

50376  
1987  
227

50376  
1987  
227

Année 1987.

N° d'ordre 124

## THÈSE

présentée à l'université de Lille  
pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR EN BIOCHIMIE**

(NOUVEAU REGIME)

par

**Youness BELAHSEN**



# PURIFICATION ET CARACTERISATION DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES SOUS FORME TRANSFORMEE

présentée le 16 juin 1987, devant la Commission d'examen

### JURY

Président : Professeur J. MONTRÉUIL

Rapporteurs : Professeur A. VERBERT

Docteur P. LUSTENBERGER

Examineurs : Professeur M. DAUTREVAUX

Professeur J.P. DUPOUY

Docteur P. FORMSTECHER

A mes Parents

A mes frères et ma soeur

A ma famille

A mes amis

Je remercie le Professeur J. MONTREUIL de l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le Jury de cette thèse.

J'exprime tous mes remerciements à Monsieur le Professeur M. DAUTREVAUX de la confiance qu'il m'a accordée lorsqu'il m'a accueilli, il y a trois ans, dans son Laboratoire de Biochimie Structurale à la Faculté de Médecine de LILLE.

J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur A. VERBERT, à Monsieur le Professeur J.P. DUPOUY, et à Monsieur le Docteur P. LUSTENBERGER de la Faculté de Médecine de NANTES d'avoir accepté de juger ce travail.

Au Docteur P. FORMSTECHE. J'ai pu bénéficier de ton sens de la recherche, de tes vastes connaissances biochimiques, et de ta rigueur scientifique. Tu as inspiré et guidé ce travail. Tu m'as aidé à respecter l'échéance pour la soutenance exigée par mes engagements. Que cette thèse t'exprime tous mes remerciements et ma profonde considération.

A V. DUMUR, P.M. DANZE et P. TOULOUSE, vous avez contribué en partie à cette thèse, je vous en remercie.

Je remercie tous les membres du Laboratoire qui, à divers titres, ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à Madame MORANDI qui a dactylographié ce manuscrit.

---

### RESUME

Le travail réalisé dans cette thèse a consisté en la mise au point de deux protocoles différents de purification du récepteur des glucocorticoïdes sous forme transformée. Le premier utilise une méthode classique largement utilisée par les spécialistes dans ce domaine. Il s'agit de la chromatographie sur support polyanionique (DNA-cellulose et phosphocellulose). Les résultats que nous avons obtenus étaient moyens.

Cependant, nous avons préféré remplacer ce protocole par un autre protocole original de purification utilisant la chromatographie d'échange d'ions à haute performance (HPIEC). Il a été mis au point et testé sur le plan analytique sur le récepteur des glucocorticoïdes de foie de lapin par P. Lustenberger. Nous avons développé une méthode de purification en deux étapes du récepteur des glucocorticoïdes de foie de rat dans un but préparatif. La première étape utilise la précipitation au sulfate de protamine, la deuxième étape l'HPIEC. La préparation obtenue a été purifiée 1200 fois environ avec un rendement de 23 %. Le récepteur purifié a été caractérisé du point de vue physicochimique, et s'est révélé identique à la protéine native présente dans le cytosol.

Nous avons ensuite envisagé de compléter la purification par une méthode tout récemment décrite dans la littérature. Celle-ci consiste en une chromatographie d'affinité du récepteur sur une colonne d'ADN-agarose, contenant l'ADN spécifique. Nous avons étudié les conditions de fixation à l'agarose d'un polymère de la séquence spécifique de liaison du récepteur des glucocorticoïdes présents sur le gène de l'hormone de croissance humaine.

---

PREMIERE PARTIE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE RECEPTEUR  
DES GLUCOCORTICOIDES

## INTRODUCTION

Les hormones glucocorticoïdes ont une influence sur la croissance, la différenciation, et la fonction d'un grand nombre de tissus et de types cellulaires. La réponse à ces hormones se manifeste par des effets cataboliques, comme la lyse et la mort des cellules lymphoïdes, et par des effets anaboliques comme l'induction d'un nombre limité d'enzymes dans les cellules hépatiques.

Des données expérimentales ont montré clairement que ces effets ont lieu grâce à l'existence de récepteurs intracellulaires, solubles et de nature essentiellement protéique.

L'hormone pénètre dans la cellule cible et forme un complexe avec le récepteur. Ce complexe subit ensuite une étape de transformation au cours de laquelle il acquiert la capacité de lier le DNA. Après translocation le complexe hormone-récepteur va pouvoir interagir au niveau de la chromatine et ainsi modifier l'expression génétique (figure 1).

La recherche dans le laboratoire d'accueil s'inscrit dans le cadre de l'étude du mécanisme moléculaire d'action des hormones glucocorticoïdes. Elle a pour but de préciser les modalités de l'interaction stéroïde-récepteur des glucocorticoïdes et d'identifier les paramètres responsables de l'activité biologique du complexe hormone-récepteur. Cette étude ne pourra être pratiquée que sur du récepteur hautement purifié.

La purification du récepteur apparaît donc comme une étape indispensable à l'étude du mécanisme d'action des glucocorticoïdes, mais elle se trouve confrontée à des difficultés qui tiennent au faible taux cellulaire des récepteurs et à leur grande instabilité en l'absence d'hormone.



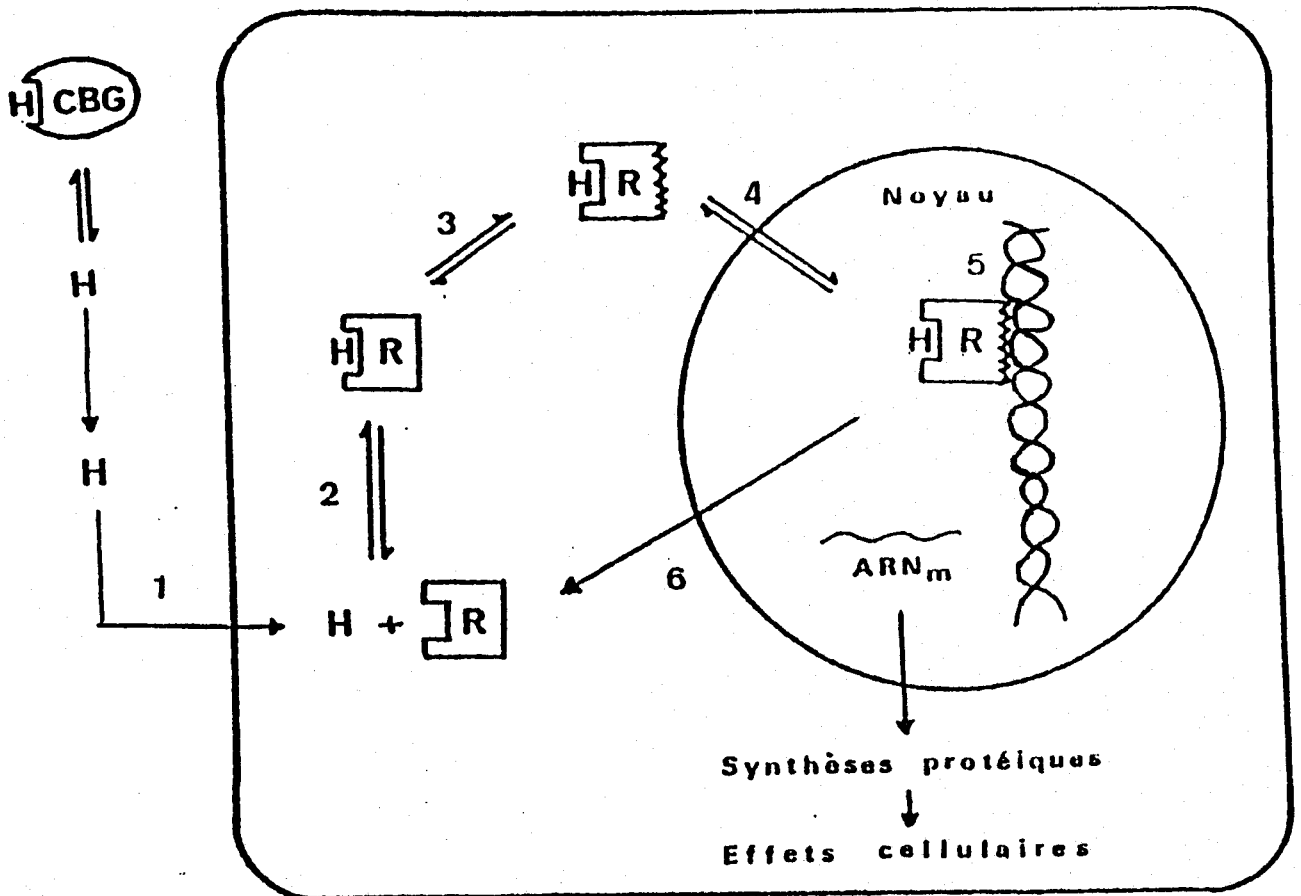


Figure 1 - Mécanisme d'action des hormones glucocorticoïdes au niveau des cellules cibles

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

Un travail rigoureux réalisé au sein de notre laboratoire a permis de purifier à l'aide de la chromatographie d'affinité, en présence de molybdate, et de caractériser le récepteur des glucocorticoïdes sous forme non transformée (Idziorek 1985). Dès lors, une approche complémentaire a été envisagée, elle concerne la purification du récepteur sous forme transformée. C'est elle qui a fait l'objet de notre travail dans le cadre de cette thèse.

Après avoir été déçu par l'utilisation des méthodes chromatographiques classiques, nous avons développé un protocole de purification basé sur la chromatographie d'échange d'ions à haute performance, ayant un caractère quantitatif.

Les résultats obtenus par cette méthode sont très intéressants et nous ont incité à chercher à achever la purification par une dernière étape spécifique. Une technique récemment apparue, et qui n'a pas encore été appliquée au récepteur semble bien adaptée pour remplir cette tâche. Il s'agit d'une chromatographie d'affinité hautement spécifique qui consiste à coupler covalentiellement un polymère de la séquence nucléotidique spécifique de la liaison au récepteur des glucocorticoïdes sur support conventionnel du type agarose. Nous sommes encore en phase de mise au point de cette technique.

## I - STRUCTURE ET FONCTION DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES

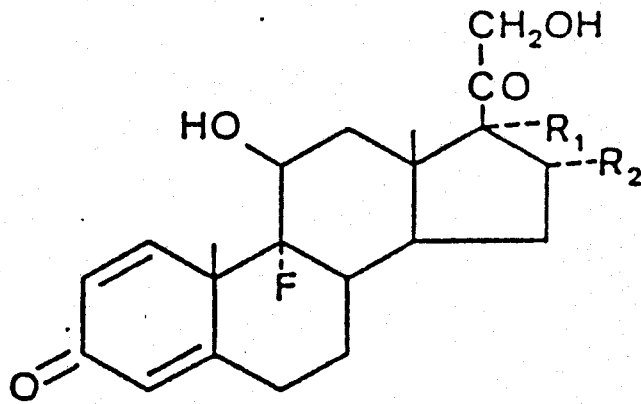
### A - MECANISME D'ACTION DES HORMONES GLUCOCORTICOIDES

En 1962, Jenson et Jacobson, montrent pour la première fois une liaison spécifique de l'estradiol marqué au tritium, à l'utérus de rat, organe cible pour les oestrogènes. Dès lors un grand nombre d'informations a pu être obtenu et un modèle du mécanisme d'action des hormones stéroïdes a pu être établi. La figure 1 montre le cas des hormones glucocorticoïdes.

#### 1) Pénétration cellulaire du stéroïde

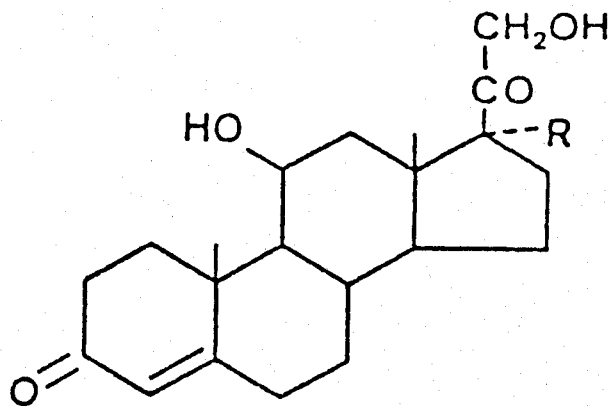
Le cortisol, une fois libéré de sa protéine porteuse, va traverser la membrane de la cellule cible par un mécanisme jusqu'ici peu exploré. L'hypothèse la plus communément admise est le passage du stéroïde par simple diffusion. Toutefois, plusieurs travaux tendent à montrer que le transport des stéroïdes est de type actif (Milgrom





Analogues de synthèse

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Dexaméthasone	OH	CH <sub>3</sub>
Désoxymétasone	H	CH <sub>3</sub>
Triamcinolone	OH	OH
Acétonide de triamcinolone		



Dérivés naturels

	R
Corticostérone	H
Cortisol	OH

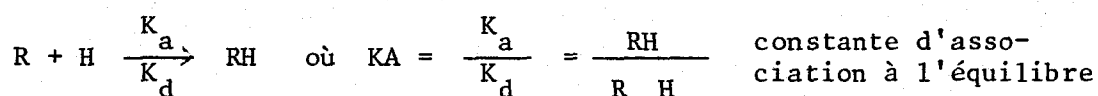


Figuré 2 - Formule des glucocorticoïdes

*et al.* 1973a, Allera *et al.* 1980). L'hypothèse de l'existence de récepteurs stéroïdiens membranaires a été proposée par Litwack *et al.* 1975. Cependant elle a été démontrée d'une manière indiscutable par Baulieu . 1978, Godeau *et al.* 1978, dans le cas particulier du récepteur à progestérone de l'ovocyte de Xénope.

## 2) Liaison de l'hormone au récepteur

La réaction de liaison du stéroïde à son récepteur est réversible et répond à l'expression :



La liaison n'est pas covalente et les mesures de l'entropie (Snochowski *et al.* 1980) suggèrent qu'elle est essentiellement de type hydrogène.

Le récepteur des glucocorticoïdes lie un grand nombre de stéroïdes naturels ou synthétiques (figure 2). Ces stéroïdes peuvent être agonistes ou antagonistes au niveau de la réponse biologique induite par la liaison. La spécificité de liaison dépend de la nature du stéroïde. La liaison est modifiée par un certain nombre de paramètres physico-chimiques : le pH optimum est de 7,2 et l'affinité augmente avec la force ionique par le renforcement des interactions hydrophobes (Blanchardie *et al.* 1979).

## 3) Transformation

Cette étape correspond à l'acquisition par le complexe hormone-récepteur de la capacité à lier le DNA ou la chromatine. Depuis sa mise en évidence *in vitro* sur système acellulaire (Higgins *et al.* 1973 ; Milgrom *et al.* 1973b), ce phénomène a fait l'objet de très nombreux travaux qui ont été récemment discutés dans plusieurs revues (Danzé 1983 ; Grody *et al.* 1982 ; Milgrom *et al.* 1981, Higgins *et al.* 1979, Schmidt *et al.* 1982, Simons *et al.* 1979).

### 3.1. Moyens d'obtention de la transformation

La transformation a été décrite d'abord par des études *in vitro*. Les facteurs ainsi utilisés pour provoquer celle-ci sont donc en grande partie des modifications de paramètres physicochimiques. Il s'agit en particulier de l'élévation de la température et l'augmentation de la force ionique.

Malgré le fait que la quantité de complexes transformés par la force ionique semble être supérieure à celle obtenue par l'élévation de la température (Bailly *et al.* 1978), la plupart des auteurs optent pour la deuxième alternative. En effet, l'action de la force ionique est lente et présente un effet maximal à une concentration en KCl 0,4M. Cela compromet l'utilisation de l'extrait transformé pour la suite des opérations, comme par exemple la fixation sur supports polyanioniques. Au contraire, l'élévation de la température semble bien adaptée à cette situation. De plus, les études sur le récepteur des glucocorticoïdes sont réalisées sur des préparations cytosoliques contenues dans un tampon de faible force ionique et nettement hypotonique. Ces conditions, déjà très éloignées de la situation physiologique, sont réalisées à 0°C pour maintenir la stabilité du complexe hormone-récepteur. Dans ces conditions, un chauffage modéré (généralement 20 à 25°) pendant 30 à 60 minutes pour l'obtention de la transformation, apparaît plus pratique.

Les autres facteurs qui provoquent la transformation sont représentés par l'élévation du pH, la dilution, et l'intervention d'un éventuel inhibiteur de petit poids moléculaire enlevé par dilution, gel-filtration ou dialyse.

### 3.2. Moyens de caractérisation des récepteurs transformés

De nombreuses techniques existent actuellement pour mettre en évidence la transformation.

### 3.2.1. Méthode basée sur le principe de liaison aux noyaux et au DNA.

Les premières études sur la transformation (Kalimi *et al.* 1973 ; Milgrom *et al.* 1973b) ont été réalisées sur des noyaux isolés provenant de foie de rat. Actuellement, la plupart des auteurs utilisent le DNA greffé à de la cellulose pour détecter les complexes transformés. Ce support, plus pratique à manipuler a été préféré aux noyaux isolés malgré la perte de détection observée par Simons 1977 et Lefebvre *et al.* 1979.

### 3.2.2. Chromatographie d'échange d'ions

D'une façon générale, l'affinité du complexe transformé pour les échangeurs d'ions se trouve modifiée dans un sens acidophile. On observe une affinité accrue pour la phosphocellulose, l'héparine agarose et l'ATP-Sepharose, réduite pour la DEAE et la QAE cellulose.

### 3.2.3. Isoélectrofocalisation

Il semble maintenant bien établi que le récepteur des glucocorticoïdes est une protéine acide (Milgrom, 1973b, Parchman 1977). Après transformation, le récepteur devient plus basique, et de ce fait, son point isoélectrique augmente (Ben Or *et al.* 1983, Danzé *et al.* 1986).

### 3.2.4. Ultracentrifugation et gel-filtration

Tous les auteurs semblent admettre actuellement que la transformation s'accompagne d'une réduction de taille du complexe récepteur-glucocorticoïde 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) et cela en présence de molybdate ajouté après la transformation pour stabiliser les complexes (voir plus loin).

### 3.3. Facteurs d'inhibition de la transformation

Depuis son identification comme agent stabilisant pour le récepteur des glucocorticoïdes (Nielsen *et al.* 1977a, 1977b), le molybdate est utilisé pour stabiliser tous les récepteurs des stéroïdes en général (Noma *et al.* 1980, Shyamala *et al.* 1980). Mais l'action la plus importante du molybdate est l'inhibition réversible de la transformation (Dahmer *et al.* 1984). Cet effet est maximum à une concentration de 10 mM.

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 de protamine. Le molybdate aurait aussi un effet synergique avec le dithiothréitol sur la réactivation du récepteur (Housley *et al.* 1984, Hubbard *et al.* 1982) et stabiliserait une forme du récepteur inactivé par déphosphorylation (Housley *et al.* 1984).

Le mécanisme d'action du molybdate reste encore inconnu mais l'hypothèse d'une interaction directe avec le récepteur est très vraisemblable.

Cependant d'autres oxyanions de certains métaux de transition tels que les ions vanadate (Nishigori *et al.* 1980) et tungstate (Murakami *et al.* 1982), semblent avoir un effet similaire à celui du molybdate. D'autre part, Dahmer *et al.* 1984 décrivent un inhibiteur endogène thermostable de faible poids moléculaire (PM < 700) dont les effets semblent similaires à ceux du molybdate et dont la nature chimique reste inconnue. De même Barnett *et al.* 1983 suggèrent l'existence d'un inhibiteur endogène de haut poids moléculaire.

D'autres auteurs (Nishigori *et al.* 1980, Toft *et al.* 1979, Leach *et al.* 1979, Barnett *et al.* 1980) ont constaté l'effet de ralentissement sur la transformation de certains inhibiteurs de phosphatases, tels que le lévamisole, les ions fluorure et arséniate.

### 3.4. Modèles proposés pour la transformation

La diversité des facteurs induisant la transformation ainsi que l'étendue des modifications physicochimiques du complexe hormone-récepteur, rendent délicate l'interprétation du mécanisme moléculaire. Il faut espérer que des préparations purifiées du récepteur sous ses deux formes, aideront à réaliser une étude par une approche directe sur la molécule protéique du récepteur, ce qui permettrait d'établir un schéma définitif pour la transformation.

Cependant, plusieurs auteurs ont essayé d'organiser les connaissances actuelles autour de modèles hypothétiques. En effet, deux questions se trouvent au centre des spéculations. D'une part, est-ce que l'étape de transformation est réversible (Litwack *et al.* 1985, Raaka et Samuels 1983, Vedeckis *et al.* 1985a) ou irréversible ? (Munk et Holbrook, 1984). D'autre part, si l'hypothèse de changement de taille par dissociation de sous-unités semble admise, s'agit-il d'un mécanisme en deux étapes (Litwack *et al.* 1985, Munk et Holbrook, 1984, Vedeckis *et al.* 1985a) ou en une seule étape ? (Raaka et Samuels 1983) (figure 3). Ces questions n'ont pas encore reçu de réponse claire.

#### 4) Translocation du complexe hormone-récepteur

En se référant au modèle de la localisation cytoplasmique du récepteur, cette étape peut être définie comme le passage des complexes hormone-récepteur transformés du cytoplasme vers le noyau. Or, il apparaît de plus en plus vraisemblable que la localisation du récepteur est plutôt nucléaire. Cette hypothèse a été démontrée dans le cas du récepteur des oestrogènes par King et Greene (1984), Welshons *et al.* (1984) et aussi dans le cas du récepteur de la progestérone (Gasc *et al.* 1984), tandis que pour le récepteur des glucocorticoïdes, les résultats sont contradictoires.

Si la réalité de cette hypothèse vient à être démontrée d'une manière générale, l'étape de translocation doit être remise en cause.

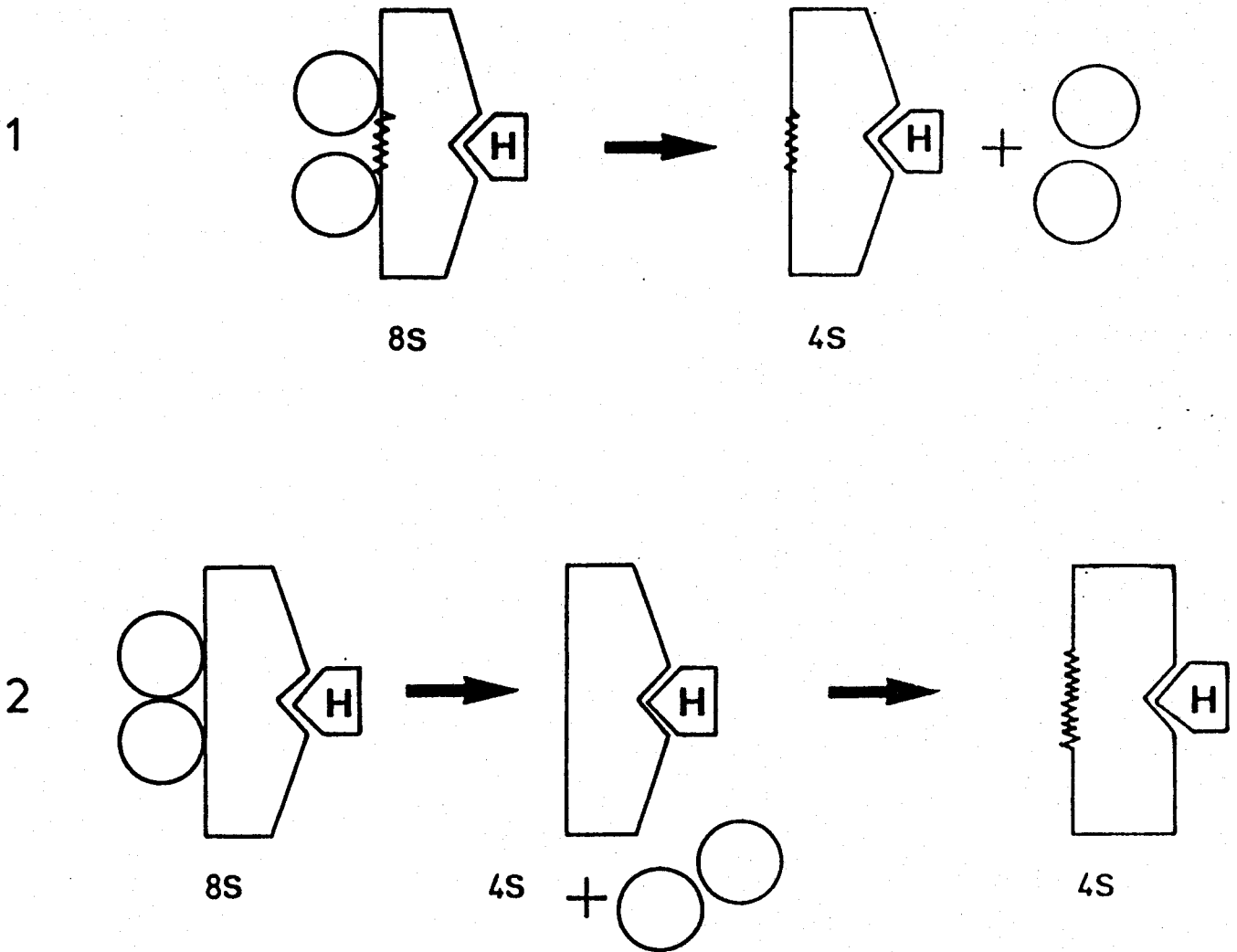


Figure 3 - Modèles de la transformation

1. Modèle à une seule étape où le site de liaison à l'ADN est démasqué par la dissociation des sous-unités.
2. Modèle à deux étapes où le site de liaison à l'ADN est exposé par transformation du récepteur 4S.



### 5) Interaction avec les constituants nucleaires

Depuis la mise en évidence du fait que le DNA est l'élément essentiel avec lequel le complexe hormone-récepteur interagit après translocation (Yamamoto *et al.* 1976), 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. Les résultats concernant l'interaction ont abouti à la conclusion que celle-ci serait de type ionique et qu'elle intervient dans des sites accepteurs se trouvant au niveau des protéines non histones ; le DNA apparaissait comme important dans la liaison, mais il n'avait pas été mis en évidence de sites spécifiques à son niveau (Higgins *et al.* 1979).

Les techniques utilisant les ressources de la biologie moléculaire ont permis d'aborder ce problème et d'aboutir à l'acquisition rapide de résultats extrêmement importants.

L'étude à la fois de la sensibilité des gènes régulés par les glucocorticoïdes en présence ou en absence de leur environnement, et des gènes non régulés par les glucocorticoïdes auxquels on a conféré la sensibilité à ces hormones, a été à la base de ces résultats.

Le modèle qui a été le plus utilisé pour ces études est celui du virus tumorigène mammotrope de la souris (Hager *et al.* 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 DNase 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 al.* 1986 ; Scheidereit *et al.* 1986, Eliard *et al.* 1985, Moore *et al.* 1985).

La séquence des sites de régulation sensibles aux glucocorticoïdes (Glucocorticoid Response Element "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. Le tableau I montre des exemples de séquences "consensus" présentant un maximum d'homologie entre elles. Les moyens disponibles actuellement, comme les séquenceurs automatiques d'oligonucléotides, et la synthèse chimique permettent de réaliser la synthèse de la séquence hautement spécifique du récepteur des glucocorticoïdes.

## B - STRUCTURE DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES

Les difficultés que posent l'instabilité et la faible concentration cellulaire du récepteur pour sa purification sont à l'origine de l'absence d'un modèle structural définitif. Toutefois, certains auteurs ont pu établir des modèles hypothétiques d'organisation moléculaire du récepteur. Pour cela, ils ont d'abord utilisé des méthodes classiques, et par la suite, ils ont bénéficié du renfort du marquage d'affinité, et des caractérisations immunochimiques. Enfin, l'existence de souches cellulaires mutantes de souris fabriquant un récepteur anormal ou tronqué, a apporté une contribution qui est loin d'être négligeable à la compréhension de cette structure.

### 1) Récepteur non transformé

#### 1.1. Caractéristiques physicochimiques

La purification du récepteur non transformé stabilisé par le molybdate (Grandics 1984, Lustenberger *et al.* 1982 et 1985, Idziorek 1985b, Weisz *et al.* 1984) a contribué d'une manière décisive à sa caractérisation. Ainsi, il a été établi que le complexe hormone-récepteur non transformé a un poids moléculaire compris entre 300 et 330 KD, une constante de sédimentation de 8-10S et un rayon de Stokes 7 à 8,5 nm. La transformation de ces complexes est accompagnée

		Eléments régulateurs des hormones stéroïdes																
Position		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	14	16	Nucleotide no.			
MTV I	-186	G	G	T	T	A	C	A	A	A	C	T	G	T	T	C	T	
MTV IIa	-129	T	G	G	T	A	T	C	A	A	A	T	G	T	T	C	T	
Mt II	-263	C	G	G	T	A	C	A	C	T	G	T	G	T	C	C	T	
hGH	+92	G	G	G	C	A	C	A	A	T	G	T	G	T	C	C	T	
RUG I	-2640	C	T	G	T	T	C	A	C	T	C	T	G	T	T	C	T	
RUG II	-2672	C	C	G	G	A	C	A	C	G	G	A	G	T	C	C	T	
RUG III	-2708	G	T	G	T	C	A	G	T	C	T	T	G	T	T	C	T	
pMr	+2	A	C	T	G	A	C	A	C	G	C	T	G	T	C	C	T	
Lys I	-191	A	A	A	A	T	i	C	C	T	C	T	G	T	G	G	C	T T A G C C A A T G T
Lys II	-75	T	G	A	C	A	A	C	T	G	T	A	G	A	A	C	A	G

Homologie principale

Homologie large

Tableau I - Exemples de séquences consensus présentant un maximum d'homologie entre elles.



Virus tumorigène mammothrope de la souris - MMTV - (MTV.I et IIa)  
 métallothionéine (M<sub>t</sub> II), hormone de croissance humaine (hGH)  
 Utéroglobine de lapin (rUG.I-III), DNA ribosomal et lysozyme de  
 poulet (ch LYS. I et II). Scheidereit, et al 1986.

d'une réduction de taille menant à une forme plus petite sédimentant entre 4 et 5S, de rayon de Stokes 5 à 6 nm, soit un poids moléculaire d'environ 90 à 100 KD. Le point isoélectrique semble augmenter d'après Ben Or *et al.* 1983, Danzé *et al.* 1986).

Enfin, il a été clairement montré que le récepteur est une phosphoprotéine (Sanchez *et al.* 1985, Grandics *et al.* 1984, Housley et Pratt 1983, Miller-Diener *et al.* 1985, Kurl et Jacob 1984, Singh et Moudgil 1985).

### 1.2. Modèles proposés pour le récepteur non transformé

Les modèles proposés récemment par Sherman *et al.* 1983 et Vedeckis 1983b (figures 4, 5) suggèrent que le récepteur non transformé serait un oligomère comportant plusieurs sous-unités dont la dissociation conduit à la forme transformée (figures 3 et 4). Les deux modèles ne tranchent pas entre une structure homooligomérique où le récepteur serait constitué de l'assemblage de sous-unités liantes identiques, et une structure hétérooligomérique où divers facteurs protéiques ou non seraient associés à une seule sous-unité. Des arguments en faveur de cette dernière hypothèse viennent d'être récemment apportés par Gehring *et al.* 1985 et Okret *et al.* 1985. Toutefois, il reste à identifier les facteurs associés à la sous-unité liante pour dissiper les incertitudes qui entourent cette question. L'existence de facteurs protéiques (les RBF, "Recepteur Binding Factors"), d'une molécule d'ARN d'un constituant lipidique et un inhibiteur de la transformation thermostable de faible poids moléculaire a été déjà proposée et discutée récemment (Formstecher 1986).

## 2) Récepteur transformé

### 2.1. Caractéristiques physicochimiques

Les caractéristiques physicochimiques établies sur des préparations cytosoliques (rayon de Stokes, Constante de sédimentation, point isoélectrique) sont du même ordre que celles obtenues sur du récepteur purifié transformé (Eisen et Glinsmann 1978, Westphal et Beato 1980, Moudgil *et al.* 1985, Wrangle *et al.* 1984, Gametchu et Harrison 1984, Govindan et Gronemeyer 1984). Cependant on peut

Formes du Récepteur	modèle schématique	$\xi_{20,w}$ 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 4 - Modèle moléculaire des récepteurs stéroïdiens d'après Sherman (1983a) et caractéristiques physicochimiques des différentes formes observées (RNP = ribonucléoprotéines)

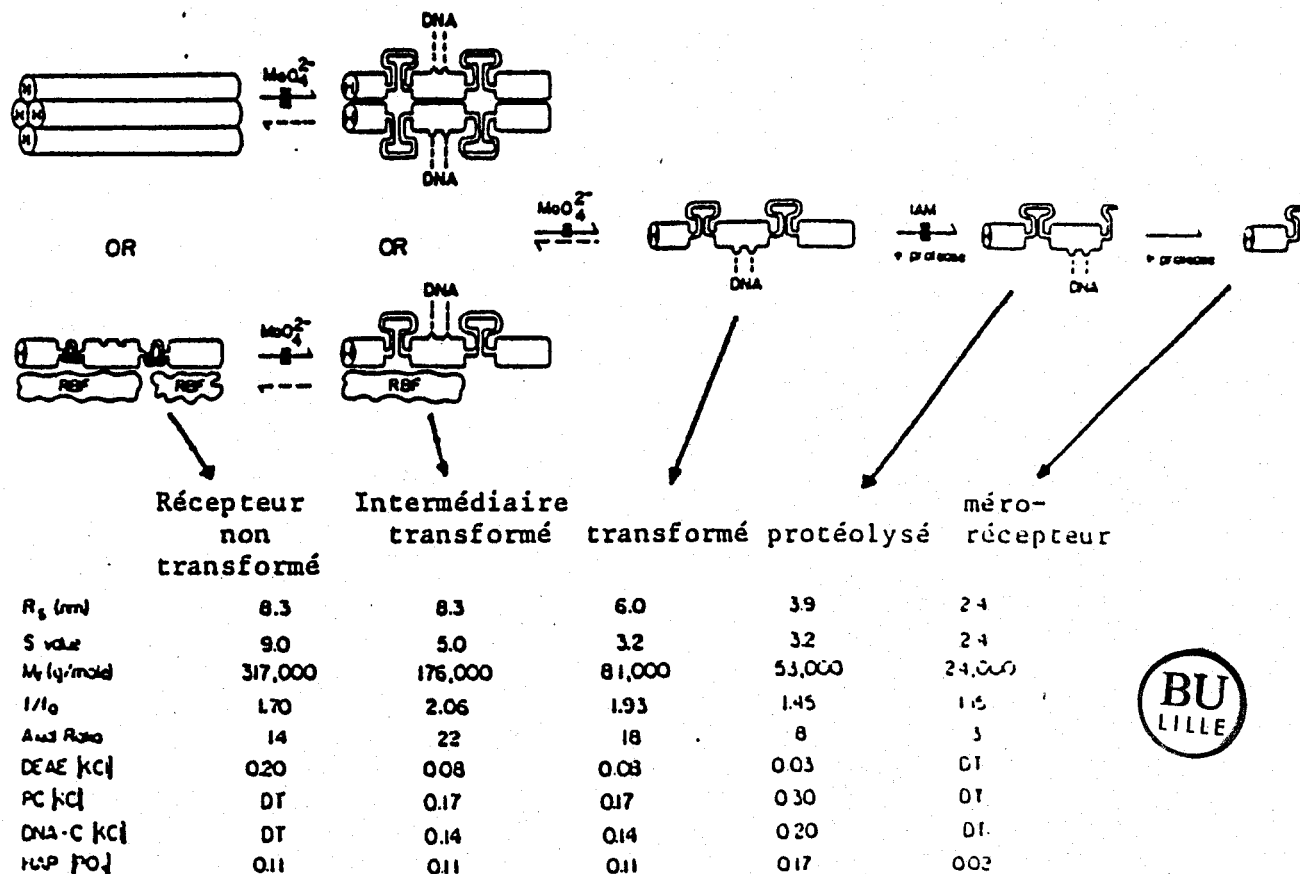


Figure 5 - Modèle moléculaire de Vedeckis (1983b) et tableau des propriétés physicochimiques des différentes formes de récepteur avec en particulier les concentrations en sel des pics d'élution après chromatographie sur divers supports (DT non retenu, RBF : receptor binding factors, IAM : iodoacétamide)



affirmer avec certitude que le récepteur transformé purifié a un poids moléculaire de 90 à 100 KD, suivant les espèces animales. Ce poids a été obtenu à partir des paramètres hydrodynamiques et l'analyse en gradient de polyacrylamide du récepteur purifié (Wrange *et al.* 1979, Govindan 1980 ) ou marqué de manière covalente par le mésylate de dexaméthasone (Simons et Thompson 1981, Eisen *et al.* 1981) ou par photoaffinité (Dellweg *et al.* 1982, Nordeen *et al.* 1981, Wrange *et al.* 1984). Le poids moléculaire de 40 KD rapporté par le groupe de Beato (Westphal *et al.* 1980 et 1981) résulterait d'une protéolyse partielle. Il a un rayon de Stokes de 6 nm et un coefficient de sédimentation de  $3,5S \pm 0,2S$  selon la force ionique du tampon (Wrange *et al.* 1979). Pour le groupe de Beato (Climent *et al.* 1977, Westphal *et al.* 1980), pour Atger *et al.* 1976 , Eisen *et al.* 1975, Grandics *et al.* 1984, le coefficient de sédimentation est de 4S, ce qui correspond aux valeurs obtenues pour le récepteur transformé cytosolique. En DEAE-cellulose, il est élué entre 0,16 et 0,2M de KCl ou NaCl (Govindan *et al.* 1978, Wrange *et al.* 1979). Pour Grandics *et al.* 1984, la force ionique d'éluion est 0,08 M de NaCl. Il possède un point isoélectrique sur acrylamide de 5,8 (Wrange *et al.* 1979) ou 6,0 (Eisen *et al.* 1975, 1976, 1978, Singh *et al.* 1985). Singh et Moudgil (1985) montrent de plus que le complexe H-R transformé purifié est un bon substrat de phosphorylation *in vitro* sous l'action d'une kinase AMPc-dépendante en présence de magnésium. Pour Kurl *et al.* (1984) et Miller-Diener *et al.* (1985) l'activité kinasique serait portée par le récepteur lui-même qui s'autophosphorylerait. Sanchez (1986), à l'encontre de ces résultats montre clairement que le récepteur purifié grâce à un immunoabsorbant portant un anticorps monoclonal anti-récepteur n'a aucune activité kinasique, pas plus d'ailleurs que la protéine 90-92K qui l'accompagne en présence du molybdate (Housley *et al.* 1985, Sanchez *et al.* 1985).

Tous ces résultats établissent de manière claire que le récepteur est une phosphoprotéine. Pour l'instant aucune variation du taux de phosphorylation du récepteur lui-même n'a pu être mesurée et corrélée avec son activité biologique.

## 2.2. Utilisation des anticorps mono- et polyclonaux

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

Le groupe de Gustaffson (Okret *et al.* 1981, Carlstedt-Duke 1979, Gustaffson *et al.* 1984) ont utilisé un anticorps polyclonal pour identifier le domaine immunogène du récepteur transformé après l'emploi d'enzymes protéolytiques sur du cytosol incubé. C'est un fragment qui peut être obtenu facilement par hydrolyse ménagée avec la chymotrypsine, son poids moléculaire se situe entre 40 et 50 KD. Il a été aussi identifié par Dellweg *et al.* (1982), Gehring et Hotz (1983) sur des préparations marquées de manière covalente. Vedeckis (1985b) suggère que son point isoélectrique et sa charge nette sont voisins de ceux du complexe non protéolysé.

## 2.3. Protéolyse limitée du récepteur purifié

Wrange *et al.* (1984) ont utilisé un récepteur purifié couplé covalentiellement à l'acétonide de triamcinolone radioactif par photoaffinité pour le soumettre à l'action de la trypsine ou de la chymotrypsine. Il apparaît ainsi un fragment de 39 KDa qui retient l'hormone et est capable de se lier à la DNA-cellulose ; le fragment 39 KDa n'est plus capable de lier les anticorps dirigés contre le 94 KDa. Ce fragment peut encore être dégradé par la trypsine mais pas par la chymotrypsine pour donner deux fragments de 25 et 27 Kd, dont le plus petit se présente sous forme non dénaturée et conserve encore la capacité de lier le stéroïde. Il s'agit du mérorécepteur, il a été identifié par plusieurs auteurs (Sherman *et al.* 1978, 1983 ; Carlstedt-Duke *et al.* 1979 ; Holbrook *et al.* 1983, Stevens *et al.* 1981a, Vedeckis 1983, Wrange *et al.* 1978 et 1984).



#### 2.4. Modèles du récepteur transformé

L'emploi de la protéolyse limitée et des anticorps a conduit les groupes de Gustaffson (Carlestedt-Duke *et al.* 1982, Gustaffson *et al.* 1986) et de Vedeckis (1985a, b) à proposer des modèles très voisins d'organisation en domaine du polypeptide 90-98 KD monomère du récepteur des glucocorticoïdes (figure 6). Vedeckis (1985b) a vu dans les propriétés structurales et fonctionnelles des divers mutants de récepteurs 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 au stéroïde, site de liaison à l'ADN puis site modulateur. Nous allons voir que l'élucidation de la séquence complète du cDNA codant pour le récepteur des glucocorticoïdes a bien confirmé l'existence de ces trois domaines et précisé leur disposition dans la molécule.

#### 2.5. Séquence complète du cDNA codant pour le récepteur des glucocorticoïdes

Au cours de la mise au point d'un protocole de purification, les améliorations prennent en compte deux critères en même temps : le taux de purification et le rendement. Généralement, quand l'un augmente, l'autre diminue, ce qui ne va pas sans poser de problèmes, d'autant plus que le récepteur existe en très faible quantité dans la cellule. Les quelques  $\mu\text{g}$  récupérés après la purification ne permettent généralement que des études de caractérisation. Cela a rendu les approches d'études directes sur la molécule réceptrice très limitées.

Devant cette situation, les auteurs se sont intéressés aux méthodes d'approches indirectes. La plus spectaculaire étant la préparation d'anticorps anti-récepteur. La part qu'elle a prise dans les études qui ont permis l'élucidation des séquences complètes des cDNA codant pour les récepteurs des glucocorticoïdes n'étant pas le moindre exemple.

En effet, ce dernier résultat a marqué un tournant dans

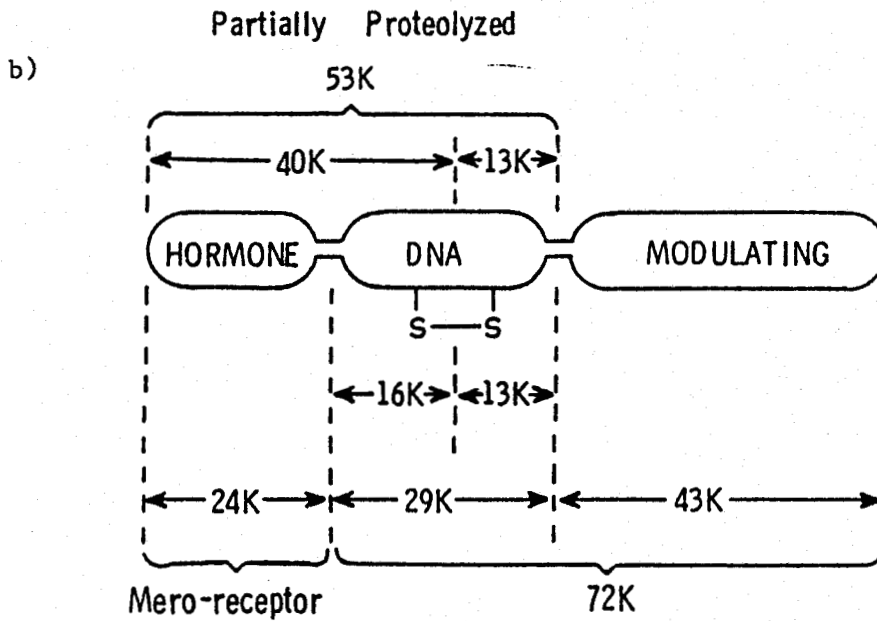
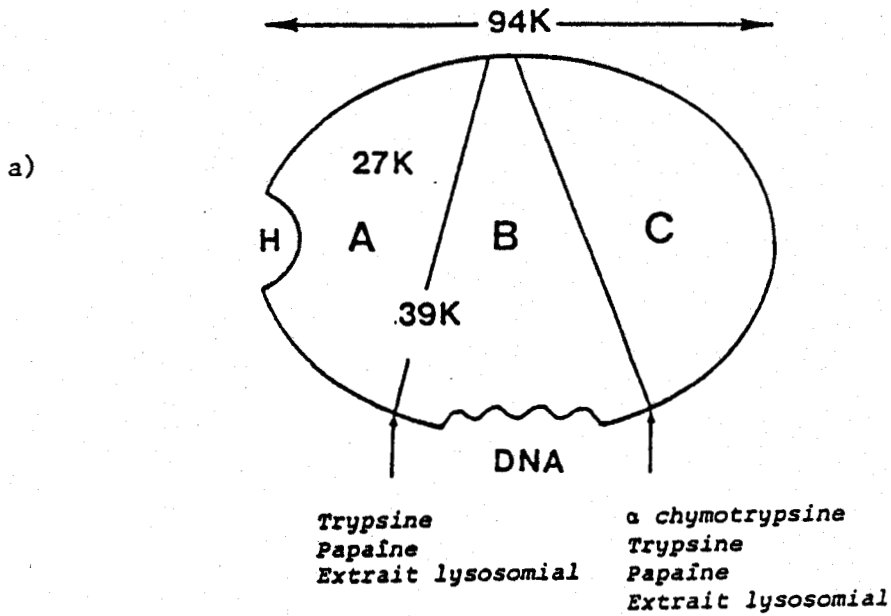


Figure 6. - Organisation en domaines fonctionnels du monomère de récepteur des glucocorticoïdes selon a) Gustafsson (1986), b) Vedeckis (1985a,b). On distingue le domaine de liaison au stéroïde A, le domaine de liaison à l'ADN B, et le domaine immunogène modulateur C.

la recherche du récepteur, son acquisition n'a pas été obtenue sans peine, il a fallu une collaboration étroite entre 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.

#### 2.5.1. Clonage du cDNA du récepteur des glucocorticoïdes

Pour cela, les auteurs ont fait appel aux cellules tumorales d'origine murine et humaine choisies pour leur contenu élevé en récepteur et donc en ARN-messager codant pour cette protéine. Dans un premier temps, un anticorps, de préférence monoclonal anti-récepteur sert à préparer des polysomes enrichis en ARN-messager. Celle-ci est ensuite fractionnée sur oligo dT cellulose. L'ARN poly A enrichi (1-2 % codant pour le récepteur) obtenu est cloné dans les phages  $\lambda$  gt 10 et  $\lambda$  gt 11 afin d'avoir une librairie de cDNA. Les clones positifs sont sélectionnés par criblage qui se fait à l'aide soit d'un anticorps anti-récepteur, soit sur dot blot, soit par sonde oligonucléotidique spécifique d'un morceau de séquence déjà connu. La dernière étape du séquençage permet d'obtenir la séquence complète. Cette stratégie a été employée pour élucider la séquence complète du cDNA du gène du récepteur des cellules hépatiques du rat (Miesfeld *et al.* 1986). Elle a été utilisée légèrement modifiée par Govindan *et al.* 1985 et par Weinberger *et al.* 1985a, Hollenberg *et al.* 1985 dans le cas du récepteur humain.

#### 2.5.2. Séquence du cDNA du récepteur des glucocorticoïdes

La séquence complète codant pour le récepteur humain (Hollenberg *et al.* 1985) montre l'existence de deux variantes  $\alpha$  et  $\beta$ . La différence entre les deux serait l'absence dans la variante  $\beta$  d'une cystéine du côté C-terminal impliquée dans la liaison à l'acétonide de triamcinolone.

D'autre part, Weinberger *et al.* (1985b) a proposé pour le récepteur des glucocorticoïdes l'organisation en domaines représentée sur la figure 7 .

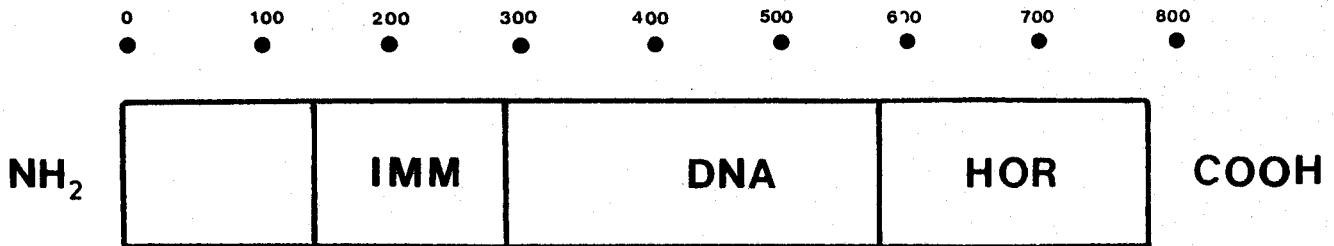


Figure 7 - Domaines de la structure primaire du récepteur des glucocorticoïdes.

Les domaines immunogènes (IMM), de liaison probable à l'ADN (DNA) et au stéroïde (HOR) sont indiqués.



La partie N-terminale de la protéine porterait la région immunogène. La moitié C-terminale serait impliquée dans la liaison du récepteur à l'ADN ; l'extrémité C-terminale du récepteur est essentielle à la liaison du stéroïde.

Nous remarquons que cet enchaînement ne correspond pas aux prévisions formulées par Vedeckis (1985b) sur la base de son modèle hypothétique.

### C - CONCLUSION

Durant les dix dernières années, les résultats concernant la fonction et la structure du récepteur des glucocorticoïdes ont été très abondants et très intéressants, mais pas encore suffisants pour élucider clairement les problèmes du nombre et la nature des sous-unités, de la phosphorylation ou des facteurs cytosoliques indispensables, ce qui permettrait d'identifier et de caractériser la forme native vraie du récepteur. Cela conduirait à mieux comprendre l'étape de la transformation.

Les méthodes mises en oeuvre actuellement dans cette recherche sont nombreuses et font appel à divers domaines : la biologie moléculaire, l'immunologie, la cristallographie. Cela montre la difficulté du sujet. Il faut espérer que la purification avance suffisamment pour rendre possible des manipulations directes sur la molécule protéique réceptrice.

DEUXIEME PARTIE

PURIFICATION DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES  
SOUS FORME TRANSFORMEE - GENERALITES ET  
RESULTATS PERSONNELS

I - PURIFICATION DU RECEPTEUR TRANSFORME PAR LES PROTOCOLES DEJA  
DECRIIS A CE JOUR.

La mise au point d'une méthode de purification hautement sélective et rapide est d'une importance capitale. Cela tient au fait que le récepteur est une protéine extrêmement labile et qu'elle est présente dans la cellule à des concentrations très faibles. A cela s'ajoute une diversité de forme qui ne fait qu'augmenter les difficultés pour le choix de la méthode de purification, et quand on sait en plus, qu'on est limité dans le choix de la source de tissus riches en récepteurs, on comprend aisément qu'il faut aborder le problème de la purification avec une stratégie bien étudiée.

Néanmoins, nous disposons actuellement de moyens très importants pour éviter les approches qui peuvent nous induire en erreur. A cet égard, il y a lieu d'être satisfait de la présence de facteurs stabilisants, qui non seulement augmentent la durée de vie du récepteur, mais permettent aussi d'améliorer la séparation des trois formes du récepteur (forme non liée au stéroïde, forme liée non transformée, forme liée transformée).

Nous évoquons ici particulièrement l'importance du molybdate. En effet, cet oxyanion à une concentration de 10-20 mM présente un double effet ; d'une part il stabilise le récepteur non lié (Blanchardie *et al.* 1983), en bloquant à la fois l'inactivation de type physicochimique provoquée par l'augmentation de la force ionique et la précipitation au sulfate d'ammonium et l'inactivation en partie enzymatique provoquée par l'augmentation de la température (Leach *et al.* 1979, Naray . 1983). D'autre part, le molybdate empêche la transformation du complexe H-R, que ce soit par l'augmentation de la température ou l'élévation de la force ionique (Leach *et al.* 1979). L'exploitation conjuguée de ces deux effets a eu pour résultat de faire avancer d'une manière spectaculaire la purification du récepteur sous forme non transformée, alors que celle-ci apparaissait



au départ compromise en comparaison avec celle du récepteur sous forme transformée.

A priori, il est évident, pour la purification du récepteur sous forme transformée, qu'il faut éviter l'utilisation du molybdate et les oxyanions ayant un effet similaire. Dans ce cas, les auteurs ont essayé au mieux d'augmenter la stabilité du récepteur transformé en utilisant les agents stabilisant des groupements thiols (mercaptoéthanol, DTT), le glycérol et les inhibiteurs de protéases (PMSF par exemple). Malheureusement, tous ces artifices ne suffisent pas à eux seuls pour pallier au problème de la stabilité. Toutefois, les progrès les plus nets sont à mettre au compte de la rapidité dans la réalisation des procédures chromatographiques et de la limitation du nombre d'étapes des protocoles proposés.

Dans ce mémoire, nous nous limiterons à commenter la purification du récepteur transformé. En effet, la purification du récepteur non transformé a fait l'objet de thèses bien détaillées (Idziorek, 1985) (Lustenberger, 1986).

#### A - LES METHODES DISPONIBLES

La préparation à l'état pur du récepteur nécessite plusieurs étapes, et toute la difficulté consiste à sélectionner et à enchaîner les différents procédés utilisés.

Deux critères permettent d'évaluer l'intérêt d'une méthode : le degré ou taux de purification et le rendement. Le taux de purification est estimé à chaque étape en mesurant l'activité spécifique du récepteur, c'est-à-dire l'activité de liaison rapportée à la concentration totale des protéines. Mais le point le plus important reste la caractérisation qualitative du récepteur purifié. Pour cela on dispose d'un éventail assez diversifié de méthodes permettant de conclure à l'identité du matériel purifié. Nous allons dans un premier temps procéder à une description des différentes méthodes classiques

qui ont été utilisées pour purifier le récepteur transformé et ensuite, nous présenterons d'une manière plus complète les supports polyanioniques dont l'utilisation dans la même intention a rapporté les meilleurs résultats.

### 1 - Méthodes classiques

L'étape préliminaire commune à tous les protocoles sans exception consiste à homogénéiser un tissu animal (généralement le foie) ou des cellules isolées (foie ou tissus) dans un tampon. Cet homogénat est soumis à une ultrafiltration, la fraction limpide ou surnageant représente le cytosol de départ.

Les premières tentatives de purification du récepteur transformé ont utilisé la gel filtration mais avec des résultats décevants caractérisés par un très faible rendement. En effet, Hackey et Pratt (1971) dans un protocole de purification du récepteur de fibroblastes de souris, en quatre étapes utilisent la gel-filtration en première et troisième étape ; entre les deux, ils précipitent avec le sulfate d'ammonium et terminent la purification par une chromatographie sur DEAE-cellulose. Litwack *et al.* 1973 après une chromatographie sur DEAE-Sephadex 50 déposent l'éluat sur gel-filtration Sephadex 100. Même si ces derniers ont obtenu un rendement meilleur que celui des premiers auteurs, il n'en reste pas moins que la gel-filtration conventionnelle s'est avérée une technique à portée limitée pour la purification du récepteur transformé. Nous même l'utilisons pour dessaler et enlever le sulfate de protamine de la préparation du récepteur, obtenue par précipitation de ce dernier.

L'autre technique utilisée dans les protocoles de purification classique et qui a déçu la plupart des auteurs est celle de la précipitation au sulfate d'ammonium. En effet, on s'était vite rendu compte qu'elle était à l'origine de phénomènes d'agrégation irréversible (Hackney et Pratt 1971, Rousseau *et al.* 1975).

## 2 - Méthodes d'échange d'ions sur supports polyanioniques

L'acquisition par le récepteur transformé de la capacité à lier des sites récepteurs nucléaires de noyaux isolés avait laissé supposer que la transformation serait responsable de l'exposition de régions positivement chargées à la surface de la molécule (Schmidt *et al.*, 1982). Cette hypothèse fut rapidement vérifiée par l'utilisation de supports polyanioniques tels que la DNA-cellulose, la phosphocellulose, l'ATP-Sépharose, le carboxyméthyl séphadex et l'héparine agarose. (Blanchardie *et al.*, 1984a, Weitz *et al.*, 1984). Des études comparatives ont clairement montré que la DNA-cellulose est le support qui retient le plus la forme transformée du récepteur. Elle n'est dépassée à ce titre que par les noyaux isolés, mais la difficulté que présente la manipulation de ces derniers, fait qu'ils présentent un modèle mal adapté aux études de caractérisation rapide et surtout à la purification. Il reste que la DNA-cellulose est le modèle de choix, de par sa relative facilité à être manipulée, de la possibilité qu'il offre de ne pouvoir fixer que la forme transformée du récepteur et surtout de la spécificité de liaison rendue possible par l'existence de la molécule d'ADN. Ce support utilisé au départ pour des études analytiques a contribué d'une manière spectaculaire au développement de méthodes de purification quantitative du récepteur transformé. Vu l'importance de ce support, nous le présenterons d'abord sous l'angle structural, puis nous montrerons son application dans les protocoles de purification décrits jusqu'à présent.

### 2.1 - Préparation de la DNA-cellulose

Trois méthodes essentielles ont été utilisées pour lier le DNA à la cellulose :

Le premier protocole de préparation de DNA-cellulose a été proposé par Alberts et Herricks, 1971, Les auteurs réalisent le couplage avec une solution de DNA à une concentration de 1-3 mg/l dans un tampon TE Tris. 10 mM, pH 7,4, EDTA Na<sub>3</sub> 1 mM). La cellulose est utilisée à raison de 1g/3 ml dans le même tampon. La réaction se déroule sur une plaque de verre à température ambiante, elle se

termine quand le mélange est sec. L'eau résiduelle est éliminée par lyophilisation. Puis la poudre est resuspendue dans environ 20 volume de TE et laissée à 4°C pendant une nuit. Après deux lavages pour enlever le DNA n'ayant pas réagi, la DNA cellulose est stockée dans le tampon TE plus NaCl 0,15 M. Le rendement calculé par mesure au spectrophotomètre du DNA libre dans le surnageant du lavage est d'environ 50 %. L'étape cruciale de cette technique est le séchage à l'air. En effet, si celle-ci vient à être oubliée et que seule la lyophilisation est réalisée, le rendement de fixation du DNA diminue de moitié.

L'inconvénient de cette méthode est que la fixation du DNA bicatenaire n'implique pas de liaison covalente. Pour étudier le comportement des complexes entre les histones et le DNA immobilisé, Biagioni *et al.* (1978) avaient besoin d'un support DNA-cellulose particulièrement stable, qui non seulement comporterait des liaisons covalentes, mais serait aussi capable de résister aux pH extrêmes (surtout les pH alcalins).

Ils ont trouvé que la cellulose activée avec le chlorure cyanurique était très convenable pour la préparation de tels supports. La cellulose activée est obtenue par la méthode de Smith *et al.* 1974. Le DNA (0,2 à 2 mg/l) dans une solution non tamponnée, est mélangé avec de la cellulose (100 mg/ml), puis laissée sous agitation pendant une heure à 4°C. Le mélange est ensuite filtré puis traité à l'éthanolamine à pH 8 pour désactiver les fonctions trichloroazinyll n'ayant pas réagi. La DNA-cellulose récupérée par filtration est lavée abondamment à l'eau distillée. La quantité de DNA lié est calculée par deux méthodes, soit par mesure au spectrophotomètre du DNA non lié présent dans le filtrat à la fin de la réaction, soit par détermination du phosphate lié à la cellulose (Zilversmit *et al.* 1950). Le rendement se situe entre 80 et 97 %, selon la quantité de DNA mise dans le milieu réactionnel (figure 8). Cette méthode présente l'avantage de coupler du DNA bicatenaire et de mettre à notre disposition un support qui se caractérise par une grande stabilité, même après traitement à l'urée et aux pH alcalins. Le seul inconvénient réside dans les précautions qu'il faut prendre pour manipuler le



chlorure cyanurique.

La troisième variété de méthode que nous proposons dans cette revue est celle qui a été mise au point par Moss *et al.* (1981) (Figure 9). C'est une technique très efficace pour coupler par une liaison covalente le DNA à la cellulose. Le pont de couplage est réalisé grâce à un oxiranne bifonctionnel. Contrairement à ce que l'on a vu pour les deux méthodes précédentes, le DNA ici est sous forme monocaténaire et la taille des fragments couplés est d'environ 700 bases. Toutefois, comme dans la technique d'Alberts et Herrick, l'étape de séchage est cruciale. Les auteurs ont par ailleurs déterminé les conditions optimales de concentration du rapport DNA sur cellulose. Ils établissent ainsi que pour une concentration  $< 4 \mu\text{g}$  de DNA/mg de cellulose le rendement est de 90 %. Ce dernier chute à 53 % quand le rapport est de  $12 \mu\text{g}/\text{mg}$ .

Le Fevre *et al.* (1979) ont déterminé les conditions optimales d'expérimentation et constatent qu'il n'y a plus de variation dans la détection des récepteurs transformés à partir d'une concentration de  $9 \mu\text{g}$  DNA/ml de suspension. En fait, la concentration optimale pour la détection varie pour les différents lots de DNA-cellulose. Les supports présentés dans notre étude satisfont bien à ces normes.

## 2.2. Application de la DNA-cellulose et autres supports polyanioniques à la purification du récepteur transformé

L'importance de cette technique s'est révélée au vu de l'abondance des publications qui sont apparues ces dix dernières années, et où les auteurs ont alterné essentiellement chromatographie

sur phosphocellulose et sur DNA-cellulose. La caractéristique commune à tous les protocoles, c'est qu'ils comportent généralement au moins deux étapes ; le cytosol incubé en présence de l'hormone est chromatographié sur phosphocellulose ou DNA-cellulose en tampon de faible force ionique, avec un débit assez rapide. Au cours de cette étape, seules les protéines ayant une affinité pour les groupements anioniques sont retenues et éliminées. Le volume exclu renfermant le récepteur est alors exposé à 25°C, ce qui permet la conversion du complexe hormone-récepteur sous la forme transformée. Le complexe acquiert alors une forte affinité pour le DNA ou la phosphocellulose. Une seconde chromatographie sur le même support avec un débit plus lent permet l'adsorption du récepteur (en principe, il ne reste pas de protéines étrangères ayant une affinité vis-à-vis du support). Après lavage, l'élution est obtenue par un gradient de force ionique. Etant donné que seuls les complexes hormone-récepteur voient leur affinité augmenter pour le support après l'activation, on peut espérer récupérer des préparations pures du récepteur. (figure 10).

Nous n'avons pas jugé utile de décrire les différents protocoles ayant servi à plusieurs auteurs pour purifier le récepteur transformé, et nous présentons simplement un tableau (voir Tableau II) qui résume l'essentiel de ce qui a été réalisé dans ce domaine. Par contre, nous avons analysé attentivement les résultats et nous avons dégagé un certain nombre de remarques.

- Il apparaît évident que la purification du récepteur lié à l'hormone sous forme transformée est fort réalisable.

- Les résultats rapportés par les différents auteurs, ne conduisent pas, sauf une ou deux exceptions, à des préparations pures à l'homogénéité. Ceci s'explique par la capacité limitée de la DNA-cellulose à séparer du récepteur les protéines qui lient le DNA et qui sont éluées à la même concentration en sel que le récepteur transformé. Cependant, le résultat le plus intéressant a été obtenu par Wrange *et al.* (1979). En effet, cette équipe, dans le souci de pallier au problème qui vient d'être évoqué, a d'une part réalisé



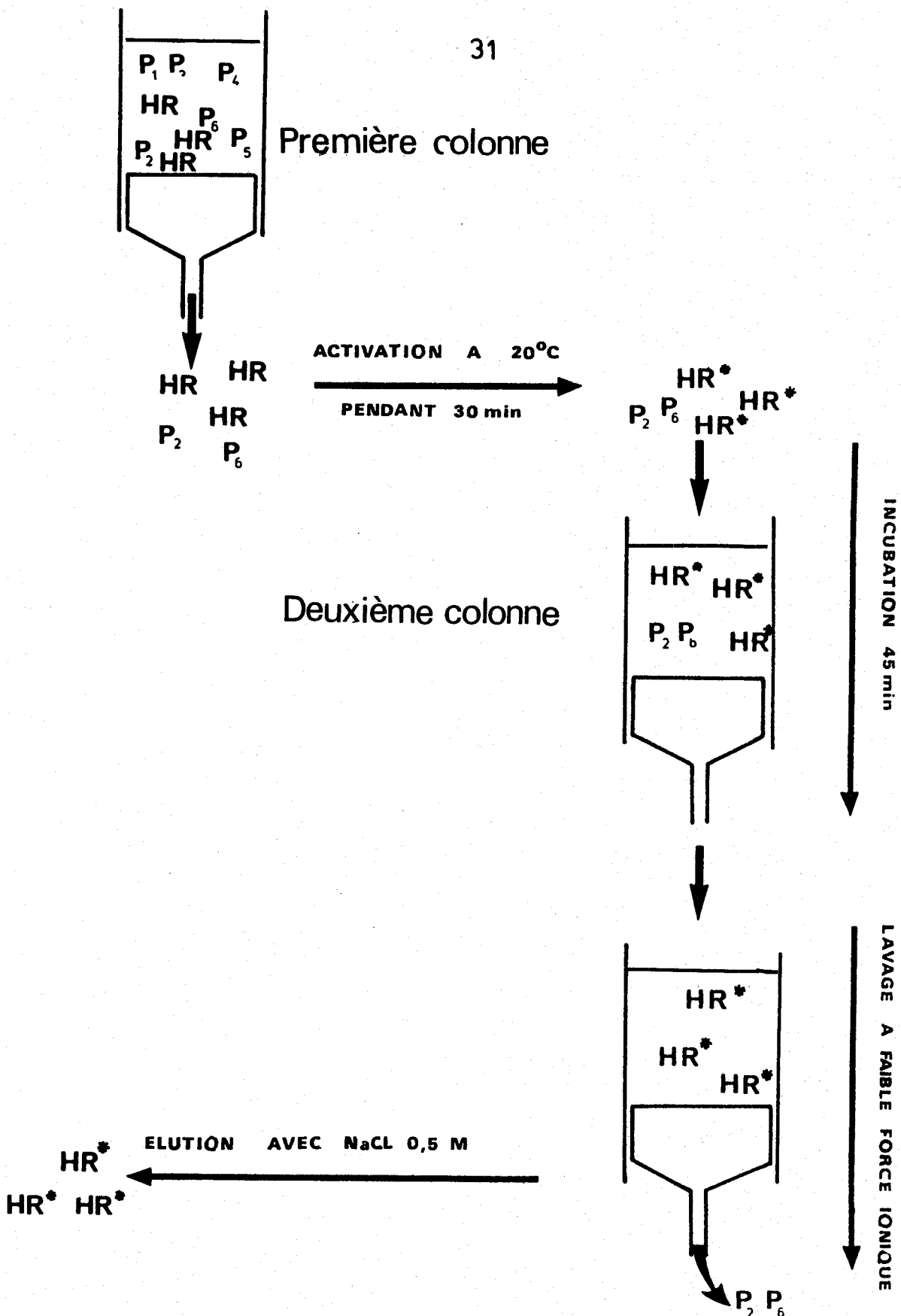


Figure 10 - Principe de la purification par DNA ou phosphocellulose.

P1, P2, P3, P4, P5, P6 : diverses protéines à éliminer.

HR : complexe hormone-récepteur non activé

HR\* : complexe hormone-récepteur activé.

AUTEURS	METHODES UTILISEES	T.P. sur DNA-cellulose	RESULTATS			CARACTERISATION	
			T.P. total	Rendement %	A.S.	P.M.	Pureté %
EISEN 1978	DNA-cellulose	11.000	11.000	90		rien	
WRANGE 1979	DNA-cellulose + DEAE Sepharose	6.700	8.500	25-30	8,6	94	80
GOVINDAN 1984	DNA-cellulose + DEAE Sepharose	2.700	6.500	15	6,6	92	60
	Chromato d'affinité + DNA-cellulose	1,3	7.800	63	6,7		62
ATGER 1976	Phosphocellulose + précipitation sulfate NH <sub>4</sub> + DEAE-Sephadex		940	24	0,4		
BEATO 1980	Phosphocellulose + precipitation sulfate NH <sub>4</sub> + gradient de saccharose		59.000	2		40	

TABLEAU II - Purification du récepteur transformé par divers protocoles utilisant essentiellement la phospho et la DNA-cellulose.

T.P. : Taux de purification ; A.S. Activité spécifique en nmole/mg de protéines

P.M. : Poids moléculaire



l'élution de la DNA-cellulose par le phosphate de pyridoxal 0,01 M, et le  $Mg Cl_2$  (Wrangle et al.1984), qui seront des moyens d'élution plus spécifique que la simple augmentation de la force ionique. D'autre part, elle termine la purification par une chromatographie sur DEAE-Sepharose à pH 7,8. Le recours à cette dernière étape lui a permis d'avoir une préparation pure à l'homogénéité.

- La transformation a été obtenue par la majorité des auteurs par chauffage des complexes hormone-récepteur entre 20 et 25°C pendant 30 minutes à 1 heure, à l'exception d'Atger (1976) et Gametchu (1984) qui ont utilisé l'artifice qui consiste à faire augmenter la force ionique. Cette étape, indispensable et incontournable, réalisée à l'aide de la chaleur, permet au mieux de n'avoir que 50 à 60 % maximum des complexes hormone-récepteur partiellement purifiés sous forme transformée. Tout récemment, Govindan et Gronemeyer ont publié un protocole impressionnant, identique dans son principe à celui de Wrangle *et al.* (1979, 1984), mais qui se distingue de ce dernier par un seul point. Il concerne l'introduction d'une seconde étape de transformation du volume exclu, récupéré après la deuxième chromatographie sur DNA-cellulose. Même si par ce biais, ces auteurs n'arrivent pas à améliorer le taux de purification, leur objectif d'augmenter le taux de transformation est toutefois atteint.

- Nous avons noté que la multiplication des étapes de filtration-adsorption-transformation se fait au détriment du rendement et de la "santé" de la préparation. A cet égard, il est intéressant d'examiner le travail réalisé par Beato et Westphal (1980). Ces auteurs ont proposé un protocole en sept étapes, ils ont alterné filtration adsorption sur phospho- ou DEAE-cellulose, et précipitation par le sulfate d'ammonium, la dernière étape étant un gradient de sucrose préparatif. Certes le taux de purification a atteint une valeur maximum de 59000 fois et la préparation est pure à l'homogénéité. Mais d'un autre côté, le rendement est très faible (3 %) et l'analyse des caractéristiques physicochimiques fait état d'une préparation dégradée. On ne saurait sous-estimer l'intérêt de ce

travail, mais pareille dualité est néanmoins gênante.

- En passant en revue tous les résultats traitant de la purification du récepteur transformé, on remarque que certains auteurs mettent en avant des taux de purification tout à fait impressionnants, mais cela n'est rien devant le caractère variable de ce chiffre, d'une publication à une autre. Et l'on est à même de se poser la question de la signification réelle de ce chiffre.

Nous n'entrerons pas dans une polémique de ce chiffre, ce n'est pas notre propos, mais nous évoquerons simplement le problème posé par le dosage de très faibles quantités de protéines, qui est très probablement la cause directe du caractère variable du taux de purification. En effet, au laboratoire, une étude comparative menée par Idziorek (1985) a permis de faire apparaître les différences qui existent entre trois méthodes testées. Deux d'entre elles utilisent le bleu de Coomassie (Bradford, 1976, Read 1981), la troisième étant celle de Lowry modifiée par Bensadoun (1976).

La conclusion principale de ce travail est que les trois techniques ne donnent pas de résultats exacts. Elles donnent toutes un éventail de réponses très variables en fonction des protéines employées. A cet égard, l'exemple du récepteur purifié est très significatif, le dosage a été réalisé avec seulement deux méthodes : celles de Bensadoun et de Read. Les résultats montrent que l'écart entre les deux techniques correspond à un rapport de 1 à 3. Cela nous donne des raisons pour penser que les chiffres qui indiquent les taux de purification doivent être considérés avec des réserves, et qu'il faut les analyser en même temps que les caractéristiques physicochimiques.

Enfin, la faible quantité de récepteur récupérée à la fin de la préparation n'a permis jusqu'alors que de préciser les paramètres physicochimiques du récepteur et d'en étudier les domaines structuraux ainsi que la liaison à l'ADN. Il est clair qu'avec de telles quantités, où le récepteur est encore plus instable, il ne saurait être question d'aborder les études concernant la liaison au

stéroïde et encore moins celles du mécanisme de la transformation.

Devant ces difficultés, les auteurs ont développé des approches indirectes, la plus spectaculaire étant la préparation d'anticorps anti-récepteur. Ainsi, le groupe de Eisen (1980) a réussi à préparer un anticorps qui reconnaît le récepteur natif et transformé et qui est spécifique de l'espèce. L'antisérum polyclonal préparé par Okret *et al.* (1981) reconnaît lui aussi le récepteur sous formes native et transformée, mais il semble non spécifique de l'espèce, ni du tissu. D'autre part, un anticorps monoclonal a été obtenu par Gametchu et Harrisson (1984). Sa préparation n'a pas demandé de récepteur hautement purifié (1300 à 3200 fois).

Ces anticorps ont d'abord joué un rôle dans la caractérisation des domaines du récepteur, puis ils ont été utilisés ensuite pour isoler l'ADN complémentaire codant pour le récepteur.

### 3 - Conclusion

Au vue de ces protocoles, il semble clair que la DNA-cellulose présente beaucoup plus d'attraits que la phosphocellulose. En effet, celle-ci a servi généralement seulement comme étape de prépurification, grâce à sa propriété d'être stable en présence du cytosol susceptible de renfermer des DNases, mais l'inconvénient que présente la phosphocellulose est qu'elle induit elle-même la transformation.

## B - RESULTATS PERSONNELS

Au sein de notre laboratoire, une étude minutieuse entamée par Lustenberger (1981) et achevée par Idziorek (1985) a permis de préparer du récepteur hautement purifié sous forme non transformée. Dès lors, une étude complémentaire a été envisagée, elle concerne la purification du récepteur sous forme transformée. Cette tâche nous a été confiée dans le cadre de cette thèse. Nous avons commencé notre étude par l'application des méthodes disponibles qui viennent d'être évoquées précédemment et qui sont apparemment très efficaces.

### 1. Choix du protocole à utiliser

Quand nous avons décidé d'entamer la purification du récepteur transformé sur supports polyanioniques, notre espoir était bien mesuré, puisque les publications apparues jusqu'alors faisaient état de résultats suffisamment avancés pour qu'on ne puisse prétendre les dépasser. Notre objectif se situait dans une perspective qui visait le développement d'une approche indirecte du récepteur transformé, comme par exemple la production d'anticorps, ou le marquage covalent d'affinité.

Devant la diversité des protocoles nous n'avions que l'embarras du choix. Mais conscients de nos moyens, nous les avons adaptés à nos objectifs, et cela dans le respect de la qualité de la méthode choisie. Ainsi par exemple, il était difficile de mettre en oeuvre les protocoles de Westphal *et al.* (1980), de Wrange *et al.* (1979, 1984) et encore plus de Govindan et Gronemeyer (1984). En effet, si ces protocoles détiennent les records des taux de purification et des rendements, il faut signaler que les moyens employés pour leur application sont très importants. Cependant nous étions particulièrement séduit par le protocole décrit par Eisen *et al.* (1978). En effet, c'est un protocole simple en deux étapes, et qui donne selon l'auteur un taux de purification de 11 000 fois avec un rendement de 80 %.

## 2. Principe du protocole choisi

Les trois publications de Eisen reprennent le même protocole avec des perfectionnements successifs. Le principe repose sur l'utilisation de la DNA-cellulose ; la technique définitive comporte deux étapes.

- Filtration sur DNA-cellulose en colonne du récepteur incubé non activé. En milieu 100 mM NaCl, le récepteur passe dans le volume exclu.

- Après activation par la chaleur, une deuxième filtration sur DNA-cellulose permet d'adsorber le récepteur qui est élué en tampon contenant NaCl 450 mM.

## 3. Rapport de charge

Le rapport de charge (volume du cytosol/volume de DNA-cellulose) utilisé par Eisen et Glinsmann (1978) sur la première colonne de DNA-cellulose est de 0,17. Celui rapporté par Wrange *et al.* (1979) est de 0,4-0,6 pour la phosphocellulose utilisée en première étape, et de 2-3 pour la première colonne de DNA-cellulose utilisée en deuxième étape. Au cours de ces deux premières étapes, le taux des protéines passe de 20-30 mg/ml à 1-1,5 mg/ml. Les rapports proposés par Govindan et Gronemeyer (1984) sont les mêmes, et ceux proposés par Beato *et al.* (1980) sont assez voisins.

Sur ce point, tous les auteurs sont unanimes ; le rapport de charge faible utilisé pour la première étape a pour but de maximiser d'adsorption des protéines non spécifiques, présentes en grande quantité dans le cytosol et surtout de permettre la fixation des protéines ayant une faible affinité pour la DNA-cellulose. Si celles-ci ne sont pas éliminées au terme de cette étape, elles risquent d'être éluées avec le récepteur à la fin de la deuxième étape. Cela aurait pour conséquence de diminuer le taux de purification de la préparation.

Dans l'étape d'adsorption spécifique sur DNA-cellulose, après la transformation, le rapport de charge doit être le plus

élevé possible, puisque en diminuant le volume de la colonne, on diminue aussi le volume dans lequel serait récupéré le récepteur purifié, ce qui aurait pour conséquence d'augmenter sa concentration.

#### 4. Partie expérimentale

Dans nos expériences, nous sommes partis du principe du protocole établi par Eisen (1978), et au vu des résultats obtenus, à la fin des manipulations, nous avons essayé d'améliorer la purification en changeant à chaque fois un paramètre. Concernant toutes ces manipulations, la procédure expérimentale était la même. Les étapes sont les suivantes :

- Préparation des colonnes chromatographiques
- Préparation du cytosol (voir appendice technique)
- Mesure de la liaison au récepteur (voir Appendice technique)
- Isolement du récepteur
- Dosage des protéines par la méthode de Bensadoun (voir appendice technique)
- Caractérisation du récepteur (Voir Résultats)

##### 4.1. Préparation des colonnes chromatographiques

Au cours des premières tentatives, nous avons utilisé des colonnes de DNA-cellulose en première et en deuxième étape. Après une série de résultats, nous avons cherché à remplacer la DNA-cellulose utilisée en première étape par un support qui aurait les mêmes propriétés et qui serait moins onéreux. La phosphocellulose se prêtait bien à cette tâche. Malheureusement, à l'usage elle présentait un effet de dégradation sur le récepteur. Nous avons vérifié que même si on enlevait la première colonne de DNA-cellulose cet effet persistait. Dès lors, une autre alternative a été choisie, elle concerne l'utilisation d'une colonne d'Ultrogel sDNA. Dans un premier temps nous avons comparé celle-ci à la DNA-cellulose et ensuite l'avons utilisée comme étape de prépurification.

Pour préparer ces colonnes, nous avons procédé de la même manière pour chacune d'entre elles (voir appendice technique).



## 4.2. Isolement du récepteur

Le schéma général que nous avons suivi dans nos expériences comporte deux étapes. D'une part la filtration sur DNA-cellulose, ou bien sur phosphocellulose puis sur DNA-cellulose, et d'autre part l'adsorption sur DNA-cellulose.

### 4.2.1. Filtration

#### 4.2.1.1. DNA-cellulose

Le cytosol incubé avec de l'hormone radioactive est déposé sur la colonne de DNA-cellulose. Le lavage s'effectue avec le tampon F ou le tampon A, le récepteur est recueilli dans le volume exclu.

#### 4.2.1.2. Phospho et DNA-cellulose

Le cytosol incubé avec de l'hormone radioactive est déposé sur la colonne de phosphocellulose. Le lavage s'effectue à débit élevé avec le tampon A ou bien le tampon F. Le volume exclu est déposé sur une colonne de DNA-cellulose. Le lavage est aussi rapide que lors de la première colonne. Le volume exclu sera récupéré.

### 4.2.2. Adsorption

La suite des opérations est la même pour les deux cas évoqués ci-dessus. Le volume exclu recueilli est chauffé à 25°C pendant 30 minutes (c'est la transformation), il est ensuite déposé sur la colonne de DNA-cellulose et incubé pendant 45 à 120 minutes. Le lavage s'effectue avec le tampon B ou bien le tampon F. Le comptage s'effectue au fur et à mesure que les fractions sont collectées, ce qui nous permet de suivre l'évolution du lavage et de savoir quand il faut l'arrêter. L'élution se fait avec les tampons C ou G. Les fractions sont comptées au fur et à mesure qu'elles sont collectées. Quand la radioactivité devient négligeable, l'élution est arrêtée.

Le dosage d'activité sur l'éluat est fait par du charbon dextran, en ajoutant 1/10 du volume de séralbumine 10 mg/ml, et ceci pour compenser la faible teneur en protéines et pour éviter que le charbon dextran fixe une partie du récepteur purifié.

## 5 - Résultats et discussion

### 5.1. Application du protocole établi par Eisen *et al.* 1978

Le rapport de charge que nous avons utilisé pour la première colonne de DNA-cellulose est de 0,7 alors que celui de la seconde est de 9,8.

Seul le profil de lavage et d'élution de la seconde chromatographie de DNA-cellulose est représenté sur la figure 11. La majeure partie de la radioactivité qu'on espérait retrouver dans le pic d'élution est passée dans le pic de lavage .

Nous avons estimé qu'une partie est perdue pendant l'incubation dans la première colonne qui était sans doute trop longue et qui conduisait à une transformation des complexes dans cette colonne où ils se trouvaient en partie retenus. Une autre partie est dégradée après la transformation et avant et pendant la charge sur la deuxième colonne. Le même protocole réalisé dans les mêmes conditions, mais seulement avec une réduction du temps d'incubation dans la première colonne (ce temps était de 2 heures dans les premiers essais, il a été réduit de moitié ) nous a donné à peu près les mêmes résultats négatifs.

Dans le protocole établi par Eisen *et al.* 1978, il n'y a pas d'indication précise concernant les temps d'incubation dans les deux colonnes de DNA-cellulose. Ainsi, ceux que nous avons suivis au départ (2 heures pour la première colonne et deux heures 30 pour la seconde colonne) tenaient compte des données théoriques à savoir par exemple, que l'incubation prolongée dans la première colonne permettrait l'adsorption du maximum de protéines et d'enzymes. Nous en avons conclu qu'il fallait faire des filtrations rapides sur la première colonne et des incubations moins longues sur la seconde.

Dans l'incapacité d'avoir un grand volume de DNA-cellulose, nous avons essayé de la remplacer dans la première étape par un support qui aurait les mêmes propriétés et qui serait nettement moins onéreux.

Dans les protocoles rapportés par Wrange *et al.* 1979, Govindan et Gronemeyer 1984, Climent *et al.* 1976, 1977, le choix a été porté sur la phosphocellulose. En effet, ce support utilisé en première étape permet d'éliminer selon ces auteurs 75 % des protéines non spécifiques.

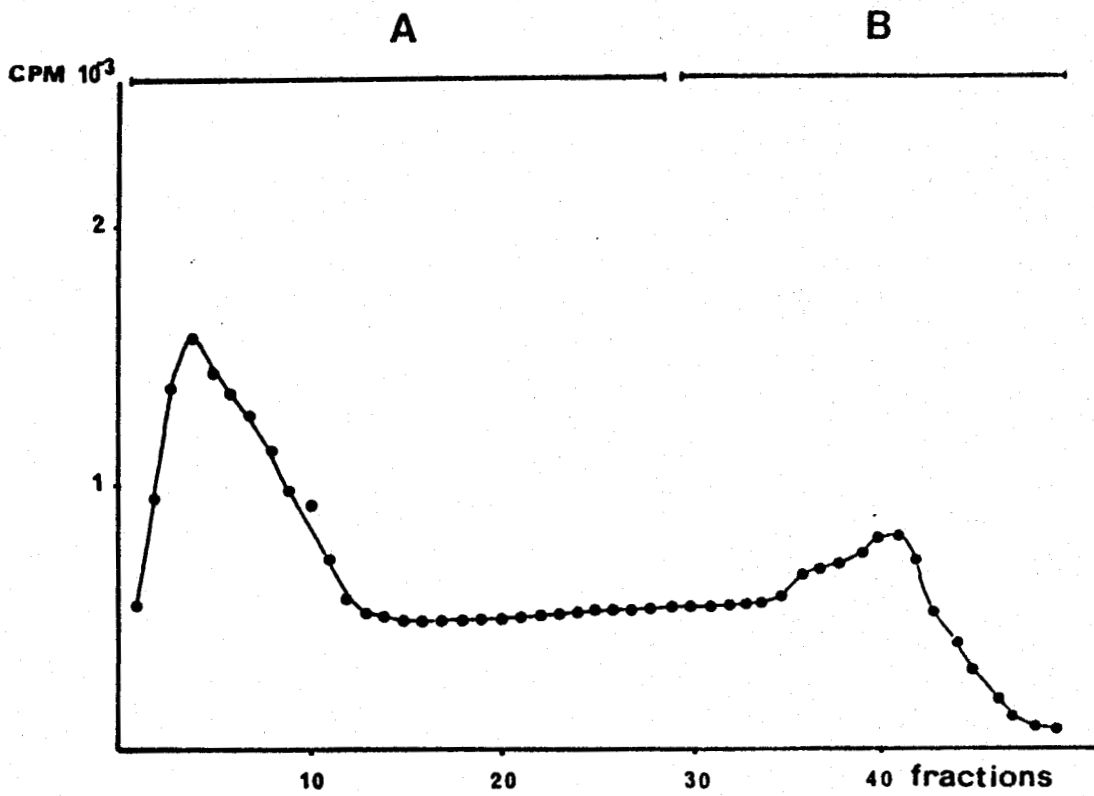


Figure 11 - Profil de lavage et d'élution de la deuxième colonne de DNA-cellulose.

Le cytosol (10 ml) est appliqué sur la première colonne (2,5 x 5 cm) de DNA-cellulose (15 ml). Le lavage s'effectue avec le tampon A, le débit est de 0,6 ml/min. Des fractions de 1,5 ml sont collectées. L'élution s'effectue dans les mêmes conditions. Les fractions du pic de lavage (15 ml) sont rassemblées et chauffées puis congelées. Après décongélation, elles sont déposées (12,5 ml) sur la deuxième colonne de DNA-cellulose (15 ml). Le lavage se fait avec le tampon A, le débit est de 0,6 ml/min. L'élution se fait avec le tampon C dans les mêmes conditions.

L'autre problème auquel nous étions confrontés est celui du temps. Généralement la filtration sur la première colonne de DNA-cellulose se faisait en fin de journée, et en attendant le lendemain, on congelait les filtrats. Cette étape de congélation s'est avérée néfaste pour le récepteur ; elle a été remplacée par une incubation en présence de l'hormone. Enfin, nous avons jugé que la concentration en sel du tampon proposé par Eisen *et al.* 1978 pour la préparation du cytosol serait un peu élevée. Nous l'avons réduite de moitié en remplaçant le tampon A par le tampon B.

### 5.2. Mise en oeuvre du protocole modifié

Les rapports de charge pour la phosphocellulose, la première et la seconde colonne de DNA-cellulose sont respectivement de 0,4, 0,73, 0,86.

A l'élution de la colonne de phosphocellulose et de la première colonne de DNA cellulose, nous avons décelé la présence d'un pic correspondant probablement à la forme transformée du récepteur. Cela confirme le fait déjà signalé par Atger et Milgrom 1976, à savoir qu'un contact avec la phosphocellulose, même s'il est relativement court, accélère l'activation du récepteur et entraîne sa transformation.

Au terme de ces trois étapes, nous ne récupérons presque pas d'activité.

Le fait de diminuer la quantité de cytosol de départ ou d'éliminer la première colonne de DNA-cellulose ne modifie pratiquement pas les résultats. Parallèlement au déroulement de la manipulation, nous avons suivi l'évolution du récepteur sur une colonne de gel-filtration en HPLC (TSK G3000). Deux fractions sont injectées, la première avant la transformation (après filtration sur phosphocellulose) et la seconde après la transformation. La figure 12 montre le profil obtenu. Nous remarquons que la forme transformée du récepteur n'apparaît pas et qu'il s'agit là d'une autre forme plus petite qui lie encore le stéroïde, et qui est assimilée au mérorécepteur. C'est le plus petit fragment du récepteur transformé, il a été décrit comme étant le résultat de l'action de protéases endogènes, dont probablement la colpaine, protéase activée par le

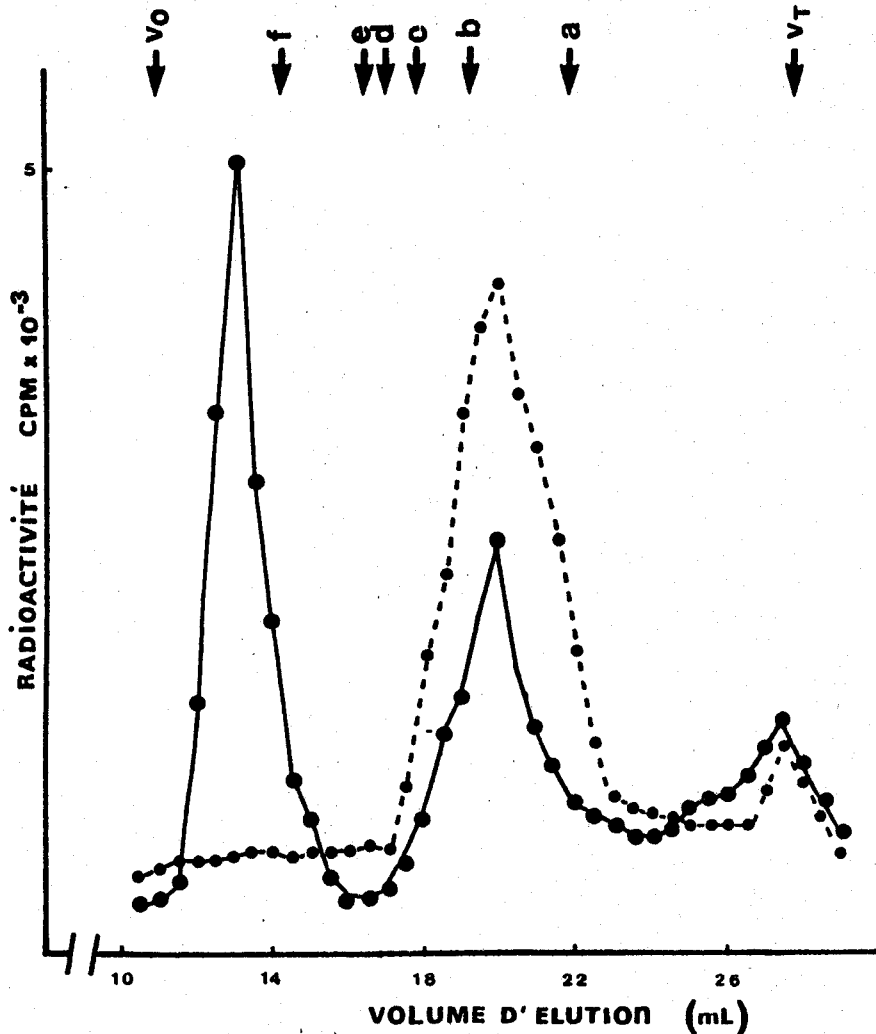
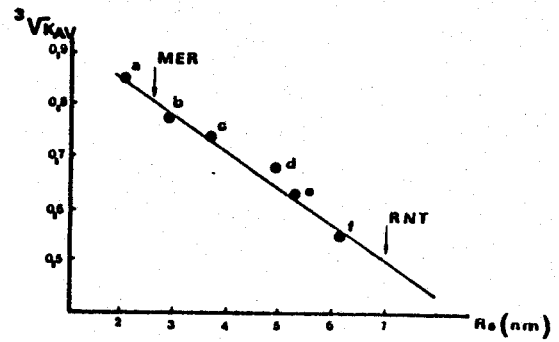


Figure 12 - Chromatographie de gel-filtration en HPLC : contrôle analytique du récepteur transformé et non transformé.

Deux aliquotes (200  $\mu$ l) du volume exclu le premier de la colonne de phosphocellulose ( $\bullet$ — $\bullet$ ), et le second de la première colonne de DNA-cellulose ( $-\bullet$ -- $\bullet-$ ), mais qui a été transformé de ce cas sont injectés dans une colonne de gel-filtration TSK G3000 SW équilibrée dans un tampon Tris-HCl 20 mM, contenant du molybdate et du mercaptoéthanol. 100  $\mu$ l de chaque fraction sont comptés en radioactivité.

$V_0$  et  $V_t$  sont respectivement le volume exclu et le volume total de la colonne. La calibration est obtenue en utilisant : a) la chymotrypsine (2 nm), b) l'ovalbumine (2,9 nm), c) l'albumine (3,6 nm) d) l'aldolase (4,8 nm), e) la catalase (5,2 nm), f) la ferritine (6,1 nm).

RNT : récepteur non transformé (7 nm)

MER (mérorécepteur (2,6 nm)

calcium (Bodwell *et al.* 1985). Il est également produit sous l'action de protéases exogènes (Sherman *et al.* 1978, 1983, Carlstedt-Duke 1979, Holbrook 1983, Stevens, J. et Stevens Y.W. 1981a, Vedeckis 1983a, Wrangle *et al.* 1978 et 1984). Parmi celles-ci la plus efficace est la trypsine.

Il est connu que le mérorécepteur n'est pas retenu sur la DNA-cellulose et ceci explique l'échec de la chromatographie sur la dernière colonne de DNA cellulose dans notre protocole.

L'apparition du mérorécepteur est probablement due à la nature chimique de la phosphocellulose. En effet, celle-ci porte une forte concentration en charge ionique, entraînant ainsi une transformation du récepteur similaire à celle obtenue par augmentation de la force ionique. Des enzymes endogènes peuvent être activés sous le même effet et provoquer ainsi une dégradation du récepteur aboutissant ainsi au mérorécepteur. Nous en avons conclu que même si la phosphocellulose élimine la majeure partie des protéines, elle a indiscutablement un effet néfaste sur le récepteur.

Nous avons donc éliminé la phosphocellulose de notre protocole et l'avons remplacée par l'Ultrogel sDNA, support contenant du DNA monocaténaire. Une étude comparative entre l'Ultrogel sDNA et la DNA-cellulose a montré que celle-ci était plus spécifique.

### 5.3. Protocole retenu pour la purification du récepteur transformé.

Dans la perspective d'améliorer notre protocole, une étude comparative entre deux cytosols préparés l'un, dans un tampon Hepes et l'autre dans le tampon Tris-HCl a montré qu'en présence de ce dernier, le pH variait moins et l'activité du récepteur après incubation avec l'hormone était plus élevée. L'addition d'un inhibiteur de protéases (PMSF) s'est montrée utile. La filtration du cytosol à travers la colonne d'Ultrogel n'a pas eu de conséquence directe sur le taux de purification ; au contraire, on assiste à un phénomène de dilution. Néanmoins, cette étape reste nécessaire puisqu'elle contribue à l'élimination de protéines et enzymes.

Parallèlement au déroulement de la manipulation, nous avons vérifié à chaque étape que le matériel injecté et sur la colonne

d'Ultrogel et sur celle de DNA-cellulose correspondait bien aux forme du récepteur qu'on devrait déposer. Ces contrôles ont été réalisés grâce à une colonne de gel-filtration en HPLC (TSK G3000). La figure 13 montre le profil de fractionnement obtenu pour les deux types du récepteur. Nous avons ainsi eu la confirmation que la forme du récepteur qui s'adsorbe sur la DNA-cellulose (figure 14) est représentée essentiellement par la forme transformée du récepteur. Le taux de purification obtenu par ce protocole est de 52 fois. L'utilisation par la suite de deux colonnes de DNA-cellulose nous a permis d'améliorer ce chiffre qui a atteint 100 fois.

Il a été décrit par Simons *et al.*, 1983, Wrange *et al.*, 1979 que l'efficacité de liaison du récepteur des glucocorticoïdes sur la DNA-cellulose après l'activation thermique était de l'ordre de 30-50 %. Sur les causes de cette fixation limitée, les avis sont partagés entre une dégradation du récepteur et une limitation dans l'étape d'activation. Govindan et Gronemeyer (1984) ont pris position en faveur de cette 2ème hypothèse en montrant qu'une deuxième activation permettait d'augmenter le taux des complexes activés d'au moins 6 %.

Cela peut expliquer en partie nos résultats très modestes, mais ne suffit pas expliquer la différence qui existe entre les résultats décrits dans la littérature. Cependant, les moyens mis en oeuvre ne sont pas les mêmes. L'exemple d'Eisen est assez significatif. Ce dernier utilise en première étape une colonne de DNA-cellulose de 150 ml pour seulement 20 ml de cytosol. Quand on sait le rôle capital que joue cette étape dans la purification, on comprend pourquoi il a pu obtenir un taux de purification de 11000. En effet, l'intérêt de la méthode réside en grande partie dans cette étape. Un grand volume de DNA-cellulose et donc une grande surface de contact offre la possibilité à toutes les protéines, même celles ayant une faible affinité pour le DNA de se fixer sur le support. Donc, logiquement, seul le récepteur se fixera en deuxième étape après son activation.

Néanmoins, nous avons montré que la purification du récepteur était possible même à partir de faibles volumes du cytosol (10 ml), et en utilisant seulement deux étapes, alors par exemple que Govindan et Gronemeyer 1984 sont partis de 300 ml de cytosol, et leur protocole comportait cinq étapes.

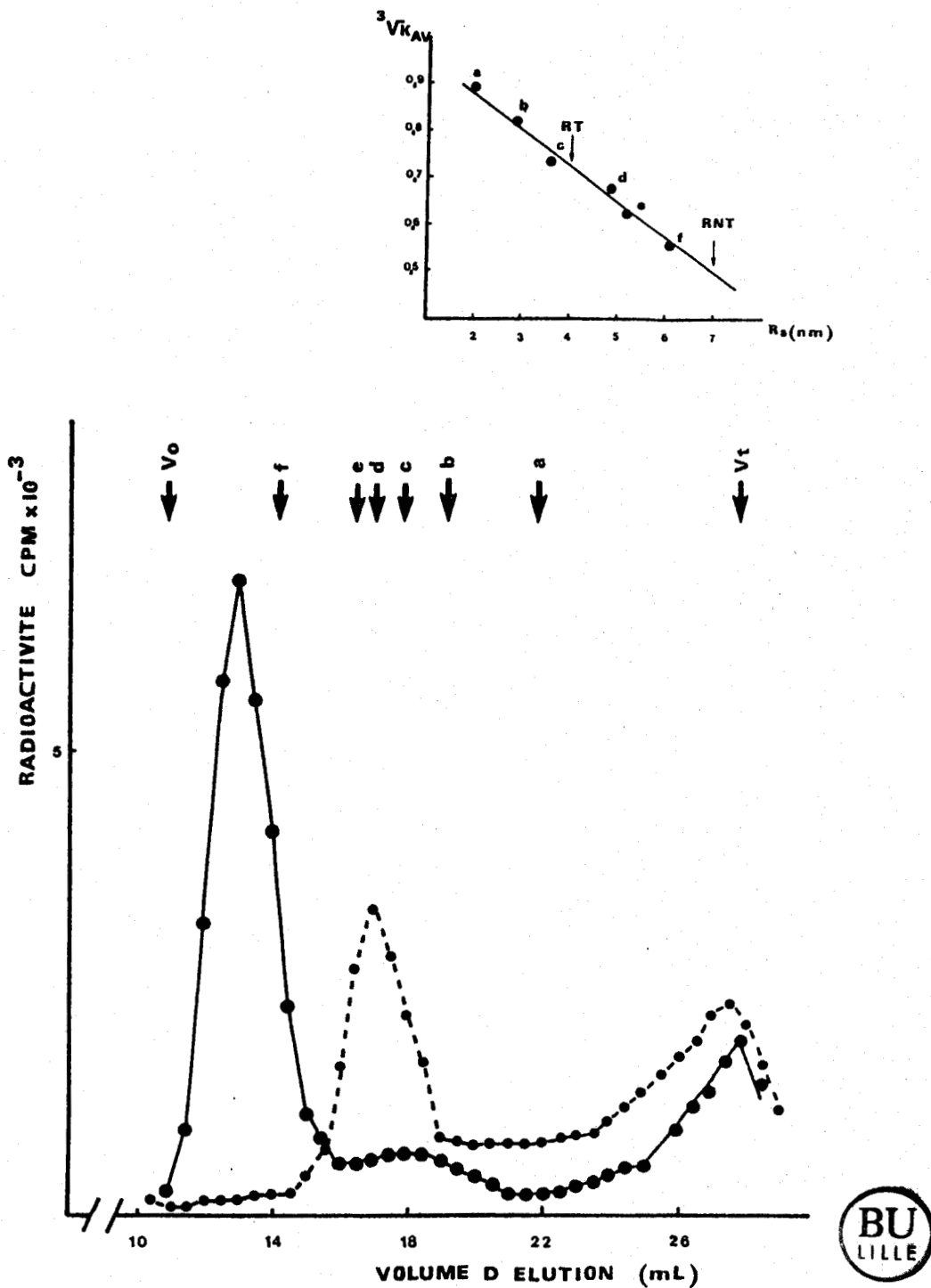


Figure 13 - Chromatographie de gel-filtration en HPLC ;  
contrôle analytique du récepteur transformé et non transformé.

Deux aliquotes (200  $\mu$ l) du volume exclu de la colonne d'Ultrogel sDNA, le premier avant la transformation (●—●) et le second après la transformation (●---●) sont déposés sur la colonne de gel-filtration TSK G3000 SW équilibrée dans un tampon Tris-HCl 20 mM contenant du molybdate et un réducteur des thiols.

$V_0$  et  $V_t$  représentent respectivement le volume exclu et le volume total de la colonne. La calibration est obtenue en utilisant :  
a) chymotrypsine (2 nm), b) l'ovalbumine (2,9 nm),  
c) l'albumine (3,6 nm), d) l'aldolase (4,8 nm), e) la catalase (5,2 nm)  
f) la ferritine (6,1 nm).

RT : récepteur transformé  
RNT : récepteur non transformé



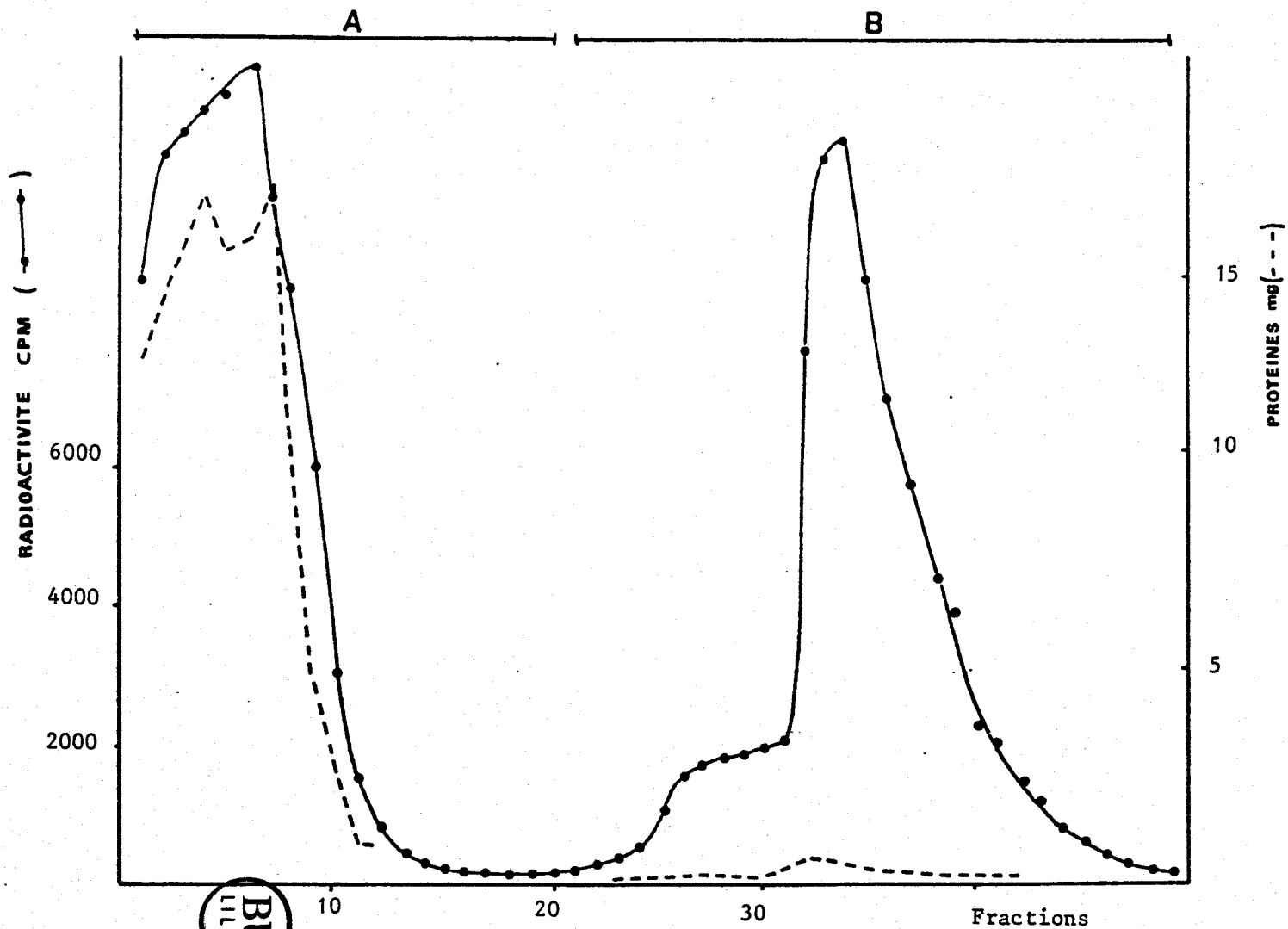


Figure 14 - Profils de lavage et d'élution de la colonne de DNA-cellulose et du dosage des protéines.

Un volume (9,5 ml) de cytosol incubé avec l'Acétonide de Triamcinolone marquée au  $^3\text{H}$  ( $^3\text{H TA}$ ) est appliqué sur la colonne (1,6 x 21 cm) d'ultrogel (10 ml). Le lavage s'effectue immédiatement avec le tampon F, le débit est de 2,5 ml/min, une éprouvette est utilisée pour collecter. Le volume (13,5 ml) récupéré est mis à chauffer à 20°C pendant 30 minutes puis déposé (12,5 ml) sur la colonne (2,5 x 20 cm) de DNA-cellulose (10 ml). L'incubation se fait en batch pendant 3/4 heure. Le lavage est effectué avec le tampon F(A), le débit est de 0,8 ml/min, puis l'élution se fait avec le tampon G (B) avec le même débit. Seule l'étape de DNA-cellulose est représentée sur cette figure.

#### 5.4. Caractérisation du récepteur purifié sous forme transformée

##### 5.4.1. Gel filtration en HPLC et DNA-cellulose

La gel-filtration en HPLC utilisée pour le contrôle de la fraction injectée sur la DNA-cellulose représente un critère de caractérisation du récepteur (figure 13). La DNA-cellulose employée pour la purification permet d'affirmer avec certitude la présence de la forme transformée du récepteur.

##### 5.4.2. Electrophorèse en PAGE/SDS

L'analyse des fractions des différentes étapes de la purification par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu SDS est représentée sur la figure 15. Elle confirme la remarque que nous avons déjà faite, c'est-à-dire que même si on ne purifie pratiquement pas après filtration sur Ultrogel sDNA on a élimination d'une certaine quantité de protéine, elle montre aussi, et d'une manière claire qu'au niveau des bandes correspondantes à l'élution de la DNA-cellulose, on a élimination d'une quantité très importante de protéines, mais si on les compare à la bande du récepteur non transformé purifié par chromatographie d'affinité, on voit qu'il nous reste à améliorer notre protocole. Cependant, nous gardons tout espoir, car en effet, même si Eisen prétend atteindre un taux de purification de 11000, son PAGE/SDS ne présente pas de bande 90K.

#### 6. Conclusions

Pour éviter la dégradation du récepteur, nous sommes convaincus que des filtrations rapides dans la première colonne de DNA-cellulose et des incubations moins prolongées dans la seconde sont d'une importance capitale.

Nous sommes arrivés, au vu des résultats du protocole que nous avons mis au point, à la conclusion que pour de petites quantités de cytosol, il faudrait mieux utiliser des colonnes à base de DNA.

La purification du récepteur transformé s'est avérée plus compliquée que nous l'avions supposé au départ, et ceci malgré le fait qu'elle a déjà été étudiée par d'autres auteurs.

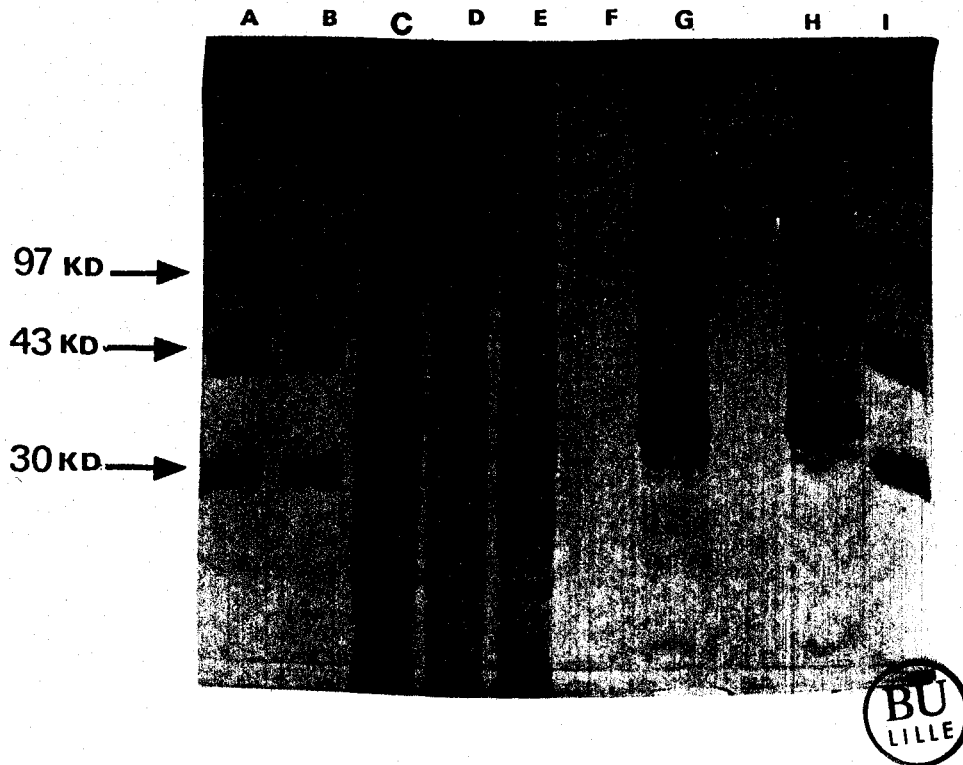


Figure 15 - Analyse des fractions des différentes étapes de la purification par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu SDS dans un gradient linéaire d'acrylamide (5 - 20 %).

A,B,I : Témoin Pharmacia (L.M.W.)

C : Fraction du cytosol de départ

D : Fraction du cytosol recueillie après lavage de l'Ultrogel

E : Fraction du lavage de la DNA-cellulose

F : Récepteur témoin purifié par chromatographie d'affinité

G : Fraction de l'élution de la DNA-cellulose

H : Fraction de l'élution de la DNA-cellulose

## III - AUTRES METHODES ENVISAGEABLES POUR LA PURIFICATION DU RECEPTEUR TRANSFORME.

### - METHODES BASEES SUR LA CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS

Devant les résultats très moyens de la purification sur supports polyanioniques, nous avons le choix entre deux solutions, ou bien persévérer dans la même voie en utilisant des quantités plus importantes de DNA-cellulose que nous avons synthétisée selon la méthode de Moss *et al.* (1981) ou bien alors chercher un autre moyen plus efficace. C'est cette dernière alternative qui a été retenue. En effet, le protocole original mis au point par Marc Denis à Nantes pour la purification du récepteur transformé sur une petite colonne d'échange d'ions en HPLC, se prêtait bien à notre intention de développer une méthode de purification rapide, efficace, et qui permettrait surtout de récupérer une quantité importante du récepteur. Nous avons à notre disposition une colonne DEAE-HPLC préparative, elle a été utilisée à cet effet.

Pour argumenter notre choix du système en HPLC par rapport au système conventionnel, nous allons présenter les deux systèmes, et montrer en quoi celui de l'HPLC est plus efficace.

#### A - Chromatographie d'échange d'ions sur supports conventionnels.

Le processus d'échange d'ions est largement gouverné par les interactions électrostatiques. Le mécanisme de séparation est ionique. La phase stationnaire présente des sites ioniques qui attirent les molécules ionisées. La phase mobile doit être aqueuse. Les molécules non ioniques ne sont donc pas retardées par la phase stationnaire et sortent en premier. Les protéines se fixent sur les échangeurs d'ions équilibrés contre des tampons de faible molarité et de pH supérieur ou inférieur à leur point isoélectrique suivant que l'on a affaire à des échangeurs d'anions ou de cations.

### 1) Supports

Les supports qui sont d'usage commun sont la cellulose et le dextran (Sephadex). Les deux types les plus couramment utilisés sont la DEAE (Diéthylamineéthyl) comme échangeur d'anions et le carboxyméthyl (CM) comme échangeur de cations (Tableau III).

Ces supports présentent des propriétés remarquables qui se manifestent essentiellement par la nature hydrophilique et par une bonne porosité de la matrice de cellulose. En effet, ils permettent de réaliser des fractionnements des protéines de haut poids moléculaire avec une résolution appréciable. Dans le cas des récepteurs des glucocorticoïdes, ils se sont montrés très utiles et ils ont permis de réaliser surtout des études qualitatives.

### 2) Résultats

L'intérêt de cette technique réside dans la possibilité qu'elle offre de pouvoir séparer sur la même colonne et au cours d'une seule procédure chromatographique les deux formes du récepteur, et ceci à l'aide d'un gradient de concentration en sel. La forme transformée du récepteur est éluée à une force ionique moins élevée que la forme non transformée. Cette technique a été essentiellement utilisée dans les caractérisations à la fin de la purification (Hackey et Pratt, 1971 ; Litwack *et al.* 1973 ; Wrange *et al.* 1979 ; Okret *et al.* 1981, Schmidt *et al.* 1985 ; Govindan et Gronemeyer 1984). Elle a aussi servi d'étape intermédiaire de la purification (Atger et Milgrom, 1976 ; Westphal et Beato, 1980). Certes, c'est une technique qui a contribué à la purification (taux faible 10 à 20 fois), mais son utilisation reste limitée, à cause de sa capacité moyenne, de la limitation de débit qu'elle présente, et aussi de la faible spécificité qu'elle offre aux complexes hormone-récepteur transformés.

SUPPORT	DESIGNATION USUELLE	GROUPEMENT ECHANGEUR D'IONS	CAPACITE d'ECHANGE mEq/g	pK
QAE-cellulose	QAE aminoethyl quaternaire	$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagdown \\ \text{(Sephadex) - O-CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+ \text{ - CH}_2\text{CH(OH)CH}_3 \text{ Cl}^- \\ \diagup \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$	0,55 ± 0,1	fortement basique
DEAE-cellulose	DEAE dithylamino - éthyle	$\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagdown \\ \text{(Sephadex) - O-CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+ \text{ - H Cl}^- \\ \diagup \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$	0,7 ± 0,1	9,5
CM-cellulose	CM-carboxyméthyle	(Sephadex) - O-CH <sub>2</sub> COO <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>	0,7 ± 0,1	4

TABLEAU III - Données théoriques relatives aux supports échangeurs d'ions



## B - Chromatographie d'échange d'ions à haute performance

La chromatographie d'échange d'ions à haute performance (HPIEC) représente l'une des techniques les plus récentes qui ont ouvert la voie à de nouvelles possibilités pour la séparation de mélanges protéiques. En effet, avec l'apparition sur le marché de nouveaux supports, l'HPIEC à côté de la chromatographie de gel-filtration à haute performance, connaît un développement considérable.

Le nombre de publications décrivant l'utilisation de l'HPIEC ne cesse de croître. La plupart des auteurs n'hésitent pas à montrer leur satisfaction de la rapidité et surtout de la possibilité qu'offre cette technique de récupérer les constituants à l'état natif et avec une activité biologique intacte.

### 1) Supports

Il y a quelques années, la chromatographie liquide à haute performance a été réservée seulement aux séparations de petites molécules. Elle utilisait des phases stationnaires apolaires de type hydrocarboné greffé sur la silice. Pour réaliser l'élution, il suffisait de jouer sur la polarité de la phase mobile. Mais le grand intérêt de ces supports réside dans la granulométrie fine des billes et le petit diamètre des pores. En effet, cela a pour conséquence directe d'augmenter au maximum les surfaces d'échange entre la phase mobile et la phase stationnaire et de diminuer l'épaisseur du film de ces phases, ce qui offre la possibilité à un échange rapide. La résistance mécanique des petites particules permet de travailler à des pressions élevées, donc à débit élevé, d'où un temps réduit de chromatographie. La taille des particules permet aussi d'avoir un grand nombre de plateaux par mètre de gel ; cela augmente considérablement la capacité de la colonne et améliore nettement sa résolution. L'amélioration conjointe de ces paramètres a eu pour conséquence de faire avancer d'une manière spectaculaire les études sur les petites molécules biologiques.

Malheureusement, ce type de support ne pouvait être appliqué à l'étude des macromolécules biologiques, et cela à cause de leur taille . D'autre part, à l'élution, les solvants plus ou moins polaires entraînaient la dénaturation des protéines. Donc, le problème essentiel qui a été posé concerne à la fois la porosité et l'inertie du gel.

Pour remédier à ces carences et permettre le fractionnement de polymères hydrosolubles sur une phase stationnaire rigide de type silice, Chang et Regnier (1976) ont pu établir que le greffage sur le gel des fonctions capables de supprimer l'adsorption des molécules due aux silanols ( $\equiv\text{Si} - \text{OH}$ ) du support permettait de rendre la phase stationnaire polaire et pratiquement inerte vis-à-vis des macromolécules. (figure 16).

En pratique, cela a d'abord été réalisé pour la chromatographie d'exclusion de taille. Les supports utilisés à cet effet sont de type diols obtenus par greffage de la silice avec un agent tel que le -glycidoxypropyltriméthoxysilane. Mais le point important qui a conditionné la réussite de ces gels était les progrès réalisés par la suite dans la porosité du gel. En effet, devant les résultats décevants obtenus avec des billes ayant des pores d'un diamètre de  $60 \text{ \AA}$ , les auteurs se sont orientés vers l'utilisation de billes à pores plus grands, d'un diamètre d'environ  $300 \text{ \AA}$ .

Pour la chromatographie d'échange d'ions à haute performance, le diamètre des pores était aussi important, car pour exploiter aussi le volume interne des billes pour les échanges, il fallait que ce diamètre soit suffisamment large pour permettre aux macromolécules d'y pénétrer, ce qui abouti à une augmentation de la résolution. Mais avant de s'attaquer à ce problème, les auteurs ont eu à résoudre celui de la synthèse d'un gel d'échange d'ions et c'est seulement après sa mise au point, qu'ils ont pu le tester sur des gels ayant une porosité différente. Ainsi, les travaux d'Alpert et Regnier (1978) ont été à l'origine de la mise au point d'un support à base de silice échangeuse d'anions.

Ces auteurs ont montré que la polyéthylèneimine dissoute dans une solution méthanolique était fortement adsorbée à la surface de la silice, et qu'après lavage abondant avec le méthanol, la polyamine





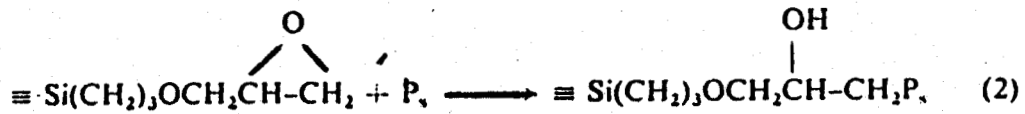
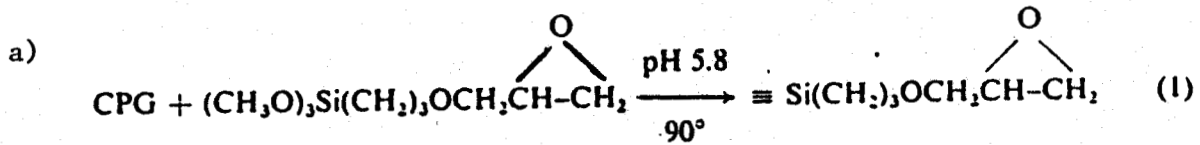
fixée sur le support est réduite à une seule couche, et qu'enfin l'utilisation d'un oxiranne bifonctionnel permet de réaliser le pontage entre les polyamines (figure 17 ). Le support obtenu est très stable et les groupements fixés ne peuvent être désorbés au cours de la procédure expérimentale. De ce fait, la surface est rendue polaire et pratiquement inerte et ayant une forte capacité d'échange d'ions.

Cette technique a été utilisée par Vanecek et Regnier (1980 et 1981) pour préparer des supports HPIEC ayant des pores de tailles différentes (1000 à 4000 Å) et greffés avec des polyamines de différents poids moléculaires (300 à 1800 daltons). Les résultats obtenus suggèrent que la surface disponible à l'échange, donc la grande taille des pores, avait une grande influence sur la résolution.

Cependant, on ne peut sans cesse augmenter le diamètre des pores, car à partir d'une certaine limite, on commence à diminuer la surface active, ce qui entraîne une perte de capacité et une diminution de la résistance mécanique des billes du gel. Un compromis est réalisé pour des diamètres allant de 200 à 1000 Å, et permet la séparation des protéines ayant un poids moléculaire allant jusqu'à 100 000 daltons. Pour les protéines allant jusqu'à 400 000 daltons, il est plus judicieux de prendre des supports de 4000 Å de diamètre de pores.

Nous disposons actuellement dans le commerce de ces divers types de supports avec des porosités différentes. Ainsi, il y a 5 ans, Pharmacia (1982) lance un polymère organique hydrophile (monobeads) présentant peu de résistance au débit et possédant une bonne capacité d'échange d'ions.

En 1982 encore, Toyosoda a proposé sur le marché des supports d'une efficacité remarquable. Ils existent en échange d'ions et en gel-filtration ainsi qu'en chromatographie hydrophobe. Probablement pour des raisons de protection commerciale, les fabricants n'ont pas publié la structure de ces supports, mais nous pensons que soit il s'agit d'une structure similaire à celle proposée dans la figure 17, ou bien une autre présentée sur la figure 18, où le principe est similaire à celui proposé pour la gel-filtration. Seulement, ici il y a arrêt au stade de l'époxyde et fixation à ce niveau du groupement fonctionnel, échangeur d'ions, par exemple le diéthylaminoéthanol,



b)

n°	Formules des groupements échangeurs d'anions P <sub>S</sub>	Désignation usuelle	Abréviation
1	-N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Diéthylamine	DEA
2	-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Diméthylaminoéthanol	DMAE
3	-OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Diéthylaminoéthanol	DEAE
4	-(NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	Polyéthylèneimine	PEI

Figure 18 - Préparation d'un support d'échange d'ions selon Chang *et al.* (1976)



- a) Réaction de greffage du 8-glycidoxypropylméthoxysilane (C.P.G.) sur support de silice (1).  
 Réaction de fixation du groupement fonctionnel échangeur d'anions (P<sub>S</sub>) sur le deuxième époxyde (2).
- b) Tableau présentant des exemples de différents groupements fonctionnels échangeurs d'anions.

Les supports proposés pour l'HPIEC sont de deux types :

- Supports inorganiques à base de silice
  - . DEAE-2-SW.TSK
  - . DEAE-3-SW.TSK
- Supports organiques à base de polymère
  - . DEAE-5-PW.TSK

Le diamètre des pores qu'offrent les polymères de 1000 Å pour la DEAE-5-PW, au lieu de 125 Å pour la DEAE-2-SW et 250 Å pour la DEAE-3-SW a pour résultat d'augmenter la surface d'échange interne aux billes. De ce fait, la résolution des grosses molécules est améliorée. Cependant, la résistance mécanique est diminuée par rapport aux billes de la silice, et l'on est obligé de travailler à basse pression. La taille des particules pour la DEAE-2-SW est de 5 µm alors qu'elle est de 10 µm dans le cas de la DEAE-3-SW et de la DEAE-5-PW. Ce paramètre se répercute directement sur le nombre de plateaux théoriques et l'on a ainsi 5000 plateaux par colonne pour la DEAE-2-SW et seulement 2000 pour la DEAE-3-SW et 1300 pour la DEAE-5-PW. Cela aurait eu pour conséquence d'augmenter considérablement la capacité d'échange d'ions de la colonne ayant des particules de 5 µm, où celle-ci n'est que de 1,79 ± 0,22 mEq pour toute la colonne alors qu'elle est de 4,73 ± 0,43 mEq pour la DEAE-3-SW et de 3,13 pour la DEAE-5-PW ; une explication à cela suggère que dans le cas des petites billes seule la surface est greffée. D'autre part, la différence qui existe entre les deux dernières colonnes serait probablement due au nombre de plateaux théoriques plus élevé dans la DEAE-3-SW. (TABLEAU IV).

Enfin, un point important qui sépare les supports à base de silice et ceux à base de polymères est celui de la zone de pH utilisable. En effet, l'un des grands avantages des supports organiques est de permettre de travailler dans une gamme de pH très large (2-12) par rapport aux supports à base de silice, où là, il ne faut surtout pas dépasser un pH 7-7,5, car sinon cela entraînerait la dissolution de la silice.

Le support proposé par Pharmacia MonoQ est à base de polymère organique, mais diffère de celui proposé par Toyosoda par la fonction

TYPE DE COLONNE	DEAE-5-PW	DEAE-2-SW	DEAE-S-SW
diamètre des pores A	1000	125	250
Taille des particules $\mu\text{m}$	10	5	10
Nombre de plateaux théoriques par colonne	1300	5000	2000
Capacité d'échange d'ions mEq	3,13	1,79 $\pm$ 0,22	4,73 $\pm$ 0,43

TABLEAU IV - Caractéristiques des colonnes de DEAE en HPLC.



amine quaternaire fixée sur le support, ce qui explique d'ailleurs sa forte rétention et sa meilleure résolution pour les macromolécules biologiques.

Le succès actuel de la chromatographie à haute performance est à mettre aussi au crédit de l'augmentation nette de l'efficacité par rapport à la chromatographie sur support conventionnel. En théorie, ceci s'explique par la notion du nombre de plateaux théoriques (N). En effet, ce nombre mesure l'aptitude d'une colonne à limiter l'étalement des pics. N est une fonction du temps de rétention ( $t_R$ ) du pic sur la colonne et de la largeur à mi-hauteur (S) de ce dernier.

$$N = 5,54 (t_R/S)^2$$

Plus le nombre de plateaux est grand, et plus S est petit, donc meilleure est la résolution. Ceci est lié à la granulométrie. Plus le diamètre des particules est petit, plus le nombre de plateaux par mètre sera grand, et plus l'échange entre phase stationnaire et phase mobile augmente par diminution de la résistance au transfert de charge entre phases, et surtout par diminution du trajet à parcourir pour aller d'une phase à l'autre. Pour les petites molécules, nous avons déjà évoqué l'effet très spectaculaire que cela provoque. Pour les macromolécules, l'effet est important mais moins spectaculaire, car celles-ci diffusent plus lentement.

## 2) Résultats

Nous donnerons dans un premier temps quelques exemples de l'utilisation de l'HPIC dans la purification de certaines protéines, et nous montrerons par la suite son application à l'étude des récepteurs des glucocorticoïdes.

Récemment, Nilsson et Belfrage (1986) ont décrit une méthode de purification par les colonnes Mono Q et Mono S d'un enzyme lipase hormono-sensible. L'activité de cet enzyme, située dans le tissu adipeux détermine le taux d'hydrolyse des Triacyl-glycérols. Si ces auteurs se sont tournés vers les méthodes à haute performance, c'est qu'apparemment, ils étaient déçus comme nous par les méthodes de

purification classiques. Ils ont ainsi mis l'accent sur la rapidité de la procédure chromatographique (une journée au lieu de cinq jours) et aussi de la qualité des séparations. De même Mansson *et al.* (1985) ont appliqué la colonne Mono Q à la séparation des gangliosides membranaires en mono-di-tri et tétrasialo gangliosides. Ces auteurs ont clairement montré l'intérêt de cette colonne par rapport aux supports classiques. Ainsi, ils ont établi que la capacité de charge dans la Mono Q était de 25  $\mu$ moles de gangliosides - Neu-Ac. par ml de résine, alors que pour la DEAE-sépharose elle n'est que de 2-2,5  $\mu$ moles/ml (Iwamori et Nagai, 1978). Ils ont aussi mis en avant le caractère rapide de la procédure et la possibilité de travailler à débit élevé (1-4 ml/min).

D'autre part, Ikigai *et al.*, 1985 ont utilisé deux colonnes échangeuses d'ions TSK-DEAE-5-PW analytique et préparative pour analyser les protéines extrinsèques membranaires d'E.coli K12 et intrinsèques des érythrocytes humains en présence d'un facteur non ionique. Les résultats rapportés par cette étude montre d'une part l'avantage qu'apporte l'HPIEC au niveau de la résolution des protéines et d'autre part qu'on pouvait gagner beaucoup de temps dans la procédure chromatographique.

Kato *et al.*, 1985 en utilisant une colonne analytique TSK-DEAE-5-PW, ont comparé l'HPIEC à l'isoélectrofocalisation dans la séparation des protéines. Ils ont ainsi pu établir que l'HPIEC pouvait être plus intéressante de par sa rapidité, sa facilité, sa reproductibilité et la possibilité qu'elle offre de récupérer la protéine dans un état natif après la séparation. En conséquence, elle peut être employée avec succès comme alternative à l'électrophorèse sur gel dans les séparations analytiques et préparations des protéines. Mais il n'en reste pas moins que les deux méthodes sont complémentaires.

Nous remarquons simplement que ces auteurs sont les fabricants du gel et qu'il va de leur intérêt de montrer ses performances. Pour cela ils utilisent des protéines commercialisées à l'état pur, alors que pour des auteurs qui cherchent à purifier une protéine plus ou moins inconnue comme cela est notre cas, le problème est posé différemment. C'est pourquoi nous allons voir en quoi ces gels peuvent être utiles pour l'étude des récepteurs des glucocorticoïdes.

Pour cela nous allons procéder à une illustration par comparaison entre un support conventionnel et un support en HPIEC. La figure 19 montre un exemple d'élution réalisée sur deux types de supports, l'un en HPLC (Idziorek, 1985) et l'autre sur gel conventionnel (Schmidt *et al.* 1985). Dans les deux cas de figure, le récepteur hautement purifié sous forme non transformée en présence du molybdate a été partiellement transformé après élimination de ce dernier. Idziorek (1985) réalise la transformation dans la colonne après élimination du molybdate par lavage avec un tampon phosphate qui n'en contient pas. Schmidt (1985) enlève le molybdate par filtration rapide sur une colonne de gel-filtration, transforme le récepteur puis l'injecte sur la DEAE-cellulose. Le récepteur transformé est élué en début du gradient alors que le récepteur non transformé est élué à force ionique plus élevée. La présence des deux formes du récepteur est due à une transformation partielle.

Nous remarquons que le pic qui correspond à l'élution du récepteur transformé sur la DEAE-HPLC est beaucoup plus fin que celui de la DEAE-cellulose. En effet, sur celle-ci l'activité de liaison s'étale sur 7 fractions de 1 ml avec un sommet du pic qui représente 15 % de l'activité éluee dans 1 ml. Alors que dans la DEAE-HPLC l'activité de liaison est récupérée dans 3 fractions de 0,5 ml avec 60 % de l'activité éluee dans seulement une fraction de 0,5 ml. L'analyse du pic du récepteur non transformé confirme ces résultats, mais à un degré moindre.

Un autre exemple plus spectaculaire est proposé sur la figure 19 (Idziorek, 1985). Le complexe hormone-récepteur hautement purifié sous forme non transformée, obtenu après gel-filtration en HPLC a été chargé sur une colonne de DEAE (TSK 545 DEAE, LKB) équilibrée dans un tampon phosphate 80 mEq contenant des réducteurs de thiols et du molybdate. Le récepteur est élué par un gradient linéaire de chlorure de potassium 0-0,5M. Le pic du récepteur obtenu est très étroit et plus de 50 % de la radioactivité liée est retrouvée dans une seule fraction de 0,5 ml sur un gradient comportant 40 fractions.

Ces exemples sont parfaitement révélateurs de l'amélioration nette issue de la convergence des modifications portées sur trois paramètres conjointement, il s'agit de la capacité, de l'efficacité



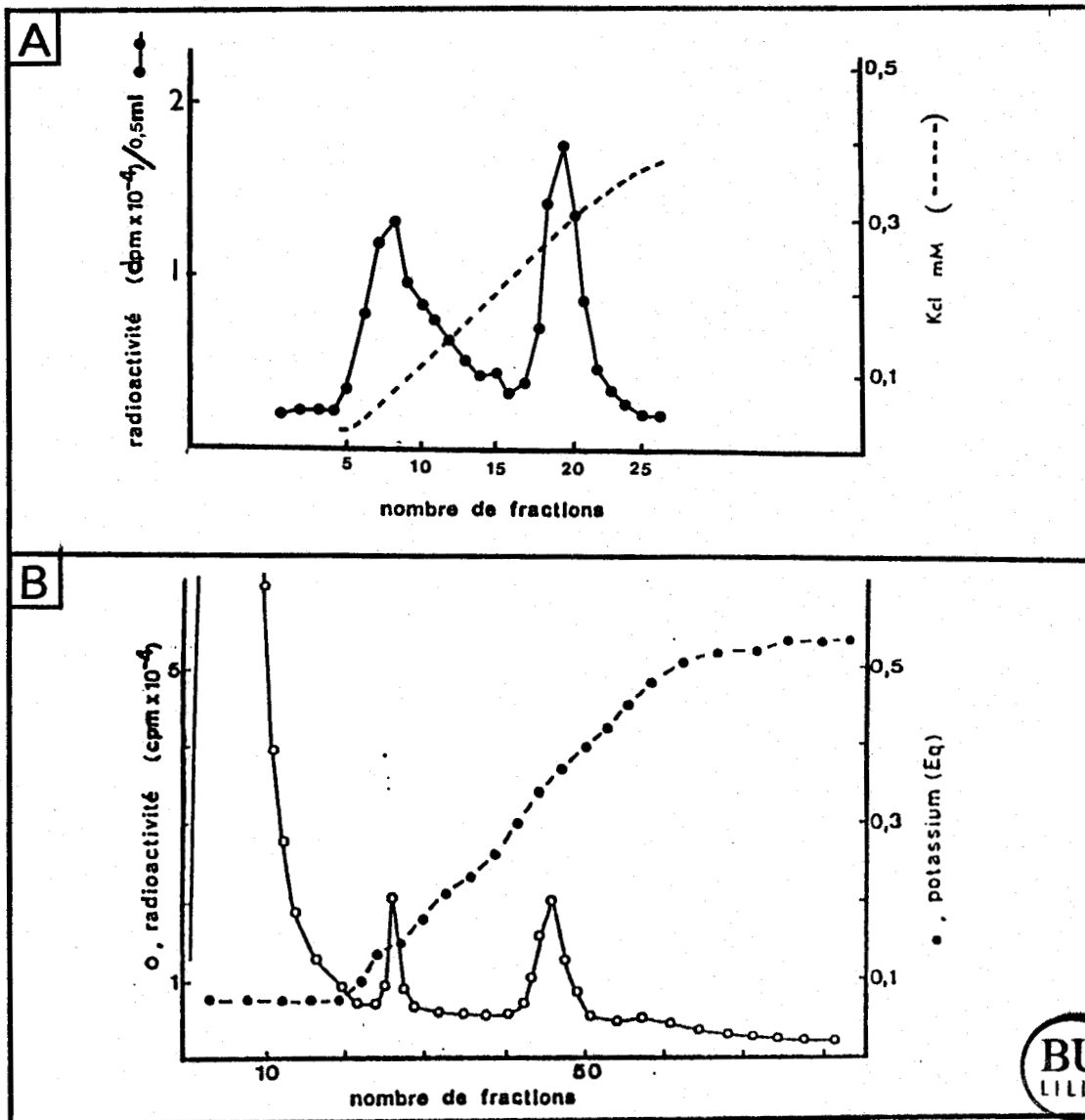


Figure 19 - Chromatographie d'échange d'ions : comparaison entre support conventionnel et support en HPLC.

**A** Chromatographie du récepteur purifié sur DEAE-cellulose  
(Schmidt *et al.*, 1985)

Un aliquote (1 ml) de l'éluat filtré sur une colonne de gel-filtration pour enlever le molybdate, puis transformé est injecté dans une colonne de DEAE-cellulose (3 ml) équilibrée dans le tampon phosphate 50 mM pH 7. Après lavage avec le tampon phosphate 5 mM, l'éluat est réalisé par un gradient linéaire 5-400 mM KCl. 30 fractions de 1 ml sont éluées et un aliquote de chaque fraction prélevé pour le dosage de la radioactivité.

**B** Chromatographie du récepteur hautement purifié sur DEAE-HPLC

Un aliquote de 500  $\mu$ l de l'éluat dilué quatre fois dans un tampon phosphate 20 mM pH 7,4 est injecté sur la colonne DEAE 545 LKB équilibrée dans le tampon phosphate 50 mM pH 7,4. Après un lavage de 20 minutes, qui permet d'éliminer l'excès de stéroïde libre et la transformation car le tampon ne contient pas de molybdate, l'éluat est effectuée contre un gradient linéaire de KCl 0-0,5 M dans le tampon. Le débit est de 0,5 ml  $\times$  min<sup>-1</sup>. Des fractions de 0,5 ml sont collectées et des aliquotes de 50  $\mu$ l de chaque fraction sont analysés pour le dosage de la radioactivité.

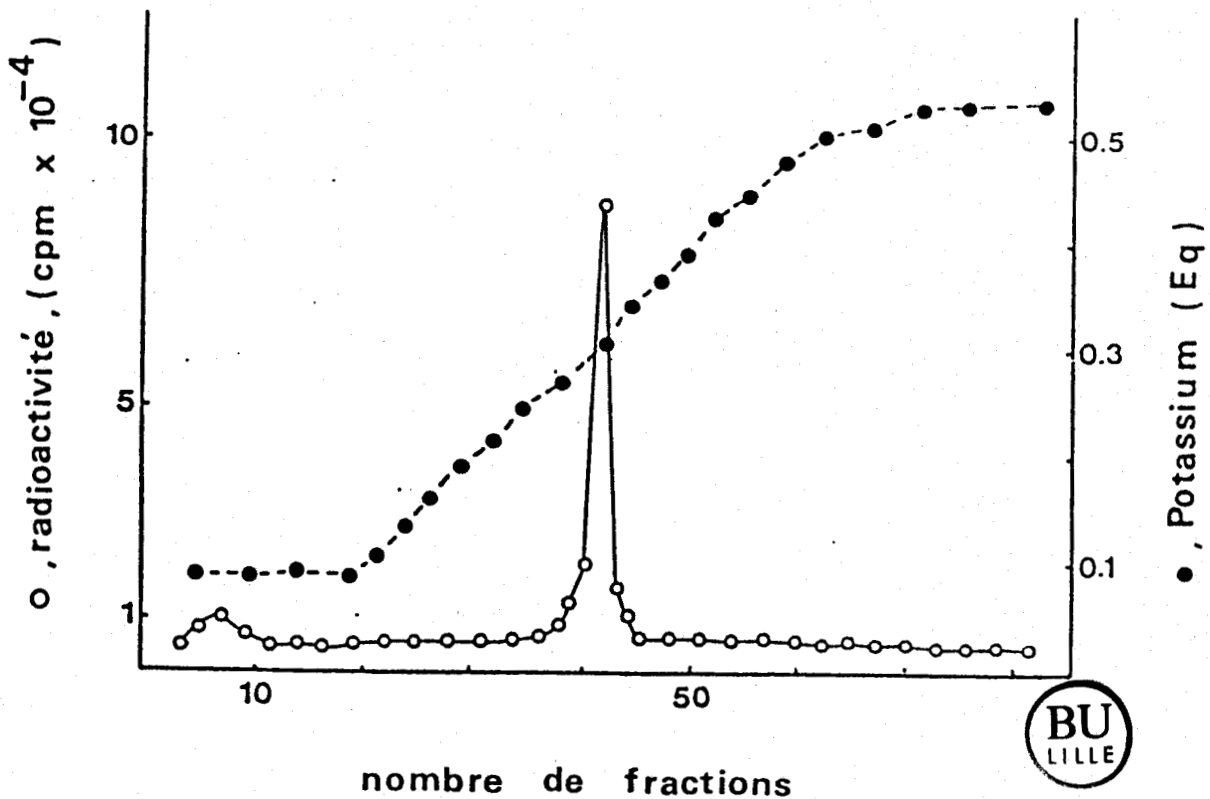


Figure n° 20 : Chromatographie d'échange d'ions en HPLC. (Idziorek 1985)  
 Un aliquote ( 500  $\mu$ l) du récepteur hautement purifié obtenue après chromatographie de gel filtration en HPLC est dilué quatre fois avec du tampon phosphate 10 mM pH 7,4 puis chargé sur une colonne DEAE 545 LKB équilibrée dans le tampon phosphate 50 mM contenant du molybdate et des réducteurs de thiols ,pH 7,4 à 0°C. Après 20 min de lavage ,l'élution est effectuée avec un gradient linéaire de KCl 0-0,5 M. Le débit est de 0,5 ml.min<sup>-1</sup> . Des fractions de 0,5 ml sont collectées et 50  $\mu$ l de chaque fraction sont analysées pour le dosage de la radioactivité et du potassium.

et la résolution. En effet, la capacité du support utilisé DEAE-HPLC (TSK-DEAE 3 SW) est de 0,3 mEq de groupements fonctionnels greffés par gramme de gel de silice, le nombre de plateaux théoriques est d'environ 17000/m et la taille des particules est de 10  $\mu\text{m}$ . Tout cela traduit la forte efficacité et donc un pic très fin. Pour situer un ordre d'idée de la différence qui existe avec la DEAE-cellulose, nous signalons que pour celle-ci le nombre de plateaux théoriques n'excède pas 500 par m

Les deux pics obtenus sur DEAE-HPLC sont bien séparés, cela traduit une bonne résolution, notion qui découle de la convergence des 2 paramètres évoqués ci-dessus.

Nous en concluons que trois avantages émergent de cette utilisation : préparation rapide, haute résolution et une importante capacité de charge.

Depuis leur apparition sur le marché, les colonnes DEAE-HPLC n'ont été utilisées qu'à des fins analytiques, pour caractériser le récepteur. Ainsi, Idziorek (1985) l'utilise à la fois pour caractériser le récepteur hautement purifié sous forme non transformée et pour montrer que ce dernier pouvait se transformer en colonne après élimination du molybdate. Il a par ailleurs comparé la force ionique d'éluion du récepteur cytosolique et du récepteur purifié non transformé. Il en déduit que leurs concentrations d'éluion étaient les mêmes.

### 3) Conclusion

Nous avons vu dans ce chapitre que les avantages apportés par l'HPIC étaient énormes. Cela nous a convaincus de l'utiliser pour la purification du récepteur transformé.

### C - RESULTATS PERSONNELS

Pour mettre au point le protocole que nous avons évoqué dans les généralités, nous avons eu recours à trois colonnes à haute performance. Ces colonnes présentent des tailles différentes : d'une part la Mono Q à base de polymère organique contient un volume de 1 ml. D'autre part, les colonnes de DEAE à base de silice contiennent un volume de 6,6 ml pour l'analytique et 54,4 ml pour la préparative. Leur structure est aussi

différente, en effet sur la Mono Q est greffé un groupement ammonium quaternaire basique (QAE) alors que dans la DEAE c'est un groupement amine tertiaire moins basique. Ces supports possèdent une propriété commune, celle d'être des échangeurs cationiques.

Notre première intention était de vérifier que le protocole était bien réalisable et surtout qu'il aboutissait à une purification. La petite colonne Mono Q (1 ml) nous a servi pour cette partie de mise au point. Ensuite, nous nous sommes assurés de la validité du protocole sur les supports DEAE en utilisant d'abord la DEAE analytique, et au vue des résultats nous nous sommes intéressés à la DEAE préparative. Celle-ci a fait l'objet d'une étude en deux étapes, la première a consisté à injecter seulement du cytosol, et la seconde est relative à l'injection d'un extrait du récepteur prépurifié par précipitation au sulfate de protamine.

#### 1) Choix de la méthode à utiliser

Nous avons déjà évoqué les raisons de notre choix, nous signalons simplement que le fait d'être bien équipés en matériel HPLC ne nous a pas fait hésiter pour suivre cette voie.

#### 2) Principe de la méthode

Le principe du protocole que nous allons présenter a été proposé et testé sur le plan analytique par M. Denis à Nantes. Il est basé sur la propriété que possède la DEAE sur gel conventionnel ou en HPLC de pouvoir séparer en même temps les deux formes du récepteur, mais surtout de la possibilité qu'offre la DEAE en HPLC de réaliser la transformation au cours de la procédure chromatographique, et de permettre aux complexes transformés de rester fixés sur la matrice pour être élués par la suite par un gradient de concentration en sel.

L'originalité de l'idée, réside dans la différence de concentration en sel nécessaire à l'éluion de chacune des deux formes du récepteur. En effet, le récepteur transformé est élué à faible force ionique alors que le récepteur non transformé est élué à une concentration en sel plus élevée. L'écart entre les deux concentrations est

d'environ 100mEq. Il est suffisant pour qu'on puisse se placer à une concentration en sel qui serait le milieu de cet intervalle. Cette concentration est celle du tampon utilisé pour équilibrer la colonne puis pour le lavage qui succédera à l'injection du cytosol contenant le récepteur non transformé. Elle sera suffisamment élevée pour éliminer les protéines de la zone d'élution du récepteur transformé, mais pas assez pour décrocher la forme non transformée. Une transformation au cours de la procédure chromatographique permettra de produire la forme transformée du récepteur, et l'établissement du gradient permettra de récupérer à l'état pur, ou tout au moins débarrassée des protéines qui sont susceptibles d'être éluées avec le récepteur transformé et qui normalement, ont été éliminées précédemment.

Pour illustrer cette technique, nous avons reporté sur la figure 21. le profil schématique avec les différentes étapes. Nous distinguons ainsi trois zones correspondant chacune à une étape. La signification de chacune d'entre elles est indiquée dans la légende. L'efficacité de cette technique peut être mieux expliquée en analysant l'influence de chaque étape au niveau de l'élution. Ainsi, sur la figure 22. nous avons représenté à titre comparatif trois profils d'élution qui seraient obtenus si on soumettait l'échantillon présent sur la colonne à une analyse par échange d'ions et ceci à chacune des étapes de la figure 21. Si les fractions de l'effluent recueillies après le lavage de la zone A sont injectées dans une colonne DEAE et soumises immédiatement aux conditions d'élution, nous obtiendrons le premier profil où toutes les protéines sont éluées à une concentration inférieure à celle choisie pour le premier lavage. Si au moment où le premier lavage est terminé on démarre le gradient cela donnerait le deuxième profil où normalement le récepteur est encore élué avec les autres protéines qui n'ont pas été décrochées lors du premier lavage.

La transformation modifie les conditions d'élution du récepteur dont la force ionique d'élution se retrouve diminuée, ce qui l'amène à être élué dans une zone où normalement il ne reste aucune protéine à éluer (3ème profil).

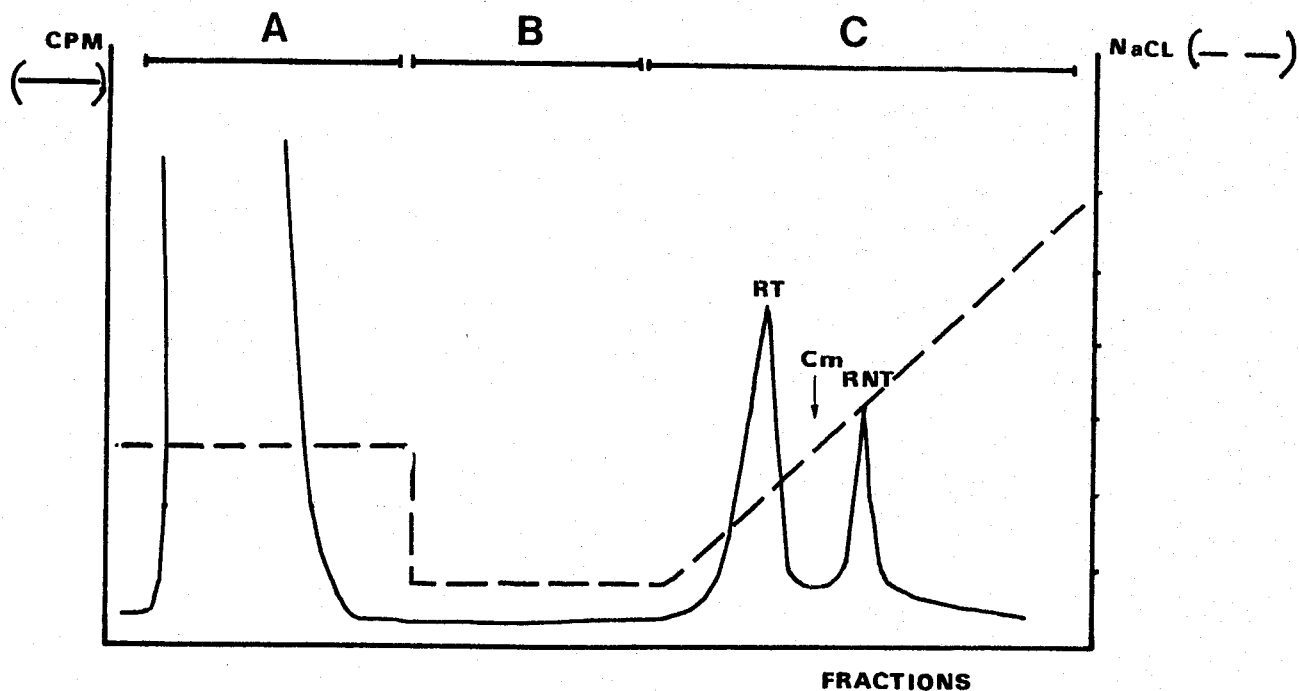


Figure 21 - Principe du protocole de la purification par échange d'ions en HPLC.



- Zone A : lavage avec le tampon de force ionique intermédiaire (Cm) entre celle nécessaire à l'élution du récepteur transformé (RT), et celle qui correspond à l'élution du récepteur non transformé (RNT).
- Zone B : lavage avec le tampon à faible force ionique ne contenant pas de molybdate. C'est l'étape de l'élimination de celui-ci et aussi de la transformation.
- Zone C : Gradient de concentration en sel.

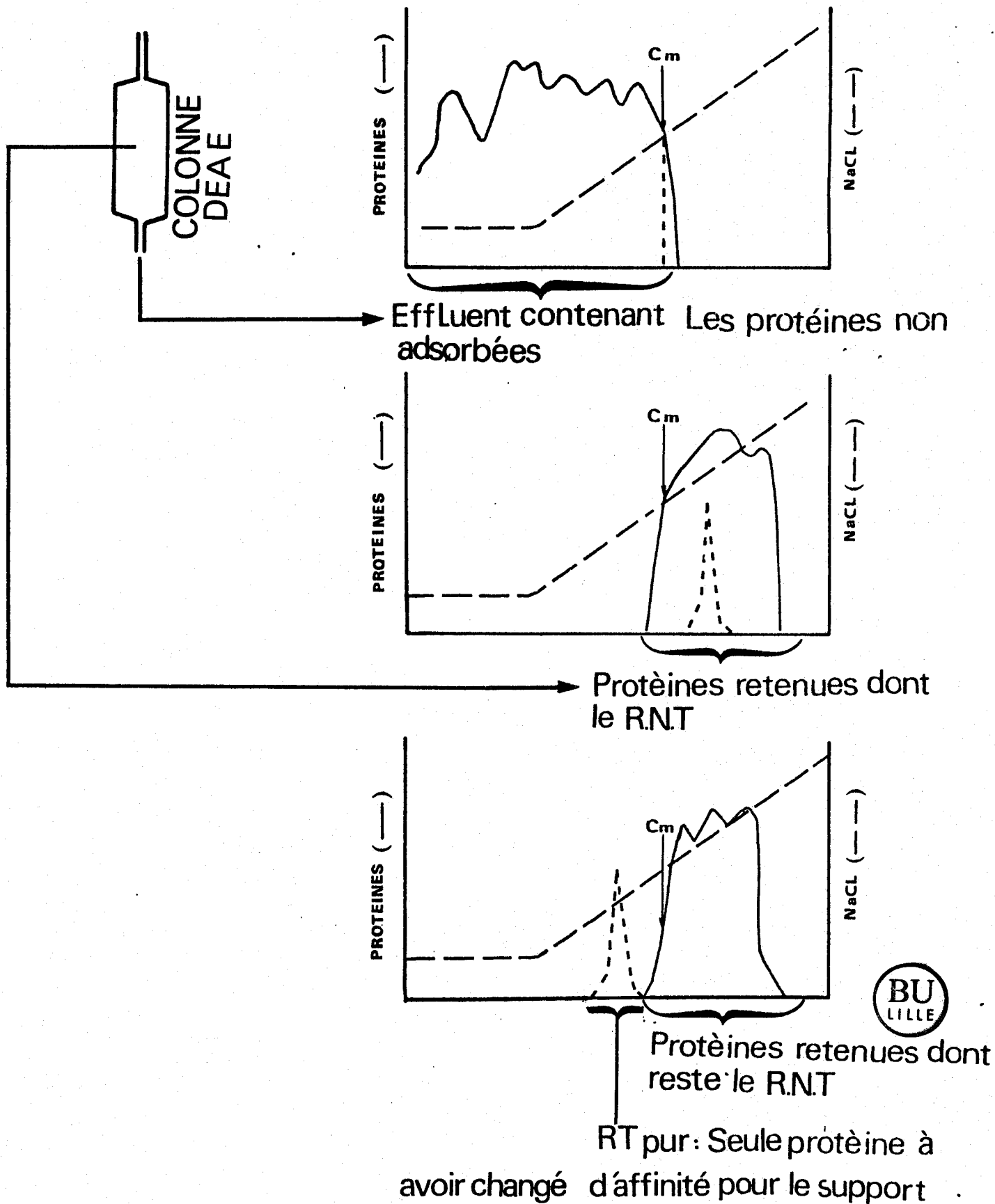


Figure 22.; Profils d'élution qui seraient obtenus si on soumettait l'échantillon présent sur la colonne à une analyse par échanges d'ions et ceci à chacune des étapes de la figure 21. (RT; Récepteur Transformé). (R.N.T: Récepteur non transformé).

### 3) Purification du récepteur transformé

#### Résultats et discussion

##### 3.1 - Source du récepteur

Nous avons commencé notre étude expérimentale par l'application du protocole qui vient d'être exposé, et au vu des résultats nous avons essayé d'optimiser les conditions du lavage, de la transformation et de l'élution. La source de récepteur utilisé à cet effet était soit le cytosol, soit l'extrait du sulfate de protamine. Dans les essais de mise au point du protocole réalisés sur toutes les colonnes, Mono Q, DEAE analytique et préparative, nous n'avons utilisé que du cytosol, puis pour augmenter le rendement de la purification sur la DEAE préparative, nous avons eu recours à l'extrait du récepteur précipité au sulfate de protamine. Il s'agit d'une fraction cytosolique qui a subi une double précipitation, par les sulfates de streptomycine, puis de protamine. La dernière précipitation nécessite l'emploi d'un tampon de forte force ionique pour resolubiliser le récepteur des glucocorticoïdes. Cette technique permet d'avoir un taux de purification moyen compris entre 8 et 10 fois. Si depuis sa mise au point (Govindan *et al.* 1978) elle a été très peu utilisée pour purifier le récepteur transformé, c'est à cause de la concentration élevée en sel du tampon de redissolution 320 mEq/l alors que le récepteur transformé est décroché des colonnes échangeuses d'ions à 180-220 mEq) et aussi de la présence du molybdate qui inhibe d'une manière efficace la transformation. S'agissant de ce dernier point, notre protocole s'en accommode très bien puisqu'il l'élimine après l'étape de lavage.

Par contre, le problème de la force ionique était plus sérieux, il s'agissait en effet d'abaisser la concentration en sel. Pour cela nous avons le choix entre une dialyse à l'équilibre et une dilution de l'extrait. C'est cette dernière solution qui a été retenue car elle est plus simple et plus rapide. Seulement, celle-ci ne pouvait être envisagée directement sur l'extrait car cela provoquerait la précipitation immédiate du sulfate de protamine. Ce problème pouvait être résolu en utilisant deux méthodes. La première proposée par Govindan consiste à incuber en batch l'extrait avec de la CM-sephadex pendant 2 à 3 minutes. Le filtrat est récupéré puis dilué. La



seconde prévoit l'élimination du sulfate de protamine par une filtration rapide sur une colonne de gel filtration ACA 202 (Pharmacia) équilibrée dans un tampon phosphate (320 mEq). L'extrait filtré est ensuite dilué au 3/5 avec un tampon phosphate 20 mEq. Nous avons adopté cette méthode à cause de son usage courant au laboratoire. Pour diminuer le volume à ajouter pour diluer, nous avons diminué la force ionique du tampon qui sert à équilibrer la colonne de gel filtration à environ 260 mEq. L'extrait dilué obtenu est à une concentration en sel de 180-200 mEq. Celle-ci est nettement en dessous de la force ionique nécessaire à l'élution du récepteur non transformé, ce qui permet de l'utiliser pour notre protocole.

### 3.2 - Injection

Une des qualités principales des systèmes d'injection en HPLC est la reproductibilité de l'injection. C'est pourquoi l'appareil utilisé à cet effet est très sophistiqué et ne permet généralement d'injecter que des petits volumes. En effet les vannes conductrices des solutions à l'intérieur de l'injecteur, sont très étroites, et ne permettent la circulation que de petits volumes de solutions limpides ne contenant pas de précipité. A cet égard, il est nécessaire de filtrer les solutions sur des filtres 0,22 à 0,45 $\mu$  avant de les injecter et ceci pour éviter le colmatage de l'injecteur.

L'injecteur que nous avons utilisé est du type U6K de Waters, avec une boucle de 2 ml. Cependant, son application à l'injection du cytosol et de l'extrait du récepteur précipité au sulfate de protamine a posé de sérieux problèmes, surtout pour des volumes relativement élevés.

#### § Cytosol

Le cytosol, surnageant d'ultracentrifugation est très hétérogène et sa teneur en protéines est relativement élevée (25-30 mg/ml). Le volume maximum qu'on peut injecter varie selon la colonne utilisée. Ainsi, pour la Mono Q il est de 1 ml. Pour la DEAE analytique il est de 1,5-2 ml et enfin, il est de 6 à 7 ml pour la DEAE préparative. En effet, ces volumes correspondent à la capacité de charge maximum en protéines des colonnes. Avant de procéder à l'injection, nous prenons soin de mettre en haut des colonnes des filtres de 0,50  $\mu$ m qui assuraient la protection des colonnes et ceci à cause de la fragilité de celles-ci.

D'autre part, nous prenions garde d'utiliser des cytosols limpides, cela afin d'éviter le colmatage du système d'injection. Cette précaution s'est avérée insuffisante pour éviter les problèmes d'injection. En effet, dès qu'on voulait injecter plus de 1 ml de cytosol (DEAE analytique), c'était l'injecteur qui se colmatait ou bien le filtre qui se bouchait. Cela nous obligeait à changer les filtres et parfois de démonter l'injecteur pour le déboucher au cours de la manipulation. Nous avons cherché à résoudre ce problème en filtrant le cytosol sur des filtres Millex 0,22  $\mu\text{m}$ , mais cette solution a été rapidement abandonnée car on perdait la moitié de l'activité de liaison du récepteur.

Dans les meilleures expériences, nous sommes arrivés à injecter 3 ml dans la DEAE préparative et nous étions donc loin de la capacité maximum de la colonne.

A partir de ce moment il fallait chercher un autre moyen pour exploiter toute la capacité de la colonne. Pour cela nous avons choisi d'utiliser l'extrait du récepteur précipité au sulfate de protamine qu'on filtrait et diluait avant de l'injecter dans la colonne.

#### § Extrait du sulfate de protamine

Le taux de protéine à ce stade est d'environ 4-5 mg/ml, donc nous avons la possibilité d'injecter 35 ml. Cependant le problème de l'injection était toujours posé, mais à un degré moindre car on arrivait à injecter plus de volume par rapport au cytosol. Là encore les filtres se bouchaient rapidement, et vu le volume qu'il fallait injecter on était obligé de changer de filtre tous les 2 ml injectés. Le problème était plus sérieux pour l'injecteur puisque le risque d'abimer les valves qui se trouvent au bout de la vanne d'injection était important et ceci à cause du démontage répété de l'appareil. C'est pourquoi, nous nous sommes rendus à l'évidence qu'il fallait utiliser une boucle en plastique en dehors de l'injecteur et qui serait placée entre celui-ci et la colonne. Dans un premier temps, nous avons gardé le filtre en précolonne, malheureusement, pour injecter les 12,5 ml de la boucle, il fallait le changer 3 à 4 fois et nous avons décidé de l'enlever car cela provoquait

en plus l'éclatement de la boucle par augmentation de la pression en amont du filtre. Nous avons donc adopté ce système d'injection qui permettait d'injecter à un débit de 3 ml/min sans difficultés. Cependant, nous sommes restés très vigilants dans la surveillance de l'augmentation de la pression et nous avons constaté qu'après les lavages de régénération de la colonne la pression redevenait normale. En effet, celle-ci se situait vers 150 psi après l'équilibrage de la colonne puis atteignait 250 psi à la fin de l'injection.

### 3.3. Détermination de la force ionique de lavage

Nous avons commencé cette étude par la détermination des concentrations en sel correspondant à l'élution des deux formes du récepteur. Pour cela, du cytosol préparé en absence de molybdate, est partiellement transformé, puis injecté dans les colonnes. Après lavage avec un tampon phosphate de faible force ionique, pour enlever le stéroïde libre, on effectue l'élution par un gradient de concentration en NaCl (80 mEq - 580 mEq). Pour la colonne Mono Q, la forme transformée du récepteur est éluée à 220 mEq et la forme non transformée à 380 mEq. Alors que pour les colonnes de DEAE, le récepteur transformé est élué à 190 mEq et le non transformé à 290 mEq (Figure 23). Nous remarquons d'une part que la force ionique nécessaire à l'élution des 2 formes du récepteur est sensiblement plus élevée dans la colonne Mono Q. Cela est probablement dû à la nature plus basique de celle-ci. D'autre part, la différence entre les forces ioniques correspondant à l'élution des deux formes du récepteur est plus grande dans la Mono Q. A priori, la colonne Mono Q semble être un meilleur candidat pour l'application de notre protocole à la purification du récepteur transformé, mais en pratique deux facteurs essentiels sont pris en considération, le premier est d'ordre quantitatif. En effet nous disposons dans le commerce de colonne DEAE préparative ayant un volume de 54,4 ml et une capacité beaucoup plus grande que la colonne Mono Q préparative qui n'existe qu'en volume de 20 ml. Le deuxième facteur est d'ordre économique, en effet les colonnes Mono Q de Pharmacia reviennent plus cher que les colonnes DEAE de LKB.

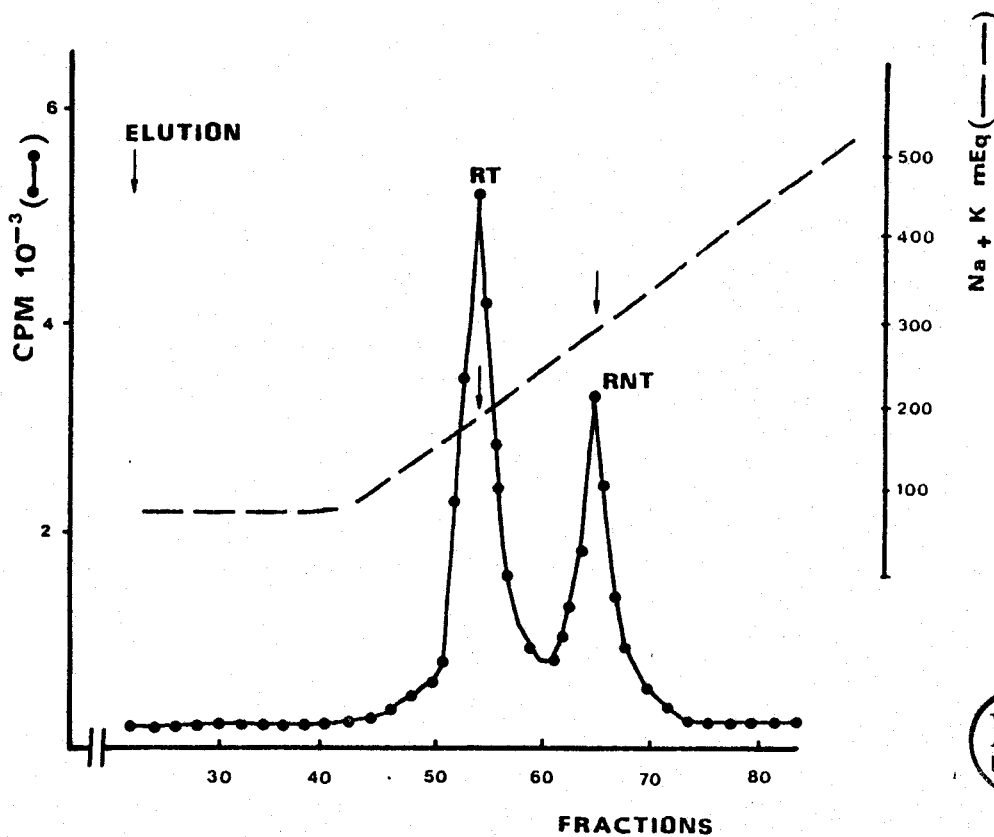
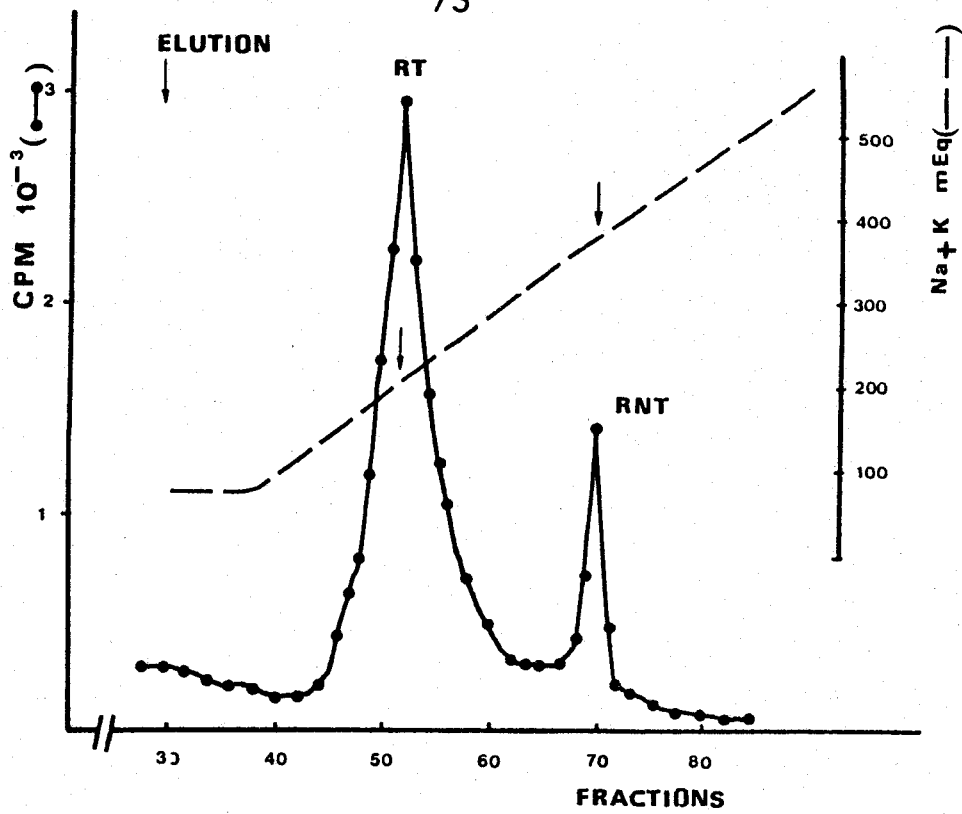


Figure 23 - Détermination des concentrations en sel nécessaire à l'élué des 2 formes du récepteur.

a) colonne Mono Q ; RT élué à 220 mEq, RNT élué à 380 mEq.

b) colonne DEAE analytique ; RT élué à 190 mEq, RNT élué à 290 mEq.

RT : Récepteur transformé ; RNT : Récepteur non transformé.

### 3.4. Importance des lavages

L'étape de lavage est chargée d'éliminer du gel toutes les protéines non spécifiques sans pour autant toucher aux complexes hormone-récepteur adsorbés sur le gel. Elle doit être à la fois efficace et douce. Cette étape est réalisée grâce à la force ionique. Il est évident que ce sont des conditions non spécifiques et qu'à partir d'une certaine concentration, même les complexes hormone-récepteur seront éliminés au même titre que les autres protéines.

L'étape de lavage avec la force ionique est la plus importante de notre protocole, car c'est elle qui conditionne le degré du taux de purification et du rendement final de la préparation du récepteur. Nous avons essayé de trouver à chaque fois les conditions optimales du lavage en procédant d'une manière empirique, à savoir une augmentation progressive et mesurée de la concentration en sel concomitante à une augmentation aussi bien mesurée du temps de lavage.

#### 3.4.1. Colonne Mono Q

Le lavage à 0°C à une concentration en NaCl de 310 mEq pendant 30 minutes avec un débit de 0,4 ml/min a donné le meilleur rendement avec un taux de purification acceptable. Un lavage plus long se fait au détriment du rendement.

#### 3.4.2. Colonne DEAE analytique

Notre but était ici de déterminer les grandes lignes du protocole nous réservant ainsi de l'améliorer avec la colonne DEAE préparative. Nous avons établi qu'à partir d'un lavage à 0°C et à 230 mEq pendant 30 à 35 minutes avec un débit de 0,5 ml/minute nous avons déjà une préparation purifiée.

#### 3.4.3. Colonne DEAE préparative

##### - Extrait de cytosol

Dans un premier temps nous avons trouvé que si la force ionique d'équilibrage était plus faible, c'est-à-dire égale à 180 mEq, et que le lavage se faisait à 235 mEq après injection, cela avait pour conséquence d'augmenter le rendement jusqu'à 60 %, seulement le taux de purification était plus faible, il se situait vers 100 fois.

C'est en augmentant la force ionique et le temps de lavage à 250 mEq pendant 40-45 minutes que nous avons eu un taux de purification moyen de 270 fois et que nous n'arrivions plus à dépasser. Cela a été réalisé au détriment du rendement puisque ce dernier est passé à 40 %. Cela illustre clairement la difficulté que pose l'amélioration de la purification, car en effet on ne peut pas prévoir à l'avance qu'un tel changement de paramètre aura obligatoirement un résultat positif. Ce sont là plusieurs paramètres qui interfèrent et on ne peut pas changer l'un sans tenir compte de l'autre. Il faut chercher continuellement le compromis.

*- Extrait du récepteur précipité au sulfate de protamine*

Les lavages qui ont donné les meilleurs résultats ont été réalisés à 250 mEq pendant 40 minutes avec un débit de 3,5 ml/minute. Nous avons noté une légère amélioration lorsque pour passer de la force ionique d'équilibrage (180 mEq) à celle du lavage (250 mEq) nous établissions un gradient de 4 minutes. Cela est encore plus net quand on établit un autre gradient de 7 minutes pour revenir au tampon phosphate 80 mEq.

### 3.5. Transformation des complexes hormone-récepteur

Les complexes hormone-récepteur subissent la transformation à l'intérieur des colonnes et ceci dans un bain-marie à 25°C. Cette étape ne peut avoir lieu que si la force ionique à l'intérieur de la colonne est inférieure à celle nécessaire à l'élution du récepteur transformé. Or, pendant le premier lavage, la concentration en sel dans le tampon phosphate est comprise entre 230 et 300 mEq, donc supérieure à la norme qui vient d'être située. Un deuxième lavage avec un tampon phosphate 80 mEq permet à la fois d'abaisser la force ionique et d'éliminer le molybdate, et ouvre ainsi la voie pour la transformation. Le protocole, tel qu'il nous a été communiqué par P. Lustenberger prévoyait que la transformation devrait avoir lieu

juste après la fin du premier lavage avec le tampon phosphate 230-300 mEq, et donc au moment du début du lavage avec le tampon phosphate 80 mEq. C'est-à-dire qu'au fur et à mesure que le molybdate s'élimine et la force ionique s'abaisse, les complexes se transforment.

Au cours des premiers essais avec la colonne Mono Q, nous avons procédé de cette façon et au vu du faible rendement obtenu, nous nous sommes efforcés dans la mesure du possible d'améliorer ce dernier. A cet égard, nous avons établi que si le lavage avec le tampon phosphate 80 mEq sans molybdate se fait à 0°C pendant 10 minutes avec un débit de 0,4 ml/min avant le début de la transformation par immersion de la colonne dans un bain-marie à 25°C, le rendement de la préparation finale était meilleur.

Nous avons repris ce même protocole et nous l'avons appliqué à la DEAE analytique. Seulement à l'élution nous ne récupérons aucune activité et nous avons pensé que celle-ci sortait probablement au cours de l'étape de transformation où il apparaissait un pic qui n'existait pas dans la colonne Mono Q. Dans un premier temps, nous avons estimé que la force ionique du tampon du premier lavage (250 mEq) était un peu élevée, c'est pourquoi nous l'avons diminuée à 230 mEq, mais ceci n'a donné aucun résultat.

Ensuite nous avons diminué de 10 minutes le temps du premier lavage avec le tampon 230 mEq, mais le résultat était toujours le même. Et enfin nous avons estimé que les 10 minutes du lavage avec le tampon phosphate 80 mEq à 0°C étaient insuffisantes pour éliminer tout le molybdate et aussi pour abaisser la force ionique sur toute la colonne. Nous avons donc prolongé ce lavage (à 0°C) à 30 minutes, et c'est seulement quand il arrivait à son terme que nous démarrions la transformation. Ce temps a été déterminé par un contrôle soigneux sur toutes les fractions de la force ionique au spectrophotomètre à émission de flamme, et du molybdate par l'absorbance à 280 nm.

Ainsi nous avons pu établir que désormais la transformation devrait avoir lieu à débit nul. Une explication à cela est que la nature plus basique de la colonne Mono Q favorise bien plus la

transformation que la colonne DEAE sur laquelle elle est beaucoup plus lente.

Enfin, pour la colonne DEAE préparative, nous avons procédé de la même façon, et à notre grande satisfaction les résultats étaient tout à fait intéressants et il ne restait qu'à optimiser les conditions requises. D'autre part, nous avons constaté que l'augmentation de la durée de la transformation, et cela pour la compléter car il restait toujours du récepteur non transformé, provoquait davantage la dissociation des complexes hormone-récepteur. Cette dissociation se manifestait par l'augmentation du pic de l'hormone libre apparaissant en début d'élution (voir plus loin).

### 3.6. Elution des complexes hormone-récepteur transformé

#### 3.6.1. Colonne Mono Q

L'élution est effectuée par un gradient linéaire de concentration des tampons phosphates 80 mEq-580 mEq, pendant une durée de 45 minutes, sélectionnée sur le programmeur de gradient. En fait la durée effective du gradient s'étale jusqu'à 60 minutes ainsi qu'en témoigne le dosage du sodium et du potassium dans l'effluent de la colonne. Ce temps s'est avéré approprié à une séparation nette des deux formes du récepteur. Donc la durée totale de la chromatographie, injection comprise, est d'environ deux heures (figure 24).

#### 3.6.2. Colonne DEAE analytique

Le récepteur sous forme transformée est élué par un gradient entre les tampons phosphates 80 mEq et 580 mEq, et l'on voit apparaître trois pics (figure 25 ). Le premier, qui sort dans le volume mort de la colonne et qui n'existait pas à l'élution de la colonne Mono Q correspond à l'hormone libre, ainsi que le contrôle de fixation sur la DNA-cellulose l'a bien confirmé. Nous pensons qu'il s'agit d'une dissociation des complexes hormone-récepteur qui intervient au cours de la transformation. Le pic majeur avec un épaulement correspond au récepteur transformé, et enfin le pic mineur représente le récepteur non transformé résiduel. La courbe des protéines présentée sur le même profil, suit une allure qui a été prévue par l'étude théorique.



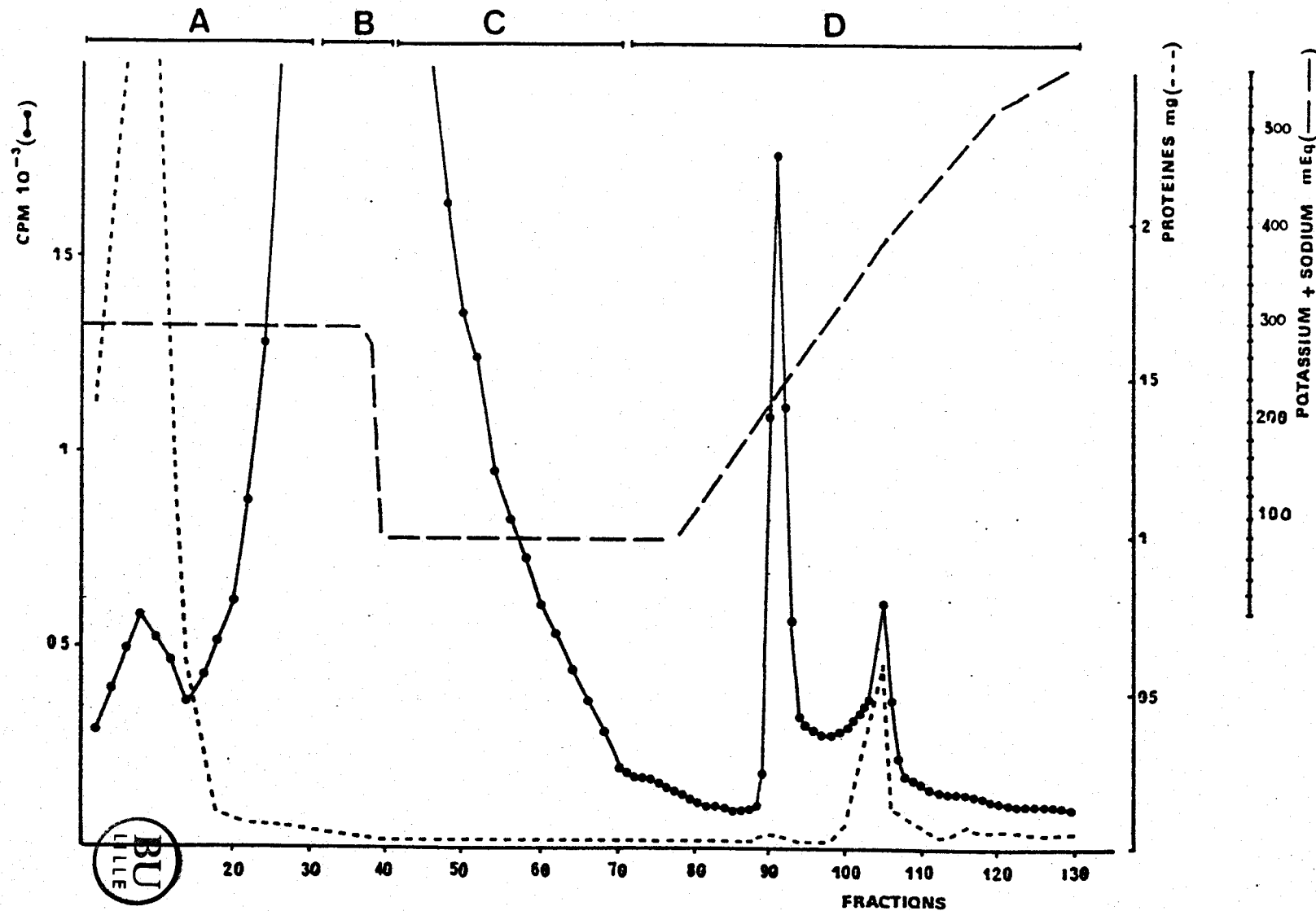


Figure 24 - Purification du récepteur transformé par chromatographie d'échange d'ions sur Mono Q en HPLC.

Un aliquote (1 ml) de cytosol est chargé sur une colonne Mono Q (Pharmacia), équilibrée dans un tampon phosphate (310 mEq). Le premier lavage dure 30 minutes à 0°C (A). Il est suivi d'un lavage avec le tampon phosphate (80 mEq) pendant 40 minutes. Pendant les 10 premières minutes (B), la colonne est maintenue à 0°C, puis elle est placée dans un bain à 25°C (C). L'éluion est effectuée à l'aide d'un gradient linéaire entre les tampons phosphate 80 mEq et 580 mEq (D). Des fractions de 0,4 ml sont collectées et 50 µl de chaque fraction sont analysés pour le dosage de la radioactivité. Le dosage des protéines est effectué sur toutes les fractions. LE DEBIT EST DE 0,4 ML/MIN.

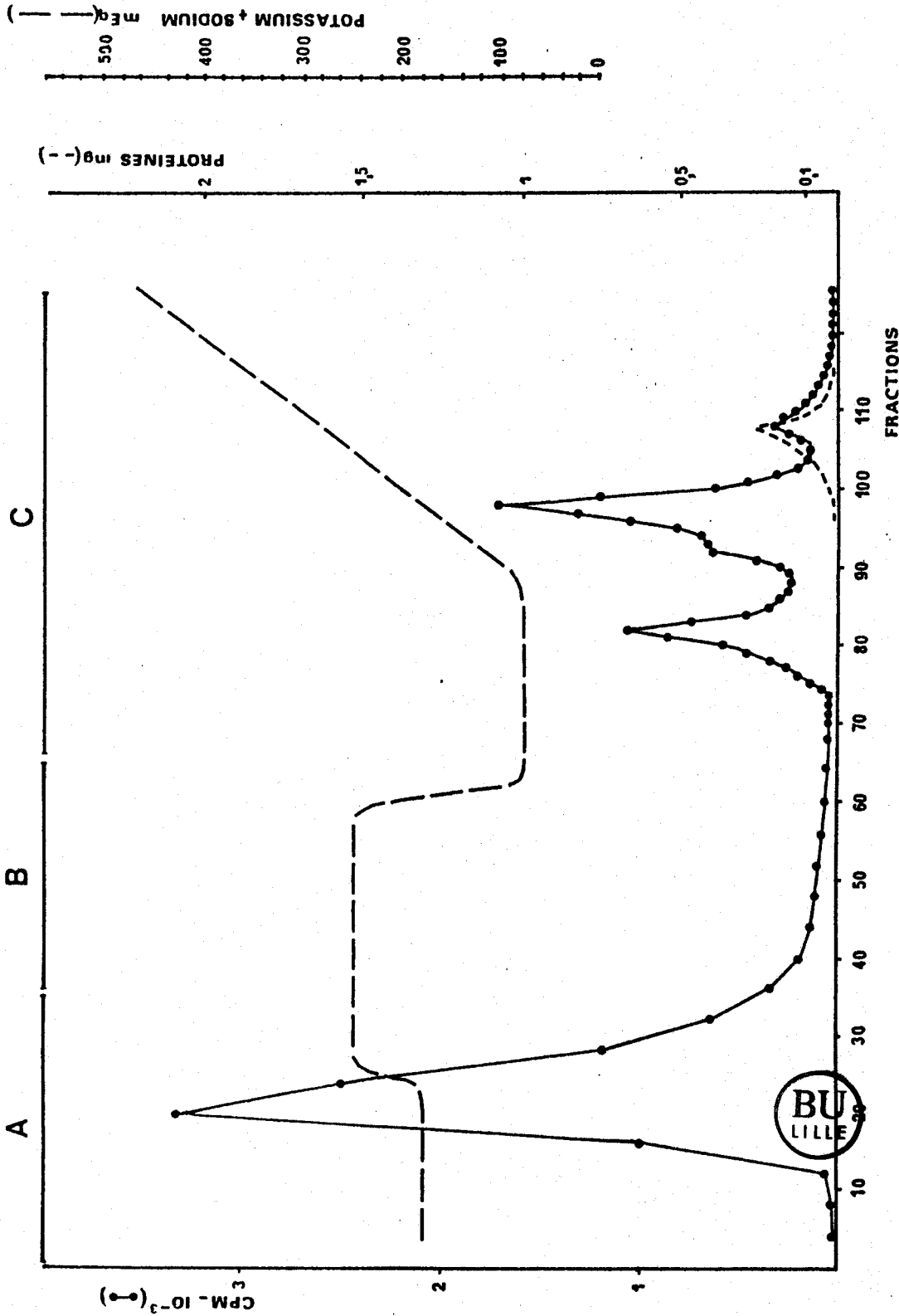


Figure 25 - Purification du récepteur transformé par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE analytique en HPLC.

Un aliquote (1,5 ml) de cytosol est chargé sur une colonne DEAE analytique 545 LKB, équilibrée dans un tampon phosphate 230 mEq. Le premier lavage dure 35 minutes (A). Il est suivi d'un lavage avec le tampon phosphate 80 mEq sans molybdate pendant 30 minutes à 0°C (B). Puis la transformation à 25°C a lieu en débit nul. L'éluion est effectuée avec un gradient linéaire entre les tampons phosphate 80 mEq et 580 mEq (C). Des fractions de 0,5 ml sont collectées et 50 µl de chaque fractions sont analysés pour le dosage de la radioactivité. Le dosage des protéines est effectué sur le cytosol de départ et sur les fractions de l'éluat. **LE DEBIT EST DE 0.5 ML/MIN.**

Donc, dès qu'on atteint la concentration intermédiaire entre celles nécessaires à l'éluion des 2 formes du récepteur, le pic des protéines apparaît.

### 3.6.3. Colonne de DEAE préparative

#### *Extrait de cytosol*

Le profil d'éluion est presque identique à celui de la DEAE analytique en ce sens qu'on voit apparaître un pic d'hormone libre, un pic majeur à deux sommets dont l'un serait probablement l'amplification de l'épaulement observé dans la DEAE-analytique, et enfin un pic mineur correspondant au récepteur non transformé (figure 26 ).

Nous étions très satisfaits de retrouver pratiquement les mêmes résultats que ceux que nous avons trouvés pour la DEAE analytique. Ceci est très intéressant en ce sens que cette étude montre clairement qu'avant de s'engager dans l'achat d'une colonne DEAE préparative, il serait judicieux de faire les essais sur une colonne DEAE analytique qui revient beaucoup moins cher, et c'est seulement en voyant les résultats qu'il faudrait se décider.

Une autre constatation satisfaisante a été que le rendement s'est révélé bien meilleur (40 %) sur la colonne préparative que sur l'analytique, ce qui était plutôt une bonne surprise. En effet il y avait là une amélioration d'un des deux facteurs les plus importants dans la purification, celui du rendement, l'autre étant le taux de purification. Cette étude renforce l'idée selon laquelle la manipulation de très faibles quantités de récepteur s'accompagne d'une perte énorme, qui peut être limitée par le fractionnement de quantités plus substantielles de cette protéine. C'est pourquoi, limités par la charge maximale en protéines tolérée par la colonne, nous avons cherché à augmenter la quantité de récepteur présente dans l'échantillon injecté en recourant à une étape de prépurification. Notre choix s'est porté sur l'extrait du sulfate de protamine.

#### *Extrait du récepteur précipité au sulfate de protamine*

Le profil d'éluion établi par un gradient de tampon phosphate 180 mEq-580 mEq fait apparaître trois pics, le premier est celui de

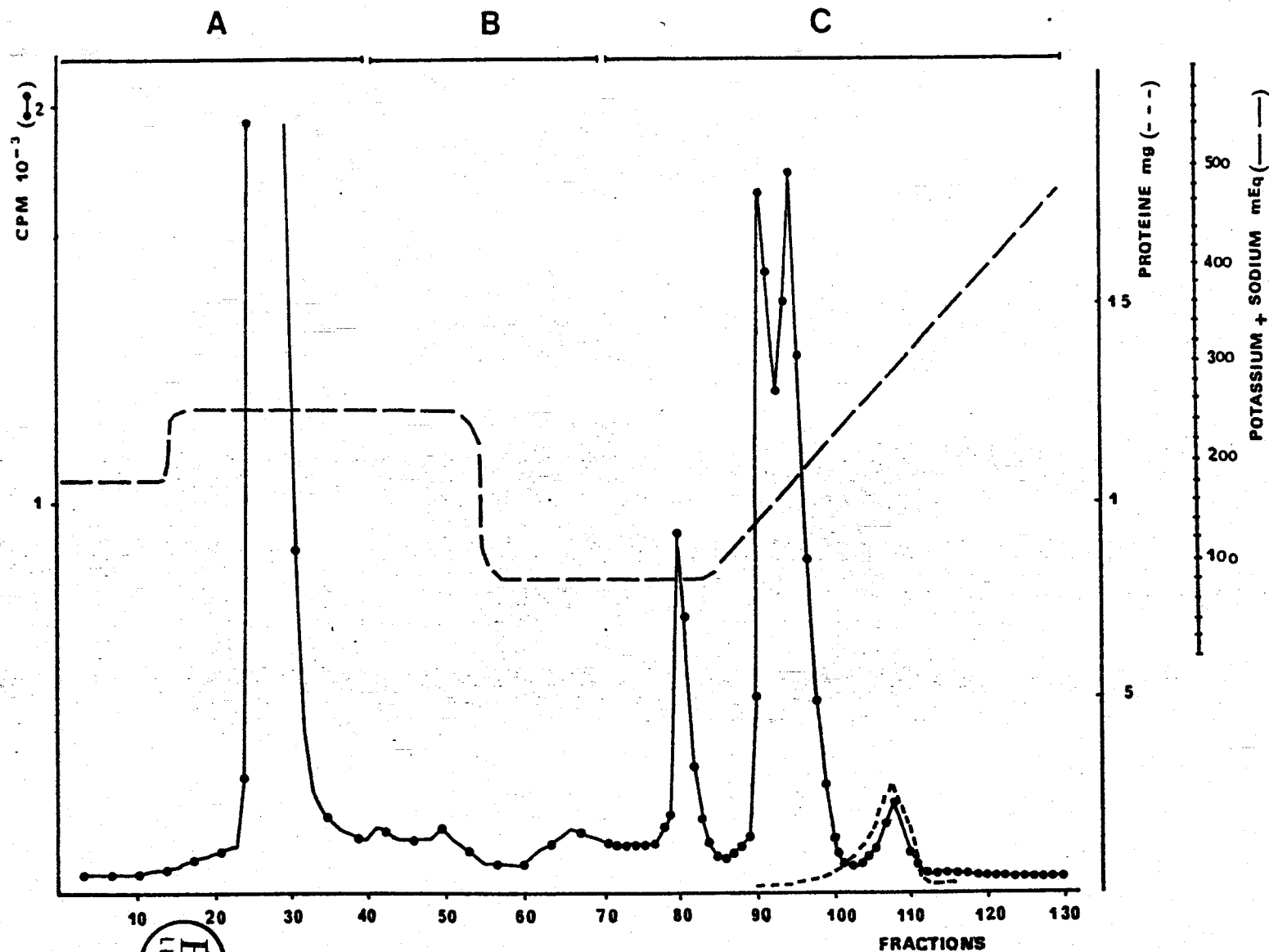


Figure 26 - Purification du récepteur transformé par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE préparative en HPLC.

Un aliquote (3 ml) de cytosol est chargé sur une colonne de DEAE préparative 545 LKB, équilibrée dans le tampon phosphate 180 mEq. Le premier lavage s'effectue avec le tampon phosphate 250 mEq pendant 40 minutes à 0°C (A). Il est suivi d'un lavage avec le tampon phosphate 80 mEq pendant 30 minutes à 0°C (B), puis la transformation a lieu à 25°C pendant 30 minutes à débit nul. L'éluion est effectuée à l'aide d'un gradient linéaire entre les tampons 80 mEq et 580 mEq (C). Des fractions de 3,5 ml sont collectées et 150 µl de chaque fraction sont analysés pour le dosage de la radioactivité. Le dosage des protéines est effectué sur le cytosol de départ et sur les fractions du pic du récepteur transformé. **LE DEBIT EST DE 3.5 ML/MIN,**

l'hormone libre. En effet, aucune rétention de la radioactivité de cette fraction n'est observée sur la colonne de DNA-cellulose; de plus toute la radioactivité sort avec le stéroïde libre après analyse en gel-filtration sur colonne HPLC TSK G3000 SW, et enfin, aucune présence de protéine dans la région de migration du récepteur n'est retrouvée en analyse par électrophorèse en PAGE/SDS. Seul le pic majeur correspond au récepteur transformé. Notre idée de démarrer le gradient à la concentration d'élution du récepteur transformé (180mEq au lieu de 80mEq) et donc d'effectuer une élution frontale s'est avérée fructueuse. Ainsi, comme nous l'avions espéré cela a eu pour résultat de concentrer le pic et donc de limiter son étalement. Ce changement a été concomitant à une réduction dans le temps du gradient à 37 minutes au lieu de 45 minutes. Un seul inconvénient, mais qui est loin d'être gênant, est que par ce biais l'hormone libre est moins bien séparée des complexes hormone-récepteur, et sort sous forme d'un épaulement (figure 27). La courbe des protéines suit une allure qui concorde avec les prévisions théoriques et montre une augmentation nette au delà de la région d'élution du récepteur transformé.

Une comparaison des différents résultats obtenus à partir des différentes colonnes pour la purification du récepteur sous forme transformée, est présentée dans les tableaux V, VI et VII. Nous n'avons retenu à chaque fois que les expériences les plus significatives et les plus importantes. Le tableau V montre la purification en une seule étape du récepteur cytosolique et compare les différentes colonnes utilisées. Les tableaux VI et VII montrent la purification en deux étapes de l'extrait du récepteur précipité en sulfate de protamine et cela en utilisant deux volumes d'échantillon différents. Certaines constatations s'imposent à la lecture de ces tableaux :

- les qualités de la colonne Mono Q apparaissent très séduisantes, forte rétention et meilleure séparation par rapport à la DEAE, mais nous ne croyons pas avoir fait un mauvais choix en optant pour cette dernière, car en pratique les résultats sur le plan de la purification sont similaires.

Le taux de purification de 70 fois que nous avons obtenu avec la MonoQ est inférieur à celui atteint par M. Denis à Nantes (2000 à 3000 fois) sur la même colonne. Cette différence est probablement due

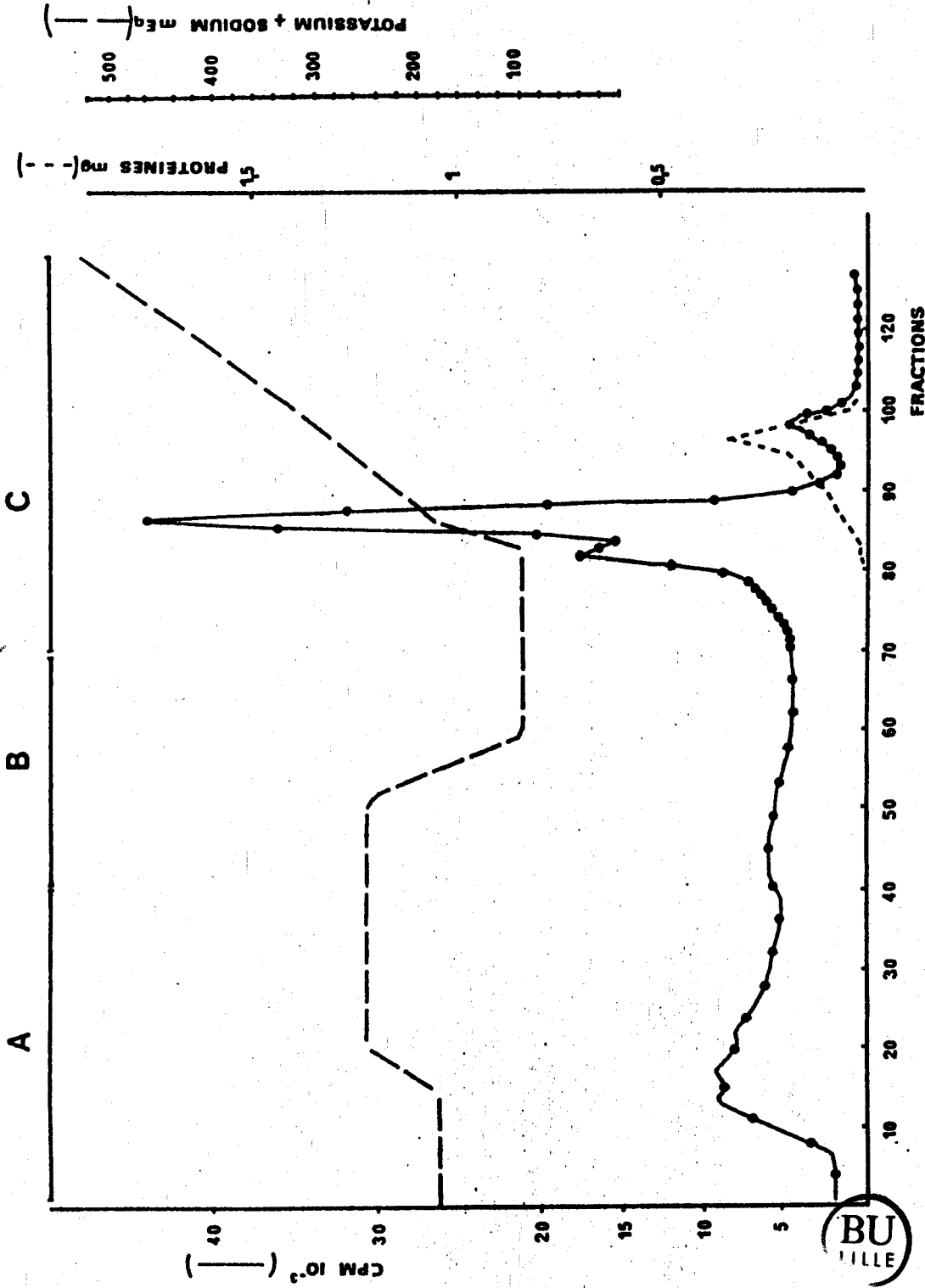


Figure 27 - Purification du récepteur transformé par chromatographie d'échange d'ions sur DEAE préparative en HPLC.

Un volume de 35 ml d'un extrait du récepteur précipité au sulfate de protamine est dessalé, dilué, puis déposé sur DEAE préparative 545 LKB, équilibrée dans un tampon phosphate 180 mEq. Le premier lavage se fait avec tampon phosphate 250 mEq pendant 40 minutes à 0°C (A). Il est suivi par un lavage avec le tampon phosphate 80 mEq pendant 30 minutes à 0°C (B). Puis la transformation a lieu à 25°C à débit nul. L'éluion est effectuée par un gradient linéaire entre les tampons phosphate 80 mEq et 580 mEq (C). Des fractions de 3,5 ml sont collectées et 150  $\mu$ l de chaque fraction sont analysés pour le dosage de la radioactivité. Le dosage des protéines est effectué sur le cytosol, sulfate dilué après dessalage et enfin sur toutes les fractions du pic du récepteur transformé.

LE DEBIT EST DE 3.5 ML/MIN.

	CYTOSOL	VOLUME (ml)	PROTEINES TOTALES (mg)	ACTIVITE DE LIAISON [ <sup>3</sup> H] TA x 10 <sup>-6</sup> (dpm)	ACTIVITE SPECIFIQUE dpm.mg <sup>-1</sup> x 10 <sup>-6</sup>	PURIFICATION taux	RENDEMENT %
MONO Q	Cytosol	1	24,3	0,97	0,04	1	100
	Pic mono Q	2	0,091	0,25	2,82	71	26
DEAF- ANALYTIQUE	Cytosol	1,5	34,8	1,32	0,038	1	100
	Pic DEAE analytique	4,5	0,105	0,36	3,42	90	27
DEAF- PREPARATIVE	Cytosol	3	75,6	2,8	0,037	1	100
	Pic DEAE preparative	31,5	0,113	1,13	10,00	270	40

TABLEAU V - Purification en une seule étape du récepteur des glucocorticoïdes de foie de rat  
sur colonne échangeuse d'ions en HPLC.



	Volume (ml)	Protéines totales (mg)	Activité de liaison [ <sup>3</sup> H] TA total x 10 <sup>-6</sup> dpm	Activité Spécifique dpm mg <sup>-1</sup> x 10 <sup>-6</sup>	Purification (taux)	Rendement %
Cytosol	45	1183,5	32,6	0,027	1	100
Sulfate	11	86,9	20,2	0,230	8,5	62
Sulfate dessalé et dilué	18	77,4	16,0	0,206	7,6	49
Purification DEAE	14	0,203	4,5	22,47	930	14

TABLEAU VI- Purification en deux étapes du récepteur à glucocorticoïdes transformé de foie de rat.

Le récepteur a été purifié à partir du cytosol de 3 foies de rat. Le rendement d'élution sur la DEAE préparative en HPLC est de 30 %.





	Volume (ml)	Protéines totales (mg)	Activité de liaison [ <sup>3</sup> H] TA total x10 <sup>-6</sup> (dpm)	Activité Spécifique dpm mg <sup>-1</sup> x10 <sup>-6</sup>	Purification (Taux)	Rendement %
Cytosol	85	2142	65	0,03	1	100
Sulfate	21	176,4	42	0,242	8,1	65
Sulfate dessalé et dilué	35	157,4	33	0,212	7	51
Purification DEAE préparative	21	0,445	16	36,00	1200	24,3

TABLEAU VII- Purification en deux étapes du récepteur des glucocorticoïdes transformé de foie de rat.

Le récepteur a été purifié à partir du cytosol de 6 foies de rat. Le rendement à l'élution sur la DEAE-préparative en HPLC est d'environ 50 %.



à l'inexactitude du dosage des protéines. En effet, les quantités dosées au niveau du pic du récepteur transformé étaient très faibles, et souvent inférieures à 2 µg. Cette valeur se situe dans une zone de calibration très variable et elle est donc difficile à déterminer avec exactitude. Cependant une faible variation de la quantité peut entraîner une augmentation ou une diminution importante dans le taux de purification.

La conséquence immédiate de l'utilisation de la colonne DEAE préparative était l'amélioration nette du rendement et aussi du taux de purification. En effet, ce dernier a été multiplié par trois par rapport à la DEAE analytique et la Mono Q. De même, le rendement a atteint 40 % alors que nous étions seulement à la moitié de la capacité de la colonne du point de vue charge. Alors que pour la DEAE analytique, même si on était à la charge maximale le rendement ne dépassait guère 30 %.

§ L'étape de dessalage de l'extrait du récepteur précipité au sulfate de protamine, suivie de la dilution a eu pour résultat de diminuer l'activité liée du récepteur et donc le rendement final de la purification, mais son utilité reste indiscutable.

§ L'acquisition d'un taux de purification aussi intéressant est à mettre au crédit de l'utilisation de l'extrait du récepteur purifié au sulfate de protamine.

§ Le fait d'avoir résolu le problème de l'injection et donc de doubler le volume de l'extrait du récepteur précipité au sulfate de protamine à injecter a eu pour résultat, à la fois d'augmenter le rendement et le taux de purification.

§ La technique d'HPIEC nous a permis de purifier avec un rendement acceptable des quantités significatives du récepteur ; cette méthode est rapide, elle paraît reproductible, et elle nous a donné des satisfactions bien plus grandes que la DNA-cellulose. C'est pourquoi elle nous paraît une alternative très appropriée à cette dernière méthode pour purifier le récepteur transformé. Toutefois, il nous paraît intéressant de la compléter.

En effet, le résultat que nous proposons ici est le fruit de plusieurs expériences. Nous présumons qu'il est raisonnable et que nous avons trouvé le compromis souhaitable. Nous estimons même que nous sommes à la limite du compromis, car d'autres changements intervenant sur la durée et la concentration en sel du premier lavage ou sur le temps de transformation nous ont fait basculer aux extrémités, c'est à dire un taux de purification élevé et un très faible rendement (tableau VIII). A l'évidence, il est illusoire d'espérer obtenir une préparation hautement purifiée du récepteur sous forme transformée après HPIEC. C'est pourquoi nous avons préféré nous orienter vers la recherche d'une étape ultime à la purification. Dans un premier temps, nous avons pensé à utiliser la DNA-cellulose, mais les résultats obtenus avec celle-ci n'étaient pas encourageants. Pour cela une autre alternative a été adoptée, elle concerne l'utilisation des séquences synthétiques reconnaissant spécifiquement le récepteur et qui seront couplées à un support de type agarose (voir plus loin). Mais avant de procéder à cette ultime étape, il faudrait s'assurer que le récepteur récupéré présente bien les propriétés qui caractérisent la forme transformée du récepteur.

Volume du sulfate injecté en ml	Force ionique du premier lavage en mEq	Durée du premier lavage en min	Durée de la transformation en min	Gradient en mEq	Durée du gradient en min	Rendement en %	Taux de purification x
4	250	55	30	80 - 580	45	6	400
8	260	50	30	80 - 580	45	10	320
10	250	45	30	180 - 580	37	24	146
10	250	40	40	180 - 580	37	30	105
18	250	40	30	180 - 580	37	28	122
35	250	45	30	180 - 580	37	44	180
35	250	40	30	180 - 580	37	50	171

Tableau VIII : Conditions relatives aux expériences d'amélioration du protocole de purification du récepteur sous forme transformé.



#### 4) Caractérisation du récepteur transformé purifié.

Le but de cette étude est de déterminer les paramètres moléculaires et ioniques du récepteur purifié sous forme transformée. Nous avons pris soin d'appliquer les mêmes protocoles expérimentaux qui ont été mis en oeuvre pour caractériser le récepteur cytosolique dans notre laboratoire.

##### 4.1) Electrophorèse sur gel polyacrylamide en présence de SDS. ( PAGE/SDS ).

Cette technique permet d'évaluer la pureté d'une préparation de protéines purifiées et le poids moléculaire de ses constituants. Elle a été réalisée sur le matériel purifié récupéré après l'HPIEC. Le gel est coloré par la méthode au nitrate d'argent.

Sur les préparations prélevées en début du pic, nous décelons la présence d'une seule bande, de poids moléculaire apparent 90K, figure 28.

Avec des préparations situées au sommet ou en aval du pic on détecte en plus de la bande 90K d'autres bandes de poids moléculaire 72K, 60K, et 25K. figure 29.

Les études de caractérisation sur du récepteur hautement purifié sous ses deux formes menées par plusieurs auteurs (Wrange *et al.*, 1979 et 1984, Govindan et Gronemeyer 1984, Idziorek 1985, Lustenberger 1986) ont clairement montré la présence d'une bande majeure 90KD en PAGE/SDS. Cette bande a été assimilée au monomère du récepteur des glucocorticoïdes décrit par Sherman et Stevens (1984), Vedeckis *et al.*, 1984, Silva et Cidlowski (1985). Les techniques utilisant le marquage covalent d'affinité (Simons et Thompson 1981 ; Eisen *et al.*, 1981, Govindan et Gronemeyer 1984) ou le marquage par photoaffinité (Dellweg *et al.*, 1982, Nordeen *et al.*, 1982, Wrange *et al.*, 1984, Govindan et Gronemeyer, 1984) ainsi que les techniques de révélation immunologique par des anticorps polyclonaux (Eisen et Glinesman 1978, Okret *et al.*, 1981) ou monoclonaux (Gamatchu et Harrisson 1984, Westphal et Beato 1980) ont toutes montré que ce monomère était bien l'unité de liaison au stéroïde du récepteur des glucocorticoïdes. Cette unité est probablement le constituant majeur de la bande 90 KD.

Nos résultats semblent donc en accord avec ceux qui ont été évoqués plus haut. Cependant les bandes qui existent en plus de la

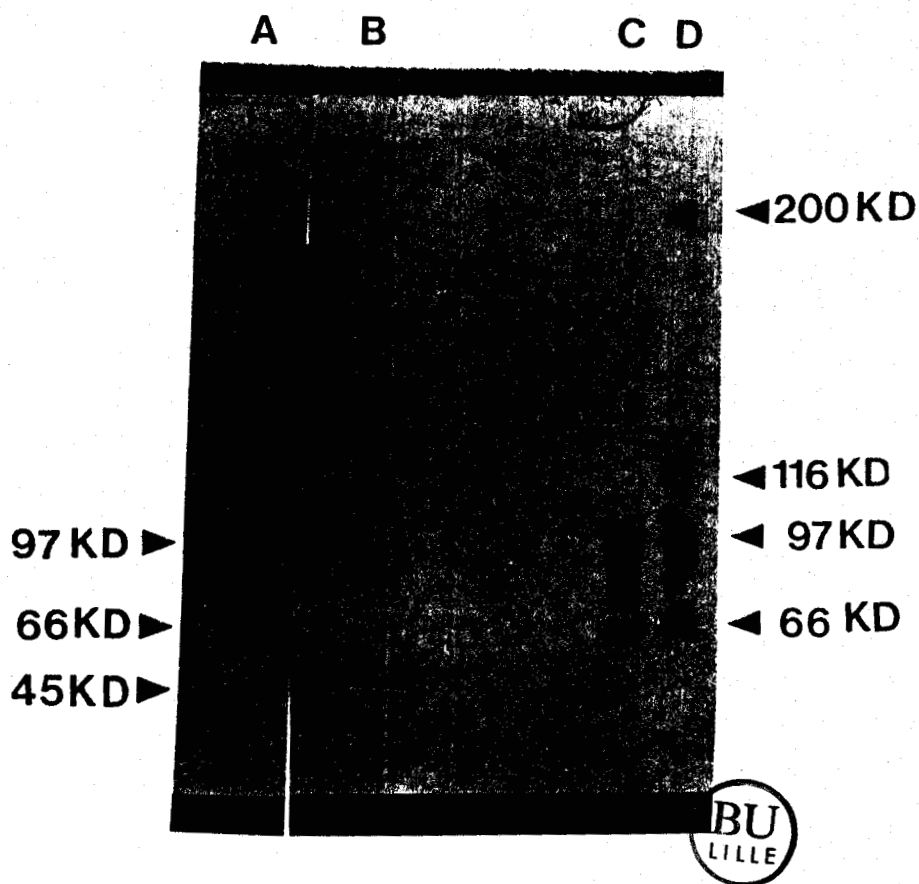


Figure 28: Analyse d'une fraction choisie au début du pic du récepteur transformé élué de la colonne DEAE préparative en HPLC, par électrophorèse en PAGE/SDS, dans un gradient linéaire d'acrylamide 5 - 20 % .

- A : Témoins 6T Pharmacia .
- B : Eluat du récepteur transformé .
- C : Témoins 6T Pharmacia .
- D : Témoins BIO-RAD .

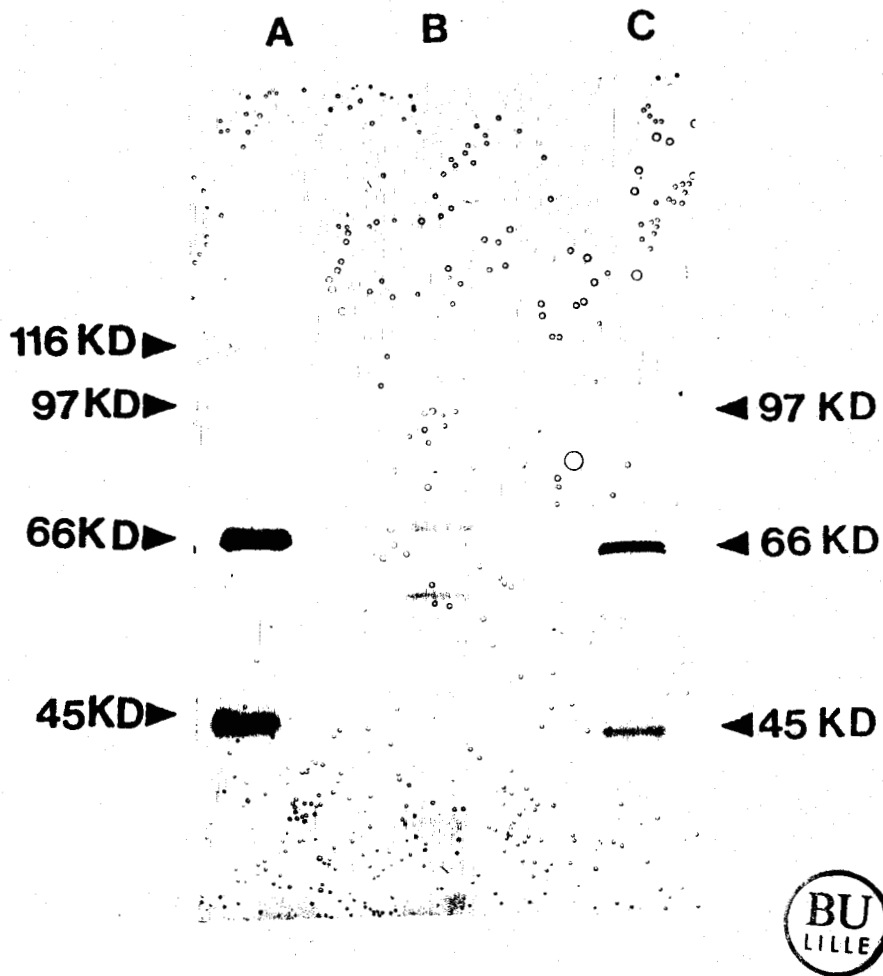


Figure 29; Analyse du pic du récepteur transformé obtenu à l'élution de la colonne DEAE préparative , par électrophorèse sur gel polyacrylamide en milieu SDS dans l'acrylamide 7,5%.

A : Témoins BIO-RAD .

B' : Eluat du récepteur transformé .

C:: Témoins 6T Pharmacia .

bande 90 KD dans la figure 29 peuvent correspondre soit à des protéines contaminantes, soit à des éléments de protéolyse du récepteur. La première hypothèse paraît plus plausible, puisque le dosage des protéines donne une quantité bien supérieure à celle qu'on aurait eu dans le cas où seule la protéine réceptrice aurait été présente dans la préparation. Toutefois, la seconde hypothèse ne peut pas non plus être écartée puisque le groupe de Gustafsson (Wrange *et al.*, 1984) avait déjà rapporté la présence de deux bandes mineures 70 KD et 72 KD. à côté de la bande majeure 90 KD. Les études de protéolyse partielle du récepteur transformé (Chapitre sur la structure du récepteur transformé) ont cependant mis en évidence de nombreux fragments de poids moléculaires très variables compris entre 30 KD et 70 KD, mais cette éventualité n'est envisageable que dans le cas où les inhibiteurs de protéases sont absents.

Notre préparation est pure dans un état de 7 à 10 % d'homogénéité. Nous remarquons que dans tous les cas de figure qui viennent d'être envisagés, ce chiffre est probablement sous-estimé, et ceci à cause du fait que le dosage des protéines est surestimé.

Pour conclure à l'identité de la bande 90 KD comme étant celle correspondant au monomère du récepteur des glucocorticoïdes, une révélation immunologique à l'aide d'un anticorps dirigé contre cette sous-unité a été utilisée.

#### 4.2) Electrotransfert sur papier de nitrocellulose (Western-blot).

Pour révéler le récepteur purifié nous avons utilisé l'anticorps monoclonal de Westphal et Beato 1981. A priori c'est un bon outil dirigé contre le récepteur transformé et qui permet de ne laisser aucun doute sur l'identité de celui-ci.

Cependant, s'il a révélé une bande 90 KD qui correspond probablement au récepteur transformé, à notre grande surprise il a aussi révélé deux autres bandes. Un autre fait encore plus surprenant est que l'intensité de la plus légère d'entre elles est plus forte que la bande 90K, révélant le récepteur transformé (figure 30). C'est un résultat qui est difficile à expliquer. Cependant, nous nous sommes attachés à vérifier la spécificité de cet anticorps.



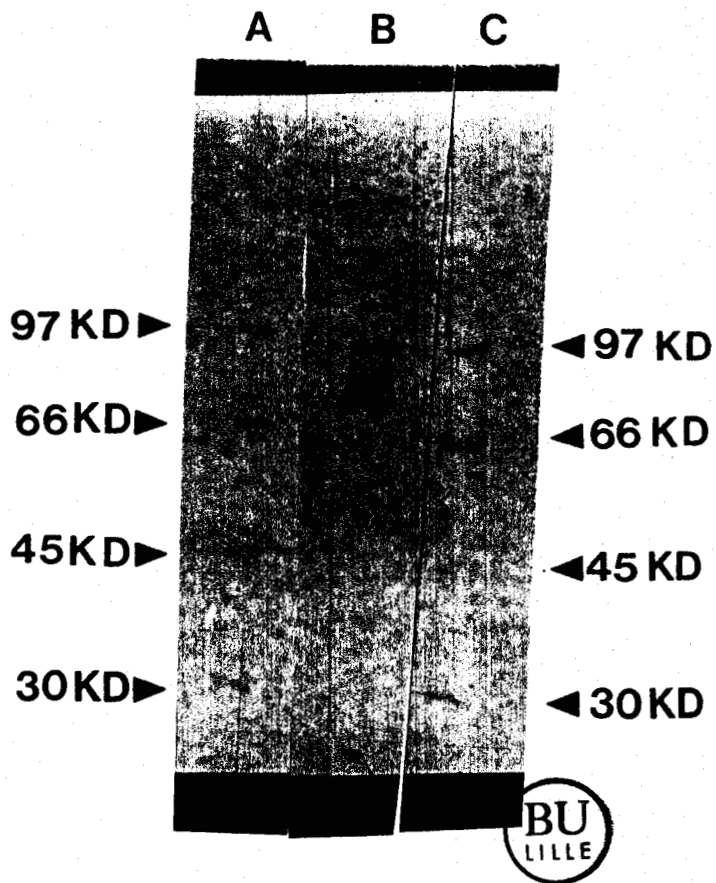


Figure 30 : Western Blot de l'éluat obtenu à partir de la DEAE préparative en HPLC .

Le PAGE/SDS est réalisé avec l'acrylamide 7,5%.

La révélation est effectuée par l'anticorps monoclonal de Beato dirigé contre le récepteur transformé .

A : Témoins 6T Pharmacia .

B : Eluat du récepteur transformé .

C : Témoins 6T Pharmacia .

D'une part, il a révélé une bande 90K unique, d'un éluat hautement purifié du récepteur non transformé (figure 31). Nous en avons conclu qu'il reconnaissait bien la sous-unité liante de cette forme du récepteur et que l'absence d'autres bandes avec cette forme du récepteur montre que leur apparition avec le récepteur transformé serait peut être liée à une dégradation de celui-ci.

D'autre part, les essais de révélation réalisés par P.Lefebvre avec le même anticorps visant à identifier les deux formes du récepteur 8 et 5 nm, ont conclu au caractère peu spécifique de cet anticorps.

La source du cytosol qu'il a utilisée était le cytosol de thymus de rat marqué à l'acétonide de triamcinolone ( $^3\text{H}$  TA). Le cytosol de départ n'ayant pas subi de transformation a été injecté dans une colonne de gel-filtration en HPLC TSK G3000 SW. Des aliquotes choisis aux endroits d'élution des deux formes du récepteur ont été révélés avec l'anticorps monoclonal de Beato dirigé contre la sous-unité liante du récepteur transformé. Nous remarquons que dans le couloir b, aucune bande n'a été révélée dans la région de la sous-unité liante 90K, ce qui est normal puisque le récepteur n'a pas subi de transformation auparavant. Par contre, dans le couloir c, on décèle la présence d'une bande 90K, mais en plus de celle-ci, d'autres bandes ont été révélées (figure 32). Parmi celles-ci on retrouve celles que nous avons eues dans notre Western-blot du récepteur transformé purifié.

Les couloirs e et f correspondent aux fractions éluées de la gel-filtration en HPLC du cytosol qui a subi la transformation avant l'injection. Les résultats montrent l'apparition de la bande 90K au niveau de la fraction du récepteur 5 nm (e) et la disparition de celle-ci dans la fraction du récepteur 8 nm (f), ce qui indique bien que le récepteur a été transformé. Le couloir d correspond à une fraction du cytosol de départ.

L'apparition de plusieurs bandes à la révélation de tous ces Western-blot ne permet pas de trancher entre l'hypothèse d'une hydrolyse partielle ou une autre où il s'agirait de bandes artefactuelles. Cependant, la première hypothèse paraît plus probable,

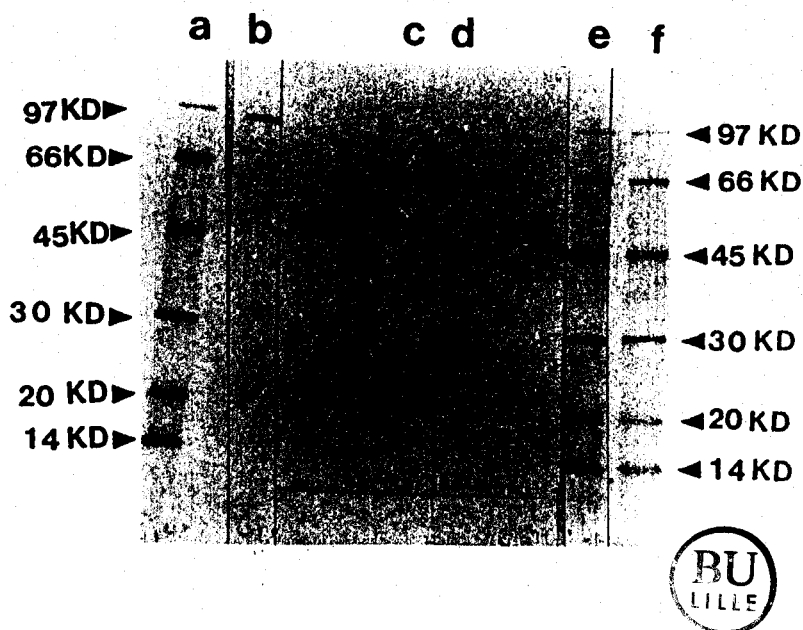


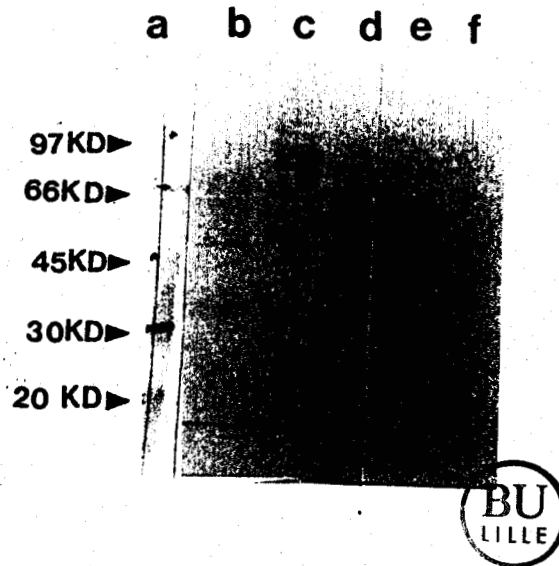
Figure 31 : Western Blot de l'éluat du récepteur hautement purifié sous forme non transformée .

La révélation est effectuée à l'aide de l'anticorps monoclonal de Beato dirigé contre la sous-unité liante du récepteur transformé .

a, e et f : Témoins 6T Pharmacia.

b : Eluat du récepteur purifié non transformé , révéle à l'Amidoschwarz.

c et d : Eluats du récepteur purifié sous forme non transformée , révéle à l'anticorps monoclonal de Beato dirigé contre la sous unité liante 90K.



**Figure 32 : Western blot ; Identification des deux formes du récepteur des glucocorticoides 8 et 5 nm, après gel filtration en HPLC.**

La révélation est réalisée par l'anticorps monoclonal de Beato dirigé contre la sous unité liante du récepteur transformé .

La source du récepteur est le cytosol de thymus de rat. Le cytosol est marqué à l'Acétonide de Triamcinolone, ( $^3\text{H}$  TA).

a : Témoins 6T Pharmacia .

b : Fraction correspondant à l'endroit d'éluion du récepteur transformé, (5 nm).

c : Fraction du pic du récepteur non transformé.

d : Fraction du cytosol de départ marqué à la  $^3\text{H}$  TA.

e et f : Fractions du cytosol récupérées après gel filtration en HPLC , correspondant respectivement aux formes 5 et 8 nm .

puisque à Nantes, P. Lustenberger nous a signalé l'existence de fragments de protéolyse qui serait le résultat de l'action d'un enzyme qui serait copurifié avec le récepteur.

Le fait que l'anticorps monoclonal de Beato reconnaisse ces bandes autorise à penser que cet auteur, lui aussi aurait purifié la même activité enzymatique, ou une autre ayant une action similaire, et qui serait responsable de l'apparition de ces fragments.

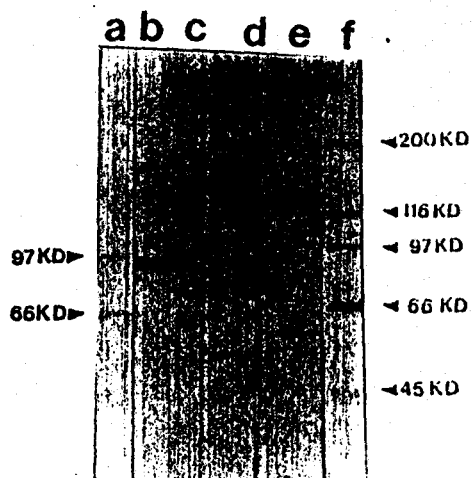
Nous en concluons que cet anticorps n'est pas l'outil idéal pour caractériser la forme transformée du récepteur, et qu'il s'agit là d'un lot de qualité moyenne. Néanmoins, il nous a permis d'identifier le fragment correspondant à la bande 90K, et qui a été probablement aussi purifié par Beato.

Nous avons par ailleurs utilisé un autre anticorps monoclonal dirigé contre la sous-unité non liante (Toft). Celle-ci ne fait partie que du récepteur non transformé. Le récepteur transformé étant un monomère qui est composé essentiellement de la sous-unité liante. Ainsi, deux aliquotes prélevés chacun dans les pics élués de la DEAE-préparative, correspondant respectivement au récepteur transformé et non transformé ont été testés avec cet anticorps. Les résultats obtenus montrent l'existence d'une bande unique de forte intensité, dans le cas du récepteur non transformé, celle-ci correspond probablement à la sous-unité non liante (figure 33).

A l'encontre, l'aliquote du récepteur transformé ne montre qu'une très faible bande 90K, à la limite de la détectabilité. Cela montre clairement que la forme du récepteur transformé que nous avons purifié ne contient pratiquement pas de sous-unité non liante.

#### 4.3. Gradient de sucrose - mesure du coefficient de sédimentation

Des aliquotes du pic radioactif élué après chromatographie sur DEAE préparative sur HPLC sont déposés sur un gradient de sucrose 5-20 % dans du tampon phosphate 160 mM, contenant du molybdate 10 mM et du  $\beta$ -mercaptoéthanol 20 mM. Les tubes sont mis à centrifuger pendant 17 heures à 0°C. Le complexe hormone-récepteur purifié sous forme transformée sédimente à 3,8S (figure 34). Le coefficient de sédimen-



**Figure 33 :** Western Blot réalisé sur deux aliquotes prélevés à l'élution de la DEAE préparative en HPLC ; l'un situé au sommet du pic du récepteur non transformé et l'autre au niveau du pic du récepteur transformé purifié.

La révélation est effectuée à l'aide de l'anticorps monoclonal de Toft dirigé contre la sous-unité non liante 90K. Celle-ci ne fait partie que du récepteur non transformé.

a : Témoins 6T Pharmacia .

b : Fraction du récepteur non transformé .

c, d et e : Fractions contenant des quantités croissantes du récepteur transformé .

f : Témoins BIO-RAD.

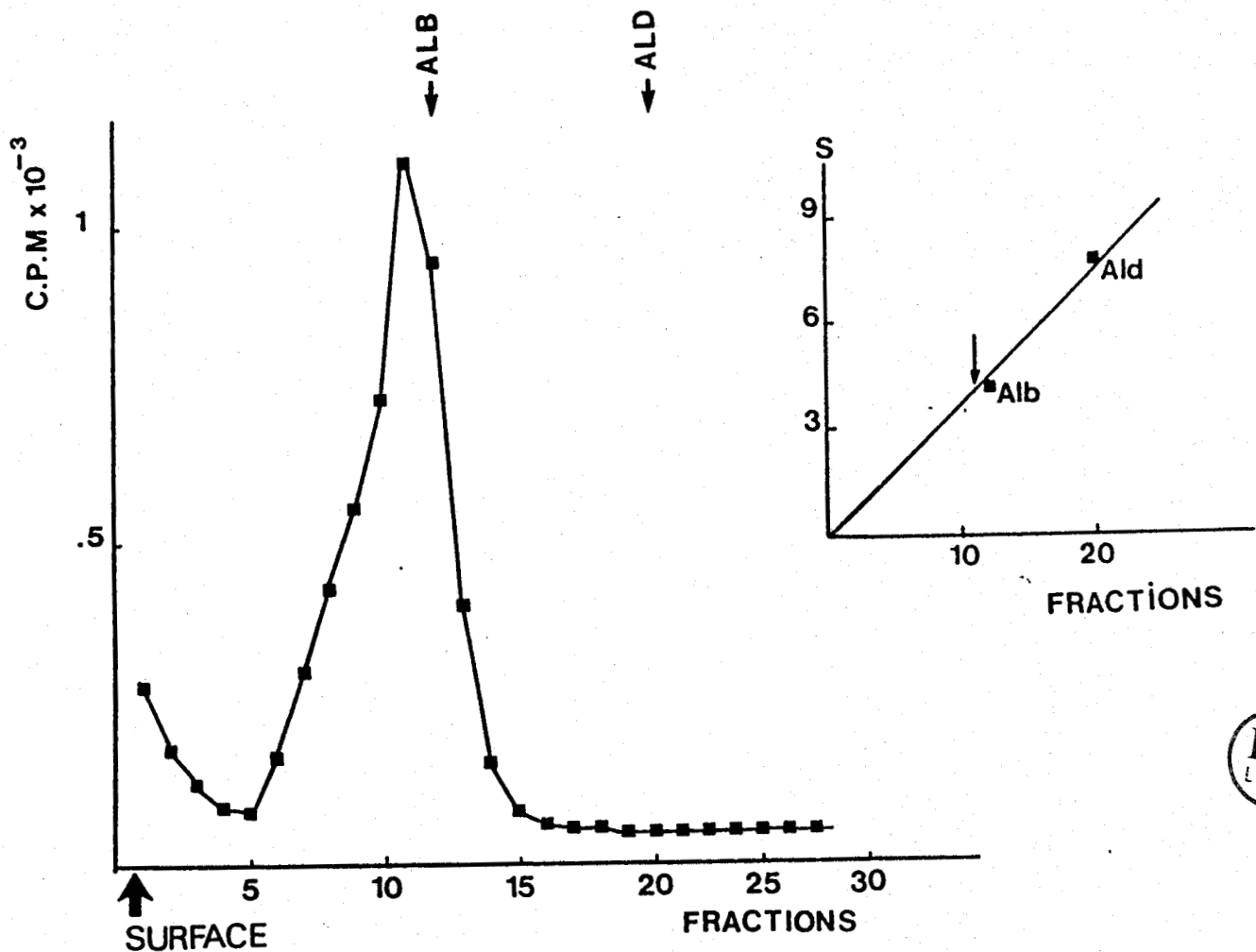


Figure 34 - Centrifugation en gradient de sucrose du récepteur purifié sous forme transformée.

Des aliquotes de 200  $\mu$ l sont déposées au sommet d'un gradient linéaire de sucrose (5-20 %). Après 17 heures de centrifugation à 55000 rpm, des fractions de 120  $\mu$ l, sont collectées par la base des tubes, puis comptées en radioactivité.

Les protéines standard utilisées sont l'aldolase (7,8 S.) et la sérumalbumine (4,3 S.).

tation du récepteur transformé  $3,5 \pm 0,2$  varie en fonction de la force ionique du tampon (Wrange *et al.*, 1979). La valeur que nous avons trouvée concorde avec celles établies par d'autres groupes (Climent *et al.* 1976, Westphal *et al.* 1980, Atger *et al.* 1976, Eisen *et al.* 1975, Grandics *et al.* 1984). Tous ces auteurs indiquent une valeur de 4S. Le récepteur cytosolique sédimente à une valeur équivalente. Le rendement obtenu est de 65 %.

#### 4.4. Gel-filtration en HPLC - mesure du rayon de Stokes

Le rayon de Stokes est déterminé par chromatographie sur la colonne de TSK G3000 SW équilibrée dans le tampon phosphate 160 mM (figure 35). La valeur que nous avons trouvée pour le complexe hormone-récepteur purifié sous forme transformée a été calculée selon la formule :

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

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

Kd : coefficient de distribution

Vt : volume total de la colonne

V : volume exclu

V : volume d'éluion pour une protéine donnée.

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

Les premiers essais effectués sur des préparations prélevées juste après leur éluion et sans addition de séralbumine ont échoué. Même en présence de celle-ci, ajoutée à une concentration finale de 1 mg/ml le résultat n'était guère meilleur.

Nous avons estimé que la colonne utilisée était responsable de cet échec puisqu'elle ne présentait plus les qualités et les propriétés requises pour une bonne séparation. En effet, sur les colonnes de gel-filtration en HPLC (TSK G3000 SW), nous travaillons dans une zone de pH limite (7,4) autorisée par le fabricant, mais il se trouve que c'est celle-ci qui assure la stabilité du récepteur. Donc, à partir d'un certain nombre d'injections, les gels qui sont à base de silice se



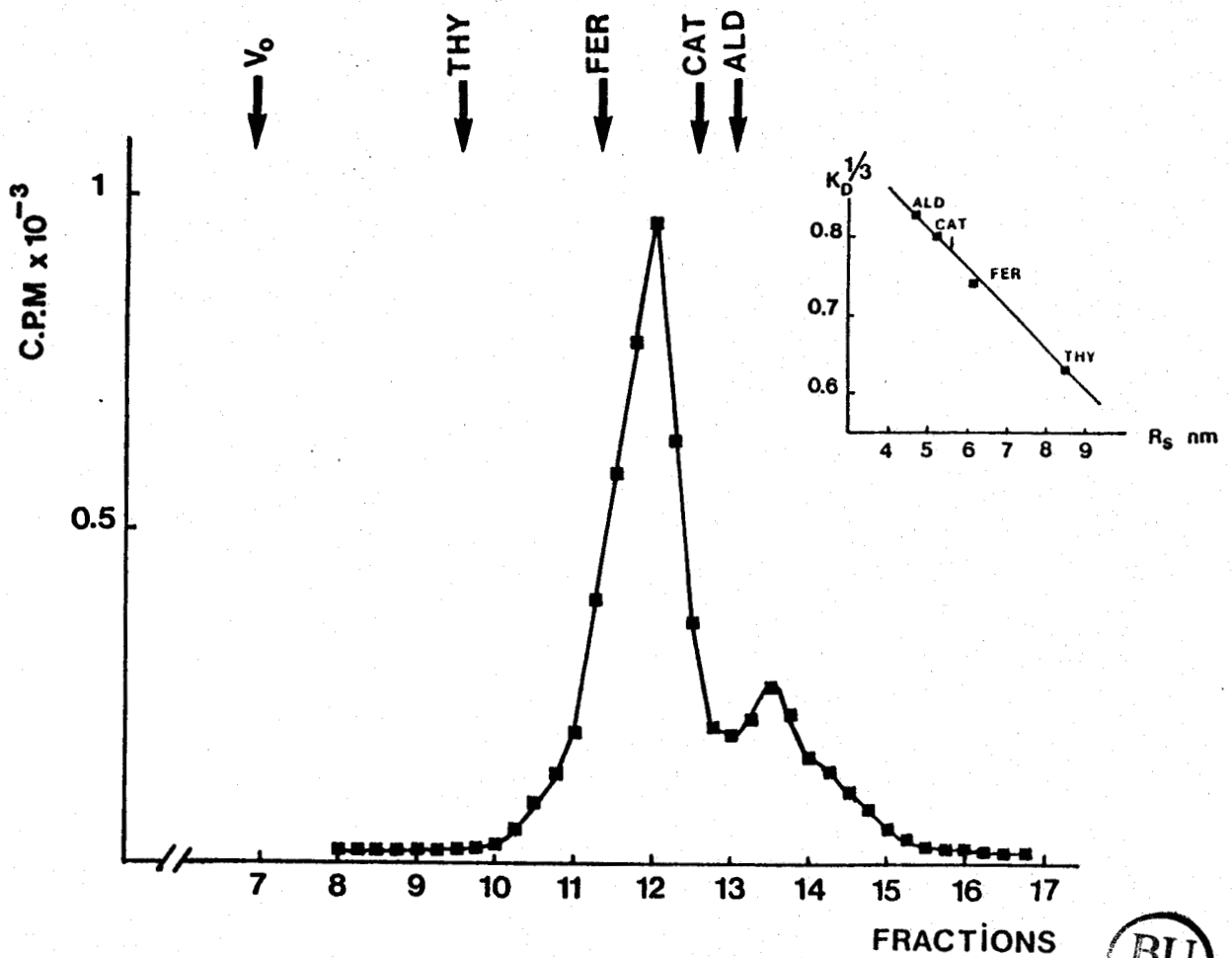


Figure 35 - Détermination du rayon de Stokes du récepteur purifié

200  $\mu$ l de l'éluat de chromatographie de DEAE préparative en HPLC sont déposés sur la colonne TSK G3000SW équilibrée dans le tampon phosphate 160 mM contenant du molybdate et du mercapto-éthanol. 100  $\mu$ l de chaque fraction sont comptés en radioactivité.

$V_0$  et  $V_t$  représentent respectivement le volume exclu et le volume total de la colonne. La calibration est obtenue en utilisant comme standard :

THY : Thyroglobuline (8,5 nm), FER : Ferritine (6,1 nm),  
 CAT : Catalase (5,2 nm), ALD : Aldolase (4,8 nm).

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

Un rayon de Stokes de 5,6 nm est obtenu pour le récepteur purifié.



détériorer et perdent leur inertie. Pour des préparations purifiées cela provoque la dissociation des complexes hormone-récepteur car les conditions de dilution sont plus importantes. C'est pourquoi nous avons mesuré le rayon de Stokes sur une colonne neuve et l'échantillon a été supplémenté avec de la sérumalbumine. Le profil obtenu contient en plus du pic majeur transformé un pic mineur. Ce dernier correspondrait soit à un produit de protéolyse du récepteur, soit à la sérumalbumine qui aurait fixé l'hormone.

La valeur du récepteur transformé que nous avons établie se rapprochait de celle décrite par Sablonnière *et al.* 1986 sur gel filtration en HPLC (5 nm) et aussi par Wrangle *et al.* 1979 sur gel-filtration conventionnelle (6 nm). L'écart qu'on pourrait rencontrer dans la littérature est essentiellement dû au fait que le rayon de Stokes est déterminé à partir de techniques différentes, gel-filtration conventionnelle (la plus utilisée) ou HPLC (plus rarement utilisée mais dont l'emploi se généralise).

Le rendement obtenu est de 23 %.

#### 4.5. DNA-cellulose : identification du matériel purifié

200 µl de l'éluat prélevés sur les fractions du récepteur transformé obtenues après la DEAE-préparative, sont dilués avec 100 µl de tampon phosphate 10 mM contenant du molybdate, du -mercapto-éthanol et du glycérol, et sont déposés sur une colonne de DNA-cellulose (3 ml) équilibrée en tampon phosphate 10 mM. Le temps de contact de l'échantillon avec la DNA-cellulose sur la colonne est limité à 15 minutes pour éviter une éventuelle dégradation du récepteur purifié. Le lavage avec le tampon phosphate 10 mM élimine l'hormone libre et les protéines à faible affinité pour la DNA-cellulose. L'élution s'effectue avec le tampon phosphate 10 mM contenant du KCl 0,5 M. Le taux de rétention sur la DNA-cellulose est de 25 % (figure 36) ; nous ne sommes jamais arrivés à améliorer ce rendement et cela, même en supplémentant l'échantillon avec de la sérumalbumine à une concentration finale de 1 mg/ml, et même en réincubant à l'élution avec l'hormone radioactive. Une explication est que l'instabilité du récepteur à la sortie de la colonne est accentuée par la dilution que nous réalisons pour abaisser la force ionique

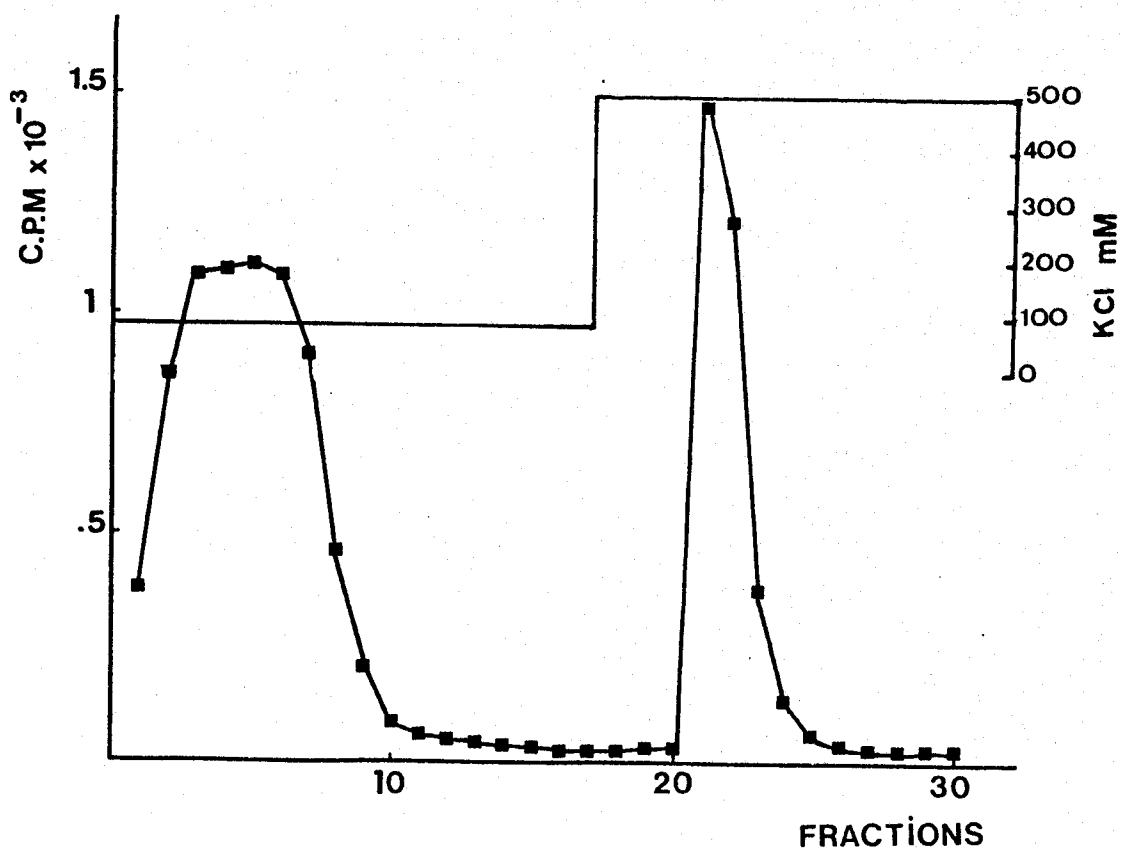


Figure 36 - Caractérisation du récepteur purifié sur une colonne de DNA-cellulose

200  $\mu$ l de l'éluat du récepteur purifié sont dilués avec 100  $\mu$ l du tampon phosphate 20 mEq, puis déposés sur 3 ml de DNA-cellulose équilibrée dans le même tampon. Après incubation pendant 15 minutes, un lavage avec le tampon phosphate 10 mM permet d'éliminer l'hormone libre. L'éluat est effectuée ensuite avec un tampon phosphate 10 mM contenant KCl 0,5 M. Le pic élué correspond au récepteur transformé.

et qui permet donc au récepteur de se fixer sur la DNA-cellulose. Le pic correspondant à l'hormone libre est très important, celui-ci serait probablement le résultat d'une dissociation qui intervient au cours de l'étape d'incubation avec la DNA-cellulose. Toutefois, celle-ci confirme l'identité du matériel purifié, à savoir qu'il s'agit bien du récepteur transformé.

#### 4.6. Chromatographie d'échange d'ions sur gel conventionnel et en HPLC.

Nous présentons simplement un tableau comparatif des forces ioniques nécessaires à l'élution du récepteur transformé des colonnes échangeuses d'ions établies par différents auteurs (Tableau IX). Nous observons que les variations pour les gels conventionnels sont plus importantes que pour les supports en HPLC, ce qui montre une fois de plus l'efficacité de ces derniers.

#### 4.7. Conclusion

Devant l'instabilité et la demi-vie courte du récepteur purifié sous forme transformée recueilli après l'élution, nous étions obligés d'opérer le plus rapidement possible. De ce fait, toutes les caractérisations ont été réalisées le jour même de la purification, sauf bien sûr, le PAGE/SDS et le Western-blot.

Cependant, nous étions satisfaits des paramètres déterminés avec le sucrose, la gel-filtration en HPLC et la DNA-cellulose puisqu'ils correspondent bien à ceux du récepteur cytosolique.

P. Lustenberger, à Nantes, avec qui nous collaborons sur ce sujet, nous a signalé qu'une protéolyse intervient au cours de l'étape d'élution et que cette protéolyse serait probablement due à la présence d'une protéase qui serait copurifiée avec le récepteur. Cependant, l'addition de la leupeptine au moment de l'élution a pour rôle d'inhiber cette protéase, et donc d'augmenter la stabilité du récepteur. Nous n'avons pas encore expérimenté cet inhibiteur, mais les essais réalisés à Nantes sont très encourageants.

Toutefois, nous disposons d'un argument supplémentaire pour expliquer l'instabilité du récepteur.

AUTEURS	COLONNES UTILISEES	CONCENTRATION EN SEL NECESSAIRE A L'ELUTION DU RT NaCl ou HCl (M)
GOVINDAN 1978	DEAE-cellulose	0,2
WRANGE 1979	DEAE-Sepharose	0,16
1984	DEAE-Sepharose	0,11
GRANDICS 1984	DEAE-cellulose	0,08
IDZIOREK 1985	DEAE-analytique-HPLC	0,18
BELAHSEN 1987	Mono Q-HPLC	0,22
	DEAE-analytique HPLC	0,18-0,2
	DEAE-preparative HPLC	0,18-0,2

TABLEAU IX - Comparaison des concentrations nécessaires à l'éluion du récepteur transformé établies par différents auteurs sur les supports conventionnels et sur supports en HPLC.

RT : Récepteur transformé.

M : Molaire.



Toujours à cause de l'instabilité, il était difficile de concevoir des études de détermination de demi-vie et donc de la constante de dissociation (KD). Nous n'avons pas tenté non plus de mesurer la spécificité en réalisant des manipulations de compétition entre le complexe hormone-récepteur et autres stéroïdes.

Le marquage covalent d'affinité n'a pas été réalisé, mais a priori il serait moins délicat à appliquer au récepteur transformé.

Nous nous sommes donc contentés de contrôler les paramètres essentiels pour affirmer qu'il s'agit bien du récepteur transformé.

La préparation du récepteur transformé obtenue n'est pas hautement purifiée, en plus elle est instable. Il reste à la purifier davantage, tout en la concentrant, ce qui augmenterait relativement sa stabilité.

## METHODES BASEES SUR LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

## A) APPLICATIONS DE LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE A SEQUENCES DE DNA SPECIFIQUE

Au vu des résultats obtenus avec l'HPIEC, il apparaît intéressant de mettre en place une étape ultime pour achever la purification du récepteur des glucocorticoïdes. Pour cela nous avons pensé que seule la propriété que possède le récepteur de lier le DNA pouvait encore être exploitée.

Nous avons d'abord utilisé la DNA-cellulose, mais celle-ci s'est avérée une mauvaise candidate pour remplir cette tâche. Ensuite, nous nous sommes orientés vers le développement d'une technique de chromatographie d'affinité sur gel d'agarose en utilisant la séquence oligonucléotidique "consensus" récemment élucidée qui reconnaît spécifiquement le récepteur des glucocorticoïdes.

Il s'agit d'une technique nouvelle qui a été mise au point dans le cadre de l'étude du mécanisme de régulation de la transcription. En effet, les analyses biochimiques et génétiques suggèrent que plusieurs facteurs protéiques et enzymatiques interviennent dans ce mécanisme.

Pour identifier et purifier ces facteurs existant en faible concentration cellulaire, plusieurs auteurs ont utilisé la propriété essentielle de ces protéines, à savoir leur capacité de se lier à des séquences spécifiques de DNA. Avant d'arriver à cette étape ultime dans la réalisation d'un gel de DNA totalement spécifique, un certain nombre d'auteurs ont utilisé des supports comportant des séquences de DNA spécifique de la protéine qu'ils avaient à purifier. Nous allons passer en revue les résultats obtenus dans ce domaine.

## 1) Utilisation de séquences enrichies

Pour purifier l'antigène tumoral (T), Oren *et al.* 1980, ont utilisé deux colonnes de DNA-cellulose. Sur la première ils ont couplé le DNA total simple brin du virus SV<sub>40</sub>, et sur la seconde le DNA de thymus de veau. Les résultats montrent que la force ionique nécessaire pour éluer l'antigène (T) de la colonne DNA SV<sub>40</sub>-cellulose, est beaucoup plus élevée que celle nécessaire à son élution de la colonne de DNA de thymus de veau-cellulose. Cela confirme l'existence

sur le DNA du virus SV<sub>40</sub> de séquences spécifiques à la liaison de l'antigène (T), et explique en même temps la purification obtenue.

Pour purifier le répresseur Lac E.coli, Herrick (1980) utilise une stratégie similaire à celle qui vient d'être évoquée, seulement ici la méthode est plus spécifique. En effet, il a utilisé deux colonnes de DNA-cellulose. Sur la première, le DNA est représenté par un plasmide contenant l'opérateur, alors que sur la seconde, l'opérateur est absent. Les résultats rapportés montrent que la force ionique nécessaire à l'élution du répresseur Lac de la colonne du plasmide-opérateur-cellulose était quatre fois plus élevée que celle qu'il aura fallu pour l'éluer de la colonne plasmide-cellulose.

La purification du facteur nucléaire NF.1 (facteur protéique qui participe à l'initiation de la réplication du DNA de l'Adénovirus *in vitro*), a été réalisée par une technique encore plus spécifique (Rosenfeld et Kelly, 1986). Elle comprend deux étapes ; la première consiste à fractionner les protéines sur un support d'affinité contenant du DNA d'E.coli non spécifique. La seconde étape utilise un support sur lequel a été greffé un plasmide qui contient 88 copies du site liant le facteur nucléaire NF 1.

Par l'intermédiaire de cette technique, le taux de purification a atteint 2400 fois. La deuxième étape apporte à elle seule un taux de purification de 40 fois. Nous signalons qu'au cours de la première étape aucune purification n'est obtenue, mais celle-ci a pour rôle de prévenir les adsorptions non spécifiques.

Dans le but de comprendre le mécanisme de reconnaissance des sites spécifiques au niveau de l'ARNm au cours de l'étape de dépissage, Grabowski et Sharp (1986) ont développé une technique de chromatographie d'affinité tout à fait originale et très spécifique, pour purifier les différentes particules ribonucléoprotéiques nucléaires qui interviennent dans ce processus (figure 37).

La technique est basée sur l'interaction spécifique entre avidine et biotine. Le RNApré (RNA prématuré) est synthétisé en présence d'une faible quantité de Biotine-UTP (UTP : Uridine tri-phosphate). Le complexe résultant Biotine marquée-RNApré est utilisé comme substrat pour l'épissage sous conditions standard dans l'extrait nucléaire des cellules HeLa . La très forte affinité de l'interaction Avidine-



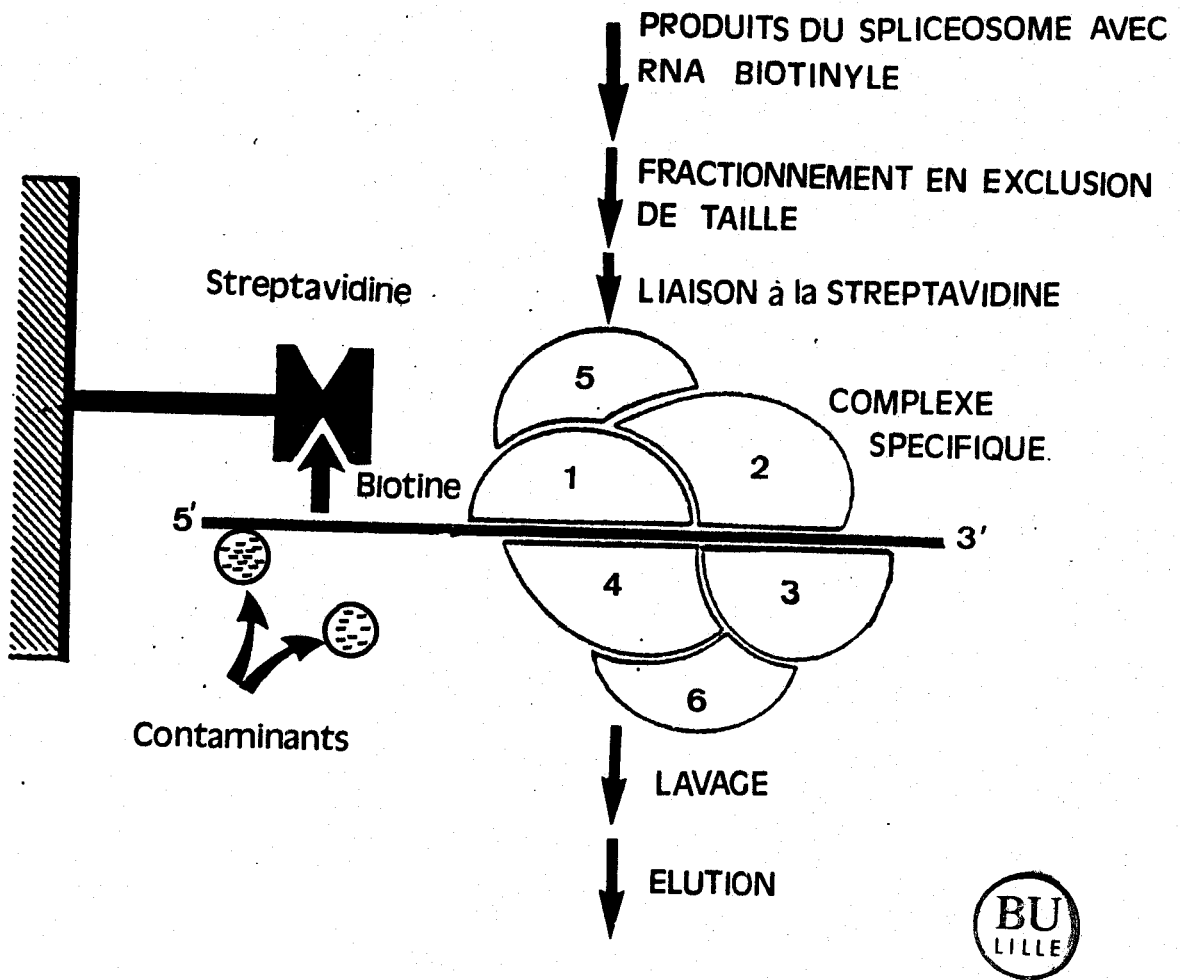


Figure 37 - Schéma de purification par affinité des composants du spliceosome.

Biotine (constante de dissociation égale à  $10^{-15}$ ) (Green, 1985) apporte une rétention spécifique de ces complexes. Cela permet un lavage très abondant du gel. A l'élution, seuls les facteurs ribonucléoprotéiques sont récupérés et analysés en gradient de sucrose.

2) Utilisation d'oligonucléotides synthétiques totalement spécifiques.

Une publication parue récemment a particulièrement attiré notre attention (Kadonaga et Tjian, 1986). Les auteurs décrivent une méthode de purification par affinité du facteur de transcription Sp 1. Dans un premier temps, les oligonucléotides complémentaires synthétisés chimiquement et reconnaissant spécifiquement le facteur de transcription Sp 1 sont appariés dans un tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) contenant entre autre la spermidine 1,3 mM, puis phosphorylés à l'extrémité 5' phosphate à l'aide de l'ATP marqué au  $^{32}\text{P}$  et la polynucléotide kinase  $T_4$  ; enfin une polymérisation permet d'obtenir des oligomères rassemblant 3 à 5 monomères. Dans un second temps les oligomères synthétisés sont couplés au Sépharose CL 2B (Pharmacia) activé au bromure de cyanogène.

La concentration de DNA lié au sépharose est de 20-30  $\mu\text{g/ml}$  de gel, ce qui correspond à une capacité théorique maximale des protéines de 2 à 3 nmoles/ml de gel, pour des sites de reconnaissance contenant environ 15 paires de bases. Ce calcul suppose que tous les sites de liaison sont accessibles à la protéine. En pratique cela ne se réalise pas.

La protéine à purifier interagit avec la séquence spécifique du support avec une spécificité étroite. Celle-ci peut être affectée si d'autres protéines ayant de l'affinité pour le DNA entrent en compétition avec la protéine à purifier et risquent ainsi de se fixer sur le support. Pour éviter cela, Kadonaga utilise une chromatographie dans un mode de compétition avec du DNA "non spécifique" pour adsorber les protéines non spécifiques et enzymes (nucléases), qui peuvent dégrader le support. Une explication schématique est présentée sur la figure 38.

Une autre alternative à cette technique consiste à établir un gradient linéaire en sel après la fixation des protéines, mais

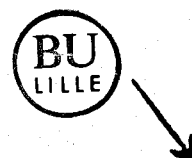
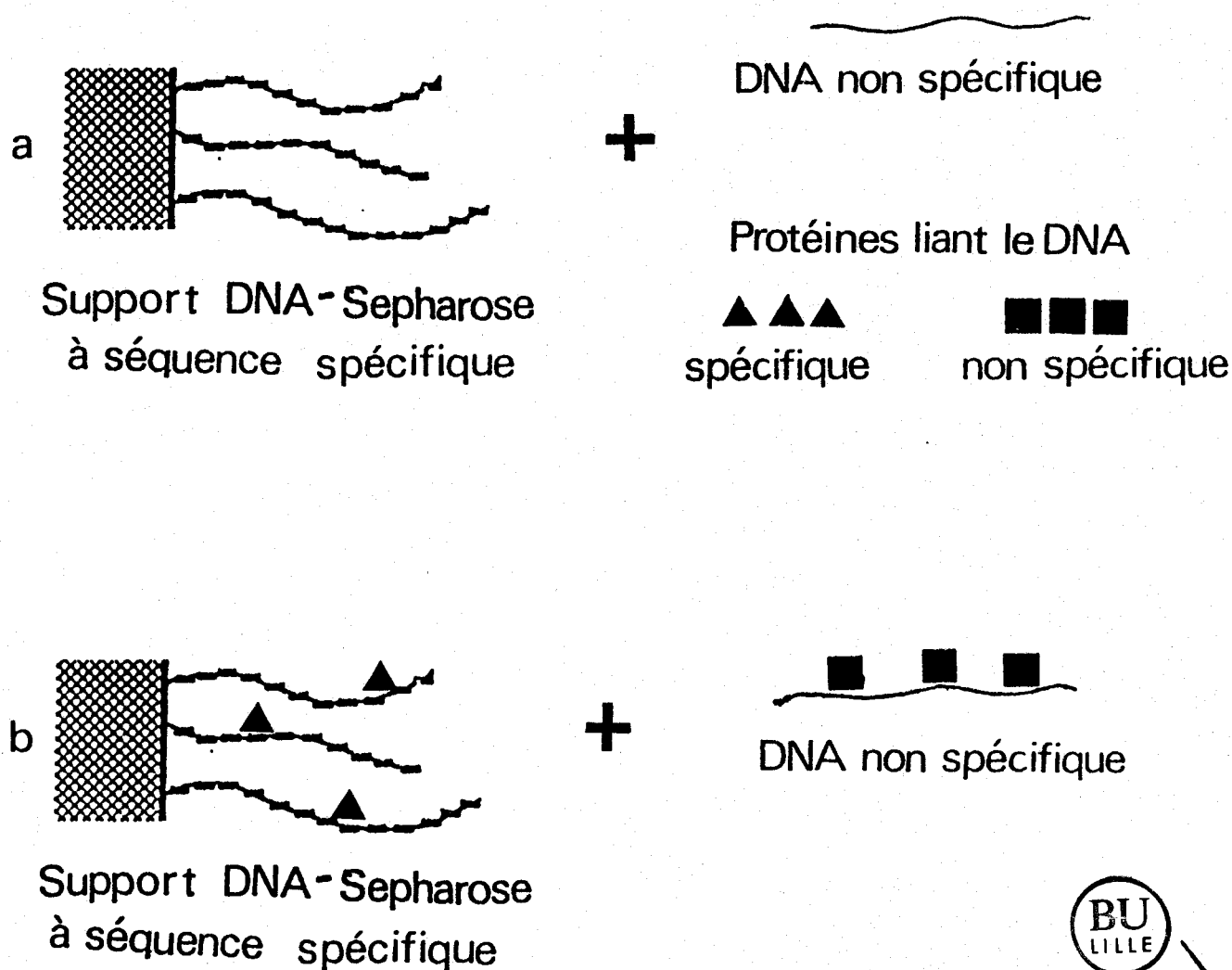


Figure 38 - Technique de compétition décrite par Kadonaga et Tjian, 1986.

- a) la préparation partiellement purifiée est d'abord incubée pendant 10 minutes avec du DNA de thymus de veau (non spécifique). Ensuite, elle est injectée dans le gel d'affinité spécifique.
- b) Normalement, les protéines spécifiques se fixent sur le DNA du gel alors que les protéines non spécifiques se fixent sur le DNA de thymus de veau.

celle-ci n'a pas été retenue probablement à cause du caractère non spécifique qu'elle présente et aussi de sa réalisation délicate.

Dans le cas de la technique retenue, le DNA compétiteur doit être minutieusement choisi en réalisant des essais avec des séquences de DNA mono brin. Par ailleurs, la composition du tampon intervient aussi et il faut veiller à un bon équilibre entre les divers cations métalliques, vérifier le pH et ajouter un chélateur qui prévient l'action des nucléases. C'est une technique qui demande beaucoup de précautions mais le résultat est impressionnant. En effet, les deux étapes utilisées permettent à elles seules d'atteindre un taux de purification de 500 à 1000 fois avec un rendement de 30 % dans un état à 90 % d'homogénéité. La première étape de compétition représente un point crucial grâce auquel ce résultat a été obtenu.

La contribution de cette technique à la purification du facteur SP 1 est très importante, elle amène le taux de purification final à une valeur de 30000. Par rapport aux techniques décrites dans la première partie de ce chapitre, cette technique se distingue d'une part par l'addition d'une étape de compétition avec le DNA de thymus de veau avant l'incubation avec la séquence spécifique du gel, et d'autre part par l'incubation d'oligonucléotides synthétiques qui reconnaissent la spécificité de la résine sépharose-DNA. Cela explique probablement les résultats obtenus.

### 3) Conclusion

Au vu des résultats, il apparaît que l'utilisation d'oligonucléotides synthétiques ouvre de nouvelles perspectives pour la purification de protéines existant en très faible concentration cellulaire et qui lient le DNA. A ce propos, la technique de Kadonaga connaît actuellement un succès rapide ainsi qu'en témoignent plusieurs communications présentées dans une récente réunion scientifique des spécialistes de la biologie moléculaire et de la purification des protéines (J. Martial, communication personnelle).

B) RESULTATS PERSONNELS

Nous avons décidé de réaliser la synthèse d'un gel d'affinité d'oligonucléotides de la séquence "consensus" reconnaissant spécifiquement le récepteur des glucocorticoïdes selon la méthode de Kadonaga et Tjian, 1986. Mais pour mener à bien cette approche il faut bénéficier impérativement d'une collaboration étroite entre différents laboratoires spécialisés chacun dans un domaine : synthèse chimique des oligonucléotides, manipulation du DNA, synthèse des gels d'affinité, purification du récepteur transformé.

Notre expérience dans les deux derniers domaines a valu à notre laboratoire d'être engagé dans une telle collaboration. La synthèse chimique des oligonucléotides a été réalisée dans le laboratoire de J. Martial à Liège, et les expériences relatives à la manipulation du DNA ont été effectuées chez J.P. Kerckaert, à l'Institut de recherche sur le cancer de Lille.

Le schéma de préparation du gel d'affinité pour la purification des protéines reconnaissant une séquence spécifique a été reporté sur la figure 39. Ce gel doit avoir les propriétés suivantes :

- Pour maximiser l'adsorption de la protéine à purifier, et minimiser la contamination par d'autres protéines, le DNA couplé doit contenir seulement des séquences bicaténaires répétitives ayant une grande affinité pour la protéine à purifier.

- Pour s'assurer que le DNA est accessible à la protéine et fixé solidement au support, chaque molécule de DNA est couplée à celui-ci par une liaison covalente.

1) Préparation des oligonucléotides de la séquence "consensus" spécifique du récepteur des glucocorticoïdes.

- Choix de la séquence utilisée

Il se trouve que notre laboratoire est engagé dans une collaboration avec celui de J. Martial à Liège. Au sein de ce laboratoire, les études sur le gène de la famille hGH (hormone de croissance humaine), régulé par les hormones glucocorticoïdes, ont abouti à l'identification de la séquence "consensus" (Eliard *et al.*, 1985). Cette séquence comporte 17 nucléotides parmi lesquels une variante du "consensus" minimum TGTCTT à la place du "consensus" classique

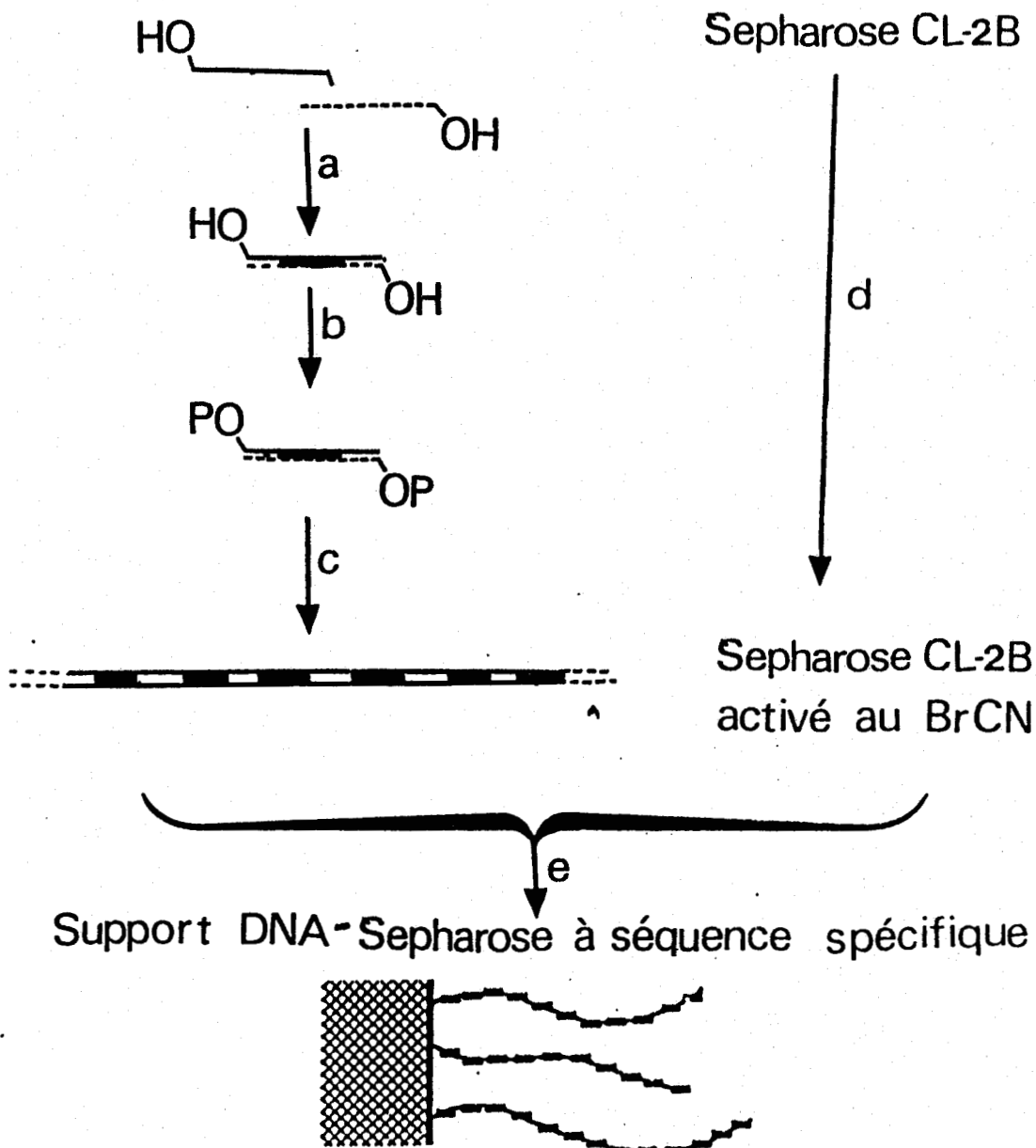


Figure 39 - Préparation de la séquence spécifique du support DNA-Sepharose.

(a) appariement des oligodesoxynucléotides complémentaires ;  
 (b) phosphorylation de l'extrémité 5' par la polynucléotide-kinase T4 et l'ATP, (c) Polymérisation des oligonucléotides complémentaires avec la DNA ligase T4 et ATP ; (d) activation du Sepharose CL 2B avec CNBr ; (e) couplage du DNA au sépharose activé et obtention du support. Le DNA se lie covalentielllement au gel par les groupes amines primaires des résidus libres à l'extrémité 5' terminale. Cependant la position exacte par laquelle le DNA est attaché au gel n'est pas connue.

TGTTCT (figure 40). Le même laboratoire réalise la synthèse chimique de la séquence complète à l'aide de synthétiseurs automatiques. Nous pouvons disposer de ces séquences dans le cadre de la collaboration engagée avec ce laboratoire et c'est pourquoi notre choix s'est porté sur celle-ci.

Nous avons reçu les oligonucléotides sous forme de deux brins complémentaires séparés, chacun dans un tube. Les séquences sont présentées sur la figure 40.

#### - Synthèse chimique

Cette synthèse se fait à l'aide de protection chimique des fonctions actives sur les nucléotides. Normalement, on ne doit laisser qu'une seule fonction libre bien choisie au départ, tout en bloquant les autres fonctions. A la fin de la réaction, le déblocage a été réalisé par l'ammoniac.

#### 2) Hybridation, phosphorylation, ligation

Ces expériences ont été menées sous la direction de J.P. Kerckaert à l'Institut de Recherche sur le cancer de Lille. Les oligonucléotides que nous avons reçus étaient en solution dans le tampon de déprotection. Nous les avons évaporés sous azote puis repris dans 100 µl d'eau, 10 µl d'acétate de sodium 3M et 250 µl d'éthanol 95 %. Après centrifugation dans les tubes Eppendorf pendant 20 minutes, les surnageants sont éliminés et les culots congelés à - 20°C. Cette étape avait pour but de laver les oligonucléotides et de les débarrasser de l'ammoniaque utilisé pour l'étape de déprotection. A l'usage, les tubes sont décongelés et reprécipités une deuxième fois à l'éthanol avant d'être lavés au TE/Ethanol (30:70) (TE Tris HCl 10 mM pH 7,6, EDTA 1 mM). Après centrifugation, les culots 19 et 20 sont repris avec 50 µl de TE. 2,5 µl de cette solution sont prélevés et dilués dans 2 ml de TE pour le contrôle au spectre UV et mesure de la DO à 260 nm.

La quantité de DNA de départ estimée par ces mesures est de 1000µg de DNA dans le tube 19 et 200 µg dans le tube 20. Cette différence provient du problème que nous avons eu pour solubiliser le tube 19. En effet, il restait toujours un précipité probablement dû à une dénaturation des séquences au cours de l'évaporation à sec. Celle-

Bgl II

5' GATCTAGGACACAT TGTGCC

5' GATCTGGCACAATGTGTCCT

Bgl II Site de liaison au R-GC  
Premier intron du GH

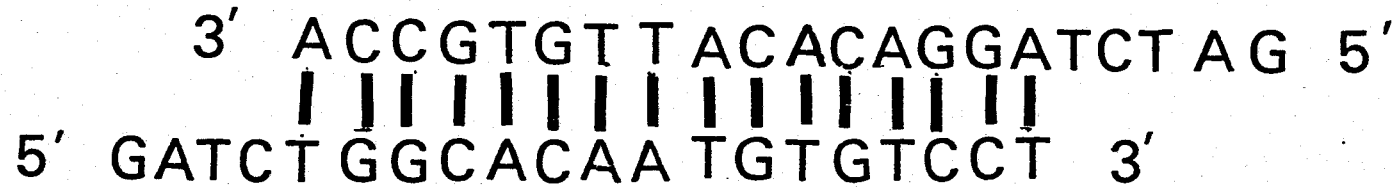


Figure 40 - Séquence complémentaire complète spécifique du récepteur des glucocorticoïdes.  
La séquence "consensus" est soulignée.





ci est en effet à éviter car elle peut conduire à une insolubilisation irréversible du DNA. Une tentative de ressolubilisation par agitation à température ambiante pendant plusieurs jours a échoué.

. L'hybridation est réalisée en mélangeant environ 200 µg de chaque séquence complémentaire (19 et 20) dans un tampon Tris HCl 70 mM contenant entre autre la spermidine. Le mélange est porté à différentes températures par incubations successives dans des bains-marie réglés à 88°C (2 min), 65°C (10 min), 37°C (10 min) et enfin à température ambiante (5 min). Une solution d'ATP 20 mM contenant 5 µCi d'ATP marqué au <sup>32</sup>P et à laquelle on ajoute 80 unités de polynucléotide kinase T4 (Boehringer Mannheim (8u/ml) est ajoutée au mélange pour la réaction de phosphorylation. Après incubation pendant 2 heures à 37°C, la réaction est stoppée par addition d'acétate d'ammonium 5M, pH 5,5, de MgCl<sub>2</sub> 100 mM et de TE. Enfin, l'enzyme est inactivé par chauffage dans un bain-marie à 65°C pendant 15 minutes. Le DNA est précipité dans l'éthanol puis centrifugé à 0°C. Le culot obtenu est lavé par resuspension dans le tampon TE contenant de l'acétate de sodium 3M, du MgCl<sub>2</sub> 100 mM, ceci pour éliminer l'excès du produit radioactif et de l'enzyme, puis reprécipitation et centrifugation pendant 30 minutes à 0°C. Le culot est enfin lavé à l'éthanol 70 %.

. La première expérience de ligation a été réalisée dans des conditions couramment utilisées au laboratoire de J.P. Kerckaert. La réaction se fait dans un tampon Tris 30 mM, pH 7,8 contenant MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 10 mM, ATP 0,5 mM, BSA 0,1 mg/ml) et 5 unités de ligase T (Promega Biotec, Madison Wisconsin USA). Après incubation pendant une nuit à 16°C, des aliquotes dilués sont déposés en présence de témoins sur un gel d'agarose 2 %. La révélation est obtenue par exposition du gel à la lumière ultraviolette, ceci grâce au bromure d'ethidium, agent intercalant contenu dans les dépôts et qui donne une fluorescence quand il est intercalé. Cette révélation montre que les séquences appariées sont restées à l'état de monomères, et que donc la ligation a échoué.

Nous avons estimé que le fait d'avoir utilisé un tampon et un temps d'incubation différents de ceux recommandés par Kadanoga et Tjian (1986) a été probablement à l'origine de cet échec. C'est pourquoi nous avons repris les mêmes conditions exposées par ces auteurs à savoir, utiliser un tampon Tris HCl 88 mM, pH 7,5 contenant MgCl<sub>2</sub> 13,3 mM,

DTT 20 mM, spermidine 1,3 mM et auquel est ajouté de l'ATP 20 mM et la ligase T4 (5 unités). L'incubation a duré 4 heures à 16°C. Le résultat obtenu n'était guère meilleur que le premier avec cependant l'apparition d'un dimère. Nous avons vérifié au détecteur de radioactivité que les séquences étaient bien marquées et nous avons prolongé le temps d'incubation à 60 heures à 0°C et ceci après avoir ajouté 5 unités de ligase T4. Le contrôle par électrophorèse sur gel d'agarose a montré cette fois l'apparition de polymère allant de 1 à 20 monomères.

Le DNA a ensuite été extrait au phénol, lavé au chloroforme puis précipité au méthanol. Le culot a été lavé d'abord dans un mélange méthanol/TE (70/30), ensuite dans le mélange éthanol/H<sub>2</sub>O (70:30). Le culot a été enfin repris dans l'eau.

### 3) Couplage au sépharose CL 2B

Le couplage des séquences de DNA spécifique polymérisé comprend une étape d'activation du gel et une autre de fixation des polymères sur celui-ci.

L'activation du gel a été réalisée à pH neutre, selon la technique de Kohn et Wilchek (1981). Nous avons suivi au départ les conditions qui ont été établies par Lustenberger *et al.* (1981) pour la préparation d'un gel d'affinité afin de purifier le récepteur non transformé. Ainsi, le taux de BrCN utilisé était de 0,7 mg par ml de gel égoutté.

L'activation a été réalisée en deux minutes, elle a été suivie de plusieurs lavages rapides (voir appendice technique) le dernier étant réalisé avec le phosphate 10 mM pH 8. Le nombre de fonctions activées sur le gel a été estimé par dosage des esters cyanates dans l'heure qui suit l'activation. Le gel est incubé en présence du DNA pendant une nuit à 20°C. Le lendemain, après centrifugation, le surnageant (4 ml) est séparé du gel puis un aliquote de ce dernier est prélevé pour être lavé à l'eau et compté en radioactivité. Le taux de fixation obtenu est pratiquement nul.

Nous avons réalisé la même expérience avec le DNA récupéré, mais en changeant seulement le taux de BrCN (3 mg/ml de gel au lieu de 0,7 mg/ml). Malheureusement, le résultat était identique.

Une autre expérience réalisée avec 29 mg de BrCN par ml de gel a enfin permis d'obtenir un taux de fixation du DNA de 4 %. Mais il est évident que nous sommes loin des rendements trouvés par Kadonaga et Tjian (1987) qui étaient de 40 à 70 %.

Le tableau X montre les différents essais avec la quantité de BrCN utilisé, la concentration des fonctions cyanate activés et le taux de DNA greffé.

Deux raisons peuvent être évoquées pour expliquer ce faible rendement. D'une part, il est probable que même si nos conditions d'activation sont déjà importantes, elles sont encore insuffisantes, comparées à celles utilisées par Kadonaga et Tjian (1981). En effet, ces auteurs ont travaillé avec une quantité de BrCN quatre fois plus importante que la nôtre. Il s'agit là de conditions très brutales et tout à fait exceptionnelles dans la préparation d'un gel d'affinité. Poonian *et al.* (1971) avaient déjà signalé la difficulté que présente la fixation sur support d'agarose activé au BrCN d'un DNA bicaténaire par rapport au DNA monocaténaire. A cet égard, l'exemple du DNA double brin d'*E. coli* est impressionnant. En effet, le taux de fixation sur support agarose était nul. Ces auteurs ont montré que plus on augmente le taux de DNA monocaténaire, plus le taux de fixation sur le support augmente. De plus, ils ont pu établir que l'utilisation d'un brin monocaténaire polyadénylique s'accompagnait d'une fixation maximum de 98 %. Ce pourcentage dépasse de loin tous ceux obtenus avec des morceaux de DNA contenant plus ou moins une petite ou une grande quantité de brin monocaténaire.

D'autre part, il est très vraisemblable que les polymères que nous avons utilisés étaient trop courts.

Au vu de cette analyse, nous avons adopté la stratégie suivante :

- utiliser des conditions aussi brutales que celles rapportées par Kadonaga et Tjian (1981) ;
- améliorer la polymérisation des oligonucléotides ;
- fixer sur le double brin polymérisé une petite queue polyA monobrin en 5', cela facilitera probablement la fixation au support.

GEL	CNBr mg/ml of GEL	CYANATE $\mu\text{mol/ml}$ of GEL	COUPLING TO DNA 100-200% for 5 ml GEL	
			CONDITIONS	YIELD
1	0.7	-	$\text{K}_2\text{HPO}_4$ 10mM pH 8.0 20°C x 18h	0 —
2	3.0	0.55	SAME BUFFER 0-4°C x 18h	0
3	30.0	2.68	$\text{K}_2\text{HPO}_4$ 30mM pH 10.0 4°C x 18h	4 % 1.3% /ml 0.025 nmole



TABLEAU X - Essais de préparation d'un gel d'affinité greffé avec la séquence complète spécifique du récepteur des glucocorticoïdes.

## CONCLUSION

## CONCLUSION

Durant les dix dernières années, la purification du récepteur des glucocorticoïdes sous forme transformée, a été réalisée par de nombreuses équipes, selon un protocole basé essentiellement sur la chromatographie sur supports polyanioniques du genre DNA et phosphocellulose.

Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse propose une alternative originale et plus rapide. Elle concerne l'utilisation de la chromatographie d'échange d'ions en HPLC. En effet, la méthode mise au point nous a donné des satisfactions bien meilleures que l'application des techniques classiques.

La préparation purifiée récupérée au terme de deux étapes (précipitation au sulfate de protamine et DEAE préparative en HPLC), était dans un état d'homogénéité suffisant pour permettre d'envisager les applications suivantes :

- Production d'anticorps par immunisation de lapins
- Réaliser des expériences relatives à la technique des empreintes, en collaboration avec le laboratoire de J. Martial à Liège. Le but serait de mieux comprendre l'interaction DNA-récepteur.
- Reconstitution de la forme non transformée du récepteur par assemblage des sous-unités non liantes à la sous-unité liante purifiée avec le récepteur transformé. Cette application nécessitera des préparations davantage purifiées.

Les exemples d'application proposés ici seront mis en oeuvre dès que les problèmes liés à la stabilité et à la protéolyse du récepteur seront résolus.

APPENDICE TECHNIQUE

## I - MATERIEL BIOLOGIQUE

## 1) Tampons

## - Tampon Hepes

Hepes	10 mM
DTT	1 mM
EDTA	1 mM
Glycérol	10 %
NaCl	100 mM
Eau ultra pure	qsp 100 ml

le pH est ajusté à 7,4 avec HCl 1M.

Avant l'emploi le pH est de nouveau ajusté à 7,4.

## - Tampon Tris-HCl (Sigma)

Tris	20 mM
DTT	1 mM
EDTA	1 mM
Glycérol	10 %
KCl	50 mM

le pH est ajusté à 7,4 à l'aide de HCl 1M. Avant l'emploi le pH est réajusté à 7,4.

## - Tampon TES (Sigma)

TES	20 mM
2-mercaptoéthanol	20 mM
EDTA	1 mM
NaMoO <sub>4</sub>	10 mM
NaCl	50 mM
PMSF	0,2 mM
Glycérol	10 %
Eau ultra pure	qsp 500 ml



le pH est ajusté à 7,4 à l'aide de HCl 1M. Avant l'emploi le mercaptoéthanol est ajouté et le pH est de nouveau ajusté à 7,4.



## - Tampon phosphate 160 mM

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	160 mM (Merck)
2-mercaptoéthanol	20 mM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4$	10 mM
Glycérol	10 %
$\text{H}_2\text{O}$ ultra pure	qsp 500 ml

le pH est ajusté à 7,4 avec  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  160 mM avant l'addition des autres réactifs. Avant l'emploi, le 2-mercaptoéthanol est ajouté et le pH réajusté à 7,4 avec KOH 2M.

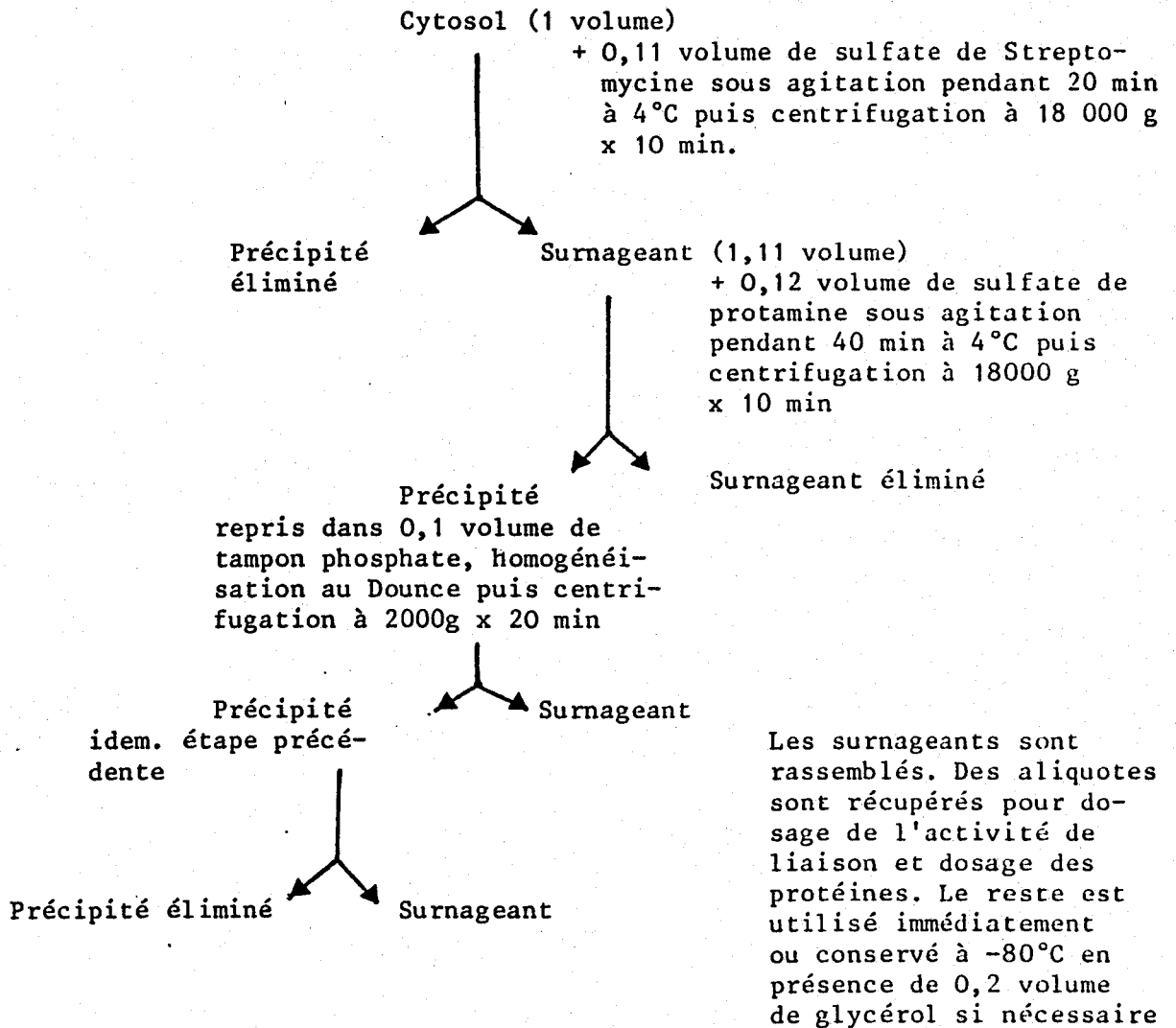
- Sulfate de streptomycine (Merck) 10 % dans l'eau ultra pure.
- Sulfate de protamine (Merck) 0,75 % dans l'eau ultra pure (dissoudre à chaud).

## 2) Préparation du cytosol

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

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

3) Préparation de l'extrait du récepteur précipité au sulfate de protamine (Govindan *et al.* 1978)



## II - MESURE DE L'ACTIVITE DE LIAISON

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

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

## Réactifs

## Suspension de charbon

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

## Mode opératoire

A l'arrêt de l'incubation, on prélève 2 fois 0,2 ml dans chaque tube d'incubation auxquels on mélange 0,1 ml de suspension de charbon. Après 10 secondes d'agitation au Vortex et 15 minutes de contact, les tubes sont centrifugés à 5000 cpm pendant 3 minutes. 150 µl de surnageant sont prélevés et ajoutés à 5 ml d'Aqualuma.

## III - PURIFICATION DU RECEPTEUR SOUS FORME TRANSFORMEE

A - CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS SUR SUPPORTS POLYANIONIQUES  
(DNA et phosphocellulose)

## 1) Tampons

## 1.1. Tampon Hepes

## - Tampon E

Hepes	10 mM
DTT	1 mM
EDTA	1 mM
Glycérol	10 %

Le pH est ajusté à 7,4 à l'aide de NaOH 0,1N  
 A l'emploi il est réajusté à 7,4

- Tampon A = tampon E + NaCl 100 mM
- Tampon B = Tampon E + NaCl 50 mM
- Tampon C = tampon E + NaCl 450 mM
- Tampon D = tampon E + NaCl 1M

### 1.2. Tampon Tris

- Tampon I

Tris (Sigma)	20 mM
DTT	1 mM
EDTA	1 mM
Glycérol	10 %

le pH est ajusté à 7,4 avec HCl 1M.

Avant l'emploi, il est ajusté à nouveau à 7,4.

- Tampon F = tampon I + KCl 50 mM
- Tampon G = tampon I + KCl 450 mM
- Tampon H = tampon I / KCl 1M

Abréviations : HEPES : acide hydroxyethyl piperazine ethane sulfonique  
 Tris : Tris(hydroxymethyl)aminométhane  
 EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique  
 DTT : Dithiothréitol

## 2) Préparation des colonnes chromatographiques

### 2.1. Equilibrage

Les colonnes sont équilibrées par le tampon ayant servi à la préparation du cytosol, donc les tampons A et F. 5 volumes de tampon pour 1 volume de gel sont largement suffisants pour équilibrer la colonne. Le débit est en moyenne égal à 1 ml/2 min.

### 2.2. Régénération

La régénération des colonnes ayant servi à la filtration ou à l'adsorption du cytosol se fait en deux étapes :

- Lavage avec le tampon D ou bien le tampon H à débit relativement élevé (1 ml/min) 5 volumes de tampon pour un volume de colonne.

- Lavage avec le tampon E ou le tampon I à débit moyen (1,5 ml/2 min) (10 volumes de tampon pour un volume du gel de la colonne.

## B - CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS A HAUTE PERFORMANCE

### 1 - Appareillage

Les colonnes utilisées sont : Mono Q HR 5/5 de Pharmacia et TSK 545 DEAE analytique et préparative de LKB.

La HPIEC est effectuée sur un appareil Waters 204 4/6/6-GN, équipé de deux pompes 6000 A, couplées à un programmeur de gradient Waters 660, d'un détecteur Waters 480 réglé à 280 nm. Les fractions sont collectées sur un appareil Gilson programmable 201.

La concentration en sodium et en potassium est mesurée sur un spectrophotomètre de flamme (flamme Photometer, model 143, Instrumentation laboratory, Inc.)

### 2 - Tampons

#### .Tampon phosphate M

$K_2HPO_4$	50 mM
$\beta$ -mercaptoéthanol	20 mM

le pH est ajusté à 7,4 avec  $KH_2PO_4$  50 mM. A l'emploi le mercaptoéthanol est ajouté et le pH réajusté à 7,4 avec KOH 1M.

#### .Tampon phosphate N = Tampon M + NaCl 500 mM

#### .Tampon d'équilibrage

100 ml de ce tampon est obtenu en mélangeant 80 ml de tampon M et 20 ml de tampon N.

#### .Tampon du premier lavage

100 ml de ce tampon sont obtenus en mélangeant 65 ml de tampon M et 20 ml de tampon N.

## .Tampon d'équilibrage de la gel-filtration ACA 202

$K_2HPO_4$	130 mM
$NaMoO_4$	10 mM
Mercaptoéthanol	20 mM
Glycérol	10 %

le pH est ajusté à 7,4 avec  $KH_2PO_4$  130 mM. A l'emploi le mercaptoéthanol est ajouté et le pH réajusté à 7,4 avec KOH 1M.

## .Tampon de dilution de l'extrait de récepteur précipité au sulfate de protamine puis filtré sur gel-filtration.

$K_2HPO_4$	10 mM
$NaMoO_4$	10 mM
2-mercaptoéthanol	20 mM
Glycérol	10 %

le pH est ajusté à 7,4 avec  $KH_2PO_4$  10 mM. A l'emploi le mercaptoéthanol est additionné et le pH réajusté à 7,4 avec KOH 0,1M.

Tous les tampons sont filtrés sur filtre 0,45  $\mu$  et dégazés avant utilisation.

## 3 - Préparation des colonnes

## - Equilibrage

L'équilibrage de toutes les colonnes est suivi par absorbance à 280 nm. Généralement, 3 volumes du tampon pour un volume de colonne sont suffisants.

## - Régénération

Cette étape est réalisée systématiquement à la fin des manipulations. A la fin du gradient, la concentration en sel à l'intérieur des colonnes atteint 0,5 M. Elle est portée à 1M par un gradient de 15 min. contre une solution de NaCl 1M. Un autre gradient de 30 min permet de revenir à l'eau azidée, c'est après cela qu'on démarre un gradient de 10 min contre le méthanol 10-20 %. Enfin, retour à l'eau azidée dans laquelle la colonne doit impérativement être conservée.

#### 4 - Préparation du matériel à purifier

20 ml de l'extrait du récepteur précipité au sulfate de protamine sont dessalés sur une colonne IBF contenant 60 ml de gel ACA 202 équilibrée dans le tampon phosphate 260 mEq. 21,5 ml sont recueillis dans une éprouvette puis dilués avec 14 ml de tampon phosphate 20 mEq ; 0,5 ml sont prélevés pour le dosage de l'activité et des protéines et 35 ml sont injectés dans la colonne DEAE préparative.

#### C - CARACTERISATION DU RECEPTEUR

##### 1 - Chromatographie de gel-filtration en HPLC

La gel-filtration est effectuée avec une colonne TSK G3000 SW (7,5 x 300 mm) (LKB) plongée dans un bain de glace. Elle est équilibrée dans le tampon phosphate 320 mEq,  $\beta$ -mercaptoéthanol 20 mM et molybdate 10 mM, pH 7,4. Le débit de la pompe est de 0,5 ml/min. Le récepteur purifié (0,15 ml) est injecté dans la colonne et l'on recueille des fractions de 0,25 ml. Des aliquotes de 50  $\mu$ l de chaque fraction sont pris pour le comptage de la radioactivité sur un appareil Intertechnique SL 4000 avec comme produit de scintillation l'Aqualyte (J.T. Baker).

##### 2- Gradient de saccharose (5-20 %, p/v)

Le gradient de saccharose 5-20 % (p/v) a été préparé en condition de haute force ionique dans le tampon phosphate 160 mM, pH 7,4 à 4°C, glycérol 10 %, EDTA 1mM, mercaptoéthanol 20 mM NaMoO<sub>4</sub> 10 mM. On prépare deux solutions dans ce tampon, l'une à 5 % et l'autre 20 % en saccharose. Le gradient est réalisé grâce à un appareil à deux chambres cylindriques.

200  $\mu$ l du récepteur purifié sont déposés sur les tubes déjà pesés à la balance. Deux témoins l'aldolase (7,8S) et la sérualbumine (4,3S) sont déposés en même temps que le récepteur.

Après ultracentrifugation à 55000 rpm pendant 17 heures on ponctionne le fond des tubes et on récupère des fractions de 200  $\mu$ l qui sont ensuite comptées en radioactivité.

- 3) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS à gradient de réticulation linéaire 5-20 % (Laemmli, 1970)

*Matériel*

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

*Réactifs*

Solution A d'acrylamide à 5 %

Acrylamide		50,0 g
Bisacrylamide		1,33 g
Tris		45,3 g
SDS		1,0 g
TEMED		300 $\mu$ l
HCl 5,6 N	qsp	pH 8,8
H <sub>2</sub> O	qsp	1 litre

Solution B d'acrylamide à 20 %

Acrylamide		200,0 g
Bisacrylamide		5,32 g
Tris		45,3 g
SDS		1,0 g
TEMED		300 $\mu$ l
Glycérol		200 ml
HCl 5,6 N	qsp	pH 8,8
H <sub>2</sub> O	qsp	1 litre

Solution C de concentration

Acrylamide		30,0 g
Bisacrylamide		0,8 g
Tris		15,1 g
SDS		1,0 g
TEMED		500 $\mu$ l
HCl 5,6 N	qsp	pH 6,8
H <sub>2</sub> O	qsp	1 litre

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



## Tampon d'électrophorèse

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

Le tampon est à diluer au quart avant l'emploi

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

*Mode opératoire*

Entre des plaques de verre (150 x 100 et 1,5 mm d'épaisseur du gel) un bouchon d'acrylamide est coulé pour maintenir l'étanchéité du système (5 ml B + 50 µl de persulfate d'ammonium). Le gradient est ensuite formé (27,5 ml A + 50 µl de persulfate d'ammonium dans une chambre et 27,5 ml B + 50 µl de persulfate d'ammonium dans l'autre). Le gel de concentration est coulé (7,5 ml de C + 15,0 µl de persulfate) et le peigne est rajouté immédiatement.

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

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

## 4) Electrotransfert des protéines sur nitrocellulose

Le transfert électrophorétique est utilisé pour augmenter la sensibilité et la rapidité de la détection des substances biologiques, comme les protéines, le DNA et le RNA.

La technique emploie le courant électrique pour réaliser le transfert des protéines d'un gel où les bandes sont déjà séparées par électrophorèse (PAGE/SDS), sur une surface de papier traité (nitrocellulose) ou sur les membranes qui lient les biomolécules. Une fois le transfert terminé, les bandes sont prêtes à une révélation par autoradiographie ou à un dosage immunoenzymatique, ou une détection par fluorescence ou

encore à une élution préparative. Cette technique présente plusieurs avantages, parmi lesquels on peut citer :

- Accessibilité : en effet, le transfert sur feuille de nitrocellulose ou sur une membrane conduit à des analyses qui sont normalement très difficiles, sinon impossibles à réaliser dans le gel.

- Les molécules transférées sont liées à la membrane, de telle sorte qu'il y ait un minimum de perte de résolution. Jusqu'ici c'est l'activité antigénique qui a été le plus utilisée, elle prévient la diffusion et la perte de résolution.

+ Les feuilles de nitrocellulose et les membranes sont beaucoup plus faciles à manipuler que les gels.

- Spécificité de liaison entre les deux anticorps de révélation.

### *Matériel*

Appareil de transfert LKB 2005.

Feuilles de nitrocellulose Schleicher et Schüll BA 85.

### *Réactifs*

Tampon de transfert

Tris	25 mM
Glycocolle	150 mM
Méthanol	20 %

Le pH est ajusté à 7,4 avec HCl 1 M

Le transfert sur feuille de nitrocellulose (aux dimensions du gel) s'effectue à 6 volts/cm<sup>2</sup> pendant 5 heures dans le tampon de transfert. La nitrocellulose est séchée entre deux papiers filtres (Bioblock)

### *Coloration au rouge ponceau*

#### *. Colorant*

Rouge ponceau	0,2 %
Acide trichloroacétique	3 %

#### *. Coloration*

Elle s'effectue pendant quelques minutes, et elle est suivie



IV- DOSAGE DES PROTEINES

## 1) Méthode de Bensadoun et Weinstein, (1976)

Réactifs

## - Solution de désoxycholate de Na 0,2 %

- Acide désoxycholique		50 mg
- Soude N/19		2,5 ml

## - Solution d'acide trichloracétique 25 %

- ACTA		25 g
- H <sub>2</sub> O	qsp	100 ml

## - Tampon bicarbonate

Solution A	NaHCO <sub>3</sub>		84 g
	H <sub>2</sub> O	qsp	500 ml
Solution B	NaOH		45 g
	H <sub>2</sub> O	qsp	300 ml

mélanger les solutions A et B et compléter à 1000 ml avec H<sub>2</sub>O distillée

## - Solution cuprotartrique

## Solution cuivrique

	CuSO <sub>4</sub>		2 g
	H <sub>2</sub> O	qsp	1000 ml

## Solution tartrique

	tartrate de Na et K		4 g
	H <sub>2</sub> O	qsp	1000 ml

mélanger en parties égales au moment de l'emploi.

Mode opératoire

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

Centrifuger 30' à 4500 t/min à 0°C

puis le surnageant est éliminé soigneusement à la pipette Pasteur.

Réaction colorée

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

## 2) Méthode au bleu de Coomassie (G250)

Read et al., (1981)

Réactif

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

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

- Température des cuves 30°C
- Longueur d'onde 595 nm
- Temps de 1ère lecture 2 min.
- pour une gamme étalon allant de 0 à 200 µg/ml de SAB
  - 15 µl d'échantillon
  - 60 µl de diluant (H<sub>2</sub>O)
  - 225 µl de réactif
- pour une gamme étalon allant de 0 à 50 µg/ml
  - 60 µl d'échantillon
  - 15 µl de diluant
  - 225 µl de réactif

Le programme détaillé est donné ci-après :

## Paramètres

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

V - PREPARATION d'un GEL d'AFFINITE AVEC LA SEQUENCE SPECIFIQUE DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES

1) Préparation du DNA

\* *Tampon d'hybridation*

L'hybridation est réalisée dans 75  $\mu$ l du tampon suivant :

Tris HCl	70 mM
MgCl <sub>2</sub>	13 mM
DTT	6,7 mM
Spermidine	1,3 mM
EDTA	1,3 mM

le pH est ajusté à 7,4 avec HCl 0,1 N.

Pour la phosphorylation, on utilise le même tampon, auquel on ajoute 15  $\mu$ l d'ATP 20 mM, 1  $\mu$ l contenant 5  $\mu$ Ci d'ATP marqué au <sup>32</sup>P et 10  $\mu$ l contenant 80 unités de polynucléotide-kinase (Boehringer Mannheim). La réaction est stoppée par 100  $\mu$ l de NH<sub>4</sub>OAc 5 M, 25  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> et 25  $\mu$ l de TE. La précipitation est réalisée en ajoutant 500  $\mu$ l d'éthanol. Le précipité est resolubilisé dans 200  $\mu$ l de TE, 25  $\mu$ l de NaOAc 3 M, et 25  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 100 mM, puis reprécipité dans 500  $\mu$ l d'éthanol.

\* *Tampons de ligation*

. Tampon proposé par J.P. Kerckaert

Volume total	55 ml
Tris HCl	30 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
DTT	10 mM
ATP	0,5 mM
BSA	0,1 mg/ml
T <sub>4</sub> ligase	5 unités (Promega Biotec, Madison, Wisconsin USA)



## . Tampon décrit par Kadonaga

Tris-HCl	88 mM
MgCl <sub>2</sub>	13,3 mM
DTT	20 mM
Spermidine	1,3 mM

Le pH est ajusté à 7,4 avec HCl 0,1 N.

A 75 µl de ce tampon on ajoute 20 µl d'ATP 20 mM et 5 µl de T<sub>4</sub> ligase (1 unité/ml).

L'extraction se fait avec 150 µl de phénol, 150 µl de chloroforme.

2) Couplage au sépharose CL 2B (Pharmacia)

- Activation du gel-sépharose CL 2B par le BrCN.
  - Acétone fraîchement distillée
  - HCl 0,1 N
  - BrCN 1,03 g/ml d'acétonitrile
  - Milieu de couplage diammonononane (0,70 g) pour 50 ml de tampon bicarbonate 0,2 M pH 9,5 contenant 50 % d'éthylène glycol refroidi à - 15°C
  - Cryostat HUBER HS40.
- 10 ml de Sepharose CL 2B sont lavés sur un fritté par 40 ml d'eau bidistillée puis par 40 ml d'acétone à 30 % (dans l'eau bidistillée) puis par 200 ml d'acétone à 60 %.
- Le gel est repris par 10 ml d'acétone à 60 % ; le mélange est refroidi à - 15°C.
- Au sépharose en suspension, agité par un mélangeur en verre fixé à un rotor à une vitesse variable, on ajoute la solution de BrCN ( 7 µl de BrCN dans 1 ml d'acétone pure).
- En refroidissant et en agitant vigoureusement on ajoute à - 15°C la solution de triéthylamine (TEA) marquée (14 µl dilués dans 1 ml d'acétone à 60 %, soit un rapport molaire CNBr/TEA 1 : 1,5) goutte à goutte sur une période de 2 minutes, puis tout le mélange est rapidement versé dans 100 ml de liquide de lavage glacé (acétone/HCl 0,1 N, 1 : 1).

Le gel est ensuite lavé sur fritté par

- acétone 60 % 0°C	50 ml
- Acétone 30 % 0°C	50 ml
- H <sub>2</sub> O 4°C	50 ml

Le gel est recueilli et versé dans un flacon à bouchon à vis contenant les 10 ml du milieu de couplage à 4°C.

- Dosage des ions CN<sup>+</sup> et des fonctions cyanate portées par les gels activés au BrCN.

#### *Réactif*

- Acide diméthylbarbiturique recristallisé dans l'eau ultra pure	500 mg
- Eau ultra pure	5 ml
- Pyridine fraîchement distillée	45 ml

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

#### *Dosage*

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

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

## BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Alberts, B.M., Herrick, G., (1971) DNA-cellulose chromatography  
Methods Enzymol. 21, 198-217.
- Allera, A., Rao, G.S., Breuer, H. (1980) Specific interaction of corticosteroids with components of the cell membrane which are involved in the translocation of the hormone into the intravesicular space of purified rat liver plasma membrane vesicles.  
J. Steroid Biochem. 12, 259-266.
- Alpert, A.J., Regnier, F.E. (1979) Preparation of a porous microparticulate anion exchange chromatography support for proteins.  
J. Chromatogr. 185, 375-392.
- Antakly, T., Eisen, H.J. Immunocytochemical localization of glucocorticoid receptor in target cells.  
Endocrinology (1984) 115, 1984-1989.
- Atger, M., Milgrom, E. (1976) Chromatographic separation on phosphocellulose of activated and non-activated forms of steroid-receptor complex. Purification of the activated complex.  
Biochemistry, 15, 4298-4304.
- Bailly, A., Sovouret, J.F., Sallas, N., Milgrom, E. (1978) Factors modifying the equilibrium between activated and non-activated forms of steroid-receptor complexes.  
Eur. J. Biochem. 88, 623-632.
- Barnett, C.A., Schmidt, T.J., Litwack, G. Effects of calf alkaline phosphatase, phosphatase inhibitors, and phosphorylated compounds on the rate of activation of glucocorticoid-receptor complexes.  
Biochemistry 1980, 19, 5445-5455.
- Barnett, C.A., Speck, L., Litwack, G. (1983) Identification of a macromolecular inhibitor of glucocorticoid-receptor complex. Activation in rat liver cytosol.  
Eur. J. Biochem. 134, 231-235.

- Baulieu, E.E. (1978) Les Hormones, in "Hormones" Paris, Hermann.
- Beato, M., Von der Ahe, D., Cato, A.C.B., Janick, S., Kranter, P., Scheidereit, C., Suske, G., Wenz, M., Westphal, H.M., Willamann, T. (1986) in "Glucocorticoid Hormone : mechanisms of action, ed. by Y. Sakamoto and F. Isohashi. Springer-Verlag, Berlin, p. 97-116.
- Ben-Or, Chrambach, A. (1983) Heterogeneity of the glucocorticoid receptors : molecular transformation during activation detected by electrofocusing. Arch. Biochem. Biophys. 221, 343-353.
- Bensadoun, A., Weinstein, D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. Anal. Biochem. 70, 241-250.
- Biagioni, S., Sisto, R., Ferrao, A., Caiafa, P., Turano, C. (1978) A new method for the preparation of DNA-cellulose. Anal. Biochem. 89, 616-619.
- Blanchardie, P., Lustenberger, P., Orsonneau, J.L., Bernard, S. (1983) Physicochemical characterization and transformation of the cytosolic glucocorticoid receptor from rabbit liver. J. Steroid Biochem. 18, 789-799.
- Blanchardie, P., Lustenberger, P., Orsonneau, J.L., Bernard, S. (1984) Resolution of the molecular forms of rat liver glucocorticoid-receptor by affinity chromatography. Biochimie 66, 505-511.
- Blanchardie, P., Lustenberger, P., Orsonneau, J.L., Denis, M., Bernard, S. (1984) Influence of molybdate, ionic strength and pH on ligand binding to the glucocorticoid receptor. Steroids, 44, 159-174.
- Bodwell, J.E., Holbrook, N.J., Munck, A. (1985) Stabilisation of thymic glucocorticoid-receptor complexes by the calcium-activated protease inhibitor, calpastatin. J. Biol. Chem. 260, 2601-2604.
- Bradford, M.M. (1986) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

- Carlstedt-Duke, J., Wrangé, O., Dahlberg, E., Gustafsson, J.A., Högberg, B. (1979) Transformation of the glucocorticoid receptor in rat liver cytosol by lysosomal enzymes.  
J. Biol. Chem. 254, 1537-1539.
- Carlstedt-Duke, J., Okret, S., Wrangé, O., Gustafsson, J.A. (1982) Immunochemical analysis of the glucocorticoid receptor : identification of a third domain separate from the steroid-binding and DNA-binding domains.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 426°-64.
- Chang, S.H., Gooding, K.M., Regnier, F.E. (1976) Use of oxiranes in the preparation of bonded phase supports.  
J. Chromatogr. 120, 321-333.
- Climent, F., Bugany, H., Beato, M. (1976) Partial purification of the activated glucocorticoid receptor of rat liver.  
FEBS Lett. 66, 317-321.
- Climent, F., Doenecke, D., Beato, M. (1977) Properties of the partially purified activated glucocorticoid receptor of rat liver. Binding to chromatin subunits.  
Biochemistry 16, 4694-4703.
- Dahmer, M.K., Quasney, M.W., Bissen, S.T., Pratt, W.B. (1981) Molybdate permits resolution of untransformed glucocorticoid receptor from the transformed state.  
J. Biol. Chem. 256, 4901.
- Dahmer, M.K., Housley, P.R., Pratt, W.B. (1984) Effects of molybdate and endogenous inhibitors on steroid receptor inactivation., transformation and translocation.  
Ann. Rev. Physiol. 46, 67-81.
- Danzé, P.M., Transformation du complexe hormone-récepteur à glucocorticoïdes et sa signification biologique.  
Thèse de Doctorat en Médecine, Université de la Santé et du Droit de LILLE (1983).
- Danzé, P.M., Formstecher, P., Richard, C. and Dautrevaux, M. (1987) Microheterogeneity of agonist and antagonist glucocorticoid receptor complexes detected by isoelectric focusing and modification induced by receptor activation.  
Biochim. Biophys. Acta

- Dellweg, H.G., Hotz, A., Mugele, K., Gehring, U. (1982)  
Active domains in wild-type and mutant glucocorticoid receptors.  
EMBO J. 1, 285-289.
- Eisen, H.J., Glinsmann, W. (1975) Partial purification of glucocorticoid receptor from rat liver using DNA cellulose.  
J. Steroid Biochem. (1975) 6, 1171-1173.
- Eisen, H.J., Glinsmann, W. (1976) Partial purification of the glucocorticoid receptor from rat liver : a rapid two-step procedure using DNA-cellulose.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 367-372.
- Eisen, H.J., Glinsmann, W. (1978) Maximising the purification of the activated glucocorticoid receptor by DNA-cellulose chromatography.  
Biochem. J. 171, 177,183.
- Eisen, H.J. (1980) An antiserum to the rat liver glucocorticoid receptor.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3893-3897.
- Eisen, H.J., Schleenbaker, R.E., Simons, S.S. Jr. (1981) Affinity labeling of the rat liver glucocorticoid receptor with dexamethasone 21-mesylate. Identification of covalently labeled receptor by immunochemical methods.  
J. Biol. Chem. 256, 12920-12925.
- Eisen, H.J. (1982) Immunochemical approaches to the study of glucocorticoid receptors. In Biochemical Actions of Hormones, ed. G. Litwack, New-York, Academic 9, 255-270.
- Eliard, P.H., Marchan, M.J., Rousseau, G.G., Formstecher, P., Mathy-Hartert, M. Belayew, A. and Martial, J.A. (1985) Binding of the human glucocorticoid receptor to defined regions in the human growth hormone and placental lactogen genes.  
DNA 4, 409-417.
- Formstecher, P. Le site de liaison aux stéroïdes du récepteur des glucocorticoïdes.  
Thèse de Doctorat ès-Sciences Naturelles, option Biochimie - Université des Sciences et Techniques de Lille 1986.

- Gametchu, B., Harrison, R.W. (1984) Characterization of a monoclonal antibody to the rat liver glucocorticoid receptor.  
Endocrinology 114, in press.
- Gasc, J.M., Renoir, J.M., Radanyi, G., Joab, I., Touhima, P., Baulieu, E.E. (1984) Progesterone receptor in the chick oviduct and immunohistochemical study with antibodies to distinct receptor components.  
Cell. Biol. 99, 1193-1201.
- Gehring, U., Hotz, A. (1983)  
Photoaffinity labeling and partial proteolysis of wild-type and variant glucocorticoid receptors.  
Biochemistry 22, 4013-4018.
- Gehring, U., Arndt, H. Heteromeric nature of glucocorticoid receptors.  
FEBS Lett. (1985) 179, 138-142.
- Godeau, J.F., Schorderet-Slatkine, S., Hubert, P. and Baulieu E.E. (1978)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2353-2357.  
Induction of maturation in *Xenopus laevis* oocytes by a steroid linked to a polymer.
- Govindan, M.V., Sekeris, C.E. (1978) Purification of two dexamethasone-binding proteins from rat liver cytosol.  
Eur. J. Biochem. 89, 95-104.
- Govindan, M.V., Manz, B. (1980) Three step purification of glucocorticoid receptors from rat liver.  
Eur. J. Biochem. 108, 47-53.
- Govindan, M.V., Gronemeyer, H. (1984) Characterization of the rat liver glucocorticoid receptor purified by DNA-cellulose and ligand affinity chromatography.  
J. Biol. Chem. 259, 12915-12924.
- Govindan, M.V., Devil, M., Green, S., Gronemeyer, H. and Chambon, P. (1985)  
Cloning of the human glucocorticoid receptor DNA.  
Nucleic Acids Res. 10, 8293-8304.
- Grabowski, J.P., Sharp, A.P. (1986) Affinity chromatography of splicing complexes : U2, U5 and U4 + U6 small nuclear ribonucleoprotein particles in the spliceosome.  
Science 233, 1294-1299.



- Grandics, P., Miller, A., Schmidt, T.J., Mittman, D., Litwack, G. (1984) Purification of the unactivated glucocorticoid receptor and its subsequent in vitro activation.  
J. Biol. Chem., 259, 3173-3180.
- Green, N.M. (1985), Adv. Protein Chem. 29, 85.
- Grody, W.W., Schrader, W.T., O'Malley, B.W. (1982) Activation, transformation and subunit structure of steroid hormone receptors.  
Endocr. Rev. 3, 141-163.
- Gustafsson, J.A., Carlstedt-Duke, J., Okret, S. et Wrange, O. (1984) On the use of antibodies in studies on glucocorticoid receptor structure. in Progress in Clinical and Biological Research : Hormones and Cancer, eds E. Gurbide, R. Calandra, C. Levy, R.J. Soto, vol. 142. Alan R. Liss, New-York, pp. 207-222.
- Gustafsson, J.A., Carlstedt-Duke, J., Wrange, O., Okret, S. and Wilkstrom, A.C. (1986) Functional analysis of the purified glucocorticoid receptor.  
J. Steroid Biochem. 24, 63-68.
- Hackey, J.F., Pratt, W.B. (1971) Characterization and partial purification of the specific glucocorticoid binding components from mouse fibroblasts.  
Biochemistry 10, 3002-3008.
- Hager, G.L., Richard-Foy, H., Kessel, M., Wheeler, D., Lichtler, A.C. Wilkstrom, A.C. (1984) The mouse mammary tumor virus model in studies of glucocorticoid regulation  
Recent Progr. Horm. Res. 40, 121-142.
- Higgins, S.J., Rousseau, G.G., Baxter, J.D., Tomkins, G.M. (1973)  
J. Biol. Chem. 218, 5866-5872.
- Higgins, S.J., Baxter, J.D., Rousseau, G.G. (1979) Nuclear binding of glucocorticoid receptors. in Monographs on Endocrinology : glucocorticoid hormone action, eds J.D. Baxter, G.G. Rousseau, vol. XII. Springer, Heidelberg, pp. 135-160.
- Herrick, G., (1980) Site specific DNA affinity chromatography of the Lac repressor.  
Nucleic Acids Res., 8, 3721-3728.

- Holbrook, N.J., Bodwell, J.E., Jeffries, M., Munck, A. (1983)  
Characterization of non-activated and activated glucocorticoid-receptor complexes from intact rat thymus cells.  
J. Biol. Chem. 258, 6477-6485.
- Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M. (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA.  
Nature 318, 635-641.
- Housley, P.R., Grippo, J.F., Dahmer, M.K., Pratt, W.B. (1984) Inactivation, activation and stabilization of glucocorticoid receptors. in Biochemical Actions of Hormones, ed. G. Litwack, vol. XI (1984) Academic Press, New-York, pp. 347-376.
- Housley, P.R., Sanchez, E.R., Westphal, H.M., Beato, M. et Pratt, W.B. (1985) The molybdate stabilized L-cell glucocorticoid receptor isolated by affinity chromatography or with a monoclonal antibody is associated with a 90-92 kDa non steroid binding phosphoprotein.  
J. Biol. Chem. 260, 13810-13817.
- Hubbard, J., Kalimi, M. (1982) Synergistic effect of molybdate plus dithiothreitol on stabilization, reactivation and partial purification of the kidney glucocorticoid receptor.  
J. Biol. Chem. 257, 14263-14267.
- Idziorek, T., (1985) Caractérisation du récepteur à glucocorticoïdes du foie de rat purifié sous forme non activée. Thèse Doctorat en Biochimie, Université de Sciences et Techniques de LILLE I.
- IKIGAI, H., NAKAE, T. (1985)  
Analysis of membrane proteine by ion-exchange high-performance liquid chromatography.  
J. Chromatogr. 322, 212-219.
- Iwamori, M., Nagai, Y. (1978)  
Biochim. Biophys. Acta
- Jensen, E.V., Jacobson, H.I. (1962) Basic guides to the mechanism and oestrogen action.  
Rec. Progr. Horm. Res. 18, 387-414.

- Kadanoga, J., Tjian, R. (1986) Affinity purification of sequence specific DNA binding proteins.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5889-5893.
- Kalimi, M., Beato, M., Feigelson, P. (1973)  
Interaction of glucocorticoid with rat liver nuclei. I. role of cytosol proteins.  
Biochemistry 12, 3365-3371.
- Kato, Y., Nakamura, K., Yamazaki, Y., Yashimoto, T. (1985)  
Comparison of high-performance ion-exchange chromatography and gel electrophoresis in proteins separations.  
J. Chromatogr. 318, 358-361.
- King, W.J., Greene, G.L. (1984)  
Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of the target cells.  
Nature 307, 745-747.
- Kohn, J., Wilchek, M. (1981) Procedure for the analysis of cyanogen bromide activated sepharose or sephadex by quantitative determination of cyanate esters and imidocarbonates.  
Anal. Biochem. 115, 375-382.
- Kurl, R.N., Jacob, S.T. (1984) Phosphorylation of purified glucocorticoid receptor from rat liver by an endogenous protein kinase.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 119, 700-705.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
Nature 227, 680-685.
- Leach, K.L., Dahmer, M.K., Hammond, N.D., Sando, J.J., Pratt, W.B. (1979)  
Molybdate inhibition of glucocorticoid receptor inactivation and transformation.  
J. Biol. Chem. 254, 11884-11890.
- Le Fevre, B., Bailly, A., Sallas, N., Milgrom, E. (1979) Comparison of assays using DNA-cellulose or homologous nuclei.  
Biochim. Biophys. Acta 585, 266-272.
- Litwack, G., Filler, R., Rosenfield, S.A., Lichtash, N., Wishman, C.A., Singer, S. (1973) Liver cytosol corticosteroid binder II. a hormone receptor.  
J. Biol. Chem. 248, 7481-7486.
- Litwack, G., Rosenfield, S. (1975) Liver cytosol corticosteroid binder IB a new binding protein.  
J. Biol. Chem. 250, 6799-6805.

- Litwack, G., Miller-Diener, A., Di Sorbo, D.M., Schmidt, T.J. Vitamin B6 and the glucocorticoid receptor. in Current Topics in Nutrition Disease : vitamin B6, its role in health and disease. eds R.D. Reynolds, J.E. Leklem, vol. XII Alan, R. Liss inc. New-York, pp. 177-191.
- Lustenberger, P., Formstecher, P., 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., 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., Rousseau, J.L. Bernard, S. (1985) Non transformed rabbit liver glucocorticoid : purification, characterization and transformation.  
Biochimie 67, 1267-1278.
- Mainwaring, W.I.P., Irving, R. (1973) The use of deoxyribonucleic acid cellulose chromatography and isoelectric focusing for the characterization and partial purification of steroid-receptor complexes.  
Biochem. J. 134, 113-127.
- Manson, J.E., Rosengren, B., Svennerholm, L. (1985) Separation of gangliosides by anion-exchange chromatography on Mono Q.  
J. Chromatogr. 322, 465-472.
- Miesfeld, R., Rusconi, S., Godowsk, R.J., Maler, B.A., Okret, S., Wilkstrom, A.C., Gustafsson, J.A., Yamamoto, R.R. (1986)  
Cell, 46, 389-393.
- Milgrom, E., Atger, M., Baulieu, E.E. (1973) Studies on estrogen entry into uterine cells and on estradiol-receptor complex attachment to the nucleus. Is the entry of estrogen into uterine cells a protein-mediated process ?  
Biochim. Biophys. Acta 320, 267-283.
- Milgrom, E., Atger, M., Baulieu, E.E. (1973) Acidophilic activation of steroid hormone receptors.  
Biochemistry 12, 5198-5205.
- Milgrom, E. (1981) Activation of steroid-receptor complexes. in Biochemical Actions of Hormones, ed. G. Litwack 8, 465-492, New-York, Academic Press,
- Miller-Diener, A., Schmidt, T.J., Litwack, G. Protein kinase associated with the purified rat hepatic glucocorticoid receptor.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 4003-4007.

- Moore, D.D., Marks, A.R., Buckley, D.I., Kapler, G., Payvar, F. Goodman, H.M. (1985) The first intron of the human growth hormone gene contains a binding site for glucocorticoid receptor. (1985)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 699-702.
- Moss, L.G., Moore, J.P., Chang, L. (1981) A simple efficient method for coupling DNA to cellulose.  
Biochemistry 12, 655.
- Moudgil, V.K., (1985) Interaction of nucleotides with steroid hormone receptors. in Molecular Mechanisms of Steroid Hormone Action: recent advances, ed. V.K. Moudgil, V. de Gruyter, Berlin, New-York, pp. 351-375.
- Munck, A., Holbrook, N.J. (1984) Glucocorticoid-receptor complexes in rat thymus cells.  
J. Biol. Chem. 259, 820-831.
- Munck, A., Holbrook, N.J. (1984) Glucocorticoid-receptor complexes in rat thymus cells.  
J. Biol. Chem. 259, 820-831.
- Murakami, N., Quattrociochi, T.M., Healy, S.P., Moudgil, V.K. (1982) Effects of sodium tungstate on the nuclear uptake of glucocorticoid-receptor complex from rat liver.  
Arch. Biochem. Biophys. 214, 326-334.
- Naray, A. (1983) Molybdate effect on the glucocorticoid receptor in cell-free systems and intact lymphocytes.  
Biochim. Biophys. Acta 756, 328-334.
- Nielsen, C.J., Vogel, W.M., Pratt, W.B. (1977) Inactivation of glucocorticoid receptors in cell-free preparation of rat liver.  
Cancer Res. 37, 3420-3426.
- Nielsen, C.J., Sando, J.J., Vogel, W.M., Pratt, W.B. (1977) Glucocorticoid receptor inactivation under cell-free conditions.  
J. Biol. Chem. 252, 7568-7578.
- Nilsson, S., Belgrave, P. (1986) Purification of hormone-sensitive lipase by high-performance ion exchange chromatography.  
Anal. Biochem. 158, 399-407.

- Nishigori, H., Alker, J., Toft, D. (1980) Inhibition of progesterone receptor by vanadate.  
Arch. Biochem. Biophys. 203, 600-604.
- Noma, K., Nakao, K., Sato, B., Nishizawa, Y., Matsumoto, K., Yamamura, Y. (1980)  
Mechanism of activation of steroid receptors : involvement of low molecular weight inhibitor in activation of androgen, glucocorticoid and estrogen receptor systems.  
Endocrinology 106, 1142-1148.
- Nordeen, S.K., Lan, N.C., Showers, M.O., Baxter, J.D. (1981)  
Photoaffinity labeling of glucocorticoid receptors.  
J. Biol. Chem. 256, 10503-10508.
- Okret, S., Carlstedt-Duke, J., Wrangé, O., Carlström, K., Gustafsson, J.A. (1981)  
Characterization of an antiserum against the glucocorticoid receptor.  
Biochim. Biophys. Acta 677, 205-219.
- Okret, S. (1983)  
Comparison between different rabbit antisera against the glucocorticoid receptor.  
J. Steroid Biochem. 19, 1241-1248.
- Okret, S., Stevens, Y.W., Carlstedt-Duke, J., Wrangé, O., Gustafsson, J.A., Stevens, J. (1983)  
Absence in glucocorticoid-resistant mouse lymphoma P1798 of a glucocorticoid receptor domain responsible for biological effects.  
Cancer Res. 43, 127-131.
- Okret, S., Wikstrom, A.C. et Gustafsson, J.A. (1985)  
Characterization of the molybdate-stabilized glucocorticoid receptor.  
Evidence for a receptor heteromer.  
Biochemistry 24, 6581-6586.
- Oren, M., Winocour, E., Prives, C. (1980)  
Differential affinities of simian virus 40 large tumor antigen for DNA.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 220-224.
- Parchman, L.G., Litwack, G. (1977)  
Basic amino-acids stimulate the activation of the glucocorticoid-receptor complex.  
FEBS Letters, 79, 25-28.

- Raaka, B.M., Samuels, H.H. (1983) The glucocorticoid receptor in GH<sub>1</sub> cells. Evidence from dense amino acid labeling and whole cell studies for an equilibrium model explaining the influence of hormone on the intracellular distribution of receptor.  
J. Biol. Chem. 258, 417-425.
- Read, S.M., Northcote, D.H. (1981)  
Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie Blue G. Dye Binding assay for protein.  
Anal. Biochem. 116, 53-54.
- Rosenfeld, P.J. and Kelly, T. (1986)  
Purification of nuclear factor I by DNA recognition site affinity chromatography.  
J. Biol. Chem. 161, 1398-1408.
- Rousseau, G.G., Baxter, J.D., Tomkins, G.M. (1972)  
J. Mol. Biol. 67, 99-105.
- Rousseau, G.G., Higgins, S.J., Baxter, J.D., Gelfand, D. et Tomkins, G.M. (1975)  
Binding of glucocorticoid receptors to DNA.  
J. Biol. Chem. 250, 6015-6021.
- Sablonnière, B., Danzé, P.M., Formstecher, P., Lefebvre, P., Dautrevaux, M. (1986)  
Physical characterization of the activated and non-activated forms of the glucocorticoid-receptor complex bound to the steroid antagonist <sup>3</sup>H RU 486.  
J. Steroid Biochem., 25, 605-614.
- Sanchez, E.R., Pratt, W.B. (1986)  
Phosphorylation of L-cell glucocorticoid receptors in immune complexes : evidence that the receptor is not a protein kinase  
Biochemistry 25, 1378-1382.
- Sanchez, E.R., Toft, D.O., Schlesinger, M.J., Pratt, W.B. (1985)  
Evidence that the 90 KDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein.  
J. Biol. Chem. (1985) 260, 12398-12401.

- Scheidereit, C., Kranter, P., Von der Ahe, D., Janich, S., Rarenan, O., Cato, A.C.B., Suske, G., Westphal, H.M. and Beato, M. (1986)  
Mechanism of gene regulation by steroid hormones  
J. Steroid Biochem. 24, 19-24.
- Schmidt, T.J., Litwack, G. (1982)  
Activation of the glucocorticoid-receptor complex.  
Physiol. Rev. 62, 1131-1192.
- Schmidt, T.J., Miller-Diener, A., Webb, M.L., Litwack, G. (1985)  
Thermal activation of the purified rat hepatic glucocorticoid receptor.  
J. Biol. Chem. 260, 16255-16262.
- Sherman, M.R., Pickering, L.A., Rollwagen, F.M., Miller, L.K. (1978)  
Mero-receptors : proteolytic fragments of receptors containing the steroid-binding site.  
Fed. Proc. 37, 167-173.
- Sherman, M.R., Moran, M.C., Tuazon, F.B., Stevens, Y.W. (1983)  
Structure, dissociation and proteolysis of mammalian steroid receptors. Multiplicity of glucocorticoid receptor forms and proteolytic enzymes in rat liver and kidney cytosols.  
J. Biol. Chem. 258, 10366-10377.
- Shyamala, G., Leonard, L. (1980)  
Inhibition of uterine estrogen receptor transformation by sodium molybdate.  
J. Biol. Chem. 255, 6028-6031.
- Simons, S.S. (1977)  
Glucocorticoid receptors steroid complex binding to DNA competition between DNA and DNA-cellulose.  
Biochim. Biophys. Acta 496, 349-358.
- Simons, S.S. (1979)  
Factors influencing association of glucocorticoid receptor-steroid complex with nuclei, chromatin and DNA : interpretation of binding data. in Monographs on Endocrinology : glucocorticoid hormone action, eds J.D. Baxter, G.G. Rousseau, vol. XII, Springer Verlag, Heidelberg, pp. 161-188.



- Simons, S.S., Jr., Thompson, E.B. (1981)  
Dexamethasone 21-mesylate : an affinity label of glucocorticoid receptors from rat hepatoma tissue culture cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3541-3545.
- Simons, S.S., Jr., Schleenbaker, R.E., Eisen, H.J. (1983)  
Activation of covalent affinity labeled glucocorticoid receptor-steroid complexes.  
J. Biol. Chem. 258, 2229-2238.
- Singh, V.B., Moudgil, V.K. (1984)  
Protein kinase activity of purified rat liver glucocorticoid receptor.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 125, 1067-1073.
- Singh, V.B., Moudgil, V.K. (1985)  
Phosphorylation of rat liver glucocorticoid receptor.  
J. Biol. Chem. 260, 3684-3690.
- Smith, N.L., Lenhoff, H.M. (1974)  
Covalent binding of proteins and Glucose-6-Phosphate déshydrogénase to cellulosic carriers activated with 5-triazine trichloride  
Anal. Biochem. 61, 392-415.
- Stevens, J., Stevens, Y.W. (1981)  
Influence of limited proteolysis on the physicochemical and DNA-binding properties of glucocorticoid receptors from corticoid-sensitive and resistant mouse lymphoma P1798.  
Cancer Res. 41, 125-133.
- Stevens, J., Eisen, H.J., Stevens, Y.W., Hanbenstock, H., Rosenthal, R.L., Artishevsky, A. (1981)  
Immunochemical differences between glucocorticoid receptors from corticoid-sensitive and resistant malignant lymphocytes.  
Cancer Res. 41, 134-137.
- Vedeckis, W.V. (1983)  
Limited proteolysis of the mouse liver glucocorticoid receptor.  
Biochemistry 22, 1975-1983.
- Vedeckis, W.V. (1983)  
Subunit dissociation as a possible mechanism of glucocorticoid receptor activation.  
Biochemistry 22, 1983-1989.

- Vedeckis, W.V., Kovacic-Milivojevic, B., La Pointe, M.C. et Recker, C.E. (1985)  
Alterations in mouse glucocorticoid receptor structure : effect of various hydrolytic enzymes. in *Molecular mechanism of steroid hormone action*, ed. V.K. Moudgil, W. de Gruyter, Berlin, New-York, pp.85-110.
- Vedeckis, W.V. (1985b)  
in *Hormonally responsive tumors*. ed. V.P. Hollander, Academic Press, New-York, pp. 3-61.
- 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. (1985a)  
Identification of human glucocorticoid receptor complementary DNA clones by epitope selection.  
*Science* 228, 740-742.
- Weinberger, C., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G. and Evans, R.M. (1985b)  
Domain structure of human glucocorticoid and its relationships to the v-erbA oncogene product.  
*Nature* 318, 670-672.
- Weisz, A., Puca, G.A., Masucci, M.T., Pagnotta, R., Petrillo, A., Sica, V. (1984)  
*Biochemistry* 23, 5393-5397.
- Welshons, W.V., Lieberman, M.E., Gorski, J. (1984)  
Nuclear localization of unoccupied estrogen receptors.  
*Nature* 307, 747-749.
- Westphal, H.M., Beato, M. (1980)  
The activated glucocorticoid receptor of rat liver : purification and physical characterization.  
*Eur. J. Biochem.* 106, 395-403.
- Westphal, H.M., Fleischmann, G., Beato, M. (1981)  
Photoaffinity labeling of steroid binding proteins with unmodified ligands.  
*Eur. J. Biochem.* 119, 101-106.

- Wrange, O., Gustafsson, J.A. (1978)  
Separation of the hormone and DNA binding sites of the hepatic glucocorticoid receptor by means of proteolysis.  
J. Biol. Chem. 253, 856-885.
- Wrange, O., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.A. (1979)  
Purification of the glucocorticoid receptor from rat liver cytosol.  
J. Biol. Chem. 254, 9284-9290.
- Wrange, O., Okret, S., Radojic, M., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.A. (1984)  
Characterization of the purified activated glucocorticoid receptor from rat liver cytosol.  
J. Biol. Chem. 259, 4534-4541.
- Zilversmit, D.B. et al. (1950)  
Dosage du phosphate.  
J. Lab. Clin. Med. 35, 155.

TABLE DES MATIERES

PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE RECEPTEUR  
DES GLUCOCORTICOIDES

INTRODUCTION	1
A) MECANISME D'ACTION DES HORMONES GLUCOCORTICOIDES	3
1) Pénétration cellulaire du stéroïde	3
2) Liaison de l'hormone au récepteur	5
3) Transformation	5
3.1. Moyens d'obtention de la transformation	6
3.2. Moyens de caractérisation des récepteurs transformés	6
3.2.1. Méthode basée sur le principe de liaison aux noyaux et au DNA	7
3.2.2. Chromatographie d'échange d'ions	7
3.2.3. Isoélectrofocalisation	7
3.2.4. Ultracentrifugation et gel-filtration	7
3.3. Facteurs d'inhibition de la transformation	8
3.4. Modèles proposés pour la transformation	9
4) Translocation du complexe hormone-récepteur	9
5) Interaction avec les constituants nucléaires	11
B) STRUCTURE DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES	12
1) Récepteur non transformé	12
1.1. Caractéristiques physicochimiques	12
1.2. Modèles proposés pour le récepteur des glucocorticoïdes non transformé	14
2) Récepteur transformé	14
2.1. Caractéristiques physicochimiques	14
2.2. Utilisation des anticorps mono et polyclonaux	17
2.3. Protéolyse limitée du récepteur purifié	17
2.4. Modèles du récepteur transformé	18
2.5. Séquence complète du cDNA codant pour le récepteur des glucocorticoïdes	18

2.5.1. Clonage du cDNA du récepteur des glucocorticoïdes	20
2.5.2. Séquence du cDNA du récepteur des glucocorticoïdes	20
C) CONCLUSION	22

DEUXIEME PARTIE : PURIFICATION DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES  
SOUS FORME TRANSFORMEE - GENERALITES ET  
RESULTATS PERSONNELS

I) PURIFICATION DU RECEPTEUR TRANSFORME PAR LES PROTOCOLES DEJA DECRITS A CE JOUR	23
A) LES METHODES DISPONIBLES	24
1. Méthodes classiques	25
2. Méthodes d'échange d'ions sur supports polyanioniques	26
2.1. Préparation de la DNA-cellulose	26
2.2. Application de la DNA-cellulose et autres supports polyanioniques à la purification du récepteur transformé	29
3. Conclusion	35
B) RESULTATS PERSONNELS	36
1. Choix du protocole à utiliser	36
2. Principe du protocole choisi	37
3. Rapport de charge	37
4. Partie expérimentale	38
4.1. Préparation des colonnes chromatographiques	38
4.2. Isolement du récepteur	39
4.2.1. Filtration	39
4.2.1.1. DNA-cellulose	39
4.2.1.2. Phospho et DNA-cellulose	39
4.2.2. Adsorption	39
5. Résultats et discussion	40
5.1. Application du protocole établi par Eisen . 1978	40
5.2. Mise en oeuvre du protocole modifié	42
5.3. Protocole retenu pour la purification du récepteur transformé	44
5.4. Caractérisation du récepteur purifié sous forme transformée	48

5.4.1. Gel-filtration en HPLC et DNA-cellulose	48
5.4.2. Electrophorèse en PAGE/SDS	48
6) Conclusions	48
II) AUTRES METHODES ENVISAGEABLES POUR LA PURIFICATION DU RECEPTEUR TRANSFORME	50
- METHODES BASEES SUR LA CHROMATOGRAPHIE d'ECHANGE d'IONS	50
A) Chromatographie d'échange d'ions sur supports conventionnels	50
1. Supports	51
2. Résultats	51
B) Chromatographie d'échange d'ions à haute performance (HPIEC)	53
1. Supports	53
2. Résultats	59
3. Conclusion	64
C) Résultats personnels	64
1. Choix de la méthode à utiliser	65
2. Principe de la méthode	65
3. Purification du récepteur transformé	
Résultats et discussion	69
3.1. Source du récepteur	69
3.2. Injection	70
. Cytosol	70
. Extrait du sulfate de protamine	71
3.3. Détermination de la force ionique de lavage	72
3.4. Importance des lavages	74
3.4.1. Colonne Mono Q	74
3.4.2. Colonne DEAE analytique	74
3.4.3. Colonne DEAE préparative	74
- Extrait du cytosol	74
- Extrait du récepteur précipité au sulfate de protamine	75
3.5. Transformation des complexes hormone-récepteur à l'intérieur des colonnes	75

3.6. Elution des complexes hormone-récepteur transformés	77
3.6.1. Colonne Mono Q	77
3.6.2. Colonne DEAE analytique	77
3.6.3. Colonne DEAE préparative	80
. Extrait du cytosol	80
. Extrait du récepteur précipité au sulfate de protamine	80
4. Caractérisation du récepteur transformé purifié	89
4.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (PAGE/SDS)	89
4.2. Electrophorèse sur papier de nitro-cellulose (Western-blot)	92
4.3. Gradient de sucrose : mesure du coefficient de sédimentation	97
4.4. Gel-filtration en HPLC : mesure du rayon de Stokes	100
4.5. DNA-cellulose : identification du matériel purifié	102
4.6. Chromatographie d'échange d'ions sur gel conventionnel et en HPLC	104
4.7. Conclusions	104
- METHODES BASEES SUR LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE	107
A) APPLICATIONS DE LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE A SEQUENCES DE DNA SPECIFIQUE	107
1. Utilisation de séquences enrichies	107
2. Utilisation d'oligonucléotides synthétiques totalement spécifiques	110
3. Conclusion	112
B) RESULTATS PERSONNELS	113
1. Préparation des oligonucléotides de la séquence "consensus" spécifique du récepteur des glucocorticoïdes	113
- Choix de la séquence utilisée	113
- Synthèse chimique	115
2. Hybridation, phosphorylation, ligation	115
3. Couplage au sépharose CL 2B	118
CONCLUSION	121

## APPENDICE TECHNIQUE

I - MATERIEL BIOLOGIQUE	122
1. Tampons	122
2. Préparation du cytosol	123
3. Préparation de l'extrait du récepteur précipité au sulfate de protamine	123
II - MESURE DE L'ACTIVITE DE LIAISON	125
III - PURIFICATION DU RECEPTEUR SOUS FORME TRANSFORMEE	125
A) Chromatographie d'échange d'ions sur supports polyanioniques (DNA ou phosphocellulose)	125
1. Tampons	125
1.1. Tampon HEPES	125
1.2. Tampon Tris	126
2. Préparation des colonnes chromatographiques	126
2.1. Equilibrage	126
2.2. Régénération	126
B) Chromatographie d'échange d'ions à haute performance	127
1. Appareillage	127
2. Tampons	127
3. Préparation des colonnes	128
3.1. Equilibrage	128
3.2. Régénération	128
4. Préparation du matériel à purifier	129
C) Caractérisation du récepteur	129
1. Chromatographie de gel-filtration en HPLC	129
2. Gradient de saccharose	129
3. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS à gradient de réticulation linéaire 5-20 %	130
4. Electrotransfert des protéines sur nitrocellulose	131
IV - DOSAGE DES PROTEINES	134
1. Méthode de Bensadoun et Weinstein 1976	134
2. Méthode au bleu de Coomassie (G250)	136
V - PREPARATION D'UN GEL D'AFFINITE AVEC LA SEQUENCE SPECIFIQUE DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES	138
1. Préparation du DNA	138



2. Couplage au Sépharose CL 2B (Pharmacia)	139
- Activation du sépharose CL 2B par le BrCN	139
- Dosage des ions (CN <sup>+</sup> ) et des fonctions cyanate portées par les gels activés	140
BIBLIOGRAPHIE	141
TABLE DES MATIERES	157

