman, D. and Litwack, G.
(1984)b
J. Biol. Chem. 259, 3173-3180.
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P.
and Chambon, P. (1986)
Nature 320, 134-139.
- Greene, G.L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y.
and Shine, J. (1986)
Science 231, 1150-1154.
- Griffin, J.F., Duax, W.L. and Weeks, C.M. (1984)
Atlas of Steroid Structure, vol. 2, Plenum Press, New-York.
- Grippo, J.F., Holmgren, A. and Pratt, W.B. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 93-97.
- Grody, W.W., Schrader, W.T. and O'Malley, B.W. (1982)
Endocrine Reviews 3, 141-163.
- Gruol, D.J., Kempner, E.S. and Bourgeois, S. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 4833-4839.
- Gruol, D.J., Campbell, N.F. and Bourgeois, S. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 4909-4914.
- Gustafsson, J.A., Okret, S., Wikstrom, A.C., Andersson, B.,
Radojcic, M., Wrangé, O., Sachs, W., Doupe, A.J., Patterson, P.H.,
Cordell, B. and Fuxe, K. (1983)
in Nobel Symposium : Steroid Hormone Receptors : structure and
function. Eds : H. Eriksson and J.A. Gustafsson, 57, Elsevier,
Amsterdam, pp. 355-386.

- Gustafsson, J.A., Carlstedt-Duke, J., Wrangé, O., Okret, S. and Wilkstrom, A.C. (1986)
J. Steroid Biochem. 24, 63-68.
- Hager, G.L., Richard-Foy, H., Kessel, M., Wheeler, D., Lichtler, A.C., and Ostrowski, M.C. (1984)
Recent Progr. Horm. Res. 40, 121-142.
- Hansen, J.C. and Gorski, J. (1985)
Biochemistry, 24, 6078-6085.
- Harmon, J.M., Eisen, H.J., Brower, S.T., Simons, S.S., Langley, C.L. and Thompson, E.B. (1984)
Cancer Res. 44, 4540-4547.
- Harris, A.W. and Baxter, J.D. (1979)
in Glucocorticoid Hormone Action, Eds : J.D. Baxter and G.G. Rousseau, Springer-Verlag, Heidelberg, pp 423-448.
- Harrison, R.W. and Yeakley, J. (1979)
Mol. Cell Endocrinol. 15, 13-18.
- Harrison, R.W., Woodward, C. and Thompson, E. (1983)
Biochim. Biophys. Acta 759, 1-6.
- Hegarthy, A.F., Mc Cormack, M.T., Brady, K., Ferguson, G. and Roberts, P.J. (1980)
J. Chem. Soc. Perkin II, 867-875.
- Heitz, J.R., Anderson, C.D. and Anderson, B.M. (1968)
Arch. Biochem. Biophys. 127, 627-636.
- Hermann, T. and Ghraf, R. (1986)
Acta Endocrinol. 111 suppl. 274, 151.
- Higgins, S.J., Rousseau, G.G., Baxter, J.D. and Tomkins, G.M. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 5866-5872.
- Higgins, S.J., Baxter, J.D. and Rousseau, G.G. (1979)
in : Glucocorticoids Hormone Action, Eds : J.D. Baxter and G.G. Rousseau, Springer-Verlag, Heidelberg, 1979, pp 135-160.

- Hofstee, B.H.J. (1952)
Science 116, 329-331.
- Holbrook, N.J., Bodwell, J.E., Jeffries, M. and Munck, A. (1983_a)
J. Biol. Chem. 258, 6477-6485.
- Holbrook, N.J., Bodwell, J.E. and Munck, A. (1983_b)
J. Biol. Chem. 258, 14885-14894.
- Holbrook, N.J., Bodwell, J.E. and Munck, A. (1984_a)
J. Steroid Biochem. 20, 19-22.
- Holbrook, N.J., Bodwell, J.E. and Munck, A. (1984_b)
J. Steroid Biochem. 20, 245-250.
- Holbrook, N.J., Bodwell, J.E., Mendel, D.B. and Munck, A. (1985)
in : Molecular Mechanism of Steroid Hormone Action, Ed. : V.K.
Moudgil, W. de Gruyter, Berlin, pp 637-657.
- Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A.,
Lebo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G. and Evans, R.M. (1985)
Nature 318, 635-641.
- Homma, H. and Listowsky, I. (1985)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7165-7169.
- Housley, P.R., Dahmer, M.K. and Pratt, W.B. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 8615-8618.
- Housley, P.R. and Pratt, W.B. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 4630-4635.
- Housley, P.R., Grippo, J.F., Dahmer, M.K. and Pratt, W.B. (1984)
in : Biochemical Actions of Hormone, Ed.: G. Litwack, vol. XI,
Academic Press, New-York, pp 347-376.
- Housley, P.R., Sanchez, E.R., Westphal, H.M., Beato, M. and
Pratt, W.B. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 13810-13817.
- Hryb, D.J., Khan, M.S., Romas, N.A. and Rosner, W. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 3253-3256.

- Hubbard, J. and Kalimi, M. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 14263-14267.
- Hubbard, J.R. and Kalimi, M. (1983_a)
J. Steroid Biochem. 19, 1163-1167.
- Hubbard, J. and Kalimi, M. (1983_b)
Biochim. Biophys. Acta 755, 178-185.
- Hubbard, J.R., Barrett, A. and Kalimi, M. (1984_a)
Biochim. Biophys. Acta 798, 178-191.
- Hubbard, J.R., Barrett, J. and Kalimi, M. (1984_b)
Endocrinology 115, 65-72.
- Hutchens, T.W., Markland, F.S. and Hawkins, E.F. (1982)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 20-27.
- Hutchens, T.W., Dunaway, H.E. and Besch, P.K. (1985)
J. Chromatogr. 327, 247-259.
- Idziorek, T., Sablonnière, B., Formstecher, P., Dumur, V. and
Dautrevaux, M. (1985_a)
J. Steroid Biochem. 23, 593-597.
- Idziorek, T., Formstecher, P., Danze, P.M., Sablonnière, B.,
Lustenberger, P., Richard, C., Dumur, V. and Dautrevaux, M. (1985_b)
Eur. J. Biochem. 153, 65-74.
- Iida, S., Gomi, M., Muriwaki, K., Itoh, Y., Hirobe, K., Matsuzawa, Y.,
Katagiri, S., Yonezawa, T. and Tarvi, S. (1985)
J. Clin. Endocrinol. Metab. 60, 967-971.
- Isohashi, F. and Sakamoto, Y. (1986)
in : Glucocorticoid Hormone : Mechanism of Action, ed. : Y. Sakamoto
and F. Isohashi, Springer-Verlag, pp 69-94.
- Izawa, M. and Ichii, S. (1980)
Endocrinol. Japon 27, 101-106.
- Jeltsch, J.M., Krozowski, Z., Quirin-Stricker, C., Gronenmeyer, H.,
Simpson, R.J., Garnier, J.M., Krust, A., Jacob, F. and
Chambon, P.
Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 5424-5428.

- Joab, I., Radanyi, C., Renoir, M., Buchou, T., Catelli, M.G.,
Binart, N., Mester, J. and Baulieu, E.E. (1984)
Nature 308, 850-853.
- John, J.K. and Moudgil, V.K. (1979)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 1242-1248.
- Jones, T.R., Sloman, J.C. and Bell, P.A. (1979)
Mol. Cell Endocrinol. 13, 83-92.
- Jones, T.R. and Bell, P.A. (1980)
Biochem. J. 188, 237-245.
- Jones, T.R. and Bell, P.A. (1982)
Biochem. J. 204, 721-729.
- Kalimi, M., Beato, M. and Feigelson, P. (1973)
Biochemistry, 12, 3365-3371.
- Kalimi, M. and Love, K. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 4687-4690.
- Kalimi, M. and Hubbard, J. (1982)
Biochim. Biophys. Acta 719, 488-494.
- Kalimi, M., Hubbard, J. and Ray, A. (1983)
J. Steroid Biochem. 18, 665-671.
- Katsumata, M., Gupta, C., Baker, M.K., Sussdorf, C.E. and
Goldman, A.S. (1982)
Science 218, 1313-1315.
- Katzenellenbogen, J.A. and Katzenellenbogen, B.S. (1984)
Vitamins and Hormones 41, 213-274.
- Kier, L.B. (1968)
J. Med. Chem. 11, 915-919.
- King, W.J. and Greene, G.L. (1984)
Nature 307, 745-747.
- Kirkpatrick, A.F., Kaiser, N., Milholland, R.J. and Rosen, F. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 70-74.

- Koblinsky, M., Beato, M., Kalimi, M. and Feigelson, P. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 7897-7904.
- Koch, B., Lutz-Bucher, B., Briand, B. and Mialhe, C. (1978)
J. Endocrinol. 79, 215-222.
- Kollman, P.A., Giannini, D.D., Duax, W.L., Rothenberg, S. and
Wolff, M.E. (1973)
J. Amer. Chem. Soc. 95, 2869-2873.
- Konig, W. and Geiger, R. (1970)
Chem. Ber. 103, 788-798.
- Kovacic-Milivojevic, B., La Pointe, M.C., Reker, C.E. and
Vedeckis, W.V. (1985)
Biochemistry 24, 7357-7366.
- Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornert, J.M.
and Chambon, P. (1986)
Embo J. 5, 891-897.
- Kumar, S.A. and Dickerman, H.W. (1983)
in : Biochemical Actions of Hormones, Ed. : G. Litwack, vol. X,
Academic Press, New-York, pp 259-301.
- Kumar, S.A. and Dickerman, H.W. (1985)
in : Molecular Mechanism of Steroid Hormone Action, Ed. : V.K. Moudgil,
W. de Gruyter, Berlin, 505-538.
- Kurl, R.N. and Jacob, S.T. (1984)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 119, 700-705.
- Lamontagne, N., Mercier, L., Pons, M., Thompson, E.B. and
Simons, S.S. (1984)
Endocrinology 114, 2252-2263.
- La Pointe, M.C., Chang, C.H. and Vedeckis, W.V. (1986)
Biochemistry 25, 2094-2101.
- Lee, D.L., Kollman, P.A., Marsh, F.J. and Wolff, M.E. (1977)
J. Med. Chem. 20, 1139-1146.
- Lee, H.J., Bradlow, H.L., Moran, M.C. and Sherman, M.R. (1981)
J. Steroid Biochem. 14, 1325-1335.

- Le Fevre, B., Bailly, A., Sallas, N. and Milgrom, E. (1979)
Biochim. Biophys. Acta 585, 266-272.
- Le Gaillard, F., Racadot, A., Racadot-Leroy, N. and Dautrevaux, M. (1974)
Biochimie 56, 99-108.
- Le Gaillard, F. and Dautrevaux, M. (1978)
FEBS Lett. 94, 63-67.
- Le Gaillard, F., Azam, H., Favre, G. and Dautrevaux, M. (1983)
Biochim. Biophys. Acta 749, 289-295.
- Liao, S., Smith, S., Tymoczko, J.L., Rossini, A.P. and Hiipakka, R.A. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 5445-5551.
- Lippman, M. and Thompson, E.B. (1974)
J. Steroid Biochem. 5, 461-465.
- Litwack, G., Miller-Diener, A., Di Sorbo, D.M. and Schmidt, T.J. (1985)
in : Vitamin B6 : its role in health and diseases, ed. : R.D. Reynolds
and J.E. Leklem, Alan R. Riss, New-York, pp 177-191.
- Logeat, F., Le Cunff, M., Pamphile, R. and Milgrom, E. (1985)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 131, 421-427.
- Loose, D.S., Stover, E.P. and Feldman, D. (1983)
J. Clin. Invest. 72, 404-408.
- Lukola, A., Akerman, K. and Pessa, T. (1985)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 131, 877-882.
- Lustenberger, P., Formstecher, P. and Dautrevaux, M. (1981)
J. Steroid Biochem. 14, 697-703.
- Lustenberger, P., Formstecher, P. and Dautrevaux, M. (1982)
in : Protides of the Biological Fluids 29th Colloquium 1981, Ed.:
H. Peeters, Pergamon Press, Oxford, pp 583-586.
- Lustenberger, P., Blanchardie, P., Denis, M., Formstecher, P.,
Orsonneau, J.L. and Bernard, S. (1985)
Biochimie 67, 1267-1278.
- Luttge, W.G., Gray, H.E. and Densmore, C.L. (1984)
J. Steroid Biochem. 20, 545-553.

- Maes, P. (1983)
Doctorat de troisième cycle universitaire - Université du Droit et de la Santé de Lille - UER de Pharmacie.
- Mc Blain, W.A., Toft, D.O. and Shyamala, G. (1981)
Biochemistry 20, 6790-6798.
- Mc Blain, W.A. and Shyamala, G. (1984)
J. Steroid Biochem. 20, 1211-1220.
- Mc Donald, R.G. and Cidlowski, J.A. (1979)
J. Steroid Biochem. 10, 21-29.
- Mc Intyre, W.R. and Samuels, H.H. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 418-427.
- Manz, B., Grill, H.J., Kreienberg, R., Rehder, M. and Pollow, K. (1983)
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, 69-75.
- Markovic, R.D. and Litwack, G. (1980_a)
Arch. Biochem. Biophys. 202, 374-379.
- Markovic, R.D., Eisen, H.J., Parchman, L.G., Barnett, C.A. and Litwack, G. (1980_b)
Biochemistry 19, 4556-4564.
- Mason, H.L., HOEHN, W.M. and Kendall, E.C. (1937)
J. Biol. Chem. 120, 719-741.
- Mason, H.L., Hoehn, W.M. and Kendall, E.C. (1938)
J. Biol. Chem. 124, 459-474.
- Mayer, M. and Litwack, G. (1983_a)
J. Steroid Biochem. 19, 323-326.
- Mayer, M., Schmidt, T.J., Miller, A. and Litwack, G. (1983_b)
J. Steroid Biochem. 19, 1719-1728.
- Mendel, D.B., Bodwell, J.E., Gametchu, B., Harrison, R.W. and Munck, A. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 3758-3763.
- Mercier, L., Thompson, E.B. and Simons, S.S. (1983)
Endocrinology 112, 601-609.
- Middlebrook, J.L. and Aronow, L. (1977)
Endocrinology 100, 271-282.

- Miesfeld, R., Okret, S., Wilkstrom, A.C., Wrange, O., Gustafsson, J.A.
and Yamamoto, K.R. (1984)
Nature 312, 779-781.
- Miesfeld, R., Rusconi, S., Godowski, P.J., Maler, B.A., Okret, S.,
Wilkstrom, A.C., Gustafsson, J.A. and Yamamoto, R.R. (1986)
Cell 46, 389-399.
- Milgrom, E., Atger, M. and Baulieu, E.E. (1973)
Biochemistry 12, 5198-5205.
- Milgrom, E., Atger, M. and Baulieu, E.E. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 320, 267-283.
- Milgrom, E. (1981)
in : Biochemical Action of Hormones, ed. : G. Litwack, vol. VIII,
Academic Press, pp 465-492.
- Miller, P.A., Ostrowski, M.C., Hager, G.L. and Simons, S.S. (1984)
Biochemistry 23, 6883-6889.
- Miller-Diener, A., Schmidt, T.J. and Litwack, G. (1985)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4003-4007.
- Miller, J., Mc Lachlan, A.D. and Klug, A. (1985)
Embo J. 4, 1609-1614.
- Miyabe, S. and Harrison, R.W. (1983)
Endocrinology 112, 2174-2180.
- Moguilewsky, M. and Philibert, D. (1984)
J. Steroid Biochem. 20, 271-276.
- Mornon, J.P., Delettre, J., Lopicard, G., Bally, R., Surcouf, E.
and Bondot, P. (1977)
J. Steroid Biochem. 8, 51-62.
- Moudgil, V.K., Murakami, N., Eessalu, T.E., Caradonna, V.M., Singh, V.B.
Healy, S.P. and Quatrociochi, T.M. (1984)
in : Adrenal Steroid Antagonism, ed. by M.K. Agarwal, W. de Gruyter,
Berlin, pp 131-167.

- Moudgil, V.K. (1985)
in : Molecular Mechanism of Steroid Hormone Action, W. de Gruyter,
Berlin, pp 351-375.
- Moore, D.D., Marks, A.R., Buckley, D.I., Kapler, G., Payvar, F.
and Goodman, H.M. (1985)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 699-702.
- Mulder, E., Vrij, A.A., Brinkmann, A.O., Van Der Molen, H.J. and
Parker, M.G. (1984)
Biochim. Biophys. Acta 781, 121-129.
- Munck, A. and Brinck-Johnsen, T. (1968)
J. Biol. Chem. 243, 5556-5565.
- Munck, A., Wira, C., Young, D.A., Mosher, K.M., Kallahan, C.
and Bell, P.A. (1972)
J. Steroid Biochem. 3, 567-578.
- Munck, A. and Foley, R. (1979)
Nature 278, 752-754.
- Munck, A. and Holbrook, N.J. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 820-831.
- Murakami, N. and Moudgil, V.K. (1981)
Biochem. J. 198, 447-455.
- Naray, A. and Bathori, G. (1982)
J. Steroid Biochem. 16, 199-205.
- Naray, A. (1983)
Biochim. Biophys. Acta 756, 328-334.
- Nicoli, M.Z. and Hastings, J.W. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 2393-2396.
- Ninh, N.V., Aranyi, P. and Horvath, I. (1982)
J. Steroid Biochem. 17, 599-601.
- Noble, C. and Anderson, B.M. (1977)
Arch. Biochem. Biophys. 178, 26-33.

- Nordeen, S.K., Lan, N.C., Showers, M.O. and Baxter, J.D. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 10503-10508.
- Norris, J.S. and Kohler, P.O. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 2350-2356.
- O'Brien, J.M., Thanassi, J.W. and Cidlowski, J.A. (1980)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, 155-162.
- O'Brien, J.M. and Cidlowski, J.A. (1981)
J. Steroid Biochem. 14, 9-18.
- O'Brien, J.M. and Cidlowski, J.A. (1982)
Biochemistry 21, 5644-5650.
- Oikarinen, J., Hamalainen, L. and Oikarinen, A. (1984)
Biochim. Biophys. Acta 799, 158-165.
- Ojasoo, T. and Raynaud, J.P. (1978)
Cancer Res. 38, 4186-4198.
- Okret, S., Carlstedt-Duke, J., Wrange, O., Carlstrom, K. and
Gustafsson, J.A. (1981)
Biochim. Biophys. Acta 677, 205-219.
- Okret, S. (1983_a)
J. Steroid Biochem. 19, 1241-1248.
- Okret, S., Stevens, Y.M., Carlstedt-Duke, J., Wrange, O., Gustafsson, J.A.
and Stevens, J. (1983_b)
Cancer Res. 43, 3127-3131.
- Okret, S., Wilkström, A.C., Wrange, O., Andersson, B. and
Gustafsson, J.A. (1984)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1609-1613.
- Okret, S., Wikstrom, A.C. and Gustafsson, J.A. (1985)
Biochemistry 24, 6581-6586.
- Papamichail, M., Tsokos, G., Tsawdaroglov, N. and Sekeris, C.E. (1980)
Exp. Cell Res. 125, 490-493.
- Parchman, L.G., Goidl, J.A. and Litwack, G. (1977)
FEBS Lett. 79, 25-28.

- Perini, J.M., Le Gaillard, F., Aubert, J.P. and Dautrevaux, M. (1983)
Biochimie 65, 579-583.
- Perrot-Applanat, M., Logeat, F., Groyer-Picard, M.T. and Milgrom, E. (1985)
Endocrinology 116, 1473-1484.
- Philibert, D., Deraedt, R. and Teutsch, G. (1981)
VIIIth International Congress of Pharmacology, Tokyo (1981)
Abst. n° 1463.
- Philibert, D. (1984)
in : Adrenal Steroid Antagonism. Ed. M.K. Agarwal, Walter de Gruyter,
Berlin, pp 77-101.
- Philibert, D. (1985)
Communication personnelle.
- Pietras, R.J. and Szego, C.M. (1979)
J. Steroid Biochem. 11, 1471-1483.
- Plagemann, P.G.W. and Erbe, J. (1976)
Biochem. Pharmacol. 25, 1489-1494.
- Pratt, W.B., Kaine, J.L. and Pratt, D.V. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 4584-4591.
- Puri, R.K., Grandics, P., Dougherty, J.J. and Toft, D.O. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 10831-10837.
- Raaka, B.M. and Samuels, H.H. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 417-425.
- Raaka, B.M., Finnerty, M., Sun, E. and Samuels, H.H. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 14009-14015.
- Radojcic, M., Okret, S., Wrangé, O. and Gustafsson, J.A. (1985)
J. Steroid Biochem. 23, 1-8.
- Rafestin-Oblin, M.E., Michaud, A., Claire, M. and Corvol, P. (1977)
J. Steroid Biochem. 8, 19-23.
- Rajpert, E.J., Lemaigre, F.P., Eliard, P.H., Place, M., Lafontaine, D.A.,
Economidis, I.V., Belayew, A., Martial, J.A. and Rousseau, G.G.
(1986) - soumis à publication.

- Rao, G.S. (1981)
Mol. Cell. Endocrinol. 21, 97-108.
- Raynaud, J.P., Bouton, M.M., Moguilewsky, M., Ojasoo, T.,
Philibert, D., Beck, G., Labrie, F. and Mornon, J.P. (1980)
J. Steroid Biochem. 12, 143-157.
- Rees, A.M. and Bell, P.A. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 411, 121-132.
- Reichman, M.E., Foster, C.M., Eisen, L.P., Torain, B.F. and
Simons, S.S. (1984)
Biochemistry 23, 5376-5384.
- Reker, C.E., Kovacic-Milivojevic, B., Eastman-Reks, S.B. and
Vedeckis, W.V. (1985)
Biochemistry 24, 196-204.
- Renoir, M., Yang, C.R., Formstecher, P., Lustenberger, P., Wolfson, A.,
Redeuilh, G., Mester, J., Richard-Foy, H. and Baulieu E.E.
(1982)
Eur. J. Biochem. 127, 71-79.
- Rice, L.M., Reid, E.E. and Grogan, C.H. (1954)
J. Org. Chem. 19, 884-893.
- Riehl, R.M., Sullivan, W.P., Vroman, B.T., Bauer, V.J., Pearson, G.R.,
and Toft, D.O. (1985)
Biochemistry 24, 6586-6591.
- Ringold, G.M. (1985)
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 25, 529-566.
- Rohrer, D.C. and Duax, W.L. (1977)
Cryst. Struct. Comm. 6, 123-126.
- Ross, P.D. and Subramanian, S. (1981)
Biochemistry 20, 3096-3102.
- Rossini, G.P. and Barbiroli, B. (1983)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 113, 876-882.

- Rousseau, G.G., Baxter, J.D. and Tomkins, G.M. (1972)
J. Mol. Biol. 67, 99-115.
- Rousseau, G.G., Baxter, J.D., Higgins, S.J. and Tomkins, G.M. (1973)
J. Mol. Biol. 79, 539-554.
- Rousseau, G.G. (1975)
J. Steroid Biochem. 6, 75-89.
- Rousseau, G.G. and Schmit, J.P. (1977)
J. Steroid Biochem. 8, 911-919.
- Rousseau, G.G. and Schmit, J.P. (1978)
in : Glucocorticoid action and leukaemia - 7th Tenovus Workshop,
Cardiff 1978, Ed. P.A. Bell and N.M. Borthwick, Alpha Omega Publishing,
Cardiff, pp 23-35.
- Rousseau, G.G. and Baxter, J.D. (1979_a)
in : Glucocorticoid Hormone Action - Eds : J.D. Baxter and G.G. Rousseau,
Springer Verlag, Heidelberg, pp 49-77.
- Rousseau, G.G., Kirchhoff, J., Formstecher, P. and Lustenberger, P. (1979_b)
Nature 279, 158-160.
- Rousseau, G.G., Van Bohemen, G.G., Lareau, S. and Degelaen, J. (1982)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 106, 16-22.
- Rousseau, G.G., Cambron, P., Brasseur, N., Marcotte, L., Matton, P.
and Schmit, J.P. (1983)
J. Steroid Biochem. 18, 237-244.
- Rousseau, G.G. (1984_a)
Mol. Cell. Endocrinol. 38, 1-11.
- Rousseau, G.G. (1984_b)
Biochem. J. 224, 1-12.
- Sablonnière, B., Formstecher, P. and Dautrevaux, M. (1984)
7th International Congress of Endocrinology, July 1-17, Québec,
Poster 2423.
- Sablonnière, B., Danze, P.M., Formstecher, P., Lefebvre, P., and
Dautrevaux, M. (1986_a)
J. Steroid Biochem., in press.

- Sablonnière, B., Formstecher, P. and Dautrevaux, M. (1986_b)
soumis à publication.
- Samuels, H.H. and Tomkins, G.M. (1970)
J. Mol. Biol. 52, 57-74.
- Sanchez, E.R., Toft, D.O., Schlesinger, M.J. and Pratt, W.B. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 12398-12401.
- Sanchez, E.R. and Pratt, W.B. (1986)
Biochemistry 25, 1378-1382.
- Sanchez, E.R., Grippo, J.F., Housley, P.R. and Pratt, W.B. (1986)
in : Glucocorticoid Hormone Mechanism of action, Ed. by Y. Sakamoto
and F. Isohashi, 1986, Springer Verlag, Berlin, pp 3-32.
- Sando, J.J., Hammond, N.D., Stratford, C.A. and Pratt, W.B. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 4779-4789.
- Santi, D.V., Washtien, W. and Pogolotti, A.L. (1979)
in : Glucocorticoid Hormone Action, eds : I.D. Baxter and G.G. Rousseau,
Springer Verlag, Heidelberg, 1979, pp 109-122.
- Schaumburg, B.P. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 261, 219-235.
- Scheidereit, C., Krauter, P., Von Der Ahe, D., Janich, S., Rarenau, O.,
Cato, A.C.B., Suske, G., Westphal, H.M. and Beato, M. (1986)
J. Steroid Biochem. 24, 19-24.
- Schmid, W., Grote, H. and Sekers, C.E. (1976)
Mol. Cell. Endocrinol. 5, 223-241.
- Schmidt, T.J., Sekula, B.C. and Litwack, G. (1981)
Endocrinology 109, 803-811.
- Schmidt, T.J. and Litwack, G. (1982)
Physiol. Rev. 62, 1131-1192.
- Schmidt, T.J., Miller-Diener, A. and Litwack, G. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 9536-9543.

- Schmidt, T.J., Miller-Diener, A., Webb, M.L. and Litwack, G. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 16255-16262.
- Schmit, J.P. and Rousseau, G.G. (1977)
J. Steroid Biochem. 8, 921-928.
- Schmit, J.P. and Rousseau, G.G. (1978_a)
J. Steroid Biochem. 9, 909-920.
- Schmit, J.P. and Rousseau, G.G. (1978_b)
J. Steroid Biochem. 9, 921-927.
- Schmit, J.P. and Rousseau, G.G. (1979)
in : Glucocorticoid Hormone Action (1979), Eds J.D. Baxter and
G.G. Rousseau, Springer Verlag, Heidelberg, pp 79-95.
- Schrader, W.T. (1984)
Nature 308, 17-18.
- Schuh, S., Yonemoto, W., Brugge, J., Bauer, V.J., Riehl, R.M.,
Sullivan, W.P. and Toft, D.O. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 14292-14296.
- Sheehan, J.C. and Hess, G.P. (1955)
J. Amer. Chem. Soc. 77, 1067-1068.
- Sheridan, P.J., Buchanan, J.M., Anselmo, V.C. and Martin, P.M. (1979)
Nature 282, 579-582.
- Sherman, M.R., Pickering, L.A., Rollwagen, F.M. and Miller, L.K. (1978)
Fed. Proc. 37, 167-173.
- Sherman, M.R., Moran, M.C., Neal, R.M., Niu, E.M. and Tuazon, F.B. (1982)
in : Progress in Research and Clinical Applications of corticosteroids.
Eds : H.J. Lee and T.J. Fitzgerald, 1982, Heyden, London, pp 45-66.
- Sherman, M.R., Moran, M.C., Tuazon, F.B. and Stevens, Y.W. (1983_a)
J. Biol. Chem. 258, 10366-10377.
- Sherman, M.R., Tuazon, F.B., Stevens, Y.W. and Niu, E.M. (1983_b)
in : Steroid Hormone receptors : structure and function, Ed. by
H. Eriksson and J.A. Gustafsson, 1983, Elsevier, Amsterdam, pp 3-24.

- Sherman, M.R. and Stevens, J. (1984)
Ann. Rev. Physiol. 46, 83-105.
- Shyamala, G. and Daveluy, A. (1982)
J. Biol. Chem. 257, 11976-11981.
- Sibley, C.H. and Yamamoto, K.R. (1979)
in : Glucocorticoid Hormone Action, Ed. : J.D. Baxter and
G.G. Rousseau, Springer Verlag, Heidelberg, pp 357-376.
- Simons, S.S., Thompson, E.B. and Johnson, D.F. (1979)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 86, 793-800.
- Simons, S.S., Pons, M. and Johnson, D.F. (1980_a)
J. Org. Chem. 45, 3084-3088.
- Simons, S.S., Thompson, E.B., Merchlinsky, M.J. and Johnson, D.F. (1980_b)
J. Steroid Biochem. 13, 211-322.
- Simons, S.S., Thompson, E.B. and Johnson, D.F. (1980_c)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5167-5171.
- Simons, S.S. and Thompson, E.B. (1981)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3541-3545.
- Simons, S.S. and Thompson, E.B. (1982)
in : Biochemical Actions of Hormones, vol. IX, Academic Press,
New-York, pp 221-254.
- Simons, S.S., Schleenbaker, R.E. and Eisen, H.J. (1983)
J. Biol. Chem. 258, 2229-2238.
- Simons, S.S. and Miller, P.A. (1984)
Biochemistry 23, 6876-6882.
- Simons, S.S. and Miller, P.A. (1986)
J. Steroid Biochem. 24, 25-32.
- Singh, V.B. and Moudgil, V.K. (1984)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 125, 1067-1073.
- Singh, V.B. and Moudgil, V.K. (1985)
J. Biol. Chem. 260, 3684-3690.
- Sluyser, M. (1983)
Trends Biochem. Sci. 8, 236-238.

- Smith, A.C. and Harmon, J.M. (1985)
Biochemistry 24, 4946-4951.
- Snochowski, M., Dahlberg, E. and Gustafsson, J.A. (1980)
Eur. J. Biochem. 111, 603-616.
- Spelsberg, T.C., Littlefield, B.P., Seelke, R., Dani, G.M.,
Toyoda, H., Boyd-Leinen, P., Thrall, C. and Kon, O.L. (1983)
Recent Progr. Horm. Res. 39, 463-517.
- Spelsberg, T.C., Gosse, B.J., Littlefield, B.A., Toyoda, H.
and Seelke, R. (1984)
Biochemistry 23, 5103-5113.
- Stevens, J. and Stevens, Y.W. (1979)
Cancer Res. 39, 4011-4021.
- Stevens, J. and Stevens, Y.W. (1981_a)
Cancer Res. 41, 125-133.
- Stevens, J., Eisen, H.J., Stevens, Y.W., Haubensstock, H.,
Rosenthal, R.L. and Artishevsky, A. (1981_a)
Cancer Res. 41, 134-137.
- Stevens, J., Stevens, Y.W. and Haubensstock, H. (1983)
in : Biochemical Action of Hormones, ed. : G. Litwack, vol. X,
Academic Press, New-York, pp 383-446.
- Suthers, M.B., Pressley, L.A. and Funder, J.W. (1976)
Endocrinology 99, 260-269.
- Suyemitsu, T. and Terayama, H. (1975)
Endocrinology 96, 573-584.
- Svec, F., Yeakley, J. and Harrison, R.W. (1980)
Endocrinology 107, 566-572.
- Svec, F. and Rudis, M. (1982)
Endocrinology 111, 699-701.
- Svec, F. (1984)
Endocrinology 114, 1250-1258.

- Svec, F. (1985_a)
J. Steroid Biochem. 23, 529-533.
- Svec, F. (1985_b)
J. Steroid Biochem. 23, 669-671.
- Szego, C.M. and Pietras, R.J., Greene, G.L. and King, W.L.
Gorski, J. (1985)
Nature 317, 88-89.
- Takahashi, T. (1964)
Tetrahedron Letters, 565-572.
- Terzis, A. and Theophanides, T. (1975)
Acta Cryst. B31, 796-801.
- Teutsch, G., Costerousse, G., Deraedt, G., Benzoni, J., Fortin, M.
and Philibert, D. (1981)
Steroids 38, 651-665.
- Teutsch, G. (1984)
in : Adrenal Steroid Antagonism, Ed. by M.K. Agarwal, W. de Gruyter,
Berlin, 1984, pp 43-75.
- Thomas, T. and Kiang, D.T. (1986)
J. Steroid Biochem. 24, 505-511.
- Thompson, E.B., Sakave, Y. and Harmon, J.M. (1986)
in : Glucocorticoid Hormone : mechanism of action. Eds : Y. Sakamoto
and F. Isohashi, Springer Verlag, Berlin, pp 119-135.
- Toth, K. and Aranyi, P. (1983)
Biochim. Biophys. Acta 761, 196-203.
- Toyoda, H., Seelke, R.W., Littlefield, B.A. and Spelsberg, T.C. (1985)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4722-4726.
- Turnell, R.W., Kaiser, N., Milholland, R.J. and Rosen, F. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 1133-1138.
- Tymoczko, J.L. and Phillips, M.M. (1983)
Endocrinology 112, 142-149.
- Tymoczko, J.L., Phillips, M.M. and Vernon, S.M. (1984)
Arch. Biochem. Biophys. 230, 345-354.

- Van Bohemen, C.G. and Rousseau, G.G. (1982)
FEBS Lett. 143, 21-25.
- Vedeckis, W.V. (1981)
Biochemistry 20, 7237-7245.
- Vedeckis, W.V. (1983_a)
Biochemistry 22, 1975-1983.
- Vedeckis, W.V. (1983_b)
Biochemistry 22, 1983-1989.
- Vedeckis, W.V., Kovacic-Milivojevic, B., La Pointe, M.C. and
Reker, C.E. (1985_a)
in : Molecular Mechanism of Steroid Hormone Action. Ed. : V.K. Moudgil,
W. de Gruyter, Berlin, pp 85-110.
- Vedeckis, W.V. (1985_b)
in : Hormonally responsive tumors. Ed : V.P. Hollander, Academic
Press, New-York, pp 3-61.
- Von der Ahe, D., Janich, S., Scheidereit, C., Renkawitz, R.
Schütz, G. and Beato, M. (1985)
Nature 313, 706-709.
- Von Der Ahe, D., Renoir, J.M., Buchou, T., Baulieu, E.E. and
Beato, M. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2817-2821.
- Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J.M.,
Jeltsch, J.M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M.
and Chambon, P. (1985)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7889-7893.
- Walters, M.R. (1985)
Endocrine Rev. 6, 512-543.
- Weatherill, P.J. and Bell, P.A. (1984)
J. Steroid Biochem. 21, 287-291.
- Weathers, B.J., Grate, J.H. and Schrauzer, G.N. (1979)
J. Am. Chem. Soc. 101, 917-924.

- Weeks, C.M., Duax, W.L. and Wolff, M.E. (1973)
J. Am. Chem. Soc. 95, 2865-2868.
- Weeks, C.M., Rohrer, D.C. and Duax, W.L. (1975)
Science 190, 1096-1097.
- Weeks, C.M. and Duax, W.L. (1976)
Acta Cryst. B32, 2819-2825.
- Weinberger, C., Hollenberg, S.M., Ong, E.S., Harmon, J.F., Brower, S.T.,
Cidlowski, J., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G. and Evans, R.M.
(1985_a)
Science 228, 740-742.
- Weinberger, C., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G. and Evans, R.M. (1985_b)
Nature 318, 670-672.
- Weisz, A., Buzard, R.L., Horne, D., Li, M.P., Dunkerton, L.V. and
Markland, F.S. (1983)
J. Steroid Biochem. 18, 375-382.
- Weisz, A., Baxter, J.D. and Lan, N.C. (1984)
J. Steroid Biochem. 20, 289-293.
- Wellman, K.M. and Djerassi, C. (1965)
J. Am. Chem. Soc. 87, 60-66.
- Welshons, W.V., Lieberman, M.E. and Gorski, J. (1984)
Nature 307, 747-749.
- Welshons, W.V., Krummel, B.M. and Gorski, J. (1985)
Endocrinology 117, 2140-2147.
- Westphal, M. and Beato, M. (1980)
Eur. J. Biochem. 106, 395-403.
- Westphal, H.M., Fleischmann, G. and Beato, M. (1981)
Eur. J. Biochem. 119, 101-106.
- Westphal, H.M., Moldenhauer, G. and Beato, M. (1982)
Embo J. 1, 1467-1471.
- Westphal, H.M., Mugele, K., Beato, M. and Gehring, U. (1984)
Embo J. 3, 1493-1498.

- Wheeler, R.H., Leach, K.L., La Forest, A.C., O'Toole, T.E., Wagner, R. and Pratt, W.R. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 434-441.
- Winneker, R.C., Russell, M.M., Might, C.K. and Schane, H.P. (1984)
Steroids 44, 447-457.
- Wira, C.R. and Munck, A. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 5328-5336.
- Wolff, M.E., Baxter, J.D., Kollman, P.A., Lee, D.L., Kuntz, I.D., Bloom, E., Matulich, D.T. and Morris, J. (1978)
Biochemistry 17, 3201-3208.
- Wrangle, O. and Gustafsson, J.A. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 856-862.
- Wrangle, O., Carlstedt-Duke, J. and Gustafsson, J.A. (1979)
J. Biol. Chem. 254, 9284-9290.
- Wrangle, O., Okret, S., Radojic, M., Carlstedt-Duke, J. and Gustafsson, J.A. (1984)
J. Biol. Chem. 259, 4534-4541.
- Wrangle, O., Carlstedt-Duke, J. and Gustafsson, J.A. (1986)
J. Biol. Chem. 261, 11770-11778.
- Wynne, K.N., Mercer, J., Stockigt, J.R. and Funder, J.W. (1980)
Endocrinology 107, 1278-1280.
- Yamamoto, K.R. and Alberts, B.M. (1976)
Ann. Rev. Biochem. 45, 721-746.
- Yamamoto, K.R. (1985)
Ann. Rev. Genetics 19, 209-252.
- Yang, C.R., Mester, J., Wolfson, A., Renoir, J.M. and Baulieu, E.E. (1982)
Biochem. J. 208, 399-406.
- Yeakley, J.M., Balasubramanian, K. and Harrison, R.W. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 4182-4188.
- Young, H.A., Parks, W.P. and Scolnick, F.M. (1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3060-3064.
- Zaret, K.S. and Yamamoto, K.R. (1984)
Cell 38, 29-38.