

50376
1988

50376
1988
121

121 **Université des Sciences et Techniques
de Lille Flandres - Artois...**
U.F.R. de Biologie

Année 1988

Thèse n° 262

Thèse

PRESENTEE A L'UNIVERSITE DE LILLE I
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
Docteur en Biochimie

PAR

Philippe Lefebvre



ETUDE DU MECANISME D'ACTION DES ANTIGLUCOCORTICOIDES

PRESENTEE LE 8 SEPTEMBRE 1988 DEVANT LA COMMISSION

JURY

Président	: Professeur J. MONTREUIL
Rapporteurs	: Professeur G. ROUSSEAU : Professeur M. PORCHET
Examineurs	: Professeur M. DAUTREVAUX : Docteur P. FORMSTECHE

La réalisation de ce manuscrit est pour moi l'occasion unique de pouvoir remercier toutes les personnes qui ont pu être concernées par ce travail. Je tiens donc à adresser mes plus vifs remerciements à

Monsieur le Professeur M. DAUTREVAUX. J'espère ne pas avoir failli à la confiance qu'il m'a accordée tout au long de mon séjour dans son laboratoire.

Monsieur le Professeur J. MONTREUIL d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Monsieur le Professeur G. ROUSSEAU, pour ses précieux conseils lors de la réalisation de ce travail. Vous me faites également l'honneur d'avoir accepté de juger ce travail.

Monsieur le Professeur M. PORCHET, d'avoir spontanément accepté de juger ce travail.

Pierre FORMSTECHE, qui a dirigé ce travail avec perspicacité. Ton enthousiasme, tes nombreuses et judicieuses idées m'ont souvent été utiles lors de la réalisation de ce travail.

A tous les autres membres du laboratoire, pour leur aide et leurs conseils.

A Madame Morandi pour avoir su maîtriser avec brio un logiciel de traitement de texte souvent récalcitrant.

Résumé

Les antiglucocorticoïdes, bien que capables de se lier au récepteur des glucocorticoïdes, ne peuvent initier une réponse biologique spécifique. La conversion du récepteur en une forme se fixant à l'ADN, ou transformation, est indispensable à la modulation de l'expression des gènes régulés par les glucocorticoïdes.

In vitro, la transformation correspond à une augmentation considérable de l'affinité du récepteur pour des séquences particulières d'ADN présentes en amont et dans les gènes régulés. Ce phénomène est accompagné d'une modification des caractéristiques physicochimiques du récepteur traduisant une dissociation d'un complexe oligomérique, en une sous-unité liant le stéroïde et l'ADN, et d'autres facteurs dont au moins un est une protéine de choc thermique de 90 kDa (hsp 90). Néanmoins, le rôle du ligand dans ce processus a récemment été remis en question (Willman T. et Beato M., Nature 324, 628-691 (1986)).

Des agonistes naturels ou de synthèse (corticostérone, dexaméthasone ...) et des antagonistes stéroïdiens (progestérone, 11-déoxycortisol, RU 486 ...) ou non stéroïdiens (trifluoperazine) sont incubés avec des thymocytes de rats à 37°C. Les complexes ligand-récepteur sont alors caractérisés.

La rapidité et la haute résolution de la chromatographie d'exclusion de taille haute performance nous ont permis d'établir une nette concordance entre la capacité du ligand à promouvoir la transformation et sa classification en fonction de son activité biologique (agoniste pur ou partiel, antagoniste). Tous les antiglucocorticoïdes testés, quelle que soit leur structure chimique, s'avèrent posséder une propriété de stabilisation du récepteur sous forme non transformée ($R_s = 7,8$ nm), alors que l'incubation avec des agonistes purs génère une forme transformée ($R_s = 5$ nm). Le cortisol, agoniste partiel dans ce système, induit un profil intermédiaire où coexistent les formes transformée et non transformée. L'analyse par Western-blot de l'éluat nous permet de démontrer la présence de la hsp 90 dans la zone 7-8 nm associée au récepteur et sous forme libre en 6 nm, probablement sous forme dimérique. Cette incapacité à destabiliser le récepteur sous forme non transformée par les antiglucocorticoïdes étaye donc l'hypothèse d'un mécanisme d'action au niveau prétranscriptionnel, et confère au ligand un rôle essentiel in vivo.

Nous disposons de plus d'une méthode de criblage de ligands, permettant d'évaluer rapidement l'affinité et l'activité des molécules dans des conditions physiologiques qui peut parfaitement s'inscrire dans un programme de recherche de nouveaux composés antistéroïdiens dont l'importance thérapeutique n'est plus à démontrer.

Ce travail, réalisé dans le laboratoire de Biochimie Structurale de la Faculté de Médecine de Lille (Pr. DAUTREVAUX), sous la direction du Dr. P. FORMSTECHEP, a fait l'objet ou a participé à l'élaboration des publications et communications suivantes :

SABLONNIERE, B., DANZE, P.M., FORMSTECHEP, P., LEFEBVRE, P., and DAUTREVAUX, M. (1986) Physical characterization of the activated and non activated forms of the glucocorticoid receptor bound to the steroid antagonist RU 486, *J. Ster. Biochem.* 25(5) : 605-614.

FORMSTECHEP, P., LEFEBVRE, P., and DAUTREVAUX, M. (1986) RU 486 stabilizes the glucocorticoid receptor in a non-transformed high molecular weight form in intact thymus cells under physiological conditions, in Proceedings of the "Anti-Steroids" Satellite Symposium of the 7th International Congress on Steroid Hormones, Marbella (Spain), J.R. Pasqualini Ed., Raven Press.

SABLONNIERE, B., LEFEBVRE, P., FORMSTECHEP, P. and DAUTREVAUX, M. (1987) Improved Stokes radius measurement of the glucocorticoid receptor using TSK G3000 SW and TSK G4000 SW high performance size exclusion columns, *J. Chromatogr.*, 403:183-196.

LEFEBVRE, P., FORMSTECHEP, P., RICHARD, C. and DAUTREVAUX, M. (1988) RU 486 stabilizes a high molecular weight form of the glucocorticoid receptor containing the 90K non-steroid binding protein in intact thymus cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 150(3):1221-1229.

LEFEBVRE, P., DANZE, P.M., SABLONNIERE, B., RICHARD, C., FORMSTECHEP, P. and DAUTREVAUX, M. (1988) The association of the glucocorticoid receptor binding subunit with the 90K non steroid binding component is stabilized by both steroidal and non steroidal antiglucocorticoids in intact cells, *Biochemistry*, in the press

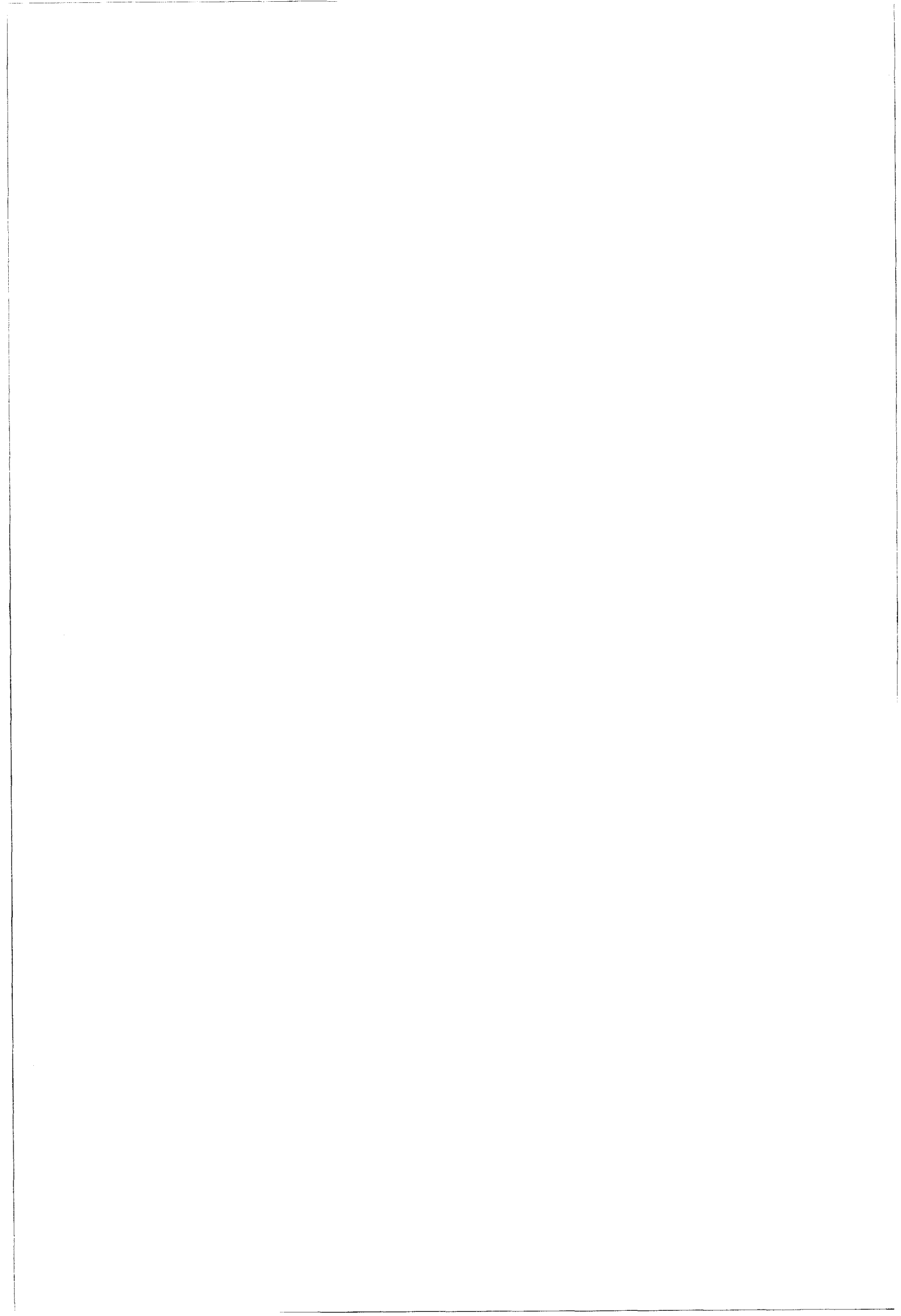
SABLONNIERE, B., ECONOMIDIS, I.V., LEFEBVRE, P., PLACE, M., RICHARD, C., FORMSTECHEP, P., ROUSSEAU, G.G. and DAUTREVAUX, M. (1988) RNA binding to the untransformed glucocorticoid receptor, *Eur. J. Biochem.*, in the press.

LEFEBVRE, P., FORMSTECHEP, P., RICHARD, C., and DAUTREVAUX, M. (1987) RU 486 stabilizes the glucocorticoid receptor in a non-transformed high molecular weight form in intact thymus cells under physiological conditions, 8th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry, Paris.

LEFEBVRE, P., FORMSTECHEP, P., and DAUTREVAUX, M. (1987) How do antiglucocorticoids exert their action at the receptor level ? Conference on Steroid receptors in Health and Disease, Rochester.

LEFEBVRE, P., FORMSTECHEP, P., et DAUTREVAUX, M. (1987) Mécanisme d'action des antiglucocorticoïdes : stabilisation d'une forme particulière du récepteur des hormones glucocorticoïdes, Premières Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, Lille.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE



INTRODUCTION

Le système endocrinien est le garant du maintien d'une parfaite synergie entre les différents tissus composant un organisme. La coordination des fonctions vitales implique un haut niveau d'intégration et d'interdépendance des systèmes nerveux, endocrinien et immunitaire .

Les hormones stéroïdes (oestrogènes, progestagènes, androgènes, minéralocorticoïdes, glucocorticoïdes, 1,25 dihydroxyvitamine D3) sont chacune impliquées dans la régulation des fonctions diverses telles la reproduction, la diurèse, le métabolisme du tissu osseux. Les glucocorticoïdes constituent une classe un peu particulière en ce sens qu'ils influencent le fonctionnement de la plupart des tissus. Cette influence résulte non seulement d'effets directs, mais aussi de la modulation par les glucocorticoïdes de l'action de médiateurs chimiques participant à la régulation de l'homéostasie.

Les glucocorticoïdes sont à ce titre considérés comme les hormones du stress, leur action globale étant d'augmenter la résistance de l'organisme à diverses agressions. Le mécanisme d'action des glucocorticoïdes et des hormones stéroïdes en général est globalement bien établi, impliquant trois partenaires essentiels : le ligand, le récepteur et le génome. Ce modèle se base sur l'étude de la localisation subcellulaire des espèces liant le stéroïde et de leurs caractéristiques physicochimiques.

Le récepteur des glucocorticoïdes (GR) non lié à l'hormone est une protéine intracellulaire. Le stéroïde pénètre dans la cellule essentiellement par diffusion passive, bien que d'autres mécanismes aient

été envisagés (Rao, 1981) et se lie au GR selon une cinétique michaelienne. In vivo comme in vitro, le GR subit une étape vraisemblablement irréversible dite de transformation, caractérisée par l'acquisition d'une haute affinité pour l'ADN. L'interaction GR-ADN induit une modulation de réponse(s) biologique(s) spécifique(s) du tissu cible. Certains stéroïdes sont capables d'interagir avec le même site de liaison sans induire d'effets biologiques, et de bloquer la modulation médiée par les glucocorticoïdes. Il s'agit des antiglucocorticoïdes. Ces dérivés font partie de la famille des antihormones stéroïdiennes dans laquelle les anti-oestrogènes occupent une place privilégiée puisqu'ils sont largement utilisés en thérapeutique humaine pour le traitement des tumeurs hormono-dépendantes. L'élucidation de leur mécanisme d'action a deux intérêts essentiels : permettre la conception de nouvelles molécules beaucoup plus actives et sélectives, et, sujet de nos préoccupations, l'étude des étapes essentielles à l'action hormonale.

A - PHYSIOLOGIE DES GLUCOCORTICOIDES

I - Régulation de la sécrétion du glucocorticoïde endogène

Le niveau basal de la sécrétion du cortisol est contrôlé par un mécanisme de rétroinhibition directe au niveau hypothalamique (production de Corticotrophin Releasing Factor) au niveau hypophysaire (production d'AdrenoCorticoTrophin Hormone) et au niveau des enzymes du cortex surrénalien, tissu dans lequel est synthétisé le glucocorticoïde à partir du cholestérol sanguin (Flèches grasses, fig. 1). Cette sécrétion basale est soumise à un cycle circadien dont le maximum est atteint en début de matinée. Dans ce contexte, les effets des glucocorticoïdes apparaissent

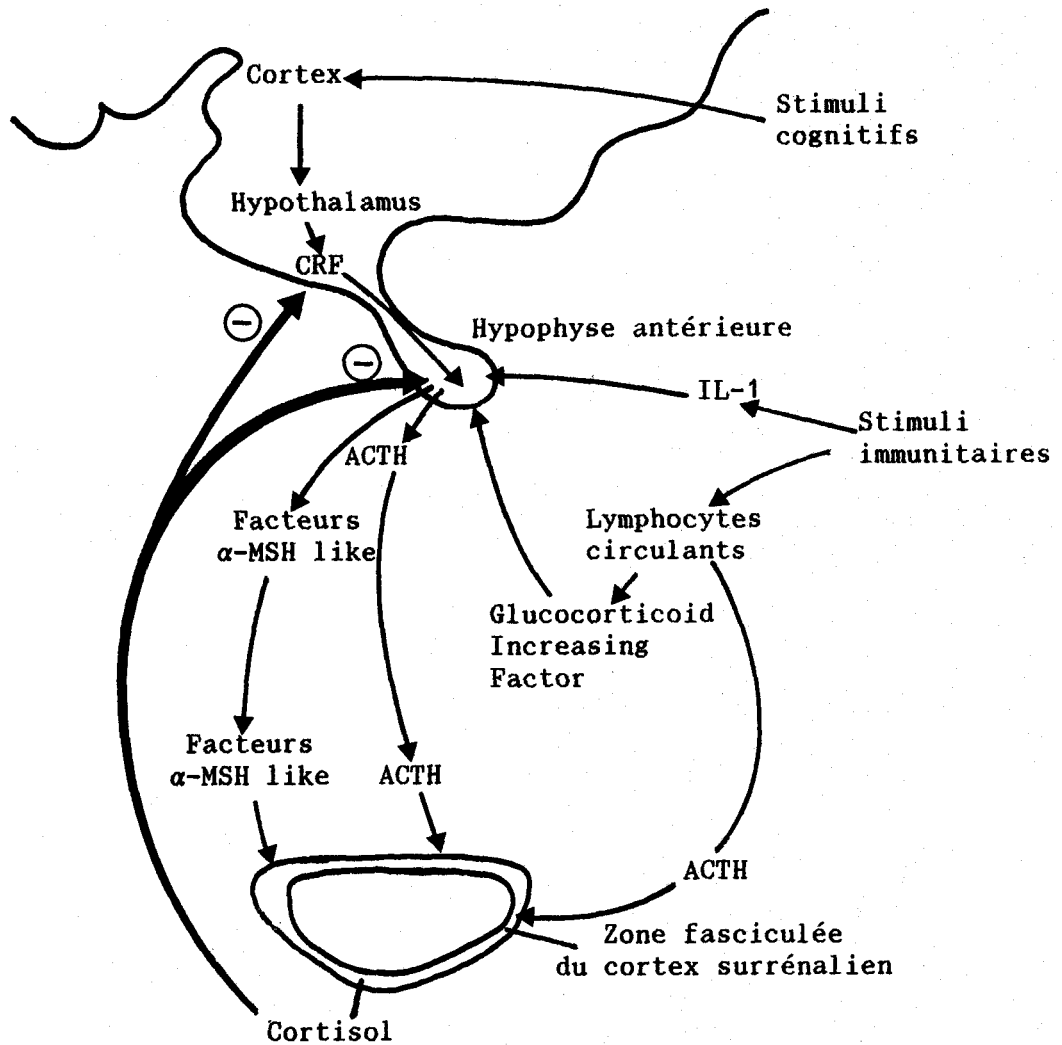


Figure 1- Axe immuno-hypothalamo-hypophysaire. Des stimuli cognitifs (sensoriels) sont capables de provoquer la sécrétion de CRF par l'hypothalamus qui la sécrétion d' ACTH par l'hypophyse. Parallèlement, les lymphocytes sécrètent de l' interleukine 1 (IL-1) et le G.I.F. stimulant la sécrétion d'ACTH. L'ACTH et d'autres facteurs apparentés à l' α -Melanocyte Stimulating Factor (Batman et al, 1986) stimulent à leur tour la production de cortisol par le cortex surrénalien. Le cortisol exerce à son tour des actions rétroinhibitrices (➔).

comme étant uniquement normalisateurs (maintien de la glycémie, du taux de glycogène hépatique, de la fonction cardio-vasculaire ...) ou permissifs vis-à-vis des catécholamines, du glucagon, l'hormone de croissance..

En situation de stress, la sécrétion des glucocorticoïdes augmente. Deux types de stimuli peuvent interférer avec le fonctionnement de l'axe hypophysio-hypothalamo-corticosurrénalien : les stimuli cognitifs et les stimuli immunitaires. Si les premiers sont bien connus pour provoquer une rapide sécrétion d'ACTH, les seconds sont d'une notion plus récente, démontrée par plusieurs observations. L'interleukine-1 (IL-1) est capable d'augmenter la sécrétion d'ACTH (Besedowski *et al.*, 1986, Berkenbosch *et al.*, 1987), les lymphocytes activés produisent de l'ACTH et sécrètent un Glucocorticoid Increasing Factor (distinct des lymphokines telles l'interféron et les interleukines) stimulant la production d'ACTH (revue par Modigliani et Gattegno, 1987). Ainsi, un stimulus portant sur le système immunitaire peut être directement responsable de son inhibition par les glucocorticoïdes en stimulant leur sécrétion (figure 1)

II. EFFETS BIOLOGIQUES DES GLUCOCORTICOÏDES

a) Effets métaboliques

Les glucocorticoïdes ont un effet s'étendant à la plupart des tissus. Il est donc impossible d'en faire une revue extensive, mais on pourra se reporter à quelques revues très bien documentées (Thompson et Lippman, 1974, Munck et Leung, 1976). Leur action est essentiellement catabolique, hormis pour le tissu hépatique dans lequel les glucocorticoïdes induisent la synthèse d'enzymes (contrôlant notamment la neoglycogénèse)

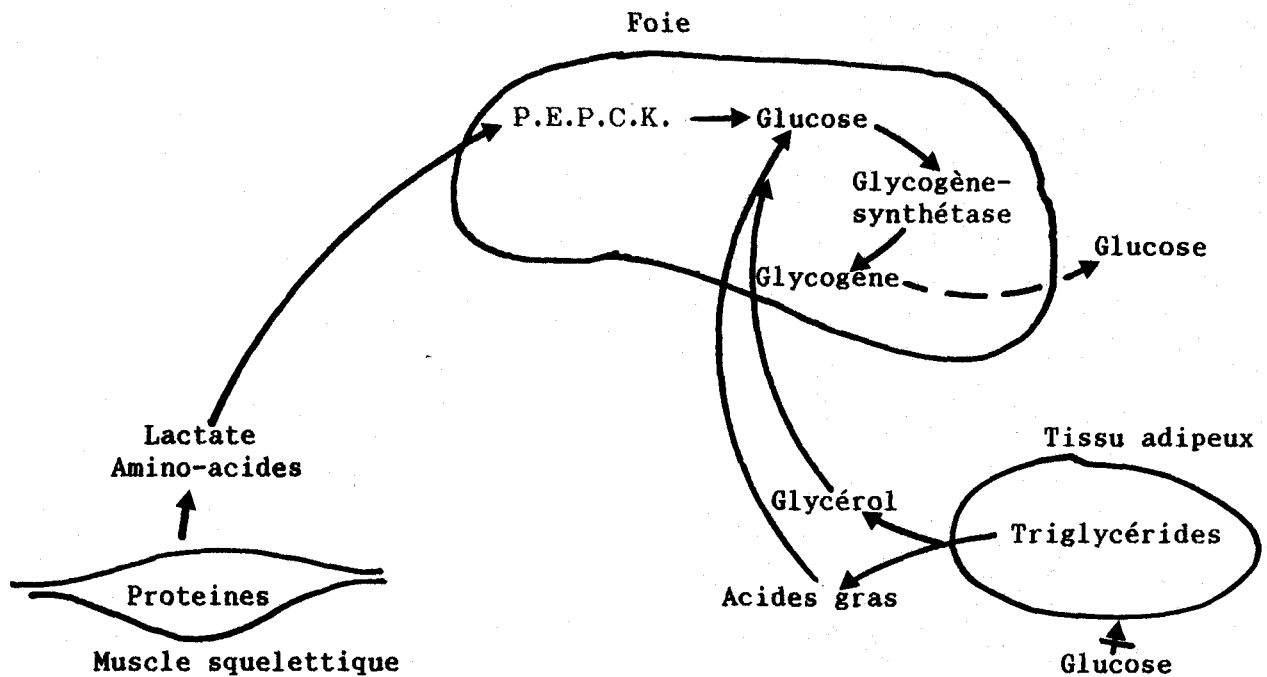


Figure 2- Quelques effets métaboliques des glucocorticoïdes. Les effets directs des glucocorticoïdes sur le métabolisme intermédiaire sont représentés par des flèches pleines. La phosphoenolpyruvate-carboxykinase est un enzyme-cléf de la gluconéogénèse dont la synthèse est contrôlée par les glucocorticoïdes. L'effet hyperglycémiant (- →) résulte essentiellement de l'effet facilitant des glucocorticoïdes vis-à-vis du glucagon et des catécholamines.

de protéines de structure, et semblent avoir un rôle non négligeable dans le processus de différenciation de ce tissu (Yang-Chou et al., 1988). Les effets les plus fréquemment rencontrés dans les tissus sont l'inhibition de la synthèse d'ADN et l'effet inhibiteur sur la captation de glucose. Ce dernier effet serait provoqué par l'internalisation des transporteurs membranaires (Horner et al., 1988).

b) Effets sur les processus inflammatoires.

Les glucocorticoïdes sont largement utilisés pour l'effet marqué qu'ils exercent sur la réponse inflammatoire aigüe, en inhibant la production de 2 types de médiateurs chimiques :(1) les prostaglandines et leucotriènes, qui sont synthétisés à partir des phospholipides membranaires par la phospholipase A₂. Les glucocorticoïdes induisent la synthèse de lipocortines, protéines capables de piéger les phospholipides et donc capables d'inhiber l'activité de la phospholipase par déplétion en substrat (Davidson et al., 1987). De même, ils inhibent (2) la transcription du gène et la traduction de l'ARN-m de l'interleukine 1 (Lee et al., 1988). Enfin, la prolifération des fibroblastes, et leur sécrétion de collagénase est inhibée par les glucocorticoïdes (Durant et al., 1986); l'effet anti-pyrétique semble résulter d'un effet direct sur l'hypothalamus.

c) Effets sur le système immunitaire

L'effet cytolytique de la dexaméthasone sur les cellules immunocompétentes des murins a été abondamment décrit, et reste d'ailleurs un des moyens d'évaluation de l'activité glucocorticoïde le plus couramment utilisé. Cette lyse cellulaire semble essentiellement résulter de l'activation précoce d'une endonucléase altérant l'intégrité du génome des

thymocytes de rat (Compton et Cidlowski, 1986, 1987).

Chez l'homme, l'effet cytolytique est beaucoup moins net et il semble qu'il faille attribuer l'effet immuno-dépresseur des glucocorticoïdes à une altération de circulation sanguine des cellules immuno-compétentes, ainsi qu'aux effets inhibiteurs de la sécrétion des cytokines (voir fig. 3).

Ces quelques exemples décrivant l'effet globalement immunodépresseur des glucocorticoïdes vont à l'encontre de la conception traditionnelle de l'action de ces stéroïdes, qui aurait un rôle protecteur vis-à-vis d'un stress. Il semble qu'il faille plutôt les considérer comme des "garde-fous" empêchant l'emballement des réponses immunitaires. Le système immunitaire serait donc soumis à une régulation négative via le système endocrinien (Munck et al., 1984a).

B - LE RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES, FACTEUR DE TRANSCRIPTION

HORMONO-INDUCTIBLE

Plusieurs étapes ont marqué la progression des connaissances sur la régulation du génome par les récepteurs des hormones stéroïdes : (1) la synthèse de ligands radioactifs à haute activité spécifique, (2) la démonstration de l'existence de sites de liaison à haute affinité et faible capacité, (3) l'interaction du récepteur avec le noyau et l'ADN, (4) la régulation de l'expression de gènes spécifiques, (5) la purification du récepteur, et l'étude de sa liaison à des séquences particulières d'ADN et enfin (6) le clonage des ADNc codant pour les divers récepteurs. Les progrès les plus spectaculaires ont été effectués ces dernières années dans les deux derniers domaines cités (5,6).

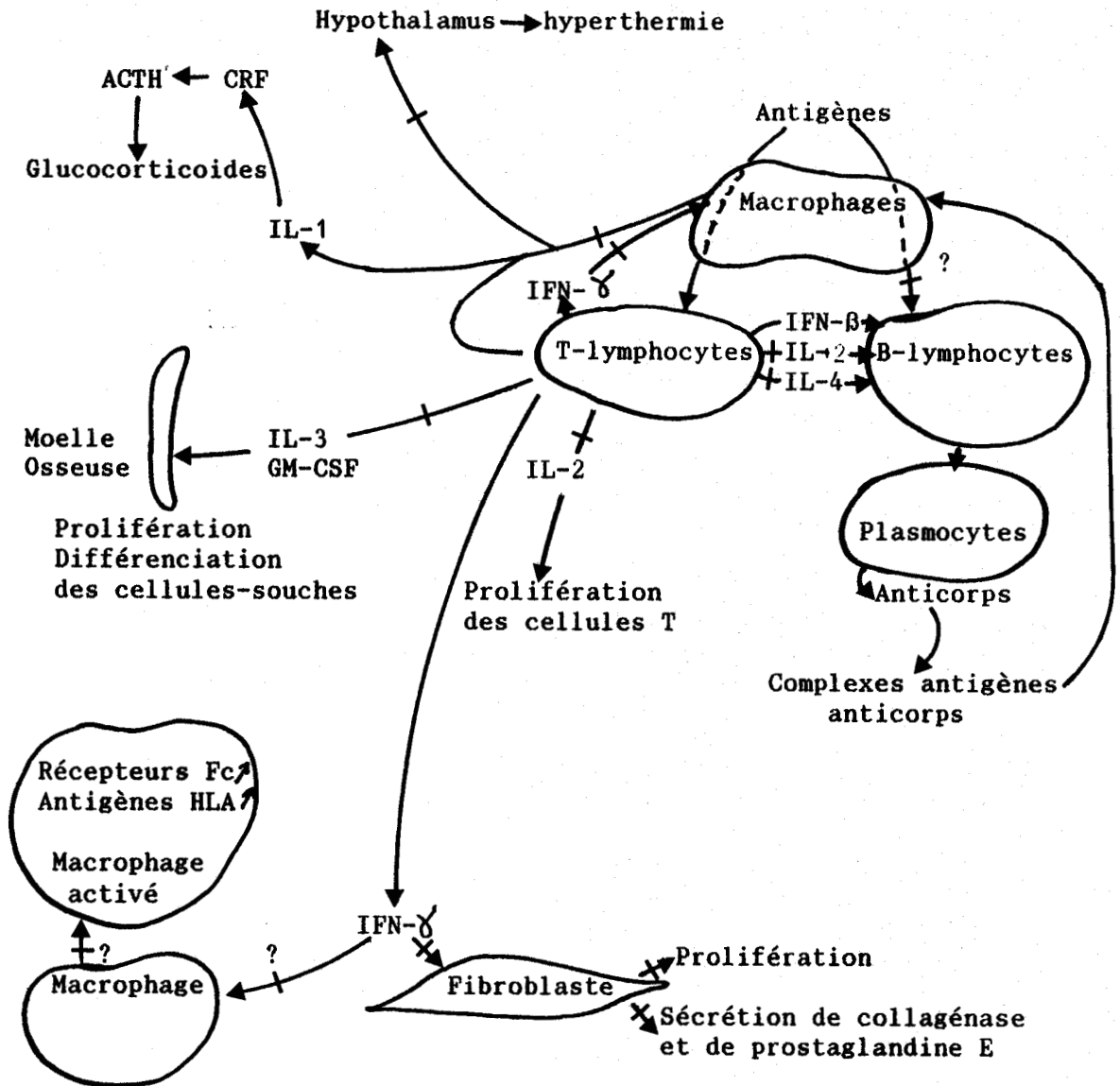


Figure 3- Effets des glucocorticoïdes sur la production de cytokines par les différents composants du système immunitaire. Les traits indiquent les étapes connues ou suspectées d'être bloquées (?) par les glucocorticoïdes. L'action inhibitrice directe de l'ACTH sur la synthèse d'anticorps, la production d'interférons et la prolifération des lymphocytes n'est pas mentionnée mais peut également participer à ce schéma de régulation.

ACTH : AdrenoCorticoTrophin Hormone

CRF : Corticotrophin Releasing Factor

IL-1, 2, 3, 4 : Interleukine 1, 2, 3, 4.

IFN- γ : interféron γ , IFN- β (=IL-6) : interféron β 2

GM-CSF : Granulocytes and Macrophages Colony Stimulating Factor

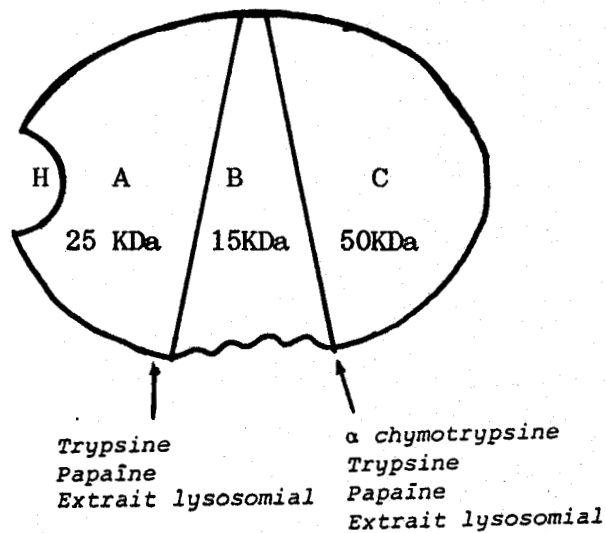
I - Structure et fonctions du polypeptide liant le stéroïde

L'analyse biochimique de GR mutants présents dans des lignées particulières de cellules lymphomateuses, et l'étude de l'effet de la protéolyse ménagée sur la fonction du GR ont permis l'élaboration d'un modèle d'organisation de ce polypeptide en trois domaines distincts (Gehring, 1985 ; Carlstedt-Duke *et al.*, 1982 ; Reichman *et al.*, 1984).

Le GR est un polypeptide de 92-97 KDa contenant 3 domaines distincts qui sont, de l'extrémité N_t vers l'extrémité C_t :

- le domaine immunogène, d'environ 50 KDa
- le domaine de liaison à l'ADN, de 15 KDa
- le domaine de liaison du stéroïde, de 25 KDa.

La figure 4 résume ces données :



Le clonage du gène codant pour le GR humain (hGR) (Hollenberg et al., 1985, Weinberger et al., 1985b), du rat (rGR) et de souris (Danielsen et al., 1986) a permis une étude plus précise de la fonction de ces différents domaines (fig. 5). La comparaison de la séquence des GR avec v-erb-A (Weinberger et al., 1985b), le récepteur des oestrogènes humain (hER) (Greene et al., 1986, Green et al., 1986) et de poulet (cER) (Krust et al., 1986) le récepteur de la progestérone humain (hPR) ou de poulet (cPR) (Misrahi et al., 1987, Gronemeyer et al., 1987), et le récepteur des minéralocorticoïdes humain (hMR) (Arriza et al., 1987) a permis de distinguer 6 régions communes aux différents récepteurs, d'homologie plus ou moins forte (fig. 6).

Giguère et al., 1986, Hollenberg et al., 1987 définissent du Nt vers le Ct :

a) La région A/B, ou domaine immunogène

Comportant environ 400 aminoacides pour le GR, il est le domaine le moins conservé entre les différentes classes de récepteurs. Il porte la majorité des sites antigéniques et n'a pas de fonction clairement définie. Son intégrité est néanmoins essentielle à l'obtention d'une activité transcriptionnelle maximale, comme pour le cPR (Gronemeyer et al., 1987) et le hER (Kumar et al., 1987). Certaines délétions altèrent l'affinité du récepteur pour les glucocorticoïdes, suggérant une contribution de ce domaine à la stabilité du site de liaison.

b) La région C, domaine de liaison à l'ADN

Très riche en résidus cystéinyl, cette région est fortement conservée et semble caractéristique des récepteurs stéroïdiens et thyroïdiens.

L'utilisation de sondes d'ADN complémentaire codant pour ce domaine a

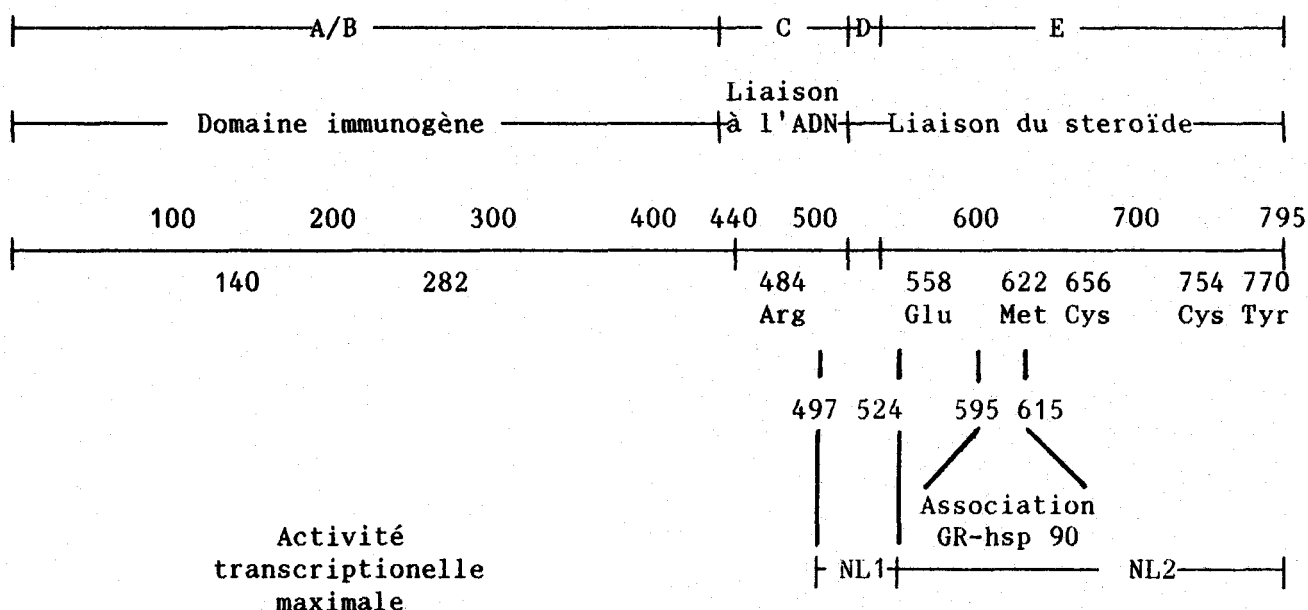


Figure 5- Localisation des domaines du GR de rat.

Le polypeptide de 795 acides aminés est divisé en 5 régions dont les fonctions majeures sont indiquées au-dessous (d'après Hollenberg et al, 1986). Les mutations ponctuelles affectant de manière significative la fonction du domaine où elles sont introduites ainsi que d'autres régions du polypeptide impliquées dans d'autres fonctions du GR sont également mentionnées:

Tyr 770: une mutation portant sur cet aminoacide diminue considérablement l'affinité du GR pour les stéroïdes.

Cys 754, Met 622: ces aminoacides sont marqués covalentiellement par marquage de photoaffinité à l'acétonide de triamcinolone (Gustafsson, 1987)

Cys 656: ce résidu cystéinyl est marqué covalentiellement par le mésylate de dexaméthasone (Simons et al, 1987).

Glu 558: la modification de cet aminoacide abolit l'activité de liaison du stéroïde.

Arg 484: la modification de cet aminoacide abolit l'activité de liaison à l'ADN.

Association avec la hsp 90: la délétion de la région 595-615 génère une forme 4S active constitutivement sur la transcription (Pratt et al, 1988).

NL-1, NL-2: sont des séquences peptidiques capables d'induire la migration au noyau du GR et de protéines de fusion GR/ β -galactosidase (Picard et Yamamoto, 1987)

Les mutations portant sur les résidus 770, 558, 484 sont déduites de la séquence de l'ADNc des variants du GR de souris nt-, existant dans les lignées lymphoïdes résistantes aux glucocorticoïdes (Danielsen et al, 1986).

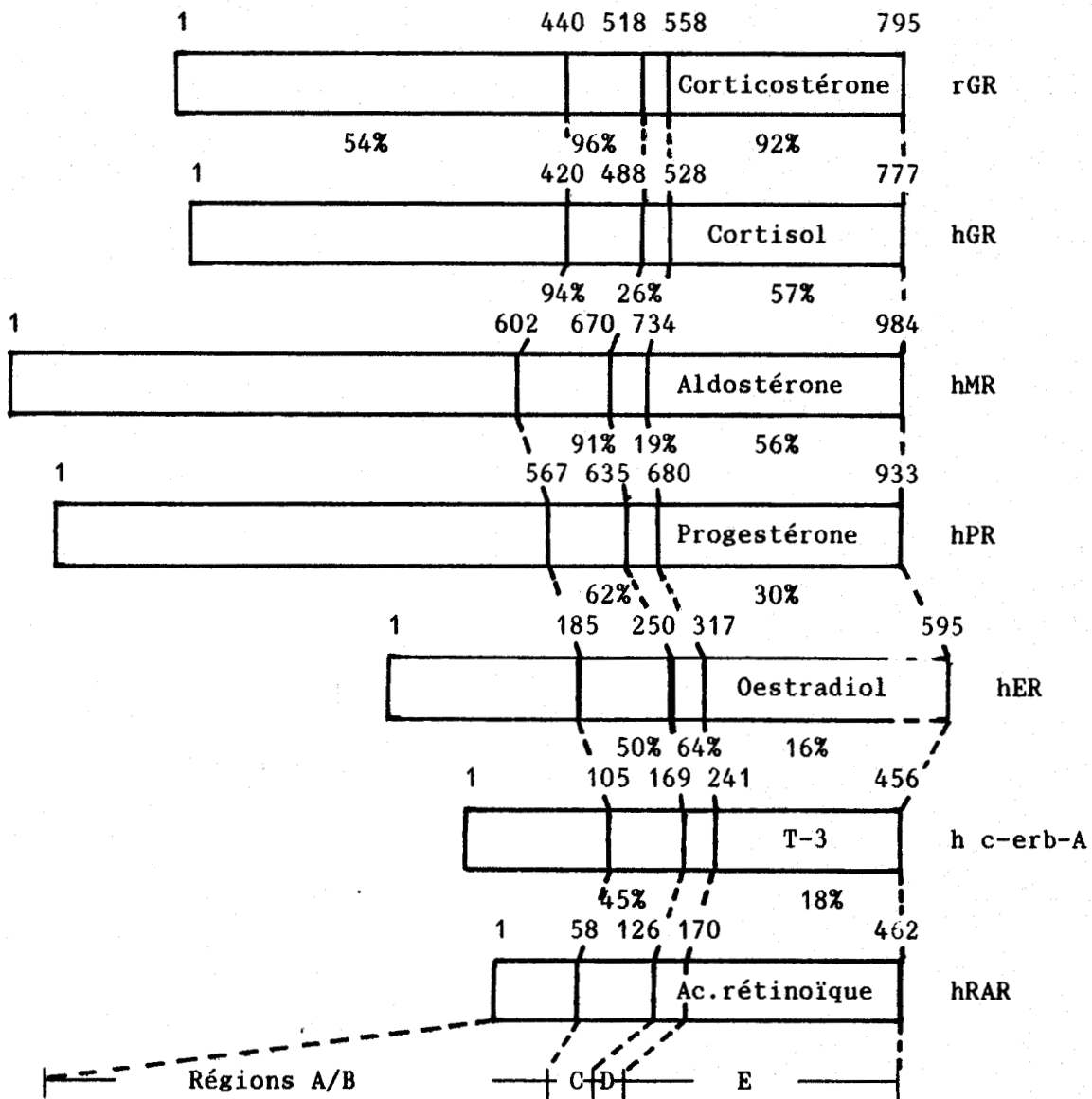


Figure 6- Homologies de séquences entre les récepteurs des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes. Cette figure décrit l'alignement des séquences d'acides aminés déduites de l'ADNc des gènes codant pour les récepteurs des glucocorticoïdes humain (hGR), qui sert de référence, de rat (rGR), des minéralocorticoïdes humain (hMR), de la progestérone humaine (hPR), des oestrogènes humains (hER), des hormones thyroïdiennes humaines (h c-erb-A), et de l'acide rétinoïque humain (hRAR). Les pourcentages d'homologies par rapport au hGR sont indiqués pour chaque récepteur.

d'ailleurs permis d'isoler un homologue du hER (hhER) (Giguere et al., 1988) et le récepteur de l'acide rétinoïque (Giguere et al., 1987, Petkovitch et al., 1988).

Ce domaine possède une région de 66 aminoacides pouvant potentiellement former deux doigts à zinc. Cette structure, initialement décrite pour le facteur de transcription de Xenope TFIIIA (Miller et al., 1985), est présente chez de nombreuses protéines liant l'ADN. L'association de cette structure à une activité de régulation de la transcription est si nette qu'elle est considérée comme prédictive de l'existence d'un facteur de transcription (revues par Evans et Hollenberg, 1987, Klüg et Rhodes, 1987).

La cohésion des doigts à zinc est maintenue par l'établissement de liaison de coordinence entre deux résidus cystéinyl, 2 résidus histidinyl et un atome de zinc (fig. 7). On distingue en fait 2 types de structure pour les doigts, notées respectivement C₂H₂ ou C₄, formant une boucle de 6 à 13 aminoacides. Dans la première catégorie, les aminoacides contractant une liaison avec le zinc sont 2 histidines et 2 cystéines. De telles structures sont rencontrées dans le TFIIIA; diverses homéoprotéines de la drosophile, et les facteurs de transcription de mammifères SP₁ et TDF. Dans la seconde catégorie (C₄), où seules des cystéines sont impliquées dans la liaison au zinc, se rangent le facteur de transcription de levure GAL 4, et les récepteurs des hormones stéroïdes. Dans ce dernier cas, le motif de base, répété deux fois, est C-X₂-C-X₁₃-C-X₂-C.

Le nombre de doigts à zinc varie considérablement d'un facteur à l'autre, allant de un à trente-neuf, pour le facteur XFin (Ruiz et al., 1987). On ignore les modalités exactes de l'interaction doigt à zinc-ADN,

néanmoins certains faits expérimentaux permettent de proposer un modèle pour TFIIIA (fig. 8).

La nature métalloprotéique a été prouvée sans ambiguïté possible dans le cas de TFIIIA et de GAL4 (voir Evans et Hollenberg, 1987 pour références). Par contre, aucune preuve directe de la présence de zinc associé aux récepteurs hormones stéroïdes n'a été rapportée. L'exposition du ER et du GR à des chélateurs de métaux (1-10 phenanthroline) provoque la perte de sa capacité à lier l'ADN (Schmidt et al., 1981, Sabbah et al., 1987) restaurée en présence de zinc dans le cas du ER (Sabbah et al., 1987). De façon contradictoire, la conversion des deux cystéines du premier doigt du ER en deux histidines abolit sa capacité à activer la transcription (Green et Chambon, 1987).

Cette région est également responsable de la spécificité de la liaison à l'ADN: en remplaçant dans la région C la séquence de 66 aminoacides du hER par celle du hGR, Green et Chambon, 1987 obtiennent des récepteurs des oestrogènes stimulant la transcription d'un gène initialement régulé par les glucocorticoïdes. D'autre part, la fonction d'activation semble également localisée dans cette région pour le hGR (Godowski et al., 1987) mais non pour le cPR et le hER (voir plus loin).

En dernier lieu, il faut noter que l'homologie de séquence de la région C des hGR, hPR et hMR avoisine 90 %, ce qui implique une possible compétition de ces récepteurs pour une même séquence d'ADN. Comme le récepteur des androgènes (AR), ils sont effectivement capables d'activer un même gène chimérique (Cato et al., 1987, Arriza et al., 1987). Divers mécanismes entrent en jeu pour maintenir une spécificité d'induction, notamment une concentration relative en récepteurs variable et une

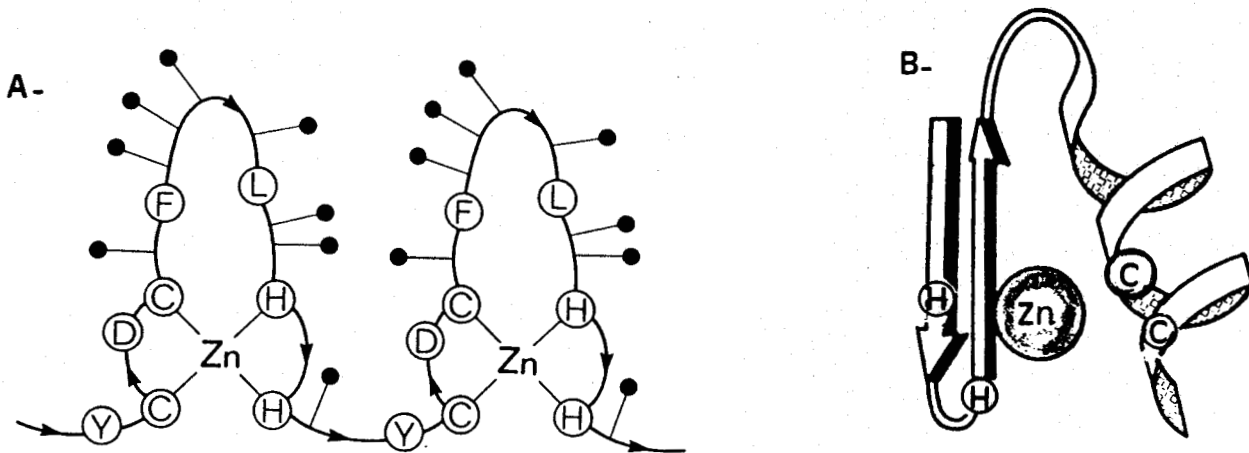


Figure 7- Structure primaire, secondaire et tertiaire de la séquence peptidique des doigts à zinc du facteur TF IIIA. (A) Structure primaire et secondaire des 2 domaines associés en tandem, basée sur un arrangement tétrahédrique des aminoacides complexant l'atome de zinc (d'après Miller et al, 1985). (B) La comparaison des structures des métalloprotéines avec celles des protéines "à zinc" a permis la construction d'un modèle tridimensionnel dans lequel un feuillet β -antiparallèle est suivi par une hélice α (d'après Berg, 1988)



Figure 8- Modèle d'interaction entre une protéine possédant 2 doigts à zinc arrangés en tandem et l'ADN. L'hélice α de chaque domaine se place dans le grand sillon de la double hélice de l'ADN et établit des contacts spécifiques avec les paires de bases, alors que le feuillet β se fixe sur le squelette déoxyribonucléique. La séquence charnière entre ces deux structures est également localisée dans le grand sillon (d'après Berg, 1988)

interaction physique avec l'ADN légèrement différente. (von der Ahe, 1986).

c) La région D est une zone charnière entre E et C d'environ 40 amino-acides.. Elle ne semble pas posséder de fonctions précises dans le hER (Kumar et al., 1987). Cependant, l'inhibition de l'expression du gène de la prolactine de rat est médiée par cette région du rER. De manière très surprenante, cette activité inhibitrice ne requiert ni le domaine C (liant l'ADN) ni les séquences d'ADN liant le ER (E.R.E.), mais implique plus probablement une interaction directe avec un facteur de transcription "Pit-1", ayant un fort effet activateur. De plus, cette région est interchangeable avec celle du hGR avec laquelle elle ne possède aucune homologie de séquence mais plutôt une homologie structurale (hydrophobicité et basicité) (Adler et al., 1988). Giguere et al., 1987 lui attribuent un rôle hypothétique durant le phénomène de transformation du hGR. Une telle fonction est confirmée pour c-erb-A qui possède une forte homologie avec hGR dans cette région. Une mutation ponctuelle dans ce domaine n'altérant ni la capacité à lier l'ADN ni celle à lier le ligand provoque une inactivation de c-erb-A (Munoz et al., 1988).

d) La région E ou domaine de liaison au stéroïde

La localisation en C_t du site de liaison a été établie par la perte de la capacité à lier le stéroïde lors de l'introduction de mutations dans ce domaine (Rusconi et Yamamoto, 1987, Giguere et al., 1987). Elle a été confirmée par l'identification du résidu cystéinyl 656 du rGR comme porteur du groupement thiol réagissant spécifiquement avec le mésylate de dexaméthasone, marqueur covalent du site de liaison des glucocorticoïdes (Simons et al., 1987a,b).

Deux types d'homologies sont remarquables dans cette région. Une homologie globale (56-57 %) entre le domaine E du PR, du GR et du MR, associée à la parenté structurale de leurs ligands respectifs, permet d'expliquer la bonne affinité des progestatifs pour le GR et des glucocorticoïdes pour le MR (Arriza et al., 1987).

Une seconde séquence de 20 à 30 aminoacides est aussi fortement conservée chez v-erb-A et ER. Elle semble impliquée dans l'interaction du récepteur avec la protéine de choc thermique de 90 KDa, interaction caractéristique de l'état non transformé (voir partie C.II-c) (Danielsen et al., 1986, Pratt et al., 1988). Ces observations pourraient expliquer l'activité constitutive des GR dont la région E est délétée (Miesfeld et al., 1987, Hollenberg et al., 1987). Des résultats similaires ont été récemment rapportés pour le rER dont le domaine E est presque totalement délété (Waterman et al., 1988). A cet égard, des résultats contradictoires sont obtenus avec les hER et hPR pour lesquels une perte quasi-totale de l'activité de transcription est observée lors de la délétion complète du domaine E (Gronemeyer et al., 1987, Kumar et al., 1987). Les délétions n'étant pas strictement équivalentes, il est par conséquent difficile d'établir un parallèle entre ces résultats. Dans le cas du hER, l'activité de liaison à l'ADN est conservée, signifiant la possibilité de dissocier l'activité de liaison et d'activation. Une étude récente menée par le groupe de Chambon (Webster et al., 1988) révèle que le hER ainsi délété recouvre une activité transcriptionnelle quasi normale, dans des cellules humaines, si l'on adjoint, en lieu et place du domaine E, la région "acide" des facteurs de transcription de levure GCN4 et GAL4. Cette région est chez ces facteurs, porteuse de la fonction "activation de

transcription" et comporte une structure caractéristique d'une vingtaine d'acides aminés formant une hélice alpha amphiphile (Ma et Ptashne, 1987) que l'on retrouve dans le domaine E du ER (fig. 9).

Deux implications importantes émergent de ces constatations : cette structure est capable à elle seule d'induire la transcription et pourrait être présente dans les autres récepteurs. D'autre part, le mécanisme d'activation chez les eucaryotes inférieurs ou supérieurs serait identique, hypothèse confirmée par les résultats de Kakidani et Ptashne, 1988 (revue par Guarrente, 1988).

e) Conclusion

Les récepteurs stéroïdiens ont donc un schéma d'organisation similaire aux facteurs de transcription de levure ou les protéines homéotiques de la drosophile pour lesquels chaque domaine est le support d'une fonction de la protéine (fig. 10).

Les récepteurs des hormones stéroïdes sont en effet capables de réguler l'expression du génome eucaryote par interaction avec des séquences particulières d'ADN très souvent localisées dans les séquences situées en 5' des gènes. Ils font partie à ce titre de la famille des facteurs de transcription dont l'activité est modulée par un signal extracellulaire (choc thermique, esters de phorbol, TGF- β ...). On conçoit donc aisément l'intérêt porté à l'élucidation des mécanismes d'action de ces facteurs sur le génome, intérêt considérablement renforcé depuis 1986 quand resurgit l'idée que l'étape primaire de l'oncogénèse pouvait être due à la perturbation de la transcription par certains oncogènes (Weinberger et al., 1985a, Varmus et al., 1987). Deux équipes (Sap et al., 1986, Weinberger et al., 1986) révélèrent conjointement que l'équivalent

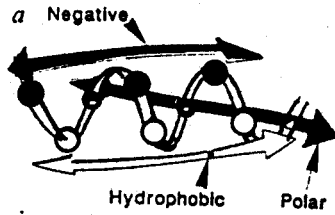
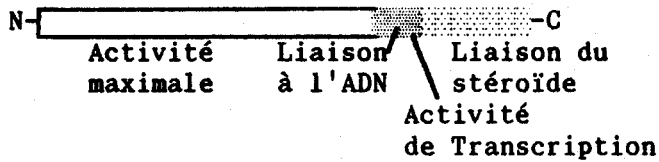


Figure 9- Structure de l'hélice α supposée être responsable de la fonction d'activation de la transcription médiée par les facteurs de transcription de levure (Giniger et Ptashne, 1987).

● Acide Glutamique, ● Glutamine, ○ Leucine

A- Récepteur des glucocorticoïdes



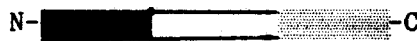
B- Gal4



C-GCN4



E- E- α 2



D-TFIIIA



▨ Liaison à l'ADN

■ Activation ou répression (E- α 2) de la transcription

□ Activité inconnue

Figure 10- Domaines fonctionnels des facteurs de transcription eucaryotiques. Les diagrammes décrivent la localisation des séquences d'acides aminés requises pour l'activité de liaison à l'ADN, la liaison du stéroïde ou l'activité transcriptionnelle de ces facteurs de transcription. (A) Récepteur des glucocorticoïdes; (B) Gal-4; (C) GCN 4 (sont tous deux des facteurs de la levure); (D) TFIIIA, facteur de transcription de l'ARN 5S de Xénope; (E) E- α 2, Protéine homéotique de la Drosophile

cellulaire du produit du virus de l'érythroblastose aviaire (v-erb-A) constitue un récepteur des hormones thyroïdiennes, possédant lui-même de fortes homologues de structure et de fonction avec les récepteurs des hormones stéroïdes. Un parallèle peut être établi avec des mutants du GR qui, amputés de leur domaine de liaison du stéroïde, possèdent une activité transcriptionnelle constitutive (Godowski et al., 1987). De ces constatations émergent deux concepts : premièrement, les récepteurs des hormones stéroïdes et thyroïdiennes constituent une superfamille de gènes structurellement et fonctionnellement comparables, et deuxièmement que ces gènes codent pour des protéines potentiellement oncogéniques (Green et Chambon, 1986).

Cette hypothèse de dérégulation de la transcription provoquée par des facteurs de transcription altérés a d'ailleurs été très récemment confirmée par la mise en évidence d'une très forte homologie de la protéine oncogène jun, isolée d'un virus de sarcome aviaire, avec le facteur de transcription AP-1, dont l'affinité pour les séquences régulatrices de certains promoteurs est augmentée par les esters de phorbol, bien connus pour leur effet tumorigène (Bohman et al., 1987, Lee et al., 1987, Angel et al., 1987 ; Bos et al., 1988)

II - Interaction du récepteur transformé avec l'ADN

L'interaction de protéines avec l'ADN constitue un mécanisme universel de régulation de l'expression du génome au cours de la différenciation cellulaire, pour assurer une spécificité tissulaire ou en réponse à des inducteurs extracellulaires. Le gène codant pour le GR est une séquence d'ADN agissant en trans : son produit d'expression est un facteur diffusible dont l'action a lieu à distance. Son effet s'exerce

par le biais de séquences nucléotidiques agissant en cis, très souvent localisées en amont du site d'initiation de la transcription (CAP-site) des gènes qu'il contrôle.

Deux types de séquences d'ADN sont nécessaires à la régulation des gènes des eucaryotes supérieurs transcrits par l'ARN polymérase II : les promoteurs et les séquences activatrices (enhancers). Un promoteur est généralement constitué d'une "TATA box" située à environ -30 bp du CAP site, et d'autres séquences situées en amont, de -40 à -110bp comme la "CAAT-box". La TATA box semble essentielle à une initiation précise de la transcription, alors que les autres séquences augmentent le taux de transcription (Maniatis et al., 1987). Les enhancers stimulent la transcription des promoteurs homologues ou hétérologues, et sont formés de un ou plusieurs motifs agissant en synergie, quelque soit leur position ou leur orientation par rapport au CAP-site. Le clonage des gènes régulés par les glucocorticoïdes ainsi que leurs séquences régulatrices, a permis d'importants progrès dans la compréhension du mode de régulation médié par le GR.

a) Modulation du taux en ARN-m

Un effet direct des glucocorticoïdes sur la transcription fut mis en évidence par Ringold et al., 1977. Des cellules d'hépatome de rat (HTC), infectées par le virus de tumeur mammaire de souris (MMTV) produisent des taux considérables de l'ARN-m du MMTV lors d'une exposition des cellules aux glucocorticoïdes. Le taux d'induction est de 10 fois le taux de base, le maximum étant atteint en 15 minutes. Depuis la modulation négative ou positive de la concentration en ARN-m a été démontrée pour de nombreux gènes (tableau I).

Produit du gène	Effet	Tissu ou système cellulaire
MMTV	+	Cellules d'hépatome de rat(HTC)
Tyrosine Amino Transférase	+	Hépatocytes et HTC
Tryptophane Oxygénase	+	Foie de rat, HTC
Métallothioneine IIA	+	Cellules HeLa
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	+	Foie de rat
Lysozyme	+	Oviducte de poulet
Récepteur à insuline	+	Lymphocytes humains
Procollagène type I	-	Fibroblastes de souris
Récepteur des glucocor- ticoïdes	-	Foie, reins, poumons...de rat
Proopiomélanocortine	-	Cellules hypophysaires de rat et de souris
α_1 -foetoprotéine	-	Hépatocytes différenciés

TABLEAU I - Effet des glucocorticoïdes sur le taux en ARN-m codant pour diverses protéines. L'effet direct sur la transcription (activation (+) ou répression (-)) a été démontré pour chacun de ces exemples.

Parmi cette liste non exhaustive d'exemples de gènes régulés, la TAT, enzyme hépatique exprimée dans des lignes stables d'hépatome de rat, et le MMTV, rétrovirus responsable de l'apparition d'adénocarcinomes chez la souris sont certainement les modèles d'induction les plus étudiés.

Des effets post-transcriptionnels ont parfois été évoqués :

l'ARN-m de la caséine de tissu mammaire du rat est stabilisé en présence de glucocorticoïdes (Chomczynsky et al., 1986), et une modulation de l'épissage alternatif de l'ARN-m codant à la fois pour la calcitonine et le "Calcitonin Gene Related Peptide" a été décrite par Cote et Gagel, 1987. Ces effets sont glucocorticoïdes-dépendant, mais un effet indirect ne peut être exclu dans ces deux cas, une synthèse protéique est d'ailleurs indispensable à l'effet glucocorticoïde-dépendant de diminution de la stabilité de l'ARN-m de l'interleukine 1 (Lee et al., 1988).

b) Nature des sites d'interaction

L'accumulation du récepteur dans le noyau est un processus dépendant du temps, de la température et du stéroïde. Seuls les agonistes sont capables d'induire un transfert nucléaire significatif (Rousseau et al., 1973). L'acquisition de cette haute affinité pour le noyau est caractérisée par la nécessité d'employer des solutions à haute force ionique pour recouvrer l'activité de liaison dans la fraction soluble de l'extrait nucléaire (Middelbrook et al., 1975).

Une fraction des GR nucléaires est localisée dans la matrice nucléaire (Kirsch et al., 1986, Kaufman et al., 1986) où sont également retrouvés les enzymes impliqués dans la synthèse et le processing des acides nucléiques telles les ADN et ARN polymérases, topoisomérases, mais également les séquences d'ADN requises pour l'expression transcriptionnelle maximale ou pour la répression d'un gène (Phi-Van et Stratling, 1988). Les gènes transcriptionnellement actifs de la matrice possèdent une sensibilité accrue aux endonucléases, notamment à la DNase I, mettant en évidence une structure chromatinienne plus relâchée.

A cette sensibilité générale à la DNase I se superposent des sites d'hypersensibilité dont l'apparition pourrait être corrélée à une fonction de régulation (Yamamoto, 1985, Gross et Garrard, 1987). Dans certains cas, l'apparition de ces sites est hormono-dépendante et concomitante à une augmentation de la transcription des gènes (Kaye et al., 1986, Turcotte et al., 1986, Jantzen et al., 1987, Becker et al., 1984). Le dosage de l'hypersensibilité à la DNase I a d'ailleurs été utilisé comme mesure de l'activité de transcription induite par le GR (Vanderbilt et al., 1987).

c) Le concept d'élément de réponse aux hormones (HRE)

Le premier système utilisé comme modèle d'induction de la transcription fut le MMTV. La transcription de l'ADN proviral est fortement activée par les glucocorticoïdes, à condition que l'intégration de ce DNA ait lieu dans des zones du génome de l'hôte sensibles à la DNase I. La structure du gène du MMTV est parfaitement connue. Comme les autres rétrovirus, il possède de part et d'autre de la région codante deux régions dite "Long Terminal Repeat" (LTR) (Groner et al., 1983, Ringold, 1985, Cordingley et al., 1987a, Hager, 1988).

L'application des méthodologies de l'ADN recombinant et de transfection a montré que le LTR en amont du CAP site contient, outre le promoteur, une séquence indispensable (de -202 à -59) à l'inductibilité par les glucocorticoïdes (Hynes et al., 1983), par les progestatifs et les androgènes (Cato et al., 1987). Cette séquence, définie comme l'élément de réponse aux Hormones (HRE) (Ponta et al., 1985), peut être séparée du LTR du MMTV pour conférer une inductibilité hormonale à des promoteurs hétérologues (Chandler et al., 1983, Groner et al., 1983). Cet HRE contient des sites de liaison du GR (Payvar et al., 1983,

Pfähl et al., 1982). De tels sites d'interaction ont été décrits dans divers promoteurs de gènes dont celui de la TAT, de la tryptophane-oxygénase, de l'ADN proviral du virus de l'hépatite B (voir Beato, 1987 pour références). L'exception est le gène de l'hormone de croissance humaine où existe un site de liaison dans le premier intron (Eliard et al., 1985). Cependant, l'existence de tels sites de liaison sur de l'ADN purifié ne préjuge pas de leur fonctionnalité in vivo (Becker et al., 1987, Hromas et al., 1988). D'autres séquences impliquées dans le maintien d'une spécificité de tissu, ont également un rôle très important (Stewart et al., 1988).

d) Existence d'une séquence consensus au sein des éléments de réponses aux glucocorticoides (GRE).

De la comparaison de la séquence des différents GRE émerge une séquence consensus de 15pb : 5' GGTACANNNTGTYCT 3' où N et Y figurent des bases variables. Le motif droit TGTYCT est retrouvé dans 90 % des séquences, et l'introduction de la séquence de 15 pb est suffisante pour conférer une inductibilité par les glucocorticoides et les progestatifs à un promoteur quelconque, bien que l'interaction du GR et du PR avec l'ADN soit légèrement différente (von der Ahe et al., 1986). D'autre part, toute altération de la symétrie rotatoire partielle de cette séquence provoque une inactivation de l'inductibilité hormonale. L'importance d'une telle symétrie se retrouve également dans les séquences liant des facteurs de transcription procaryotiques, qui interagissent avec l'ADN sous forme de dimères (Strähle et al., 1987).

Enfin, la modification du motif TGTYCT en TGACCT suffit à convertir un GRE (Glucocorticoid Responsive Element)

en un ERE (Estrogen Responsive Element). Cette similitude est à rapprocher avec celle observée pour le domaine C des récepteurs, dans lesquels quelques aminoacides seraient responsables de la spécificité de l'interaction avec leurs "éléments de réponse" respectifs (Martinez et al., 1987, Klöck et al., 1987, Klein-Hitpass et al., 1987).

e) Propriétés des GRE

Les GRE ont une caractéristique commune avec les enhancers viraux. Ils peuvent agir à des distances de quelques centaines de nucléotides par rapport au CAP site, quelque soient leur orientation (Maniatis et al., 1987). La spécificité d'un GRE vis-à-vis d'un gène est néanmoins stricte, la proximité physique de deux gènes régulés par les glucocorticoïdes n'induit pas d'interférence dans la régulation propre à chaque gène (Charron et al., 1988).

L'étude des promoteurs de différents gènes révèle une répartition variable des GRE. Certains sont placés près du site d'initiation de la transcription (-300 pb), comme le MMTV ou plus éloignés comme pour la TAT, la tryptophane-oxygénase (T.O ou la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (de -450 à -2500 pb) (Jantzen et al., 1987, Danesh et al., 1987, Petersen et al., 1988). Ces gènes possèdent de multiples GRE soit très proches (MMTV, TAT), soit très éloignées (T.O, PEPCK). Dans le cas de la TAT, les deux GRE ont un effet synergique alors que les deux séquences de la TO et PEPCK somment leur effets.

Pour de nombreux gènes, la régulation observée est donc essentiellement positive, en ce sens que l'interaction GR/ADN provoque une augmentation du taux de transcription. D'autres gènes sont régulés négativement par les glucocorticoïdes. Le gène de la proopiomélanocortine

fait partie de cette catégorie, Charron et al., 1988 ont suggéré que l'inhibition pourrait résulter du chevauchement partiel de la séquence GRE avec une putative CCAAT-box, le GR empêchant, par encombrement stérique, la fixation du facteur se liant à cette CCAAT-box.

f) Mécanisme d'action

L'étude de l'organisation structurale du fragment LTR du MMTV mobilisé sur des minichromosomes (virus de Papillome Bovin) ou dans d'autres situations montre une association des nucléosomes à l'ADN selon un motif régulier (Hager, 1988). Une stimulation par les glucocorticoïdes crée une zone de sensibilité aux agents clivant l'ADN dans la région associée au second nucléosome (-70 à -220 pb) qui porte également les GRE : un déplacement transitoire du nucléosome par le GR peut expliquer ces observations (Richard-Foy et al., 1987a). La présence de nucléosomes dans le promoteur est d'ailleurs capable d'inhiber l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II (Lorch et al., 1987). Outre le déplacement du nucléosome, la stimulation hormonale provoque la liaison de deux facteurs de transcription NF-1 et F-i, présents également dans les cellules non stimulées sous une forme très affine pour le LTR purifié. La structure chromatinienne serait donc perturbée par la fixation d'un ou plusieurs GR, entraînant une meilleure accessibilité à l'ADN des facteurs de transcription (Cordingley et al., 1987b, 1988) (fig. 11).

L'accessibilité des séquences régulatrices semble être d'une importance primordiale pour l'expression des gènes. Ce point a été souligné pour le gène de la TAT (Becker et al., 1987) et pour le gène codant pour la chaîne kappa des immunoglobulines (Hromas et al., 1988).

Le modèle précédent ne permet cependant pas d'expliquer l'effet

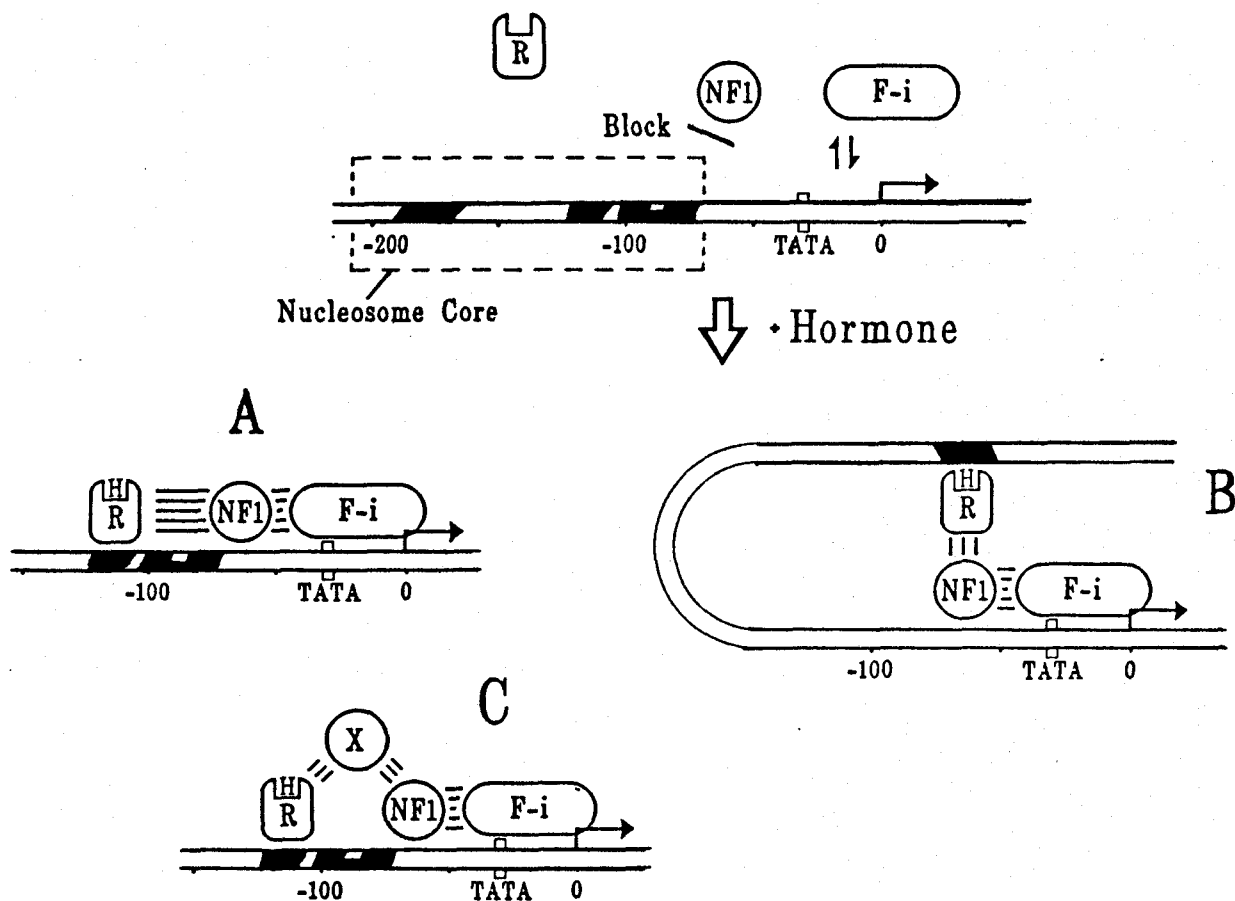


Figure 11- Modèles proposés pour l'activation de la transcription par le récepteur des glucocorticoïdes.

La stimulation hormonale induit la fixation du GR (R) et le déplacement subséquent du nucléosome. Ce déplacement permet au facteur NF1, facteur de transcription ubiquitaire, de former un complexe de transcription actif avec le GR et F-i. F-i est un facteur commun à de nombreux promoteurs et se lie à la "TATA-box".

- A : interaction directe entre le GR et un site promoteur adjacent, comme dans le site LTR du MMTV
 B : interaction à distance entre le GR et un promoteur
 C : formation d'un complexe de transcription par une protéine X

à longue distance ni la coopérativité de deux GRE. Dans les systèmes procaryotes, les interactions protéines-protéines sont indispensables à la génération d'un complexe de transcription efficace. La formation de boucles d'ADN permettrait l'interaction entre deux facteurs protéiques séparés par un grand nombre de nucléotides (Ptashne, 1986). Récemment, la formation de telles boucles d'ADN a été caractérisée en microscopie électronique dans la région 5' non codante d'un gène régulé par la progestérone en présence de PR purifié (Theveny et al., 1987). La nécessité d'un alignement stéréospécifique pour observer une coopérativité entre un GRE et un CACCC-box étaye également l'hypothèse de l'implication des interactions protéines-protéines aboutissant à l'augmentation du taux de transcription (Schüle et al., 1988).

Bien qu'encore parcellaires, les résultats obtenus soulignent deux points essentiels :

- la fixation de facteurs de transcription est conditionnée par la modification de la structure chromatinienne induite par la liaison GR-ADN
- les interactions protéine-protéine jouent un rôle essentiel dans la formation de complexes transcriptionnellement actifs.

C - MODULATION DE L'ACTIVITE DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES

Le mécanisme de l'acquisition de l'activité de liaison à l'ADN ou transformation, a été abondamment étudié dans des préparations acellulaires. Depuis les travaux de Munck et Foley, 1979, et de Markovic et Litwack, 1980, démontrant que la transformation est un processus se déroulant également in vivo, une partie des résultats acquis

in vitro a pu être intégrée à un modèle cellulaire cyclique dans lequel on distingue plusieurs formes du GR, certaines d'entre elles restant mal caractérisées ou purement spéculatives.

On différencie donc :

- le récepteur non transformé non lié à l'hormone, activé (capable de lier l'hormone)
- le récepteur non transformé lié à l'hormone
- le récepteur transformé, hautement affine pour l'ADN
- le récepteur transformé interagissant avec l'ADN
- le récepteur inactivé.

I - Localisation intracellulaire du GR.

Le GR est localisé dans la fraction soluble de l'homogénat cellulaire (cytosol), alors qu'une incubation préalable des tissus avec un glucocorticoïde provoque une accumulation dans le noyau (Middelbrook et al., 1975). Le modèle classique de l'action des hormones stéroïdes est basé sur cette répartition différentielle du GR (voir fig. 12).

Les études immunocytochimiques, permises par la production d'anticorps monoclonaux spécifiques des polypeptides liant les stéroïdes, ainsi que l'étude de l'incorporation de ligands radioactifs dans les cytoplastes obtenus par énucléation à la cytochalasine B, ont remis en question ce modèle. Les PR, ER non liés à l'hormone sont des protéines nucléaires (Perrot-Applanat, 1985, King et Green, 1984, Welshons et al., 1984, Ennis et al., 1986, Gasc et al., 1984). La véritable localisation du GR est plus controversée. Alors que les cytoplastes de cellules hypophysaires GH₃ ne possèdent aucune capacité de liaison des glucocorticoïdes (Welshons et al., 1984), ceux obtenus à partir de

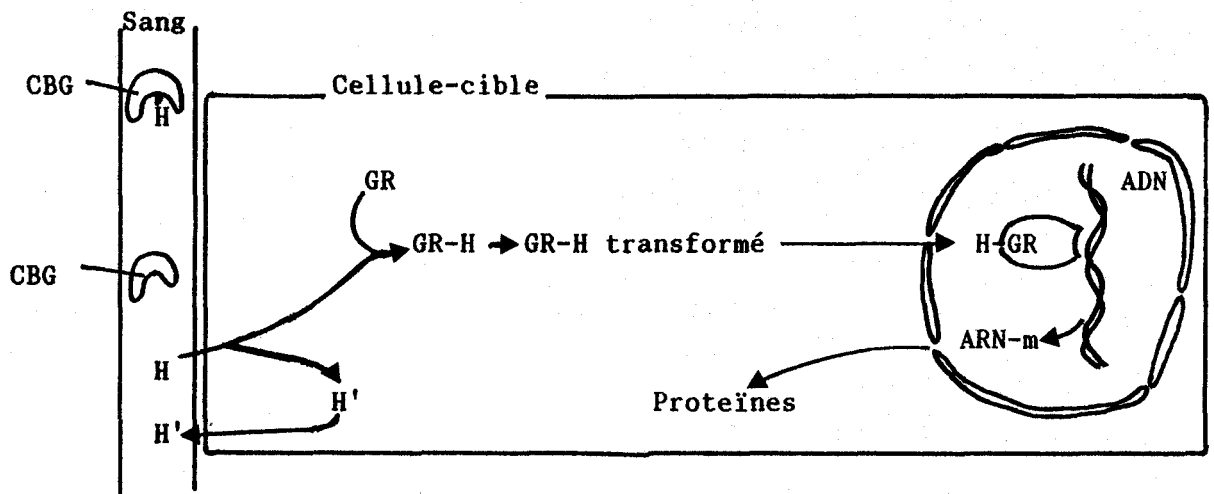


Figure 12- Modèle classique de l'action des glucocorticoïdes.
 CBG: transcortine; H: hormone, H': hormone métabolisée; GR: récepteur des glucocorticoïdes.

Propriétés	Complexes		
	non transformé	transformé	méro-récepteur
Liaison à l'ADN	non	oui	non
Elution de la DNA-cellulose (mM KCl)	200	50	ne se fixe pas
Rayon de Stokes(nm)	8.3	5.0	2.3
Coeff. de sédimentation	9.2	4.8	2.9
Poids moléculaire(KDa)	330	100	27
Poids moléculaire (en PAGE-SDS)	90	90	-

Tableau 2- Caractéristiques des différentes formes du récepteur des glucocorticoïdes de thymocytes de rat. Les cellules sont incubées soit à 4°C durant 2 heures ou à 37°C durant 30 min. avec de l'acétonide de triamcinolone. Les cytosols préparées à partir de ces cellules sont ensuite soumis à diverses analyses (Holbrook et al, 1983).

lymphocytes humains lient spécifiquement les glucocorticoïdes de façon non négligeable (Lukola et al., 1985). De plus aucune étude immunocytochimique n'attribue une localisation uniquement nucléaire au GR (Antalky et Eisen, 1984, Wikström et al., 1987, Picard et Yamamoto, 1987). La déplétion totale du cytoplasme en GR est obtenue après incubation des cellules avec un glucocorticoïde (Govindan, 1980, Papamichail et al., 1980, Wikstrom et al., 1987). L'hormonodépendance de cette translocation est confirmée par les études en immunofluorescence de la localisation du GR et de protéines de fusion GR/ β -galactosidase (Picard et Yamamoto, 1987). De façon surprenante, un antiglucocorticoïde est capable dans ce test de provoquer la migration du GR au noyau, infirmant par cela les études menées par les moyens biochimiques classiques (Rousseau et al., 1973). Le phénomène de translocation ne serait donc pas synonyme de transformation qui requierait donc une étape ultérieure d'acquisition d'une activité transcriptionnelle.

Au regard des techniques utilisées, la détermination précise de la localisation cellulaire des récepteurs des hormones stéroïdes reste encore difficile à affirmer. Les résultats obtenus ne peuvent être utilisés que dans un but comparatif (Gustafsson et al., 1987)

II - La transformation

In vitro, comme dans les cellules intactes, la liaison d'un glucocorticoïde au GR induit le processus de transformation, dépendant du temps et de la température. La modification des paramètres physicochimiques des complexes hormone-récepteur est corrélée à l'acquisition de l'activité de liaison à l'ADN..

a) La transformation in vitro, en milieu acellulaire.

La transformation du GR peut être induite, après liaison de

lymphocytes humains lient spécifiquement les glucocorticoïdes de façon non négligeable (Lukola et al., 1985). De plus aucune étude immunocytochimique n'attribue une localisation uniquement nucléaire au GR (Antalky et Eisen, 1984, Wikström et al., 1987, Picard et Yamamoto, 1987). La déplétion totale du cytoplasme en GR est obtenue après incubation des cellules avec un glucocorticoïde (Govindan, 1980, Papamichail et al., 1980, Wikstrom et al., 1987). L'hormonodépendance de cette translocation est confirmée par les études en immunofluorescence de la localisation du GR et de protéines de fusion GR/ β -galactosidase (Picard et Yamamoto, 1987). De façon surprenante, un antiglucocorticoïde est capable dans ce test de provoquer la migration du GR au noyau, infirmant par cela les études menées par les moyens biochimiques classiques (Rousseau et al., 1973). Le phénomène de translocation ne serait donc pas synonyme de transformation qui requierait donc une étape ultérieure d'acquisition d'une activité transcriptionnelle.

Au regard des techniques utilisées, la détermination précise de la localisation cellulaire des récepteurs des hormones stéroïdes reste encore difficile à affirmer. Les résultats obtenus ne peuvent être utilisés que dans un but comparatif (Gustafsson et al., 1987)

II - La transformation

In vitro, comme dans les cellules intactes, la liaison d'un glucocorticoïde au GR induit le processus de transformation, dépendant du temps et de la température. La modification des paramètres physicochimiques des complexes hormone-récepteur est corrélée à l'acquisition de l'activité de liaison à l'ADN..

a) La transformation in vitro, en milieu acellulaire.

La transformation du GR peut être induite, après liaison de

l'hormone, par diverses méthodes utilisant des agents physiques (élévation de température, force ionique élevée, dilution), des agents chimiques (aminoacides, nucléotides) ou des enzymes (RNAase, phosphatase alcaline) (voir Schmidt et Litwack, 1982).

Quelle que soit la méthode utilisée, les complexes hormone-récepteur (HR) obtenus possèdent des caractéristiques qui les distinguent des complexes non soumis à ces facteurs transformants. Sont observés une forte affinité pour les noyaux isolés, l'ADN et d'autres polyanions (Atger et Milgrom, 1978), une baisse d'affinité pour la DEAE-cellulose (Sakaue et Thompson, 1977) et une hausse du point isoélectrique (Danzé et al., 1987). Une corrélation très nette peut être établie entre l'acquisition de l'affinité pour la DNA-cellulose et une réduction du poids moléculaire apparent, qui passe de 300kDa à 90 kDa (Luttge et al., 1984, Vedeckis, 1983, Sablonnière et al., 1986). En effet, le complexe HR passe d'une forme de rayon de Stokes (R_s) 7-8 nm et d'un coefficient de sédimentation 8-10S, à une forme de R_s 4-6 nm, 4-5S, selon un processus vraisemblablement irréversible.

L'addition de divers oxyanions de métaux de transition (molybdate, tungstate, vanadate) permet d'inhiber réversiblement cette conversion vers la forme transformée et préserve également l'activité de liaison du GR non lié (Dahmer et al., 1984, Leach et al., 1979)..

b) La transformation dans les cellules intactes et in vivo

Les études des complexes préformés dans les cellules intactes confirment le schéma établi in vitro. Munck et Foley, 1979 mettant à profit la rétention accrue des complexes HR non transformés par

la DEAE-cellulose, montrent une conversion progressive mais totale des complexes HR en une forme transformée en moins de 30 minutes, dans des thymocytes de rat incubés en présence d'acétonide de triamcinolone, un agoniste synthétique puissant. Markovic et Litwack, 1980, aboutissent à des conclusions identiques par des expérimentations sur l'animal entier. La caractérisation complète de ces complexes formés in vivo montrent une parfaite similitude avec les valeurs obtenues in vitro (Holbrook et al., 1983, voir Tableau II).

L'étude cinétique de la formation et de l'interconversion des complexes HR souligne l'extrême rapidité des processus, qui se déroulent, à 37°C, avec des durées de l'ordre de la minute. La figure 13A traduit cette caractéristique : à 25°C, le prélèvement maximal du stéroïde par la cellule est atteint en deux minutes (Rao, 1981). La formation des complexes non transformés (HR) est suivi par leur conversion en une forme transformée "cytoplasmique" (HR') et nucléaire (HR'n) après un délai de 30 à 60 secondes. L'étape limitante de ce processus est la transformation, le transfert nucléaire prenant probablement moins de 10 secondes (Munck et Holbrook, 1984b).

La conversion en la forme HR' est conditionnée par différents facteurs. Elle est maximale à 37°C, et totalement inhibée à 4°C (Munck et Holbrook, 1984b). Elle dépend également étroitement du ligand pour lequel une relation entre accumulation nucléaire et activité biologique semble patente (Rousseau et al., 1973, Miyabé et Harrisson, 1982, Munck et Holbrook, 1984b, voir également la partie D).

L'acquisition d'une haute affinité pour le noyau est, comme dans les conditions in vitro, corrélée à une conversion 9S-4S

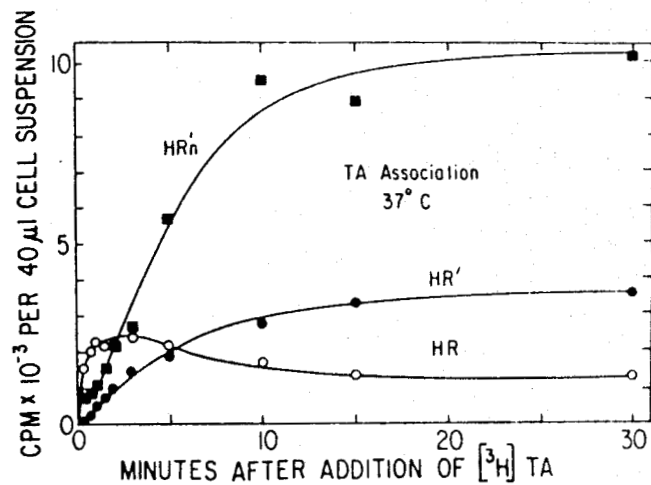


Figure 13 A- Cinétique de formation par l'acétone de triamcinolone (TA) des complexes GR-TA non transformés cytosolubles (HR), transformés cytosoluble (HR'), et transformés liés au noyau (HR'n) dans des thymocytes de rat incubés à 37°C (Munck et Holbrook, 1984b).

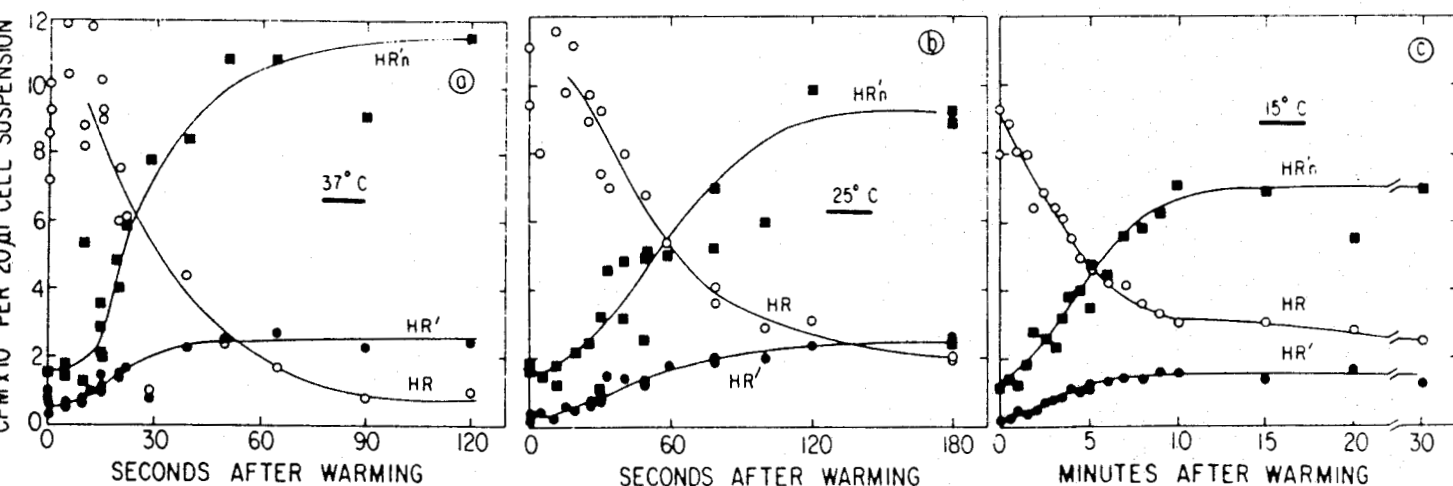
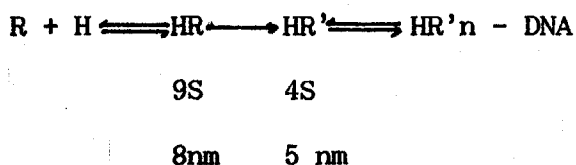


Figure 13 B- Influence de la température sur la cinétique de formation des différents types de complexes GR-TA dans les thymocytes de rat (HR : forme non transformée cytosolique; HR' : forme transformée cytosolique; HR'n : forme transformée nucléaire) (Munck et Holbrook, 1984b)

(Raaka et al., 1985). Un équilibre est ensuite atteint entre la forme transformée libre et celle liant l'ADN (Raaka et Samuels, 1983, Rousseau et al., 1973, Miyabé et Harison, 1982).

Un modèle simple de l'action des glucocorticoïdes (H) sur la génération des complexes HR de formes variées peut être proposé =



Le processus de régénération de la forme non liée du GR (R) n'est pas encore connu. La suppression du stéroïde du milieu d'incubation des cellules provoque une réapparition du récepteur sous sa forme cytosoluble indépendamment de toute synthèse protéique (Rousseau et al., 1973, Miyabé et Harisson, 1982, Raaka et Samuels, 1983), la vitesse de recouvrement de l'activité de liaison initiale étant proportionnelle à la constante de vitesse de dissociation k_a du complexe HR (Munck et Foley, 1976).

Peu d'arguments plaident en faveur d'une réversibilité de la transformation. In vitro, ce processus est généralement considéré comme irréversible, et aucune reconstitution de la forme non transformée n'a pu être obtenue. Seuls Raaka et Samuels, 1983, suggèrent que le récepteur existe à l'état non lié sous les deux formes 8S et 4S, la forme 8S étant nettement majoritaire. L'addition d'un glucocorticoïde influencerait sur cet équilibre (fig. 14b). A l'opposé, le groupe de Munck a développé un modèle cyclique en postulant l'irréversibilité de la transformation. Le recyclage du récepteur serait un processus énergie-dépendant impliquant un passage par une forme déphosphorylée inactivée (fig. 14a) (Munck et Brinck Johnsen, 1968, Munck et Holbrook, 1984b, 1987, Mendel et al., 1987).

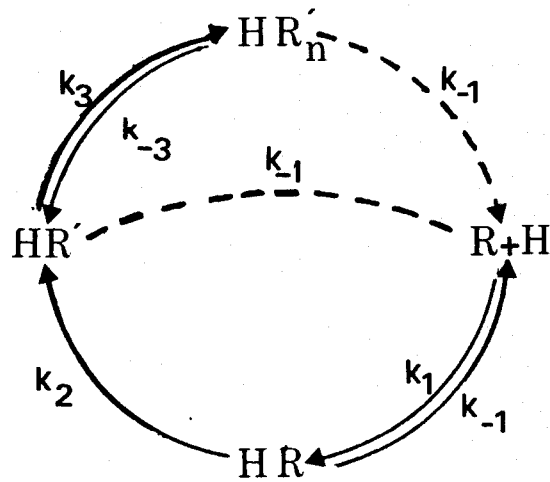


Figure 14 A- Modèle cyclique de Munck et Holbrook, 1984. Cette version simplifiée du modèle cyclique repose sur deux hypothèses: la transformation (conversion $HR \rightarrow HR'$) est irréversible, et la dissociation du stéroïde à partir des différentes formes de GR se fait toujours à une vitesse identique (constante de vitesse de dissociation k_{-1}).

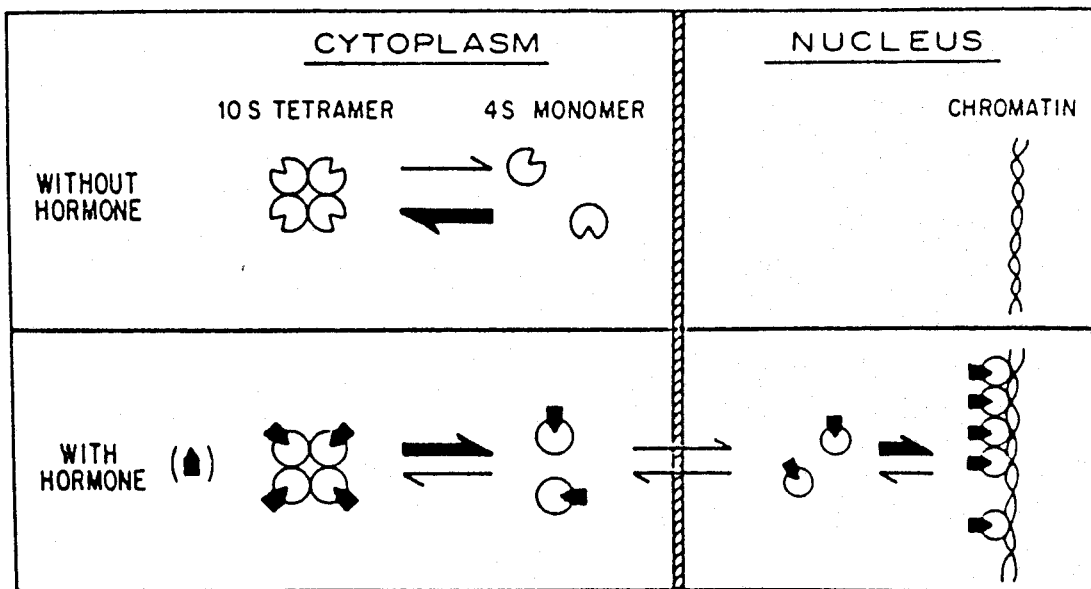


Figure 14 B- Modèle à l'équilibre de Raaka et Samuels, 1983. La présence d'un glucocorticoïde déplace l'équilibre préexistant dans la cellule entre la forme oligomérique 10S non transformée, qui est majoritaire, et la forme transformée 4S.

c) Structure du récepteur non transformé

La purification du rGR non transformé stabilisé par le molybdate a permis d'établir la nature oligomérique de cette forme de haut poids moléculaire (~300 KDa). Analysé en conditions dénaturantes et réductrices sur gel de polyacrylamide, cette phosphoprotéine s'avère posséder un poids moléculaire de 90-94 kDa (Grandics et al., 1984, Idziorek et al., 1985).

L'analyse du mGR purifié a permis de déceler une hétérogénéité de composition. On visualise une protéine liant le stéroïde, de 97 KDa, et une protéine de 90 KDa non liante. Ces deux protéines sont phosphorylées in vivo (Housley et al., 1985, Mendel et al., 1986). Cette hétérogénéité est d'ailleurs retrouvée pour le cPR (Renoir et al., 1986) qui est également associé à cette protéine de 90 KDa.

Ce polypeptide peut être différencié des récepteurs sur des critères immunologiques. Un anticorps monoclonal (AcM) dirigé contre le PR non transformé réagit spécifiquement avec cette protéine 90 KDa (Radyani et al., 1983) et forme des complexes avec les formes natives des ER, AR et GR non transformés de l'oviducte de poulet (Joab et al., 1984).

L'immunoabsorption du GR stabilisé par le molybdate par des AcM anti-récepteur permet la coelution de la 90 KDa, contrairement au récepteur transformé (Sanchez et al., 1985, 1987). Cette protéine apparaît donc clairement être un composant spécifique de la forme non transformée des récepteurs stabilisés par le molybdate.

De façon remarquable, un AcM dirigé contre une protéine cytosolique majeure d'un champignon aquatique, *Achlya ambisexualis*, reconnaît un épitope commun à une protéine de 90 KDa présente chez de

nombreuses espèces d'oiseaux et de mammifères, qui s'est ultérieurement révélée être la 90 KDa associée aux récepteurs des hormones stéroïdes (Riehl et al., 1985, Mendel et al., 1986a, Sanchez et al., 1985).

Cette protéine non liante est une protéine de choc thermique (heat shock protein, hsp) représentant 0.5 à 1.0 % des protéines cytosoliques. Elle est présente à l'état libre sous forme de dimère et possède des propriétés anioniques similaires à celles des récepteurs non transformés (Catelli et al., 1985, Schuh et al., 1985, Sullivan et al., 1985, Renoir et al., 1986).

La fonction précise des protéines de choc thermique n'est pas clairement établie. On distingue 3 groupes par leur taille moléculaire (20-23, 70 et 83-90 KDa) auxquels sont attribuées deux fonctions générales : la protection des cellules contre un stress, et le recouvrement des fonctions perdues lors de ce stress. La hsp 90 semble dépourvue d'activité enzymatique et reste essentiellement cytoplasmique après un choc thermique (Burdon et al., 1986, Pelham, 1986). Son association à diverses protéines kinases (Schuh et al., 1985, Ziemcicki et al., 1986, Dougherty et al., 1987) et avec les filaments d'actine du cytosquelette (Koyasu et al., 1987) est remarquable mais ne permet pas de lui attribuer une fonction précise. Celle-ci doit néanmoins être importante puisque la hsp 90 est conservée entre différentes espèces et présente en forte concentration.

Toutes ces données arguent donc en faveur de la nature hétéro-oligomérique du GR non transformé. La stoechiométrie des différents composants n'est pas définitivement établie. Ce complexe ne contient qu'un seul polypeptide liant le stéroïde (Gehring and Arndt, 1985, Okret et al., 1985), et donc au moins une hsp 90. Il est cependant tentant de proposer

que le complexe 9S soit constitué de 2 hsp 90 et d'une sous-unité liante donnant un poids moléculaire apparent de 280 KDa, tout à fait compatible avec les données hydrodynamiques et la nature dimérique de la hsp libre (Denis et al., 1987).

Aucune démonstration concluante n'a cependant été apportée en faveur d'une telle composition. Il n'est pas exclu que d'autres facteurs puissent faire partie du complexe. En effet, une protéine de 59 KDa, distincte de la hsp 90, est associée spécifiquement aux ER, PR, AR et GR de l'oviducte de lapin et présente dans nombre d'espèces (Tai et al., 1986). L'association probable avec un ARN de faible taille (~ 30 KDa) a été mise en évidence au laboratoire (Sablonnière et al., 1988a,b) et par d'autres (Economidis et Rousseau, 1985).

d) Dissociation du complexe hétérooligomérique lors de la transformation

S'appuyant sur les paramètres physicochimiques des deux formes du GR, Vedeckis, 1983, a suggéré que la transformation pouvait consister en une dissociation de l'oligomère. L'association sélective de la hsp 90 à la forme non transformée du GR stabilisée par le molybdate étaye fortement l'hypothèse d'une nette implication du phénomène de dissociation lors de la transformation in vitro (Mendel et al., 1986a, Sanchez et al., 1985).

e) Importance de la phosphorylation et de l'état d'oxydation du récepteur

L'inhibition de la transformation in vitro, par le molybdate connu pour son effet inhibiteur des phosphatases, ainsi que l'effet activateur de ces dernières sur la transformation ont longtemps fait

penser qu'un processus de déphosphorylation pouvait être impliqué dans la conversion vers la forme liant l'ADN (Schmidt et Litwack, 1982). Il est désormais établi, in vitro comme in vivo (Mendel et al., 1987, Tienrungroj et al., 1987a) que le taux de phosphorylation au cours de la transformation du polypeptide liant le stéroïde reste constant, avec un rapport de 2 à 3 résidus phosphate par site de liaison du stéroïde.

D'autres fonctions semblent néanmoins en relation avec un processus impliquant une phosphorylation, soit du récepteur, soit d'autres facteurs :

Le maintien de la capacité cellulaire à lier les glucocorticoïdes est directement dépendant du taux d'ATP intracellulaire (Munck et Brinck-Johnsen, 1968, Wheeler et al., 1981). D'autre part, la modulation de l'activité de la protéine-kinase C est corrélée à la capacité des glucocorticoïdes à induire une réponse biologique. L'inhibition de cet enzyme inhibe l'accumulation des complexes HR dans le noyau des cellules cibles (Kido et al., 1987a,b).

L'effet de l'oxydation des résidus thiols (SH) du GR est beaucoup plus documenté. Des groupements SH distincts ont un rôle prédominant dans les fonctions de liaison du stéroïde à l'ADN. La cystéine 656 du rGR (voir fig.5) est la cystéine du site de liaison aux glucocorticoïdes spécifiquement marqué par le mésylate de dexaméthasone (Simons et al., 1987b), elle est située dans un environnement hydrophobe (Formstecher et al., 1984). L'existence de groupements thiols réduits est également indispensable à la conversion 8S-4S (Tienrungroj et al., 1987b, Blicq et al., 1988).

f) Inhibition de la transformation par le molybdate

Si l'action du molybdate reste controversée in vivo (Raaka et al., 1985, Naray et al., 1983), elle ne semble pas due, in vitro, à son activité inhibitrice des phosphatases puisqu'il agit sur celles-ci à des doses inférieures à celles utilisées pour stabiliser le GR. De plus, ce composé est tout aussi efficace sur le récepteur purifié et sur l'induction de la transformation par des facteurs physiques. La dissociation du complexe GR/hsp 90 est inhibée par ce composé (voir ci-dessus).

Le molybdate est réputé pour établir des complexes entre des groupements SH proches, et pourrait ainsi maintenir la cohésion du GR oligomérique. Un facteur endogène de faible poids moléculaire, possédant toutes les caractéristiques du molybdate, inhibe la transformation. Ce dernier pourrait interagir avec le site de liaison de ce composé endogène, et présenterait une affinité comparable à celui-ci (Pratt, 1987). D'autre part, Bodine et Litwack, 1988, ont récemment purifié et caractérisé un glyco phospholipide dont les propriétés inhibitrices de la transformation sont également analogues à celles du molybdate.

Conclusion à propos du GR :

La figure 15 représente le mécanisme d'action global du GR où sont intégrées les données essentielles de ces deux chapitres.

III - MODULATION DES REPONSES BIOLOGIQUES INDUITES PAR LES GLUCOCORTICOIDES

La régulation de la sensibilité cellulaire aux glucocorticoïdes peut porter sur les trois facteurs responsables de la cascade d'événements

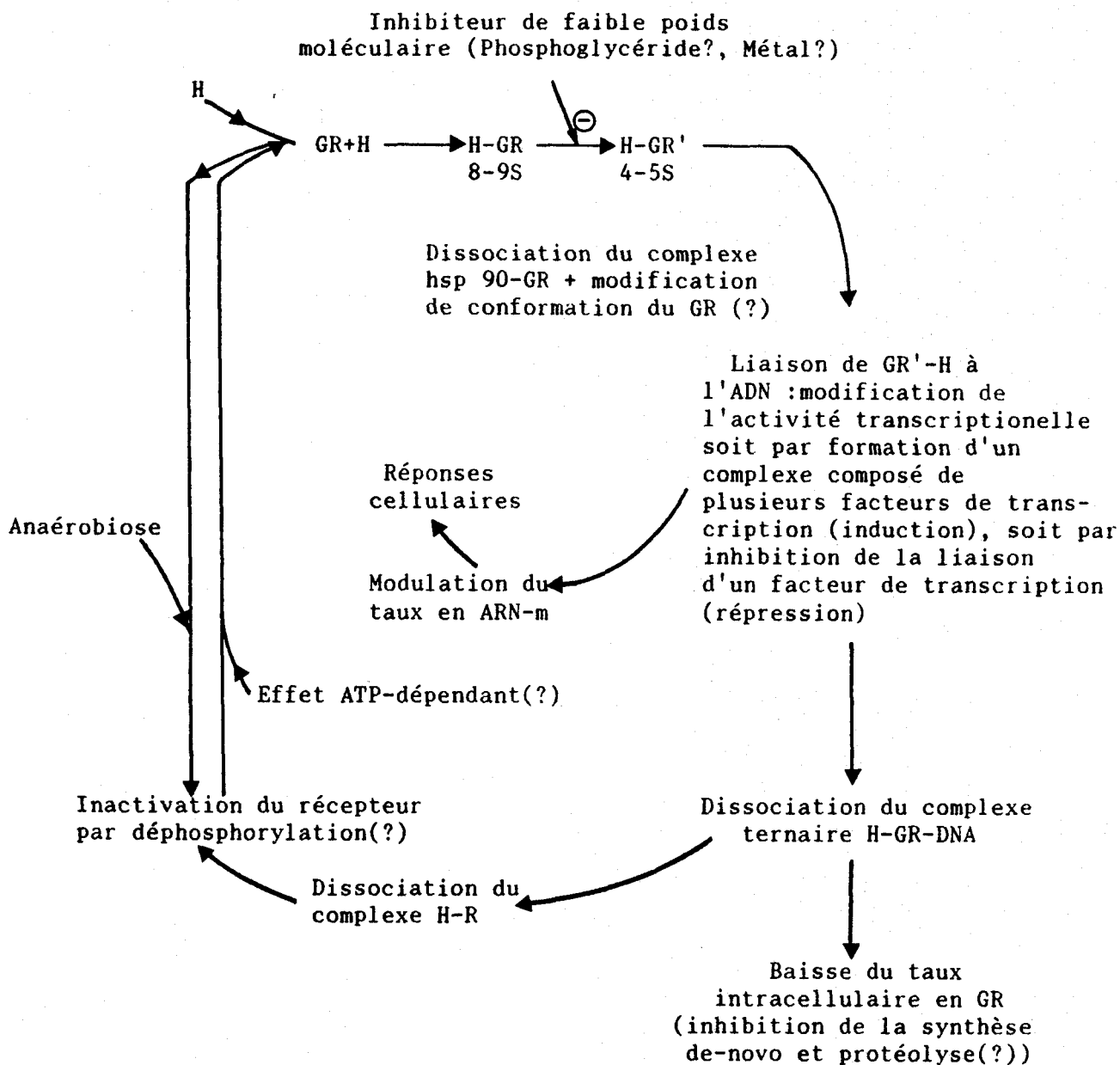


Figure 15- Représentation du cycle cellulaire du GR. Cette figure schématise les étapes connues ou très probables (?) de modification du GR dans une cellule soumise à un stimulus hormonal.

aboutissant à l'expression d'une réponse par la cellule-cible, i.e. l'ADN, le récepteur ou le ligand. L'altération de la structure chromatinienne au cours du cycle cellulaire ou de la différenciation peut expliquer l'apparition ou la perte de la sensibilité aux glucocorticoïdes, à un taux en GR constant (Rousseau, 1984, Gustafsson, 1987). L'apparition d'une insensibilité aux glucocorticoïdes a été décrite comme étant le résultat de l'inactivation des gènes contrôlés par les hormones par un mécanisme épigénétique, qui serait très probablement une méthylation des séquences gouvernant l'expression du gène (Gasson et al., 1983, Darbre et al., 1987). Néanmoins, l'implication du facteur "ADN" dans le processus de modification de la sensibilité aux glucocorticoïdes, semble d'après les données de la littérature, relativement marginale au regard de l'importance constatée pour les facteurs récepteur et ligand.

a) Régulation par le récepteur

Le nombre, l'affinité des GR pour les glucocorticoïdes et l'ADN modifient la sensibilité hormonale des cellules.

Les modifications d'affinité résultent de l'apparition de mutations altérant la transcription du gène du GR ou/et la fonction des domaines de liaison, ou rendant la protéine plus labile. Ces cas de figure ont été démontrés pour des variants de cellules de lymphomes de souris résistant aux effets cytolytiques des glucocorticoïdes (Dellweg et al., 1982, Danielsen et al., 1986, Northrop et al., 1986, Rabindran et al., 1987).

D'autre part, le taux en GR peut lui-même être un facteur régulateur. En fusionnant deux lignées cellulaires lymphoïdes ayant des concentrations en GR différentes, Bourgeois et Newby, 1977, ont pu démontrer

une corrélation entre nombre de récepteurs et intensité maximale de la réponse biologique. Grove et al., 1980, Rabindran et al., 1987, Vanderbilt et al., 1987 aboutissent à une conclusion similaire en utilisant d'autres artifices techniques pour obtenir des sous-clones à concentration en GR variable. Cependant, la définition d'un seuil en-deça duquel une insensibilité aux glucocorticoïdes apparaît dépend étroitement de la réponse biologique choisie, une réponse biologique maximale peut être observée avec un taux réduit en récepteur, alors qu'une autre ne sera plus obtenue (Mercier et al., 1983, Rabindran et al., 1987). Une accessibilité ou une affinité différente des GR pour l'ADN pourrait expliquer ces constatations.

Différents facteurs peuvent modifier le taux cellulaire en GR. Comme nous l'avons déjà vu, les altérations du métabolisme énergétique cellulaire influencent la concentration en GR. L'âge des cultures cellulaires (nombre de repiquages) influe également, un fort taux de passage peut faire chuter le nombre de GR de 70 %. Enfin, la concentration en GR est modifiée au cours des phases du cycle cellulaire, variant d'un facteur 2 à 3 (voir Svec, 1985 pour références).

Le facteur le plus étudié reste l'influence du ligand sur la concentration cellulaire en GR. En effet, les nombreux résultats obtenus sur des lignées cellulaires montrent clairement que les glucocorticoïdes exercent une régulation négative sur le taux en GR. Une concentration saturante provoque une chute en GR de 50 à 75 % dans des cellules pituitaires de souris, sans altérer leurs caractéristiques physicochimiques (Svec et Rudis, 1981, Seigler et Svec, 1984a,b). Ni les hormones sans affinité pour le GR, ni les antagonistes des glucocorticoïdes sont capables d'un tel effet (Svec et Rudis, 1981, Rapjert et al., 1986). Cette régulation

négative exercée par le ligand pourrait résulter, soit d'une dégradation intensive du récepteur, soit d'une inhibition de la synthèse de novø ou encore d'une distribution cellulaire modifiée. Si aucune preuve expérimentale n'étaye la troisième hypothèse, les deux autres sont confirmées. La baisse du temps de demi-vie du récepteur est notable en présence d'un agoniste puissant, puisqu'elle passe de 20 heures à 10 heures (Mac Intyre et Samuels, 1985). D'autre part, le traitement de cellules d'hépatome de rat par la dexaméthasone provoque une baisse du taux de l'ARN-m codant pour le récepteur de 50 à 80 % en 24 heures (Okret et al., 1986). Un phénomène similaire mais moins accentué est observé chez l'animal intact, avec une baisse de l'ARN-m de 40 à 60 % (Kalinyak et al., 1987). Cet effet est observé in vitro en présence d'inhibiteurs de synthèse protéique et résulte donc d'une inhibition de la transcription du gène du GR par lui-même (Rosewic et al., 1988).

b) Régulation par le ligand

1- Relation taux d'occupation du récepteur-amplitude de la réponse biologique.

La corrélation entre la liaison d'un ligand et l'induction de la réponse biologique subséquente est un des critères majeurs d'identification d'un récepteur. Diverses études ont parfaitement démontré que, sur cellules en culture ou in vivo, le degré d'occupation du récepteur était directement lié à l'induction d'une réponse enzymatique (Beato et al., 1972) et que la relation pouvait s'étendre au taux de transformation induit par le ligand (Bloom et al., 1980, Mercier et al., 1983, Miyabé et Harrison, 1983). Mercier et al., 1983 constatent néanmoins que, dans le cas particulier de sous-clones de cellules HTC, cette corrélation taux de

saturation-intensité de la réponse est perdue pour un type de réponse. La modification de l'accessibilité du GR aux séquences régulatrices du gène est une explication très probable à ce phénomène.

Le taux d'occupation du récepteur est également affecté par la structure chimique du ligand. La nature des substituants présents sur le noyau 4-pregnène influe sur l'affinité du stéroïde pour le GR, mais aussi sur l'activité biologique. En effet, une classe particulière de stéroïdes est capable d'occuper le site de liaison sans provoquer de réponse.

2- Classification des stéroïdes

Les stéroïdes sont classés selon l'effet produit sur le niveau d'expression d'un enzyme hépatique, la Tyrosine Amino Transférase (TAT). Quatre classes de composés sont ainsi distinguées (Samuels et Tomkins, 1970, voir fig. 16) :

- les agonistes optimaux, capables d'induire la TAT à un taux maximum (x 10 à 15)
- les agonistes partiels, induisant la TAT à un niveau infra maximal, mais significatif, et capables d'inhiber compétitivement l'induction médiée par les agonistes optimaux.
- les antagonistes, incapables d'induire une réponse par eux-mêmes mais inhibant l'induction de la TAT par les composés des deux classes précédentes.
- les stéroïdes inactifs (dont l'inactivité n'est pas due à une modification métabolique).

La classification en regard de l'activité glucocorticoïde des différents stéroïdes peut varier en fonction des systèmes biologiques choisis.

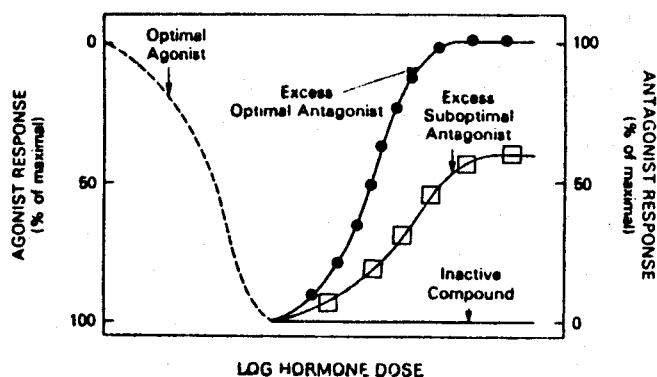
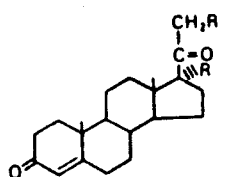
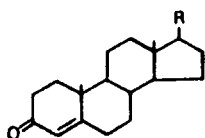


Figure 16- Courbe théorique dose-réponse pour les différentes classes de ligands du GR (agoniste optimal ---, agoniste partiel □-□, antagoniste ●-●, composé inactif —). L'administration d'une dose fixe d'un agoniste optimal et l'accroissement de la dose administrée simultanément provoque un retour au niveau basal, alors qu'un agoniste partiel n'a qu'un effet intermédiaire.

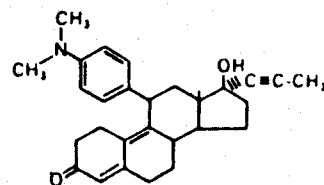
1. Stéroïdes modifiés en 11 :



4-Prègnène
(R = H ou OH)

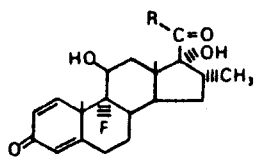


4-Androstène
(R = O ou OH)

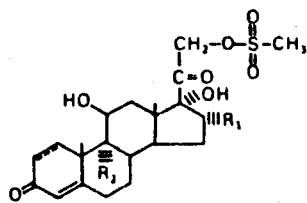


11-nor-11-β(p-dimethyl
amino)-phényl-17α
éthynylmethyl-androsta
4,9(10)-diène-17β-ol-
3-one = RU 38486

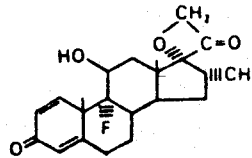
2. Analogues du cortisol modifiés en 17-β :



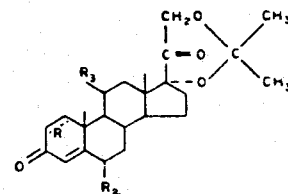
17-β carboxamides
de la dexaméthasone
(R = NH-X)



Mésylate de Déxa-
méthasone ou de cortisol
(R1 = CH3 ou H, R2 = F ou H)



Déxaméthasone-
oxétanone



Dérivés
17-21 acétonide

Figure 17- Structure chimique des deux classes de composés stéroïdiens connus pour leur activité antiglucocorticoïde in-vitro.

3- Facteurs affectant l'affinité et l'activité du ligand.

L'association du stéroïde au GR est un processus à deux étapes : la fixation est d'abord gouvernée par l'hydrophobicité du stéroïde, puis par la mise en place des forces à faible rayon d'action où la nature des substituants donneurs ou accepteurs de proton joue un rôle prépondérant (Eliard et Rousseau, 1984). Aux concentrations voisines de la saturation, le processus d'association est une interaction bimoléculaire simple (Pratt *et al.*, 1975). La dissociation du complexe HR est un processus du premier ordre, les différences d'affinité sont d'ailleurs essentiellement justifiées par une cinétique de dissociation variable selon les composés (Jones et Bell, 1982). A l'équilibre, la constante de dissociation (K_D) est de l'ordre de la nanomole par litre pour les stéroïdes les plus affines (Bell et Jones, 1982). Les études de relation entre la structure et activité (RSA) des stéroïdes ont permis de définir les domaines essentiels à ces molécules leur conférant une bonne affinité pour le GR et une activité biologique précise. Ayant nécessité un travail considérable de synthèse chimique, de cristallographie et d'évaluation de l'activité (revue par Duax et Griffin, 1984), ces études de R.S.A. font ressortir plusieurs faits :

- la conformation spatiale globale du stéroïde influe sur l'affinité. La présence d'un atome de fluor en 9α provoque une torsion de la molécule vers sa face α . Les dérivés 9α -fluorés tels la dexaméthasone ou l'acétonide de triamcinolone sont les agonistes les plus puissants, couramment utilisés en thérapeutique.

- la présence de la double liaison en 4-5 est indispensable à la liaison au GR. L'introduction d'une liaison en 1-2 augmente l'affinité.

- la suppression du groupement hydroxyl en 11 β du cycle C diminue l'affinité et convertit un agoniste en un antagoniste, de même que la modification de la chaîne latérale 17 β (voir paragraphe D.I)

D - LES ANTIGLUCOCORTICOIDES

La mise au point d'antihormones stéroïdiennes a d'énormes applications thérapeutiques, notamment dans le traitement des tumeurs hormono-dépendantes dans lequel les antioestrogènes occupent une place privilégiée. Les antiminéralocorticoïdes s'utilisent dans le traitement des hypertensions, et les antiandrogènes dans les cancers de la prostate. La description récente du RU 38486 a étendu le champ d'application des antihormones stéroïdiennes à la contraception (effet antiprogestatif) et au traitement de l'hypercorticisme (effet antiglucocorticoïde). Le mode d'action de ces différents composés a été abondamment exploré, mais aucun schéma simple n'émerge des travaux et cela pour deux raisons essentielles :

- la similitude structurale entre agonistes et antagonistes ne permet que très rarement d'obtenir un composé antagoniste pur. Ils possèdent donc une activité biologique variable selon la dose (Bullock *et al.*, 1978, Sutherland *et al.*, 1986, Chrousos *et al.*, 1983), l'organe et même l'espèce étudiée, notamment dans le cas des antioestrogènes (Jordan, 1985).

C'est ainsi qu'à été proposée pour chaque type d'antihormones, une interférence avec la plupart des étapes connues du mécanisme d'action des hormones stéroïdes :

- l'inhibition du transfert nucléaire pour la cortéxolone

(un antiglucocorticoïde) (Coutard et al., 1979, Kaiser et al., 1972).

- une rétention accrue dans le compartiment nucléaire des complexes antioestrogènes-ER, due à une fixation sur des sites particuliers et/ou une inhibition de recyclage du récepteur (Katzenellenbogen et al., 1983, Jordan, 1985).

- l'affinité supérieure des antiglucocorticoïdes pour une forme particulière de GR, inactive, selon un modèle allostérique similaire à celui décrit par Monod, Wyman et Changeux (Samuels et Tomkins, 1970).

Dans le domaine des antiglucocorticoïdes, la plupart des composés actifs in vitro ne le sont pas chez l'animal intact, car ils sont très souvent inactivés ou convertis en un composé agoniste par une voie métabolique surrénalienne ou hépatique. L'obtention de deux composés actifs in vivo, le Δ 1-11-oxo-11-deoxycortisol, de synthèse très délicate, et le RU 38486 témoigne de la possibilité de la conception d'un antiglucocorticoïde à haute affinité et spécifique du GR. Nous ne détaillerons pas l'aspect pharmacologique de l'action de ces composés, pour privilégier l'étude de l'interaction antiglucocorticoïdes-GR.

En effet, l'intérêt de ces molécules est aussi de procurer des sondes moléculaires qui constituent des outils remarquables pour l'étude des séquences de l'action des glucocorticoïdes. Néanmoins, cette étude s'est révélée problématique car une des caractéristiques majeure des complexes antiglucocorticoïdes-GR est d'être très instables, gênant considérablement leur analyse par les méthodes classiques.

I - Description de l'activité antiglucocorticoïde de divers dérivés stéroïdiens.

Les antiglucocorticoïdes peuvent être scindés en deux groupes structurellement distincts :

- les dérivés à noyau 4-pregnène ou 4-androstène modifiés en 11β . La suppression du groupement hydroxyl en 11β du cycle C diminue l'affinité et convertit un agoniste en un antagoniste. La présence d'un volumineux groupement en C11, ou plus généralement dans la zone délimitée par les atomes C₁-C₉-C₁₀-C₁₁ est commune à toutes les antihormones stéroïdiennes actives *in vivo* (Baulieu, 1984).

- les dérivés du cortisol ou de la dexaméthasone modifiés sur la chaîne latérale 17β . La modification de la chaîne latérale 17β d'un agoniste puissant diminue son affinité pour le GR et convertit son activité agoniste en une activité antiglucocorticoïde (Rousseau *et al.*, 1979, 1983, Simons *et al.*, 1980, Lamontagne *et al.*, 1984) (voir fig. 17).

Le tableau III résume les principales propriétés des stéroïdes doués d'activité glucocorticoïde et antiglucocorticoïde. Y figurent le temps de demi-vie du complexe HR rendant compte de la stabilité du complexe, l'affinité (K_D) pour le GR mesurée dans des préparations acellulaires et leur classification dans les principaux systèmes étudiés. L'activité sur l'animal intact est également indiquée lorsque les tests ont été effectués (revue par Chrousos *et al.*, 1983).

Composé	t _{1/2} (min)	KD _{4C} (nM)	Test in vitro Modèle	Activité	Classifi- cation	Activité in vivo (rats surrenalectomisés)	Références
AGONISTES							
Acétonide de Triamcinolone	>1800	1,6	HTC	T.A.T.	Ag	Ag	
Dexaméthasone	900-1100	4,0	HTC	T.A.T.	Ag	Ag	Samuels et Tomkins, 1972
Corticostérone	150	12,0	HTC	T.A.T.	Ag	Ag	" "
			Thymocytes (rat)	Urd	Ag	Ag	Philibert, 1984
Cortisol	70-100	60,0	HTC	T.A.T.	Ag	Ag	Samuels et Tomkins, 1972
Deacylcortivazol	>3000	0,6	HTC	T.A.T.	Ag	Ag	Simons <i>et al.</i> , 1979
ANTAGONISTES							
11-Deoxycortisol (cortexolone)	-	300,0	HTC	T.A.T.	Ap	Ag	Samuels et Tomkins, 1972
	-	150,0	Thymocytes (rat)	Glc	An	-	Munck et Brinck Johnsen, 1988
			Thymocytes (rat)	Urd	Ap	-	Turnell <i>et al.</i> , 1974 Kaiser <i>et al.</i> , 1972
			Thymocytes (souris)	Urd	An	-	Philibert <i>et al.</i> , 1984
Δ ¹ -9(11)-11- deoxycortisol	-	300,0	-	-	-	Ap	Chrousos <i>et al.</i> , 1980
Δ ¹ -11 oxa-11- deoxycortisol	-	90,0	-	-	-	An	Chrousos <i>et al.</i> , 1982
Deoxycorticostérone	-	200,0	HTC	T.A.T.	Ap	-	Samuels et Tomkins, 1972
Progesterone	50-70	64,0	HTC	T.A.T.	An	-	Raynaud <i>et al.</i> , 1980 Gagne <i>et al.</i> , 1986
	-	110,0	Thymocytes	Urd, Glc	An	-	Kaiser <i>et al.</i> , 1974
			L-929	D, Gln	Ap	-	Hackney <i>et al.</i> , 1981
Promegestone (R 5020)	-	40,0	HTC	T.A.T.	An	-	Raynaud <i>et al.</i> , 1980
Testostérone	40-60	1000,0	Thymocytes (rat)	Glc, Urd Cytolyse	An	-	Sasson et Mayer, 1981
			HTC	T.A.T.	An	-	Danhaive et Rousseau, 1986
RU 38486	-	6,0	HTC	T.A.T.	An	An	Golaz et Beck, 1984 Gagne <i>et al.</i> , 1986
	6000	14,0	Thymocytes (rat)	Urd	An	-	Philibert, 1984
			L-929	D	An	-	Jung-Testas <i>et al.</i> , 1984
17β-carboxamides de la dexaméthasone	85-600	100,0-600,0	HTC	T.A.T.	An	Ag ou In	Rousseau <i>et al.</i> , 1979 et résultats non publiés
			Thymocytes (souris)	Urd	An	-	Duval <i>et al.</i> , 1983
Cortisol-21-mesylate		covalent	HTC	T.A.T.	An	Ap	Simons <i>et al.</i> , 1980
Dexaméthasone-21- mesylate		covalent	HTC	T.A.T.	An	-	Simons et Thompson, 1981
Dexaméthasone-3'-oxétanone	27	32,0	HTC	T.A.T.	An	In	Lamontagne <i>et al.</i> , 1984
Dérivés 17-21 acétonides :							
17-21-acétonide de cortexolone	-	70,0	IM-9 HTC	5' nuc } T.A.T. }	An	An	Rousseau <i>et al.</i> , 1983
de 6-OH-cortexolone	-	135,0	IM-9 HTC	5' nuc } T.A.T. }	An	An	
Trifluoperazine	-	6000,0	HTC	T.A.T.	An	-	Van Bohemen et Rousseau, 1983
Ketoconazole	-	2000,0	HTC	T.A.T.	An	-	Loose <i>et al.</i> , 1983
Clotrimazole	-	650,0	HTC	T.A.T.	An	-	" "

TABLEAU 3 - Les principaux ligands du GR sont classés selon leur activité biologique. Les antagonistes sont subdivisés en 3 classes structurales : les 11-β modifiés, les 17-β modifiés et les antigluco-corticoides non stéroïdiens.

IM-9 : cellules lymphoblastiques humaines - HTC : cellules d'hépatome de rat en culture - L-929 : fibroblastes de souris en culture - D : croissance de la population cellulaire, T.A.T. : Tyrosine Amino Transférase, Glc : inhibition de captation de glucose, Urd : inhibition de l'incorporation d'uridine tritiée dans le RNA, Gln : induction de la glutamine-synthétase
5'-nuc : induction de l'enzyme membranaire 5' nucléotidase. Ag : agonistes purs - Ap : agonistes partiels - An : antagonistes.

II - Particularités de comportement des complexes antigluco-corticoïdes-GR.

a) Différence de comportement cinétique

Il n'existe pas de corrélation entre l'affinité des antigluco-corticoïdes pour le GR dans des préparations acellulaires à 4°C et leur activité in vivo à 37°C (Bell et Jones, 1979). Par contre, des différences peuvent être détectées dans la cinétique de liaison et la capacité à protéger le GR de l'inactivation thermique (Eliard et Rousseau, 1984).

Il semble en effet que pour la plupart des dérivés testés, il existe une décroissance progressive de la stabilité des complexes non transformés quand on passe des dérivés agonistes aux dérivés antagonistes (Degaelen et al., 1981, Bell et Jones, 1982, Raynaud et al., 1975, 1980a) ce qui peut expliquer l'incapacité de tels complexes à générer une activité biologique. Cependant, la corrélation n'est pas nette, n'en ayant pour preuve que la valeur identique de la constante de vitesse de dissociation du cortisol et de la progestérone (Bell et Jones, 1982). De plus, cette hypothèse d'une relation entre instabilité du complexe et propriétés antagonistes est totalement infirmée par le fait que le RU 486 forme un complexe plus stable que la plupart des agonistes, et que le mésylate de cortisol et de dexaméthasone sont des marqueurs covalents doués d'activité antagoniste (Philibert, 1984, Simons et al., 1981).

Beaucoup plus nette est la différence de labilité des deux types de complexes à la chaleur. En effet, les complexes agoniste-récepteur soumis à une élévation de température sont beaucoup moins rapidement inactivés que les complexes antagonistes-récepteurs ou les récepteurs non liés (Toth et Aranyi, 1983, Eliard et Rousseau, 1984, Bell et Weatherhill,

1986). De la même façon, les complexes agonistes-GR soumis à des conditions transformantes acquièrent une stabilité beaucoup plus importante, alors que les complexes antagonistes-GR ne subissent aucune modification (Toth et Aranyi, 1983, Bell et Weatherhill, 1986, Rousseau et al., 1972). Ces faits étayent fortement l'hypothèse que l'interaction des antigluco-corticoïdes avec le site de liaison du stéroïde est différente. Ceci est d'ailleurs confirmé par la sensibilité accrue du complexe RU 486-GR à l'acétonitrile (solvant interagissant avec les zones hydrophobes des protéines) quand il est comparé au complexe acétonide de triamcinolone-GR (Danzé et al., en préparation).

b) Etude des caractéristiques physicochimiques des complexes antagonistes-GR.

Très peu de travaux ont été consacrés à la caractérisation de ces complexes très instables. Seuls Kaiser et al., 1972, 1974 signalent l'existence d'un complexe GR-cortexolone à coefficient de sédimentation anormalement faible (3,5S contre 4,4S). La disponibilité récente du mésylate de dexaméthasone et du RU 486 sous forme tritiée a considérablement facilité les expérimentations visant à mettre en évidence les particularités des complexes formés avec ces deux antagonistes très affines pour le GR.

L'étude des paramètres physicochimique des complexes RU 486-GR a été réalisée extensivement dans notre laboratoire. Aucune différence n'a pu être notée par rapport aux complexes GR-agoniste (Sablonnière et al., 1986). Concernant les critères de liaison à l'ADN, les résultats sont plus contradictoires. Alors que pour la plupart des auteurs aucune différence majeure d'affinité ou de sensibilité à la force ionique n'est observée lors

de la liaison des complexes à la DNA-cellulose (Sablonnière et al., 1986, Schmidt, 1986, Rapjert et al. 1986), Bourgeois et al., 1984 rapportent que les complexes RU 486-GR sont nettement moins affines pour la DNA-cellulose et des fragments de DNA du LTR de MMTV, et que l'interaction GR-RU486/DNA-cellulose est beaucoup plus sensible à l'augmentation de la force ionique. Des différences similaires ont été décrites, vis-à-vis d'un ADN non spécifique, pour les complexes mésylate de dexaméthasone-GR (Simons et Miller, 1984), alors que ceux-ci ont une affinité similaire pour les séquences LTR du MMTV (Miller et al., 1984).

Beaucoup plus nette est la constatation d'un taux de transformation des complexes RU 486-GR nettement réduit (Sablonnière et al., 1986, Moguilewski et Philibert, 1984, Bourgeois et al., 1984, Groyer et al., 1987) ainsi qu'une diminution variable mais significative du "transfert nucléaire" des complexes formés dans les cellules intactes (Moguilewski et Philibert, 1984, Chasserot-Golaz et Beck, 1984, Jung-Testas et Baulieu, 1984, Bourgeois et al., 1984). Les variations du taux de transfert vont de 3 % à 50 %, et apparaissent difficiles à rationaliser car la mesure du transfert nucléaire implique la séparation des fractions cytosolique et nucléaire d'une façon arbitraire dans des conditions expérimentales variables, où la nature du tissu, le pH, la force ionique ... peuvent avoir un rôle non négligeable. Un taux de transfert nucléaire très faible est une observation souvent rapportée dans le cas des antiglucocorticoïdes, et vérifiée pour le mésylate de dexaméthasone (Simons et al., 1983), la progestérone (Rousseau et al., 1973, Golaz et Beck, 1984), la promegestone (R 5020) (Golaz et Beck, 1983), et la cortexolone (Kaiser et al., 1972, Turnell et al., 1974, Wira et Munck,

1974).

Néanmoins, l'accord n'est pas fait sur la capacité du faible nombre de complexes GR-antiglucocorticoïde nucléaire à induire ou non une réponse biologique.

Au vu de ces résultats, quatre hypothèses restent envisageables pour expliquer le mécanisme d'action des antiglucocorticoïdes :

- ces composés inhibent la transformation
- les complexes GR-antihormone génèrent un récepteur transformé à haute affinité pour des séquences non spécifiques d'ADN.
- de même, leur affinité pour les HRE peut être altérée
- leur affinité est identique mais les événements suivant la liaison au HRE ne sont pas promus de façon adéquate.

c) Modèles proposés pour expliquer l'activité des antiglucocorticoïdes

c.1 - Le premier modèle fut proposé par Samuels et Tomkins, 1972. Il s'inspire du modèle allostérique de Monod et al., 1965 modifié par Rubin et Changeux, 1966 et a été appliqué aux antagonistes des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes. Deux formes de GR sont supposées être en équilibre, l'une capable de générer un effet biologique, l'autre pas. En l'absence de stéroïde, la forme inactive prédominerait. Les antagonistes purs stabiliseraient la forme inactive, les agonistes partiels la forme active et la forme inactive, et les agonistes purs la forme active. La forme active du récepteur se lie à l'agoniste, le complexe étant ensuite transformé (Rousseau et al., 1973). Sans avoir à supposer l'existence de forme non caractérisée du GR, les formes inactive et active peuvent être assimilées respectivement à la forme non transformée

et transformée du récepteur. Cependant, nous avons vu que la forme non transformée existe également en présence d'agoniste. Notons également le modèle mathématique de Bullock et al., 1978 qui prend en compte à la fois les interactions stériques (compétition entre deux stéroïdes) et allostériques. Ce modèle s'inspire largement du modèle précédent.

c.2 - Pratt et al., 1975 proposent un modèle à ajustement induit. Il diffère essentiellement du précédent par l'inexistence de la forme active en l'absence d'hormone. Dans ce modèle, les antagonistes se lieraient exclusivement à la forme inactive, pouvant être également assimilée à la forme non transformée. Ce modèle convient très bien si l'hypothèse d'un mécanisme d'action par inhibition de la transformation est retenue.

c.3 - Le modèle "à site d'entrée" de Bell et Jones, 1979 décrit le GR comme possédant deux sites de liaison, un site d'entrée à faible affinité et un à haute affinité. Tous les ligands du GR sont capables d'interagir avec le premier site à faible affinité. L'affinité du stéroïde pour le second site déterminerait le taux de transformation induit. Ce modèle suppose l'existence de deux sites de liaison, hypothèse peu compatible avec les données actuelles de la biologie moléculaire ni les expériences de liaison de stéroïdes au GR par compétition, impliquant une exclusion du site de liaison d'un stéroïde par le compétiteur.

c.4 - Raynaud et al., 1980a postulent que l'on peut discerner un agoniste d'un antagoniste par la valeur de la constante de vitesse de dissociation du complexe ligand-GR. Si il semble logique d'admettre qu'un complexe instable sera incapable de générer une forme active, Gagne et al., 1987 ont démontré que dans les cellules intactes à

37°C, une parfaite corrélation existait entre affinité des antiglucocorticoïdes pour le GR et leur efficacité biologique. De plus, cette hypothèse a un corollaire fort peu enthousiasmant, qui est l'impossibilité d'obtenir des antiglucocorticoïdes à forte affinité pour le GR, et donc de se priver des composés du type RU 486...

c.5 - Enfin, Munck et Holbrook, 1987 ont développé un modèle où seuls sont pris en compte les paramètres cinétiques de l'interaction hormone-récepteur. Son extrapolation sur un plan mathématique conduit à l'obtention de valeurs généralement confirmées expérimentalement. Postulant de l'irréversibilité de la transformation, ce modèle distingue 5 mécanismes générant une activité antagoniste en affectant un paramètre cinétique du cycle (fig. 18).

- le premier est une baisse du taux de transformation, et donc très proche des modèles c.1, c.2, c.4 (constante k_2)
- une baisse du taux de migration au noyau (k_3)
- une dissociation plus rapide des complexes liés à l'ADN (k_3)
- une augmentation du taux de régénération de la forme non liée à partir des complexes liés à l'ADN (k_4)
- une augmentation de la vitesse de régénération de la forme non liée à partir du récepteur transformé (k_5).

Tous ces modèles sont évidemment discutables. Leur propos n'est évidemment pas de proposer une explication définitive à l'action antihormonale, mais d'émettre des hypothèses évaluables sur un plan expérimental.

Conclusion : L'étude in vitro du mécanisme d'action des antiglucocorticoïdes a généré une profusion de données à partir

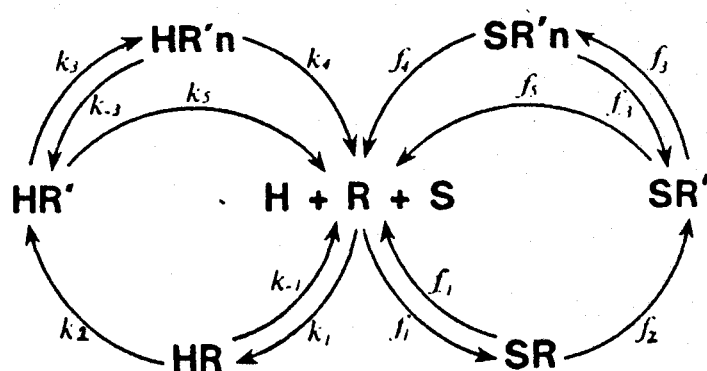


Figure 18- Modèle cyclique de Munck et Holbrook, 1987.
 L'agoniste H ou l'antagoniste S se lie réversiblement aux récepteurs libres R pour former les complexes non transformés HR ou SR qui génèrent avec une constante de vitesse k_2 ou f_2 , par une réaction irréversible, les complexes transformés HR' ou SR'. Ces complexes HR' et SR' se lient réversiblement aux sites nucléaires pour former les complexes HR'n et SR'n induisant la réponse biologique. Les complexes HR', HR'n, SR', SR'n régénèrent la forme libre R par des réactions dont les constantes de vitesse sont k_5 , k_4 , f_5 , et f_6 respectivement. L'activité biologique est proportionnelle à la quantité de complexes HR'n et SR'n formés.

desquelles il est difficile de tirer une conclusion univoque, les modèles décrits précédemment en témoignent. Aucun mécanisme précis n'est démontré, et il ne serait pas défaitiste de dire que tous les mécanismes sont envisageables. L'élucidation de ceux-ci peut néanmoins grandement aider à la compréhension et à l'identification des étapes-clefs de l'action hormonale. Pour ce faire, il nous a semblé très intéressant de recourir à des conditions expérimentales plus physiologiques, afin de pouvoir étudier les processus tels qu'ils se déroulent dans la cellule intacte.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

A - RAPPELS DES RESULTATS ACQUIS AU LABORATOIRE

L'étude des paramètres physicochimiques du GR non transformé, lié soit à l'acétonide de triamcinolone (TA), soit au RU 486, stabilisé par le molybdate, ou transformé par la chaleur, a été réalisée sur cytosol de foie de rat à 4°C. Le taux de transformation a été estimé par une mesure de la liaison à la DNA-cellulose. En parallèle ont été mesurés le rayon de Stokes (R_s) par chromatographie d'exclusion de taille haute performance, le coefficient de sédimentation ($S_{w,20}$), et l'affinité pour un support DEAE-cellulose. Les tampons utilisés pour les analyses contenaient du molybdate afin de prévenir toute transformation ou inactivation des complexes hormone-récepteur (HR) lors des analyses.

Les complexes non transformés, qu'ils soient formés par incubation du cytosol en présence de 3H TA ou de 3H RU 486 présentent des caractéristiques physicochimiques strictement identiques ($R_s = 7$ nm, 9,3S, élution de la DEAE-cellulose à 220-280 mM KCl). Après transformation par exposition à la chaleur (25°C durant 30 min), les complexes transformés possèdent alors un R_s de 5 nm, un coefficient de sédimentation de 4,4S et sont élués de la DEAE-cellulose à 120 mM de KCl. A nouveau, aucune différence qualitative n'est détectable entre les complexes GR-agoniste ou GR-antagoniste. Par contre, le taux de conversion de la forme non transformée 9,3S, 7 nm en la forme transformée 4,5S, 5 nm est nettement moindre en présence de RU 486. Un comportement similaire est

d'ailleurs observé avec le "DxDiMet" un représentant de la série des 17- β carboxamides de la dexaméthasone, dérivés connus pour leur activité antagoniste dans diverses lignées cellulaires. Alors que le taux de transformation avoisine 60-65 % en présence de TA, les 2 composés antagonistes n'induisent qu'une conversion de 15 et 12 % (Sablonnière et al., 1986). De même, le taux de transformation des complexes RU 486-GR estimé par isofocalisation (passage d'un pI de 4,4 à 4,8) est fortement réduit par rapport aux complexes TA-GR (37 % contre 63 %) (Danzé et al., 1987). Ces résultats sont résumés dans le tableau IV.

	³ H TA	³ H RU 486	³ H DxDiMet
Liaison à la DNA-cellulose	65 %	15 %	12 %
Paramètres hydrodynamiques			
Rs : 7 nm	30 %	80 %	20 %
5 nm	70 %	20 %	20 %
Sw,20 : 9,3S	35 %	90 %	70 %
4,5S	65 %	10 %	30 %
DEAE-cellulose :			
Pic I (120 mM KCl)	75 %	20 %	ND
Pic II (220-280 mM KCl)	25 %	80 %	ND
pI de l'isoforme			
prépondérante	4,8	4,4	ND

TABLEAU IV : Corrélation entre le taux de transformation et les caractéristiques physicochimiques des complexes GR-³H stéroïdes après exposition à la chaleur.

Ces résultats prouvent donc que deux composés antagonistes stabilisent la forme non transformée de haut poids moléculaire du GR. De plus, ils établissent une parfaite corrélation entre transformation et réduction du poids moléculaire. Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux obtenus par d'autres équipes estimant le taux de transformation des complexes GR-RU 486 2 à 5 fois inférieur à celui des complexes GR-TA ou GR-dexaméthasone (GR-Dex) (Moguilewski et Philibert, 1984, Bourgeois et al., 1984, Groyer et al., 1987).

Cependant, d'autres auteurs aboutissent à des résultats tout à fait opposés, avec un taux de transformation des complexes GR-RU 486 similaire à celui des complexes GR-Dex (Schmidt, 1985, Agarwal et al., 1985). Les études menées sur des fractions subcellulaires, préparées dans des tampons hypotoniques et soumises à des conditions transformantes peu physiologiques (0,3 M KCl, 10 mM ATP, chaleur) aboutissent donc à des résultats contradictoires. De plus, seule l'utilisation systématique du molybdate lors des analyses des complexes permet une nette caractérisation des complexes non transformés. Certains auteurs s'accordent à émettre des réserves quant à l'existence réelle de cette forme de haut poids moléculaire dans la cellule intacte : le récepteur non lié au stéroïde existerait sous une forme identique à celle du récepteur transformé, mais incapable de lier l'ADN (Radojcic et al., 1985). L'existence de mutants du GR qui, délétés de leur domaine de liaison du stéroïde, s'avèrent être des activateurs constitutifs de la transcription, a été interprétée comme un argument en faveur d'une simple modification conformationnelle du GR

lors de la transformation (Carlstedt-Duke et Gustafsson, 1987). Le complexe non transformé d'environ 300 kDa résulterait donc d'une association artéfactuelle, lors de l'homogénéisation des tissus, du GR avec la hsp 90 et d'autres composants abondants dans le cytosol.

Une approche plus physiologique s'avère donc nécessaire pour l'étude des complexes ligands-GR, et plus particulièrement dans le domaine des antigluco-corticoïdes. Nous nous sommes donc attaché à la mise au point de conditions expérimentales ne nécessitant pas l'apport de facteurs stabilisateurs exogènes, afin de vérifier si l'on pouvait observer le même effet inhibiteur des antigluco-corticoïdes sur la transformation se déroulant dans les cellules intactes.

B - DESCRIPTION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

I - Le matériel biologique

Quantité de lignées cellulaires ou de tissus ont été décrits comme contenant des GR en abondance. Il fallait néanmoins veiller à ce que le type cellulaire choisi ne possède que ce type de récepteurs car, comme nous l'avons vu précédemment, certains antigluco-corticoïdes sont des androgènes ou des progestagènes, et le RU 486 possède une affinité très importante pour à la fois le GR, PR, et l'AR (Philibert, 1984). Notre choix s'est donc porté sur les lymphocytes thymiques de rat qui ont été un des premiers modèles cellulaires utilisés dans l'étude du GR (Schaumburg, 1970, Wira et Munck, 1970). L'absence de ER, de PR et de AR est clairement établie dans ce type cellulaire (Pierce *et al.*, 1983, Mac Cruden et Stimson, 1985). Ces cellules quiescentes non adhérentes sont tout à fait appropriées pour le type d'expérimentation choisie, étant facilement

obtenues en grande quantité.

II - Conditions d'incubation des cellules et d'analyse des complexes GR-ligands.

Les cellules incubées à 37°C dans du milieu de culture sans sérum de veau foetal, sont mises en contact avec les ligands radioactifs ou non pour des temps variables selon les expériences. L'étude de la répartition cellulaire des complexes GR-ligands ainsi formés, ainsi que leur caractérisation physicochimique sont ensuite effectuées.

L'utilisation d'un tampon sans molybdate, isotonique, requiert une technique de caractérisation physicochimique très rapide, car, comme nous l'avons déjà signalé, la plupart des complexes GR-antigluco-corticoïdes sont très instables. Une très nette corrélation entre le taux de transformation estimé par la fixation à la DNA-cellulose et la répartition relative des complexes de haut poids ($M \sim 300$ KDa) et de faible poids moléculaire (90-100 KDa) a été établie au laboratoire (voir tableaux IV et V) et par d'autres équipes (Luttge *et al.*, 1984, Holbrook *et al.*, 1983).

La chromatographie d'exclusion de taille haute performance est un outil privilégié pour l'étude des récepteurs des hormones stéroïdes car le temps d'analyse de ceux-ci est considérablement réduit (moins de 30 min), minimisant donc (1) la dissociation des complexes hormone-récepteur et augmentant par conséquent le rendement d'élution, (2) le risque de protéolyse à laquelle le récepteur transformé est très sensible, (3) la transformation spontanée en cours d'analyse (Sablonnière *et al.*, 1987). Cette technique apparaît donc appropriée à notre étude des complexes préformés dans la cellule intacte et analysés en l'absence de molybdate.

Le processus de transformation sera donc assimilé à la conversion de la forme de 7-8 nm vers la forme 4-5 nm.

Paramètres	Forme non transformée	Forme transformée
Liaison à la DNA-cellulose	non	oui
Rayon de Stokes (nm)	7-8	4-5
Coefficient de sédimentation	8-9	4-5
Elution DEAE-cellulose (mM KCl)	220-280	100-120

TABLEAU V - Correspondance entre l'état de transformation et les paramètres physicochimiques couramment utilisés dans l'étude des complexes GR-ligand.

C - CARACTERISTIQUES DE LA LIAISON D'UNE HORMONE A UN RECEPTEUR.

ASPECTS PRATIQUES.

L'estimation du taux de fixation d'un stéroïde à son récepteur est considérablement gênée, que ce soit dans les préparations acellulaires ou dans les cellules intactes, par l'existence de sites distincts de ce récepteur. Il peut s'agir d'autres récepteurs également affines pour ce ligand, des enzymes, des protéines de transport et également de sites de liaison non spécifiques (membranes, autres protéines ...). Le faible taux en récepteur permet d'obtenir à de très faibles concentrations, une rapide

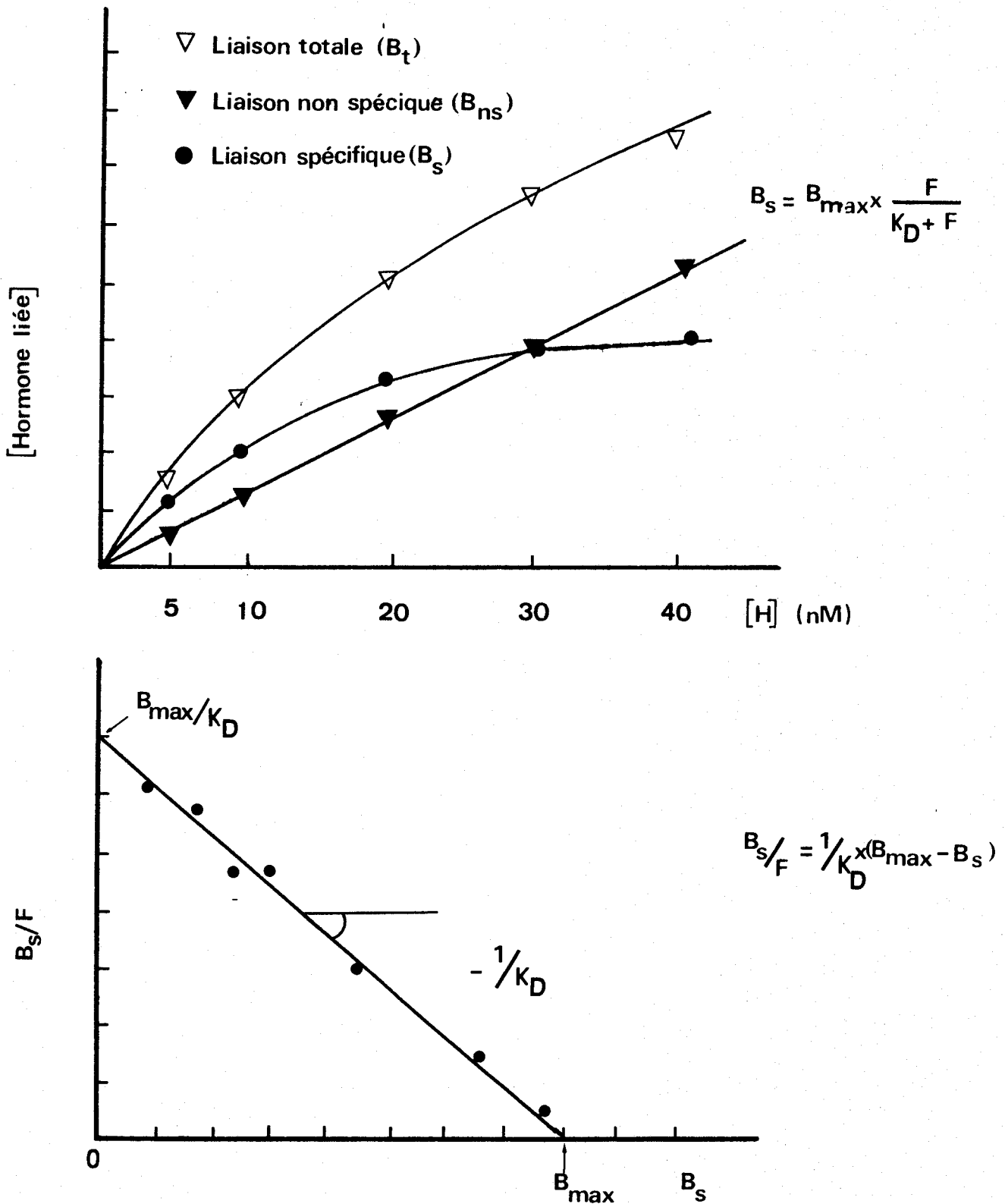
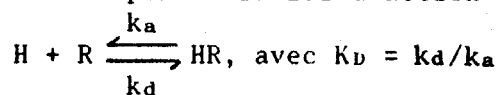


Figure 19 - Représentations graphiques de la liaison hormone-récepteur (HR). L'interaction HR répond à la loi d'action de masse avec :



K_D = constante de dissociation à l'équilibre ; k_d = constante de vitesse de dissociation (sec^{-1}) ; k_a = constante de vitesse de dissociation ($\text{M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$) ;
 F = ligand libre.

19A - Représentation directe ; H = concentration en hormone libre ;

B_s = liaison spécifique ; B_{\max} = liaison maximale ;

B_t = liaison totale ; B_{ns} = liaison non spécifique.

19B - Représentation linéaire de Scatchard.

saturation de la liaison aux récepteurs. La coexistence de sites non spécifiques ne permet pas de visualiser ce phénomène (fig. 19A, courbe B). L'estimation du taux de liaison non spécifique (courbe B_{ns}) est obtenue par dilution isotopique, conditions expérimentales dans lesquelles l'incubation est réalisée en présence du ligand radioactif et d'un excès d'hormone froide ($\times 50$ à 500 selon les expériences). Il est impératif de recourir à un ligand froid très spécifique du récepteur (Dexaméthasone ou acétonide de triamcinolone pour le GR) capable de masquer uniquement la liaison au récepteur. Dans ces conditions, les sites non spécifiques, de faible affinité et non saturables, conservent une capacité de liaison du ligand identique. La liaison spécifique B_s a pour valeur $B_t - B_{ns}$ (fig. 19A). La courbe obtenue est souvent linéarisée par la méthode de Scatchard, 1959, dans laquelle $B_s/H = 1/K_D (B_{max} - B_s)$ (fig. 19B). Par cette méthode on peut mettre en évidence l'existence d'un éventuel autre site spécifique du ligand, qui se traduira par un graphe de Scatchard à deux pentes. Dans ce cas, il est nécessaire de trouver un ligand monospécifique du récepteur étudié, ou de saturer le récepteur "indésirable" par un ligand froid qui lui est également monospécifique.

D - LIAISON DES STEROIDES AUX CELLULES INTACTES ET REPARTITION

SUBCELLULAIRE

I- Captation des stéroïdes tritiés par les thymocytes intacts

La présence d'un site de liaison à forte affinité est un des critères d'identification d'un récepteur. Cependant, l'équivalence site de liaison/récepteur n'est pas stricte, notamment dans la cellule intacte dans laquelle le stéroïde peut être lié à divers composants, dont des

enzymes, ou à la membrane, en raison de son hydrophobicité marquée. Nous avons donc comparé le prélèvement cellulaire spécifique des dérivés stéroïdiens afin de détecter l'existence éventuelle de sites de liaison fortement affines, distinct du GR.

La teneur moyenne en sites de liaison spécifiques de chaque stéroïde testé est similaire à celle obtenue pour l'acétonide de triamcinolone, ligand spécifique du GR, et avoisine 3000 sites par cellule (3280+508), sauf pour le RU 486 avec lequel on observe une liaison spécifique excédant de 1,6 à 2,0 fois le taux en GR (5600+600 sites, voir tableau VII). Les sites de liaison surnuméraires sont distincts du GR puisque la présence d'un excès de TA froide n'est capable d'inhiber la liaison du [³H]RU 486 qu'à une partie des sites spécifiques occultés par un excès de RU 486 froid (Tableau VI).

L'étude de l'interaction RU 486 avec le GR contenu dans la fraction cytosoluble du thymus de rat ne montre cependant pas la présence d'un site de liaison supplémentaire. Un résultat similaire est obtenu avec la progestérone, réfutant donc l'hypothèse de la présence de récepteur de la progestérone (tableau VII). La mobilité chromatographique du ³H RU 486 n'étant pas modifiée après 60 min d'incubation à 37°C avec les thymocytes, la présence d'un enzyme très affine pour le RU 486 semble également improbable.

L'existence de tels sites surnuméraires avait déjà été remarquée dans les thymocytes de rat par Moguilewski et Philibert (1984) et dans une lignée cellulaire lymphoblastique (Dietrich *et al.*, 1986). Cette liaison excédentaire n'apparaît cependant pas être une caractéristique générale des lignées lymphoïdes puisque Bourgeois *et al.*, 1984 mesurent un nombre

Liaison aux cellules Stéroïde tritié	Bs/Br excès en RU 486	Bs/Br excès en TA
RU 486	0,76	0,48
TA	0,64	0,64

TABLEAU VI - Variation de la liaison spécifique du ^3H RU 486 aux thymocytes intacts en fonction du stéroïde non radioactif ajouté en excès 400 fois (incubation avec 30 nM de stéroïde tritié durant 60 min à 37°C).

Bs : liaison spécifique (= Br - Bns)

Br : Liaison totale mesurée en présence de 30 nM de stéroïde tritié.

Bns : Liaison non spécifique mesurée en présence du stéroïde tritié plus un excès de 500 fois en stéroïde non radioactif.

Stéroïde	Cellules intactes (a)		Cytosol thymique (b)	
	Nbre de sites (par cellule)	K _D (nM) ^d	Conc. en GR (fm/mg prot.)	K _D (nM) ^d
³ H TA	2900 ± 300 (n=3)	8,5 ± 0,5	632	1,52
³ H Dex	2758 ± 342 (n=4)	12,2 ± 1,1(n=2)	nd	nd
³ H corticosté- rone (150nM)	3575 ± 673 (n=2) ^c	nd	nd	nd
³ H cortisol (200nM)	2949 ± 604 (n=4) ^c	nd	nd	nd
³ H cortexolone (300nM)	3407 ± 400 (n=2) ^c	nd	nd	nd
³ H DOC (170 nM)	2093 ± 512 (n=3) ^c	nd	nd	nd
³ H progestérone	3936 ± 578 (n=4)	121,3 ± 17(n=2)	552	18,2
³ H RU 486	5600 ± 600 (n=3)	4,25 ± 0,9	620	0,90

TABLEAU VII - Comparaison de la liaison de différents stéroïdes aux thymocytes intacts et au cytosol thymique.

n nombre de mesures, + S.E.M. (ecart moyen standard)

(a) Les incubations sont faites à 37°C durant 2 heures. L'excès d'hormone libre est ôté par 3 lavages avec du milieu de Hanks, à 4°C.

(b) Les incubations sont faites à 4°C durant 16 heures en présence de molybdate. L'excès d'hormone libre est ôté par la méthode au charbon dextran.

(c) Le nombre de sites est estimé par mesure de la liaison avec des concentrations saturantes en stéroïde indiquée entre parenthèses.

(d) Le K_D est déterminé par mesure de la pente du graphe obtenue par la méthode de Scatchard, 1949.

NB.- La liaison spécifique est calculée par différence entre B_r et B_{ns}, où B_r représente la radioactivité liée en présence de la seule hormone tritiée, et B_{ns} la radioactivité liée en présence de l'hormone tritiée plus un excès de 500 fois du même stéroïde radioinerte, et pour les études de l'affinité du stéroïde (K_D), en présence d'un excès de 400 fois de Dex non radioactive.

de sites équivalents pour la Dex et le RU 486 dans la lignée W7TB

II - Transfert nucléaire du RU 486

L'existence de sites de liaison du RU 486 distincts du GR a été confirmée par les mesures de transfert nucléaire de ce stéroïde. Lorsque des thymocytes sont incubés pour des durées variables soit en présence de TA, soit en présence de RU 486, la cinétique de transfert nucléaire est similaire pour les 2 stéroïdes, un plateau étant atteint en 15 à 20 min. (Fig. 20). Cependant, le taux de transfert dépend à la fois de la nature du stéroïde et des conditions expérimentales. Trois méthodes ont été successivement comparées :

(I) Après lavage des cellules incubées en présence de stéroïde tritié, celles-ci sont homogénéisées délicatement avec un homogénéiseur de Dounce à espace large (ou un potter de Thomas) dans le tampon isotonique. La fraction cytoplasmique est ensuite séparée de la fraction particulaire par centrifugation à 4000g, pendant 15 min à 4°C. La radioactivité présente dans chaque fraction est ensuite mesurée.

(II) Empruntée à Munck et Wira, 1975, cette méthode donne d'excellents résultats, reproductibles et comparables à ceux obtenus avec la méthode I. Très facilement mise en oeuvre, elle consiste en la dilution des cellules en milieu hypotonique qui provoque la lyse de ces cellules et après centrifugation la mesure rapide de la répartition intracellulaire des espèces moléculaires liant le stéroïde.

Avec ces deux méthodes, le transfert nucléaire de la TA équivaut à 70-85 % du taux de stéroïde spécifiquement incorporé dans la cellule, alors que pour le RU 486, le transfert n'excède pas 50-60 %. De ce cas, la

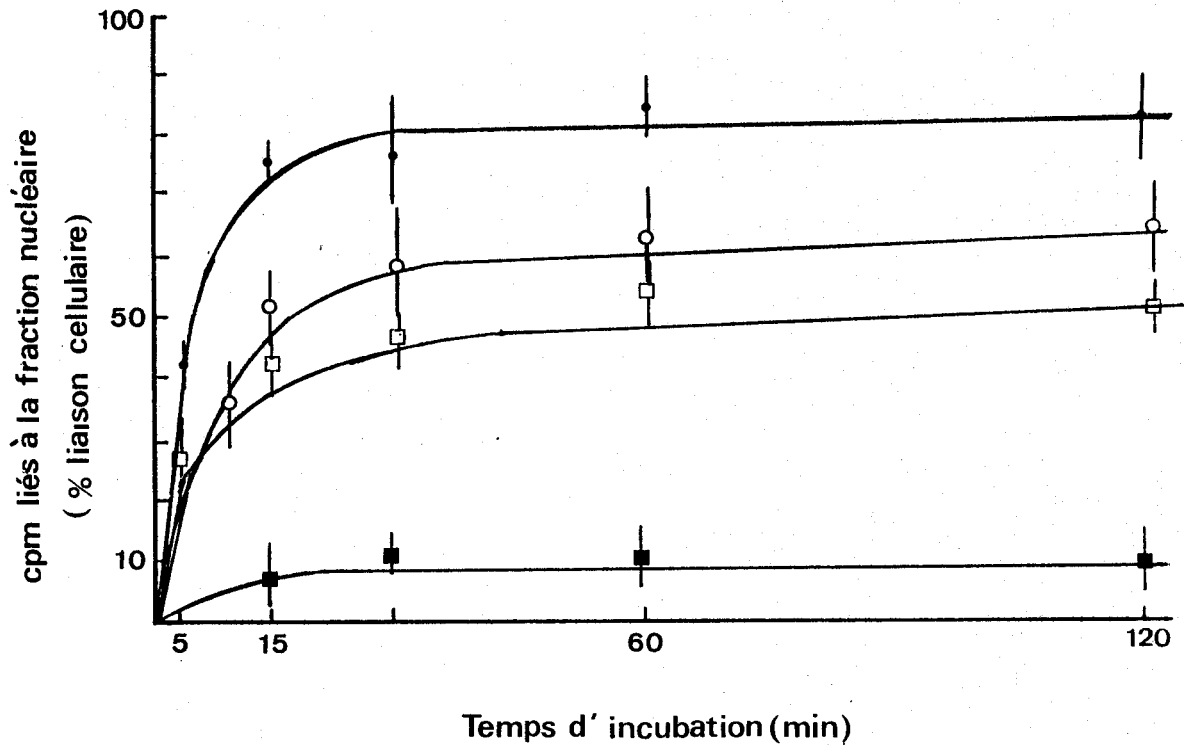


Figure 20 - Cinétique du transfert nucléaire de [³H] TA et de [³H] RU 486 dans les thymocytes de rat incubés à 37°C. La radioactivité spécifique liée au noyau est mesurée en présence ou en l'absence de 0,1 % Triton X-100 et représentée comme une fonction du temps d'incubation.

[³H] TA : ●—●, sans 0,1 % Triton X-100 ; ○—○ avec 0,1 % Triton X-100.

[³H] RU : □—□, sans Triton X-100 ; ■—■ avec 0,1 % Triton X-100.

Le taux de liaison non spécifique est estimé en présence d'un excès 400 fois du même stéroïde non marqué. La radioactivité cellulaire spécifiquement liée à la cellule est mesurée après trois lavages dans le tampon isotonique.

plupart des sites nucléaires ne sont pas masqués par un excès de TA, suggérant que seule une faible partie des complexes GR-RU 486 a effectivement subi une transformation vers le noyau (12 %, voir fig. 21A). L'addition de 0,1 % de Triton X-100 au tampon d'homogénéisation des cellules provoque une nette réduction du transfert nucléaire apparent du RU 486, résultant en la disparition quasi totale des sites nucléaires non affines pour la TA (fig. 21B).

Plusieurs remarques s'imposent : (1) la méthode II n'est pas applicable en présence de 0,1 % de Triton X-100, pour deux raisons : à cette concentration, ce détergent a un effet protecteur vis-à-vis de la lyse par choc hypotonique, et interfère avec la méthode de mesure de la radioactivité liée par le charbon dextran.

(2) Le traitement des noyaux par 1 % de Triton X-100 ne provoque qu'une extraction de 20 % des GR nucléaires (Kaufman et al., 1982) et n'affecte que très peu, dans nos conditions, le transfert nucléaire de la Dex et de la TA (baisse de 5 à 14 %, fig. 21).

(3) La stabilité des complexes GR-RU 486 et GR-TA n'est que très peu modifiée en présence de Triton X-100 : une incubation des complexes cytosoliques durant 60 min. à 4°C en présence de 0,1 % de détergent ne provoque qu'une baisse de 5 à 13 % du taux de liaison spécifique.

Il est donc clair que le faible taux de transfert nucléaire observé en présence de Triton X-100 n'est pas dû à une sensibilité particulière des complexes à ce détergent ni à leur extraction sélective du culot contenant les noyaux. La séparation des organites cellulaires sur un gradient discontinu de sucrose a mis en évidence la nature exclusivement nucléaire des sites surnuméraires liant le RU 486 (fig.22).

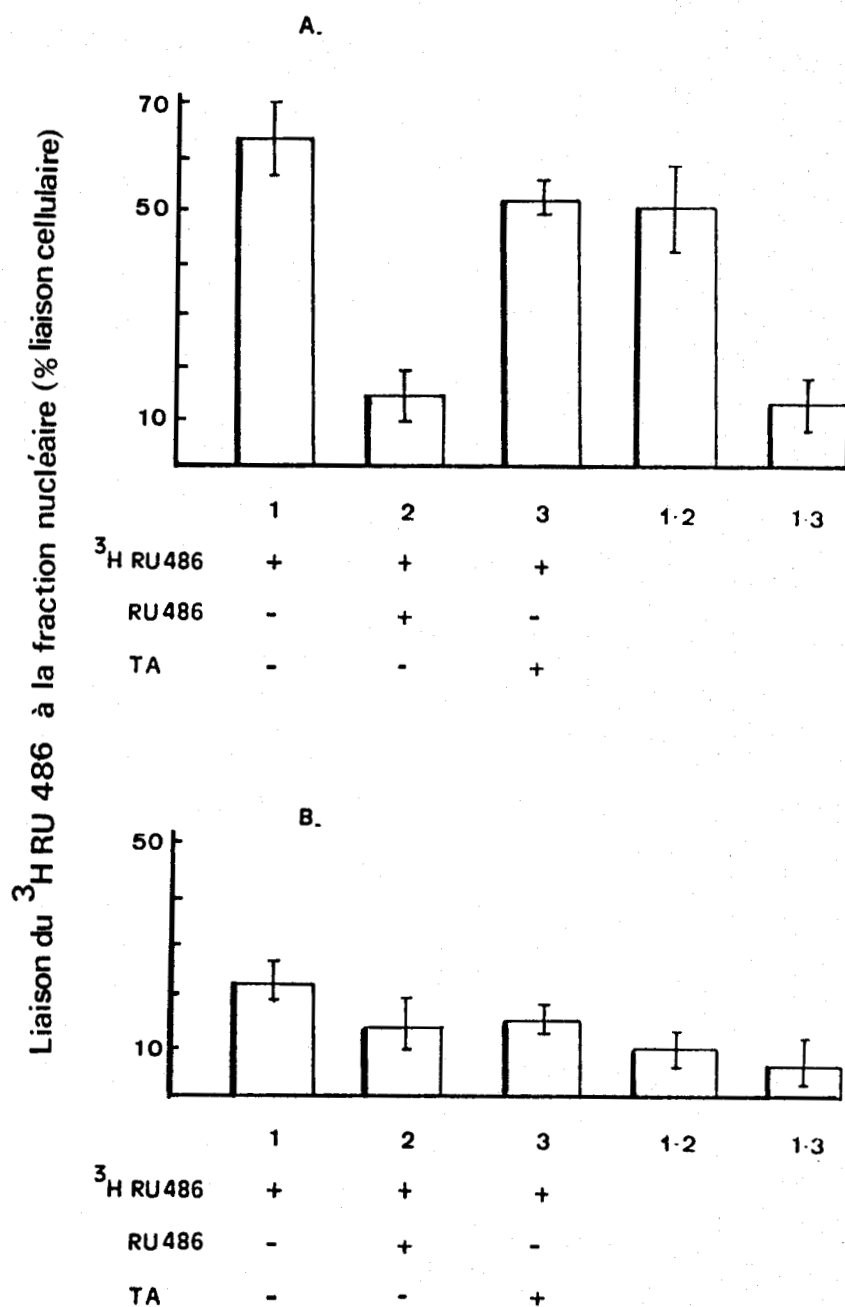


Figure 21 - Variation de la liaison du [³H] RU 486 aux noyaux de thymocytes de rat. La radioactivité totale liée aux noyaux (1), la liaison non spécifique estimée en présence d'un excès (x 400) de RU 486 (2) ou de TA (3) et la liaison spécifique (1-2, 1-3) est représentée en fonction de la liaison spécifique du RU 486 aux cellules intactes.

A : Transfert nucléaire estimé en l'absence de Triton X-100 ;

B : Transfert nucléaire estimé en présence de 0,1 % Triton X-100.

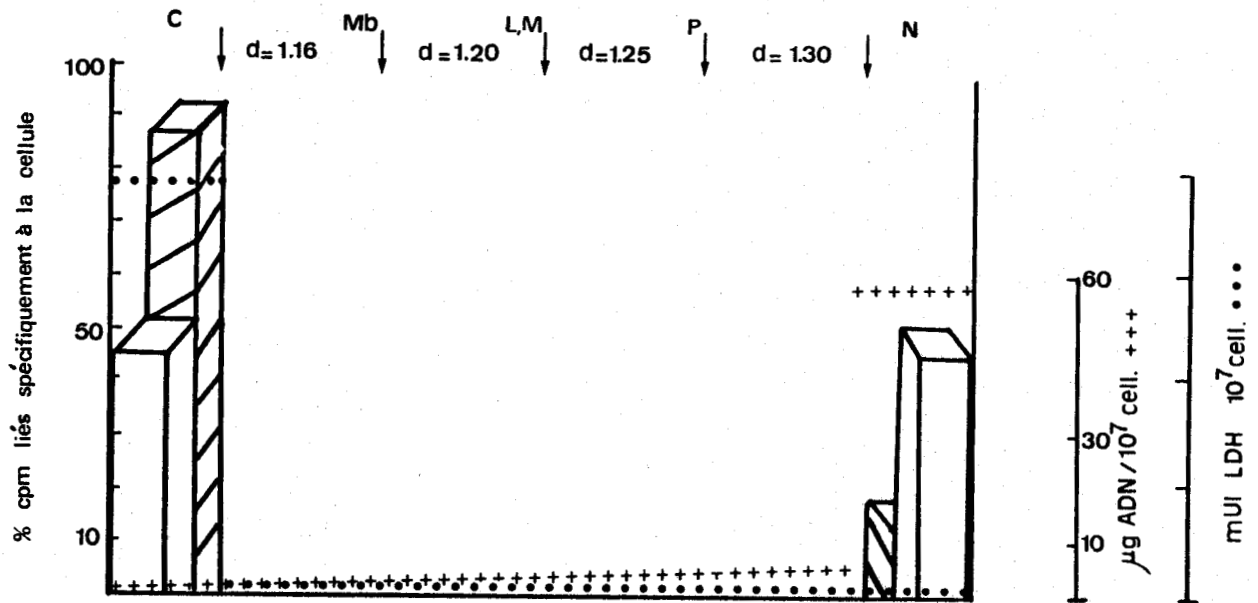


Figure 22 - Etude de la localisation subcellulaire des sites surnuméraires liant le RU 486 avec \square ou sans Triton X-100 \square . 10^7 cellules sont homogénéisées dans un tampon TES 20 mM pH 7,4, saccharose 0,25 M, β -mercaptoéthanol 20 mM, PMSF 1 mM. L'homogénat est ensuite déposé sur un gradient discontinu de saccharose (37 %, 45 %, 54 %, 62 %) et centrifugé 180 min à 25 000 rpm, 4°C. Sur chaque fraction de 400 μ l sont dosés la radioactivité \square ou \square , le contenu en ADN (+++).

L'activité de la lactico-déshydrogénase (●●) est utilisée comme marqueur cytoplasmique. Les flèches indiquent l'interface où sédimentent les différents organites cellulaires : Mb : membrane plasmique; L : lysozomes; M : mitochondries; P : peroxyosomes; N : noyaux; d : densité

Ces sites de liaison nucléaires sont donc très probablement localisés sur la membrane externe de l'enveloppe nucléaire. En effet, le Triton X-100 est connu pour provoquer une extraction sélective des phospholipides de la fraction nucléaire. Cet effet a été confirmé par dosage et par microscopie électronique (Kaufman *et al.*, 1982, Holtzman, 1966).

Il semble d'ailleurs clair, a posteriori, que les différences concernant le taux de transfert nucléaire du RU 486 notées dans la littérature sont dues à la variation des conditions expérimentales, et notamment à l'usage de détergent (Tableau VIII).

III - Relation entre transfert nucléaire et activité biologique des stéroïdes

Le transfert nucléaire de divers composés stéroïdiens tritiés a été mesuré par la méthode I, en présence ou en l'absence de 0,1 % Triton X-100. L'emploi de ce détergent exerce un effet variable sur le transfert nucléaire apparent du cortisol (F) de la corticostérone (B), et du RU 486, mais n'affecte pas de manière significative les valeurs observées pour la dexaméthasone, l'acétonide de triamcinolone, la progestérone (Prog) et la cortexolone (S) (fig. 23). Munck et Holbrook, 1984 observent un effet comparable du Triton X-100 (à 0,05 %) sur le transfert nucléaire dans les thymocytes de rat du cortisol qui est réduit de 45 à 75 %, alors que celui de la TA n'est pas affecté.

Les valeurs obtenues en présence de Triton X-100 semblent donc plus significatives puisque mettant en évidence une corrélation qualitative entre activité biologique et taux de transfert nucléaire. En effet, les agonistes sont localisés à 45-75 % dans la fraction nucléaire, alors que

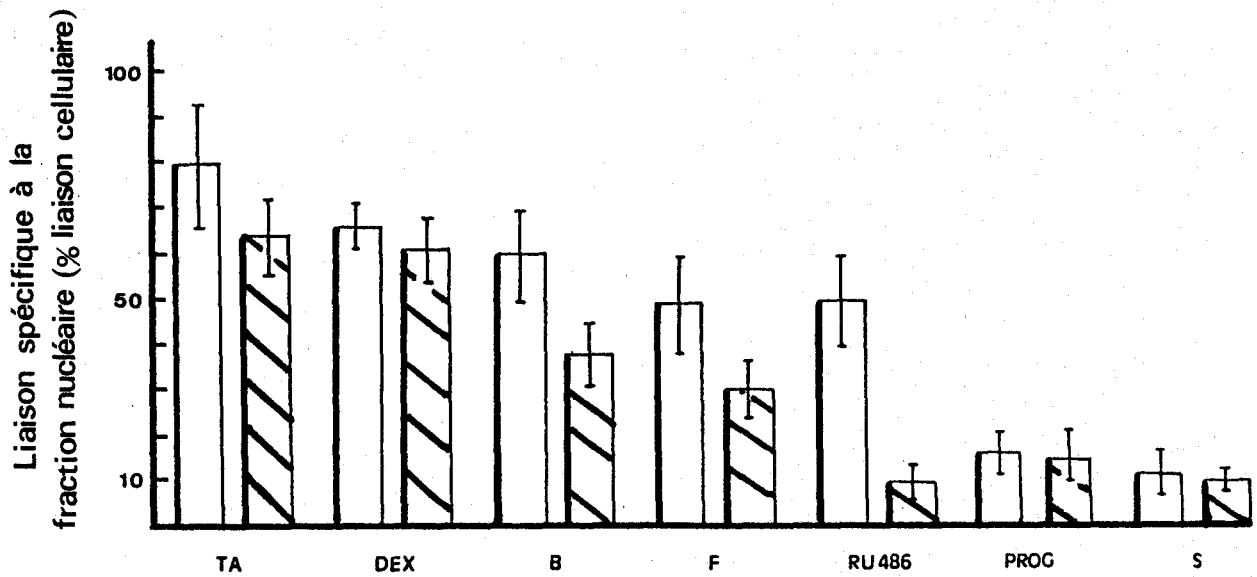


Figure 23 - Transfert nucléaire de divers stéroïdes dans les thymocytes de rat. Les cellules sont incubées durant 30 min à 37°C en présence de dérivés agonistes (TA, Dex, B, F) ou antagonistes (RU 486, Prog., S). Après homogénéisation des cellules avec (▨) ou sans 0,1% Triton X-100 (□) la liaison spécifique au culot 4000 G est mesurée. La liaison non spécifique est estimée en présence d'un excès de 400 fois du même stéroïde non marqué. Chaque valeur représente la valeur moyenne pour 3 mesures indépendantes, et est exprimée comme le rapport de la liaison spécifique au noyau sur la liaison spécifique à la cellule intacte.

TA : acétonide de triamcinolone (20 nM) ; Dex : dexaméthasone (30 nM) ;
 B : corticostérone (50 nM) ; F : cortisol (100 nM) ; RU 486 (20 nM) ;
 Prog : progestérone (40 nM) ; S : cortéxolone (300 nM).

les dérivés antagonistes ne migrent pas de façon significative (5-15 %). Il faut également remarquer le taux de transfert nucléaire intermédiaire du cortisol (F) (de l'ordre de 30 %), probablement en rapport avec son caractère agoniste moins puissant chez le rat. Ainsi, la relation entre transfert nucléaire et activité biologique déjà établie pour les agonistes (Svec et Harrison, 1982, Bloom *et al.*, 1980) peut, dans nos conditions, s'étendre aux dérivés antagonistes.

La seule exception à cette relation est observée avec le mésylate de dexaméthasone, marqueur covalent du site de liaison du GR doué de propriétés antagonistes, avec lequel nous obtenons un taux de transfert de 53 %. La fixation de ce composé à des protéines nucléaires distinctes du GR semble très probable puisqu'il n'est possible d'extraire qu'une fraction très limitée de la radioactivité nucléaire (22 %) par un tampon contenant 50 mM MgCl₂, condition dans laquelle tous les autres complexes sont extraits à 60-70 %. Par ailleurs, la quantification du nombre de sites de liaison cellulaire pour ce composé est extrêmement difficile. Les valeurs sont très souvent aberrantes et non reproductibles.

Les mesures du transfert nucléaire ne sont donc valables que dans un contexte comparatif et il semble très hasardeux de vouloir établir une relation stricte entre la présence d'un stéroïde tritié dans le compartiment nucléaire et l'action de son récepteur sur la transcription. Une revue de la littérature sur ce sujet démontre clairement que les valeurs mesurées dépendent étroitement des techniques utilisées, et que l'identification et la caractérisation physicochimique des composés liant ces stéroïdes s'avèrent indispensables lors de telles études.

Type cellulaire	Noyaux purifiés	Transfert nucléaire (sans détergent)	Transfert nucléaire avec détergent % et type Valeur		Références
Oviducte de poulet	oui	2-3 %	-	-	Groyer et al. 1987
Fibroblaste souris L-929	non	50 %	-	-	Jung-Testas et Baulieu 1984.
id	non	50 %			Jung-Testas et Baulieu 1983.
HTC	oui	-	Nonidet P 5%	3%	Chasserot Golaz et Beck, 1984
FAZA	oui	-	id	6,8%	id
W7TB	non	40 %	-	-	Bourgeois et al. 1984
Thymocytes de rat	oui	-	0,25 % Triton X100	5 %	Moguilewski et Philibert 1984
Thymocytes de rat	oui	50-60 %	0,1 % Tri-ton X100	12 %	résultats personnels
	non	50-60 %	id	id	

TABLEAU VIII - Valeurs du transfert nucléaire du RU 486 en fonction de certains facteurs expérimentaux (purification des noyaux, utilisation de détergent).

E - ETUDE COMPARATIVE DU RAYON DE STOKES ET DU COEFFICIENT DE
SEDIMENTATION DES COMPLEXES RU 486-GR ET TA-GR PREFORMES DANS LES CELLULES
INTACTES.

Cette étude est rendue nécessaire de par l'utilisation d'un tampon d'homogénéisation particulier, isotonique et ne contenant pas de molybdate. Les complexes préformés dans les cellules intactes possèdent des caractéristiques hydrodynamiques variables selon les conditions et les techniques d'analyse :

Les extraits cytosoliques des thymocytes incubés 30 min à 37°C en présence soit de [³H]RU 486, soit de [³H]TA sont analysés en parallèle par chromatographie d'exclusion de taille haute performance ou en gradient de sucrose 5-20 %, en présence ou non de 20 mM de molybdate de sodium (Na₂MoO₄) (Tableau IX). Quelles que soient les conditions, le rayon de Stokes (Rs) du complexe RU 486-GR est de 7,2-8,3 nm, alors que les complexes TA-GR ont un Rs de 4-5 nm. Le RU 486 stabilise donc, comme il l'a été montré dans le cytosol de foie de rat, une forme de GR de haute taille. Il faut noter que la stabilisation observée dans nos conditions semble beaucoup plus marquée puisque le taux de conversion des complexes RU 486-GR en la forme 4-5 nm n'excède pas 5 %. Ce pourcentage est également retrouvé après incubation des thymocytes à 4°C durant 2 heures en présence d'un agoniste (TA), condition expérimentale connue pour inhiber la transformation des complexes et leur migration au noyau. Les conditions d'analyse en chromatographie d'exclusion de taille ne provoquent donc pas de dissociation artefactuelle du complexe 7-8 nm en un complexe 5 nm, malgré l'absence de molybdate.

TABLEAU IX - Paramètres hydrodynamiques et poids moléculaire apparent des complexes [^3H] TA, [^3H] Dex et [^3H] RU 486-GR. Après une incubation de 20 min à 37°C en présence de 20 nM de stéroïde, le cytosol est rapidement préparé dans le tampon isotonique supplémenté avec 1 mM PMSF et 10 % glycérol puis analysé en exclusion de taille ou sur gradient de sucrose.

Stéroïde	Na ₂ MoO ₄ (mM) ^a	Rs (nm)	Sw, 20	M _{app.} (KDa) ^f
RU 486	20	7,2-8,3	8,2	270
	0	7,2-8,3 ^b	4,6 ^d	150
	0	7,2-8,3 ^c	ND	
	0	7,2-8,3	8,2 et 4,6 ^c	270 et 150
Dex ou TA	20	5,0	4,0 ^d	84
	0	5,0	4,0 ^{d,e}	84

(a) ajouté au tampon utilisé pour les analyses.

(b) analyse effectuée 30 min après l'homogénéisation.

(c) analyse effectuée 24 heures après préparation du cytosol (conservé à 4°C).

(d) analyse réalisée par gradient de sucrose conventionnel (rotor à godets mobiles) centrifugation 16 h à 4°C.

(e) analyse réalisée sur rotor à tubes verticaux (centrifugation 120 min à 4°C).

ND : non déterminé.

(f) calculé d'après la formule $M_{app} = 4224 \times R_s \times S_{w,20}$ où 4224 représente le produit des constantes égal à $6 \pi \eta N (1 - \bar{v} \rho)^{-1}$, appliquée aux récepteurs des hormones stéroïdes (Siegel et Monty, 1966 ; Sherman *et al.*, 1983)

avec η = viscosité du milieu

ρ = densité

N = nombre d'Avogadro

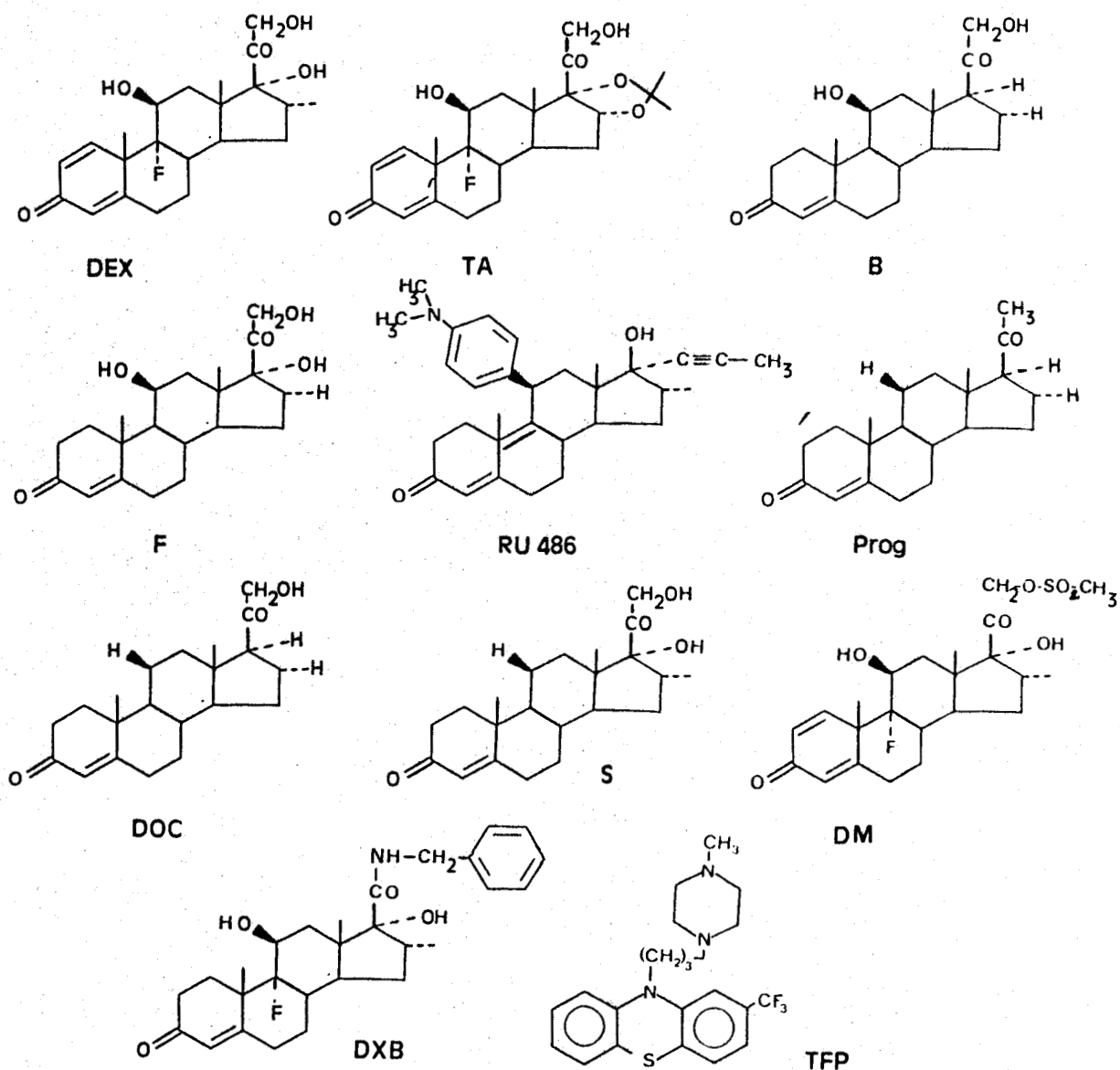
\bar{v} = volume spécifique partiel = 0,732 cm³·g⁻¹.

De façon surprenante, le coefficient de sédimentation des complexes RU 486-GR varie selon les conditions. Alors que les complexes TA-GR possèdent, en présence ou non de 20 mM Na₂MoO₄ dans le gradient, un coefficient de 4,0S, les complexes RU 486-GR sédimentent à 8,2 S en présence de 20 mM Na₂MoO₄ et à 4,6S sans ce composé. Cette valeur anormalement faible est attribuée à une dissociation spontanée et irréversible du complexe se produisant lors de la très longue centrifugation (16 heures), ce phénomène étant inhibé en présence de molybdate. Cette hypothèse est étayée par le fait que cette dissociation n'est que très peu observée lorsqu'une analyse identique est réalisée rapidement sur un rotor à tubes verticaux, ne nécessitant que 120 minutes de centrifugation. Le taux de transformation varie dans ce cas entre 0 et 50 % selon les expériences.

La chromatographie d'exclusion de taille est donc le moyen de séparation des différentes formes du GR le plus sûr et le plus rapide, puisque l'analyse se déroule en moins de 30 minutes, sans induire de dissociation en l'absence de molybdate.

F - EFFET DU LIGAND SUR LA CINÉTIQUE DE CONVERSION 7-8 nm/5nm DES COMPLEXES CYTOSOLIQUES.

La fraction cytoplasmique des thymocytes incubés en présence de ligands du GR est rapidement préparée, après lavage et homogénéisation des cellules, par centrifugation de 10 minutes à 4000 g et à 4°C. 200 µl de cytosol sont ensuite injectés sur une colonne TSG G3000 SW ou G4000 SW équilibrée dans le tampon isotonique refroidi à 4°C, à un débit de 0,5



ml/min, conditions permettant une séparation optimale des différentes formes du récepteur (Sablonnière *et al.*, 1987). Un lavage incomplet des cellules pourrait laisser persister dans le milieu d'homogénéisation une quantité non négligeable de stéroïde tritié. Celui-ci serait alors susceptible de s'associer aux récepteurs libres durant la phase de préparation du cytosol, formant ainsi des complexes non transformés. L'ajout d'une forte concentration de dexaméthasone froide (1 μ M) au tampon d'homogénéisation ne perturbe en rien les résultats, prouvant qu'aucun complexe n'est formé lors de la préparation du cytosol dans de telles conditions.

I - Ligands agonistes

Lorsque les thymocytes sont incubés à 37°C en présence d'agonistes synthétiques (Dexaméthasone, Acétonide de Triamcinolone) ou naturel (Corticostérone, agoniste naturel chez le rat), la forme 7-8 nm est visualisée uniquement après une incubation de 5 minutes (fig. 25). La prolongation de l'incubation à la même température provoque une rapide conversion de la forme 7-8 nm vers la forme 5 nm, qui est la seule forme persistante après 15 à 30 minutes d'incubation. Une faible proportion de complexes non transformés est parfois observée à des temps compris entre 10 et 25 minutes. La cinétique de conversion 7 nm/5 nm est donc similaire à celle du transfert nucléaire (fig. 20) et donc supposée être concomitante au processus de transformation, hypothèse vérifiée par l'inhibition de cette conversion lorsque les thymocytes sont incubés à 4°C (Tableau X).

Le cortisol affiche une fois encore un comportement particulier puisque la forme 7-8 nm persiste après 60 minutes d'incubation, suggérant

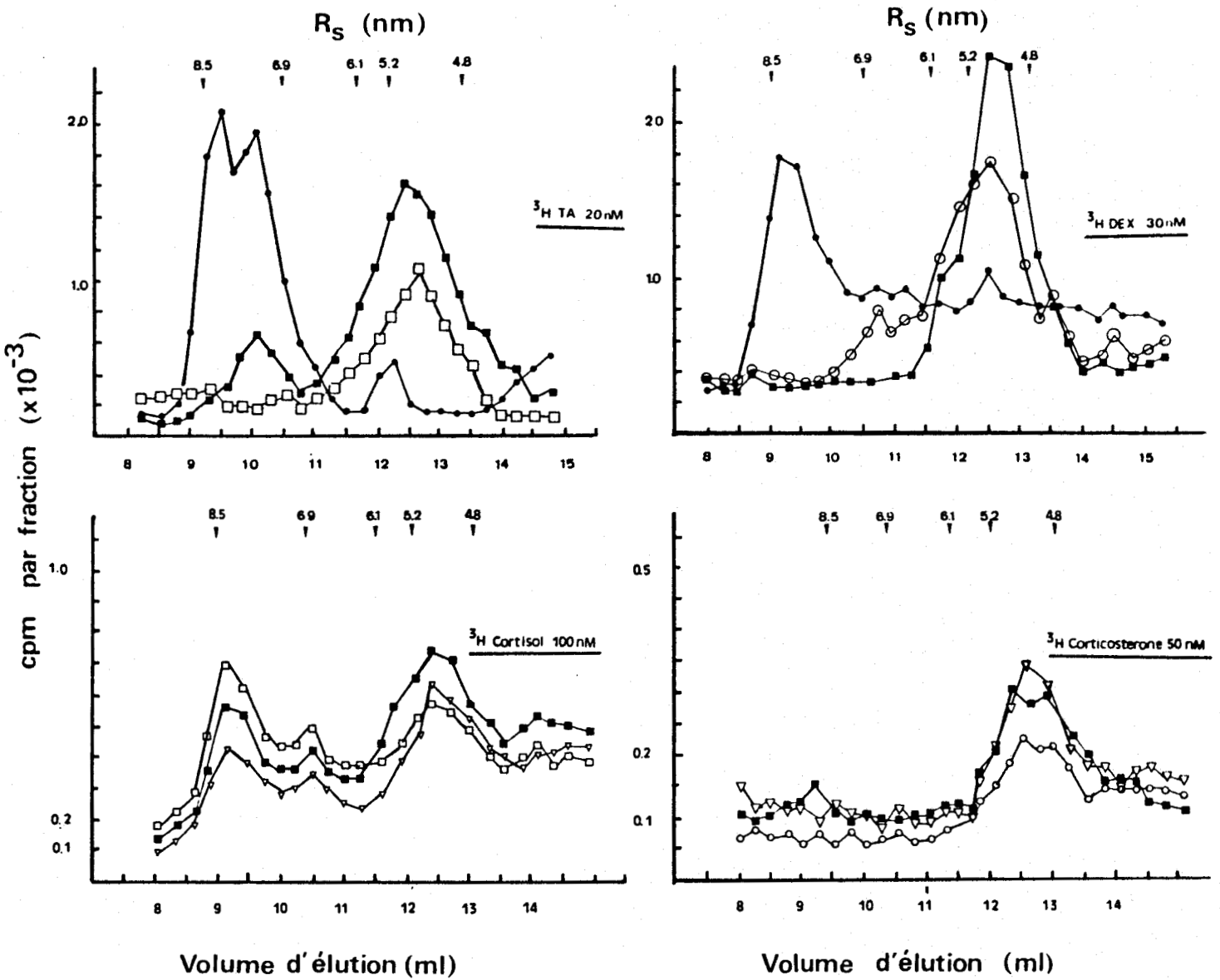


Figure 25 - Cinétique de transformation des complexes cytosoliques préformés dans les thymocytes intacts en présence de dérivés agonistes naturels (Cortisol, Corticostérone) ou de synthèse (TA, Dex). Les complexes non transformés sont élués entre 8,5 et 7,0 nm, les complexes transformés en 5 nm. Seule est représentée la radioactivité liée spécifique. La colonne utilisée est une TSK G4000 SW (300 x 7,5mm) munie d'une précolonne (60 x 7,5 mm) équilibrée dans le tampon isotonique à 4°C.

●—● : 5 min ; ▽—▽ : 15 min ; ■—■ : 30 min ; ○—○ : 45 min ; □—□ : 60 min.

que ce composé n'induit qu'un taux de transformation plus faible (70 % environ en 60 min), ce qui semble à nouveau en accord avec son activité agoniste moins marquée, à cette concentration, que pour les trois agonistes testés auparavant. Munck et Holbrook, 1984b arrivent à une conclusion identique quant au comportement du cortisol dans les thymocytes de rat en utilisant d'autres critères analytiques (liaison à la DEAE et DNA-cellulose).

II - Ligands antagonistes

D'une manière très nette, les antigluco-corticoides génèrent des complexes uniquement sous la forme 7-8 nm, et ceci quel que soit le temps d'incubation (testé jusque 360 min à 37°C pour le RU 486, 180 min pour la progestérone et 120 min pour les autres composés, voir Fig. 26 et Tableau X).

La stabilisation des complexes sous la forme non transformée est observée pour tous les antigluco-corticoides testés, qu'il s'agisse d'antagonistes réversibles naturels (cortexolone, progestérone), de synthèse (RU 486, DXB), ou d'un antagoniste irréversible tel le mésylate de dexaméthasone (fig.26).

Le cas de la 11-desoxycorticostérone est particulier : ce produit est un agoniste partiel chez le rat, mais son activité agoniste n'apparaît, dans les thymocytes de rat, qu'à des concentrations de 1 μ M (Colbert et Young, 1986). Testé à la concentration de 50 nM, nous pouvions donc nous attendre à ce que seul soit révélé son caractère antagoniste. Cette hypothèse est vérifiée par le profil d'élution obtenu (fig.26), qui est caractéristique d'un composé à activité antagoniste.

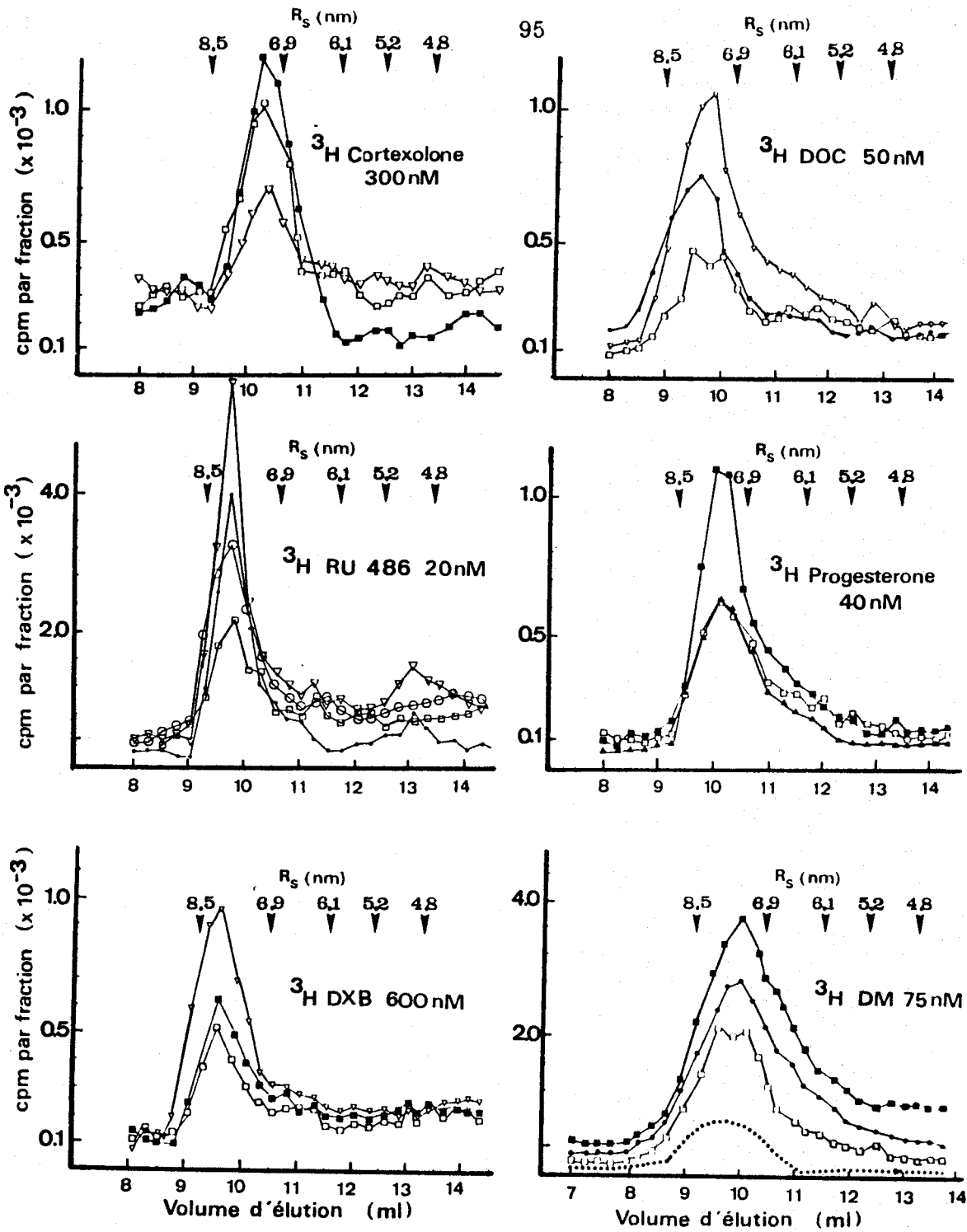


Figure 26 - Cinétique de transformation des complexes cytosoliques préformés dans les thymocytes intacts en présence de dérivés antagonistes naturels (cortisolone, deoxycorticostérone, progestérone) ou de synthèse (RU 486, DXB, DM).

●—● : 5 min ; ▽—▽ : 15 min ; ■—■ : 30 min ; ○—○ : 45 min ;
 □—□ : 60 min ; ▲—▲ : 120 min.

Stéroïde	Répartition des formes 8/7 nm et 5 nm après une incubation de 30 min. à 37°C (%)		Conversion en la forme 5 nm (%)		Transfert nucléaire (%) après une incubation de 30 min. à	
	7.2-8.2 nm	5 nm	37°C	4°C	37°C	4°C
Agonistes :						
TA	0-20	80-100	Totale en 15 min.	<15% en 60 min.	62±7	10
Dex	5-20	80-95	Totale en 15 min.	<15% en 60 min.	60±4	nd
B	0-10	90-100	Totale en 15 min.	nd	38±7	nd
F	60-40	40-60	50% en 15 min.	nd	30±5	nd
Antagonistes						
RU 486	100	0	0% jusque 360 min.	0% après 120 min.	10±3	<10
DXB	100	0	0% jusque 60 min.	nd	nd	nd
Dex Mes	100	0	0% jusque 120 min.	nd	50	nd
S	100	0	0% jusque 120 min.	nd	8±3	nd
DOC	100	0	0% jusque 120 min.	nd	nd	nd
Prog.	100	0	0% jusque 120 min.	nd	15±5	<10

Tableau X : Modification du rayon de Stokes et de la localisation intracellulaire des complexes stéroïdes-GR en fonction du temps, de la température et du stéroïde. TA : acétonide de triamcinolone, Dex : Dexaméthasone, B : corticostérone, F : cortisol, Dex Mes : Mésylate de dexaméthasone, S : cortexolone, DOC : deoxycorticostérone, Prog. : progestérone. nd : non déterminé

III - Distinction des composants macromoléculaires liant les stéroïdes

Des incubations de contrôle en présence d'un excès de dexaméthasone non marquée ont permis la distinction du GR parmi les composants macromoléculaires liant le stéroïde testé. Si la dexaméthasone, l'acétonide de triamcinolone, la corticostérone, la progestérone, le RU 486, le DXB et le DOC ne génèrent qu'un seul pic de radioactivité totalement effaçable par la dexaméthasone, il n'en est pas de même pour le cortisol, la cortexolone et le mésylate de dexaméthasone.

Nous n'avons pas cherché à préciser la nature des composants distincts du GR liant ces trois composés, mais leur existence reflète parfaitement leur fort taux de liaison non spécifique à la cellule, quand on le compare aux autres stéroïdes (excepté le RU 486). En effet, le taux de fixation non spécifique avoisine les 40 à 50 % de la liaison totale à la cellule dans les cas "standard" (TA, Dexa, DXB, corticostérone) alors que dans ces trois cas, la proportion monte jusque 80 %, et parfois plus dans le cas du mésylate de dexaméthasone.

La figure 27 représente les profils d'élution obtenus pour le cortisol, la cortexolone et le mésylate de dexaméthasone après incubation à 37°C durant 30 min, en présence ou en l'absence d'un excès de dexaméthasone non marquée masquant spécifiquement la liaison au GR.

IV - Stabilisation de la forme non transformée par un antigluco corticoïde non stéroïdien.

La mise en évidence d'une capacité de stabilisation de la forme non transformée commune à tous les antigluco corticoïdes stéroïdiens, dont l'activité biologique peut résulter soit d'une modification en 11β , soit

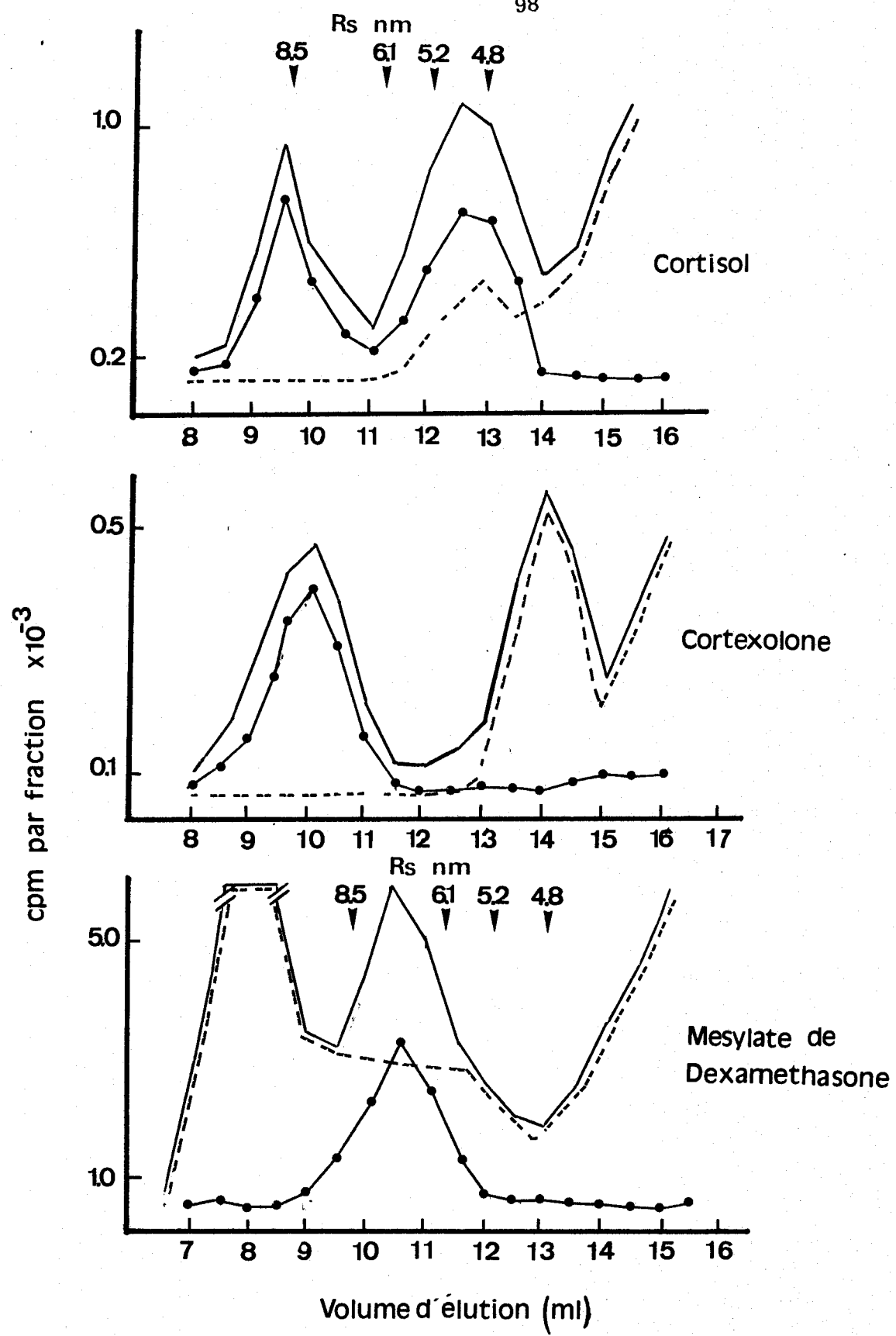


Figure 27 - Profil d'élution des complexes macromoléculaires cytosoliques formés avec le cortisol, la cortisolone et le mésylate de dexaméthasone. Les profils d'élution obtenus en présence du seul stéroïde tritié sont indiqués en trait plein (—), la même incubation effectuée avec un excès de 400 fois de dexaméthasone non radioactive figure en pointillé (---). La radioactivité liée spécifique, déduite des deux courbes précédentes est représenté par —●—. Les profils d'élution représentés sont obtenus après une incubation standard de 30 min à 37°C.

en 17 β , nous a incité à vérifier si des antiglucocorticoïdes non stéroïdiens (voir tableau III) possédaient une propriété similaire.

La trifluoperazine (TFP) est un dérivé de la phénothiazine connu pour son activité antagoniste de la calmoduline. Ce composé est néanmoins capable de se lier au GR avec une faible affinité ($K_{i0.6} \mu\text{M}$) et d'inhiber par ce biais l'induction de la Tyrosine Amino Transférase par la dexaméthasone dans les cellules d'hépatome de rat en culture. Son mode d'action est donc analogue à celui des antiglucocorticoïdes stéroïdiens. Nous avons donc procédé à une caractérisation des complexes GR-TFP du cytosol de thymocytes de la même façon que précédemment.

Néanmoins, la TFP n'étant pas disponible sous forme radioactive, nous avons du recourir à un marquage par échange de ligands après fractionnement des complexes TFP-récepteur afin de visualiser la présence du GR dans l'éluat. Le protocole suivant a été employé : après incubation des thymocytes en présence de 6 μM de TFP durant 30 min à 37°C, le cytosol est préparé et analysé par chromatographie d'exclusion de taille. Les fractions recueillies à 4°C sont supplémentées avec 1 mg/ml de sérum-albumine bovine et immédiatement incubées en présence de 30 nM de [^3H]TA, avec ou sans un excès de TA non radioactive. Après 5 heures d'incubation la radioactivité liée est mesurée.

Une activité de liaison spécifique est retrouvée dans la région 7-8 nm du chromatogramme, que ce soit en présence de TFP ou de RU 486, utilisé comme témoin (fig. 28). Le taux de recouvrement de l'activité de liaison semble beaucoup plus important avec la TFP qu'avec le RU 486. Ce résultat est probablement dû à une dissociation beaucoup plus rapide des complexes TFP-GR que des complexes RU 486-GR, ce dernier ayant une

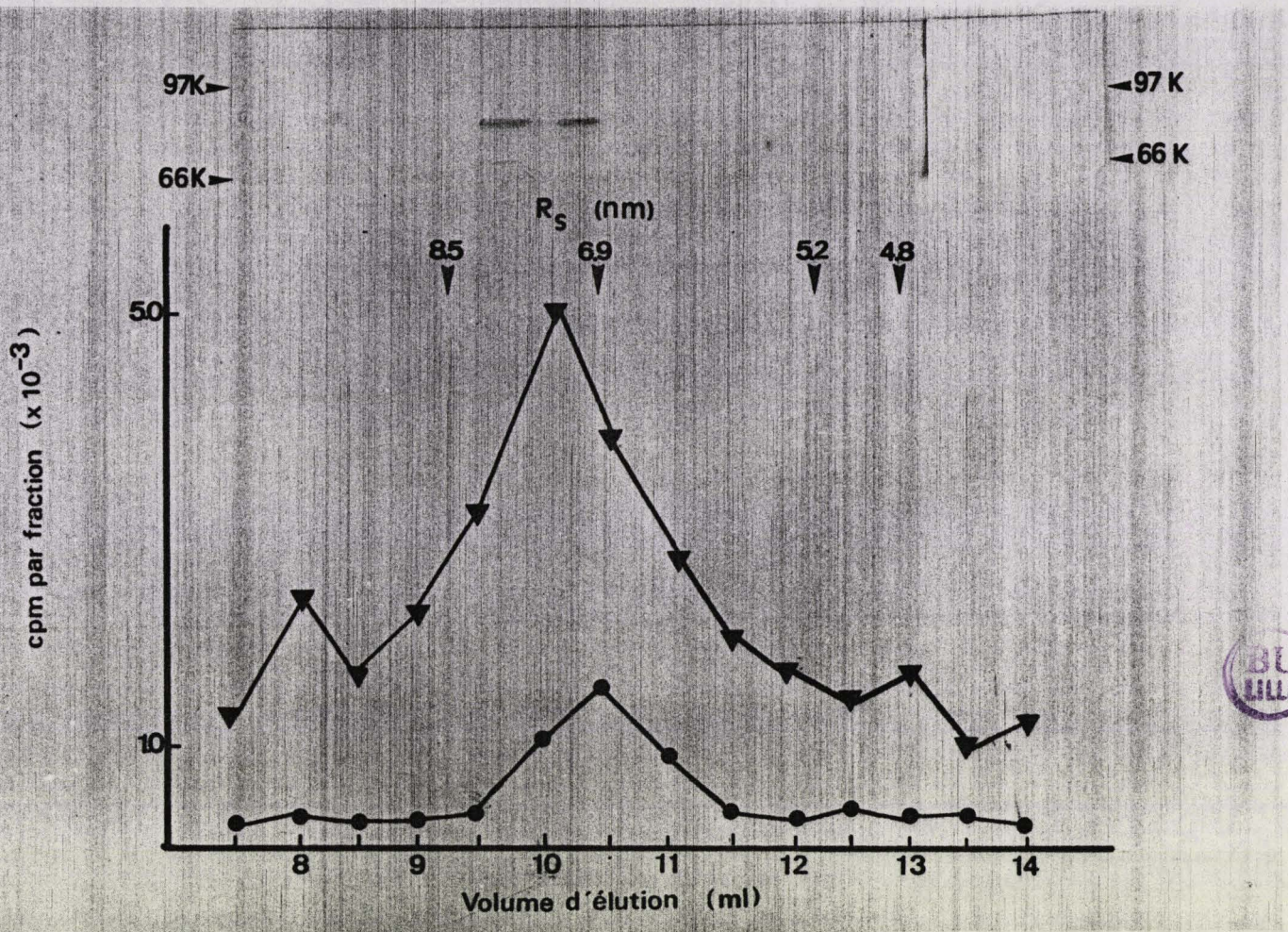


Figure 28 - Analyse des complexes GR-TFP par échange et Western-blot. Après préparation et analyse des complexes dans des conditions similaires à celles décrites pour les autres composés, des fractions de 0,5 ml sont recueillies et incubées (0,2 ml) avec ^3H TA avec ou sans excès de TA non radioactive. Le taux de radioactivité liée est mesuré par la technique du charbon-dextran.. La radioactivité liée au GR est tracée en fonction du volume d'élution pour la TFP (\blacktriangledown) et le RU 486 (\bullet). 0,1 ml de chaque fraction est analysé en Western-blot en utilisant l'anticorps monoclonal GR 49, spécifique du GR de rat. Les flèches indiquent la position des marqueurs de poids moléculaires ou de rayon de Stokes pour le Western-blot et la chromatographie d'exclusion de taille respectivement.

affinité environ 1000 fois supérieure pour le GR. La présence d'une activité de liaison résiduelle dans la région 7-8 nm n'est cependant pas une preuve absolue de l'absence totale de GR sous forme transformée. En effet, il est bien établi que les complexes transformés sont beaucoup plus stables que les complexes non transformés. Dans ce cas, l'absence de liaison spécifique dans la zone 5 nm ne résulterait que d'une impossibilité à échanger la TFP avec la ^3H TA. Nous avons donc analysé le même éluat par Western-blot en utilisant l'anticorps monoclonal GR 49 spécifique du GR de rat (Westphal *et al.*, 1982). Ce type d'analyse montre à nouveau la présence de matériel immunoréactif de poids moléculaire 90 KDa, caractéristique du GR, uniquement dans la région 7-8 nm. Il y a donc une parfaite corrélation entre l'activité de liaison détectée et la présence du polypeptide liant le stéroïde. Ces faits démontrent à nouveau qu'un antigluco-corticoïde non stéroïdien est également capable de stabiliser le GR sous une forme non transformée.

La stabilisation observée est clairement due à la fixation de la TFP au GR, et non à une détection du récepteur non lié qui aurait les mêmes caractéristiques que la forme non transformée. En effet, une analyse similaire faite sur des thymocytes non exposés à un ligand du GR ne permet pas de recouvrer, après élution du cytosol, une activité de liaison dans une quelconque région du chromatogramme (Tab.X) De plus, le matériel protéique révélé par GR 49 est localisé dans la zone de $R_s = 6$ nm. La TFP protège donc le GR d'une inactivation et d'une dissociation en cours d'analyse, ce qui est caractéristique d'un ligand à propriété antagoniste.

La forme 6 nm du GR pourrait être la forme native du GR, non liée à l'hormone (Radjovic *et al.*, 1985). Notre interprétation est différente

et nous supposons qu'elle résulte d'une dissociation partielle en cours d'analyse, car le seul fait d'ajouter du molybdate (20 mM) au tampon d'éluion suffit pour obtenir une activité de liaison dans la région 7-8 nm, alors que son addition au seul tampon d'homogénéisation n'est pas suffisante pour préserver l'activité de liaison (tableau XI). Le ligand et le molybdate ont dans ce cas un rôle similaire de protection contre l'inactivation (perte de la capacité de liaison) et la dissociation.

V - Conclusion.

L'ensemble des résultats obtenus démontre clairement que les antiglucocorticoïdes, quelle que soit leur structure chimique, stéroïdienne ou non, partagent une caractéristique commune de stabilisation des récepteurs des glucocorticoïdes sous la forme non transformée. Qu'en est-il des complexes persistant , après homogénéisation, dans le compartiment nucléaire ?

	Activité de liaison du GR	Forme (Rs)	Révélation GR 49
TFP	+	7-8nm	+
RU 486	+	7-8nm	+
GR non lié en tampon isotonique sans Na ₂ MoO ₄	-	6nm	+
GR non lié, cytosol préparé en tampon supplémenté en 20 mM Na ₂ MoO ₄	-	-	nd
GR non lié élué en présence de 20mM Na ₂ MoO ₄	+	7-8nm	nd

TABLEAU XI - Corrélation entre activité de liaison du GR, Rs et conditions d'analyse. L'activité de liaison est déterminée par échange après élution comme décrit dans le texte. La présence du polypeptide liant le stéroïde est révélée par l'anticorps monoclonal GR 49 spécifique du GR de rat.

G- EXTRACTION ET CARACTERISATION DES COMPLEXES NUCLEAIRES

I - Conditions de solubilisation

a) Purification des noyaux

Après incubation des thymocytes avec le stéroïde tritié, ceux-ci sont lavés puis homogénéisés par un appareil de Dounce dans un tampon hypotonique supplémenté avec 0,25M sucrose et 0,01 % de Triton X-100. L'homogénat est ensuite déposé sur une couche de sucrose 2,2M et centrifugé 45 minutes à 35000 rpm. Cette procédure permet d'obtenir des noyaux intacts et dénués de toute contamination cytoplasmique. Après purification, l'intégrité physique des noyaux est vérifiée en microscopie photonique, l'activité de la lactate-déshydrogénase (LDH), marqueur enzymatique du cytoplasme et la concentration en ADN sont mesurés dans l'homogénat de départ, le surnageant et le culot de centrifugation.

b) Procédé d'extraction

La solubilisation des complexes nucléaires peut être obtenue par diverses techniques. La technique la plus classique est l'extraction par 0,4-0,6 M KCl, ou par divers agents enzymatiques (endonucléases telle que la DNase I). Des essais préliminaires nous ont montré que l'utilisation de 0,4M KCl permettait de solubiliser et de caractériser 60 à 70 % des complexes GR-Dex ayant migré dans le noyau, mais que cette méthode était totalement inopérante vis-à-vis des complexes RU 486-GR nucléaires. De plus cette méthode a le désavantage de nécessiter l'emploi de molybdate, l'exposition à une haute force ionique étant un facteur transformant bien connu. Nous avons donc eu recours au chlorure de magnésium ($MgCl_2$) capable d'éluer les complexes liés in vitro à la DNA-cellulose, aux noyaux après incubation des cellules intactes (Carlstedt-Duke et al., 1984, Stevens et al.,

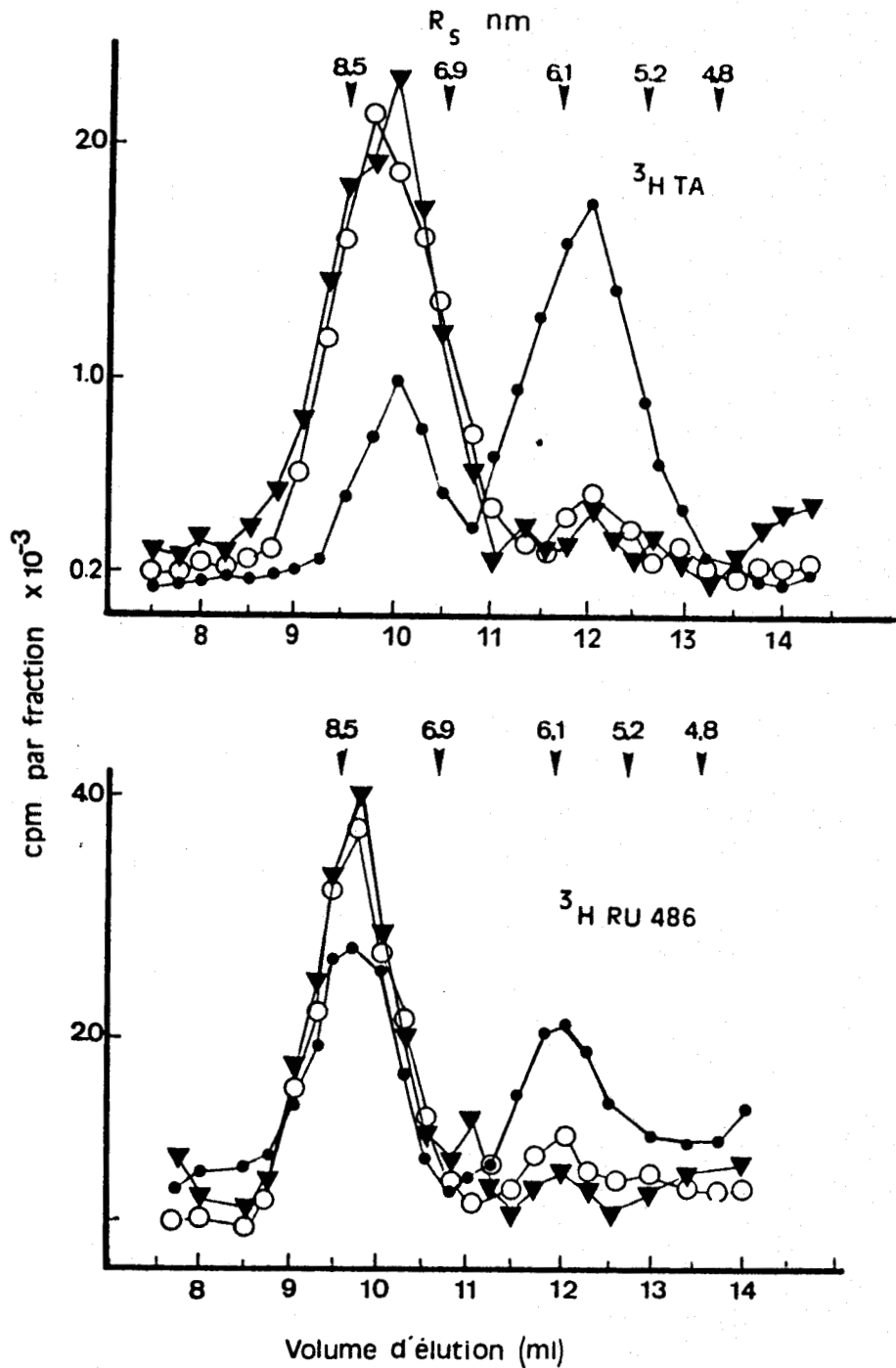


Figure 29 - Exposition des complexes cytoplasmiques GR-TA ou GR-RU 486 à 0,4 M KCl ou 50 mM MgCl_2 .

(A) Les complexes GR-TA non transformés sont obtenus par incubation des thymocytes à 4°C en présence de 40 nM de $^3\text{H TA}$ durant 2 heures. Le cytosol obtenu est exposé durant 45 min à 0,4 M KCl ou 50 mM MgCl_2 puis analysé par chromatographie d'exclusion de taille.

(B) Même expérience avec les complexes RU 486-GR. Un profil identique est obtenu avec la DOC, la progestérone et le DXB.

▼▼ : témoin ; ○○ : + MgCl_2 ; ●● : + KCl.

1978) sans provoquer la transformation du GR (fig. 29). Le taux d'extraction est proche de celui obtenu avec 0,4 M KCl (tableau XII) et la solubilisation des complexes RU 486-GR devient possible. Cette action du $MgCl_2$ peut avoir plusieurs origines : la hausse de la force ionique provoquée par l'addition de 50 mM $MgCl_2$ au tampon n'est pas négligeable puisqu'elle passe de 0,18 (isotonie) à 0,32, mais n'explique pas la capacité d'extraction des complexes RU 486-GR. L'utilisation de faibles concentrations de $MgCl_2$ (0,2 mM) est capable d'activer des endonucléases Mg^{2+} -dépendantes (Barrack et Coffey, 1983), cependant, une extraction identique peut être obtenue avec d'autres cations divalents (Ca^{2+}) ou polycations (spermidine) (Stevens *et al.*, 1978). D'autre part, l'utilisation de concentrations variables en $MgCl_2$ a une influence considérable sur l'état de compaction du matériel nucléaire et de fortes concentrations en Mg^{2+} sont capables de solubiliser la chromatine résiduelle associée à la lamina nucléaire (Barrack et Coffey, 1983, Dwyer et Blobel, 1976). La solubilisation des complexes RU 486-GR nucléaires pourrait donc résulter de ces différents types d'actions. Il est très probable que l'effet du $MgCl_2$ sur la structure de la chromatine permet une extraction des complexes RU 486-GR piégés physiquement dans le noyau.

II - Caractérisation des complexes nucléaires

a) A partir des noyaux purifiés

Comme attendu, les complexes TA-GR sont caractérisés sous une forme 5 nm, typique de la forme transformée. De façon surprenante, les complexes GR-RU 486 sont élués dans un pic homogène de $R_s = 8,2$ nm (fig. 30). L'exploitation mathématique des résultats permet d'exclure l'hypothèse d'une éventuelle contamination par des complexes cytosolubles,

Stéroïde	Liaison spécifique aux cellules intactes (cpm/10 ⁸ cellules)	Liaison spécifique dans le cytoplasme (cpm/10 ⁸ cellules)	Liaison spécifique au culot 4000G (cpm/10 ⁸ cellules)	Extrait nucléaire MgCl ₂ 50mM
TA (30nM)	12354	2408	9018	5730
Dex (40nM)	20152	6587	12964	9460
Cortisol (100nM)	42003	28780	13607	8096
Progestérone (40nM)	18515	16599	2191	1813
RU 486 (20nM)	41430	34387	7096	4037
Cortexolone (300nM)	25856	21010	4980	2724

TABLEAU XII - Extraction des complexes GR-stéroïdes localisés dans les noyaux préparés en présence de 0,1 % Triton X-100. La répartition de la radioactivité spécifiquement liée est mesurée par la méthode de Munck et Wira, après une incubation de 30 min à 37°C en présence du stéroïde à la concentration indiquée. La radioactivité liée au culot nucléaire est extraite par resuspension du culot dans 0,3 ml de tampon isotonique supplémenté avec 50 mM MgCl₂ et placée sous agitation douce durant 45 min à 4°C.

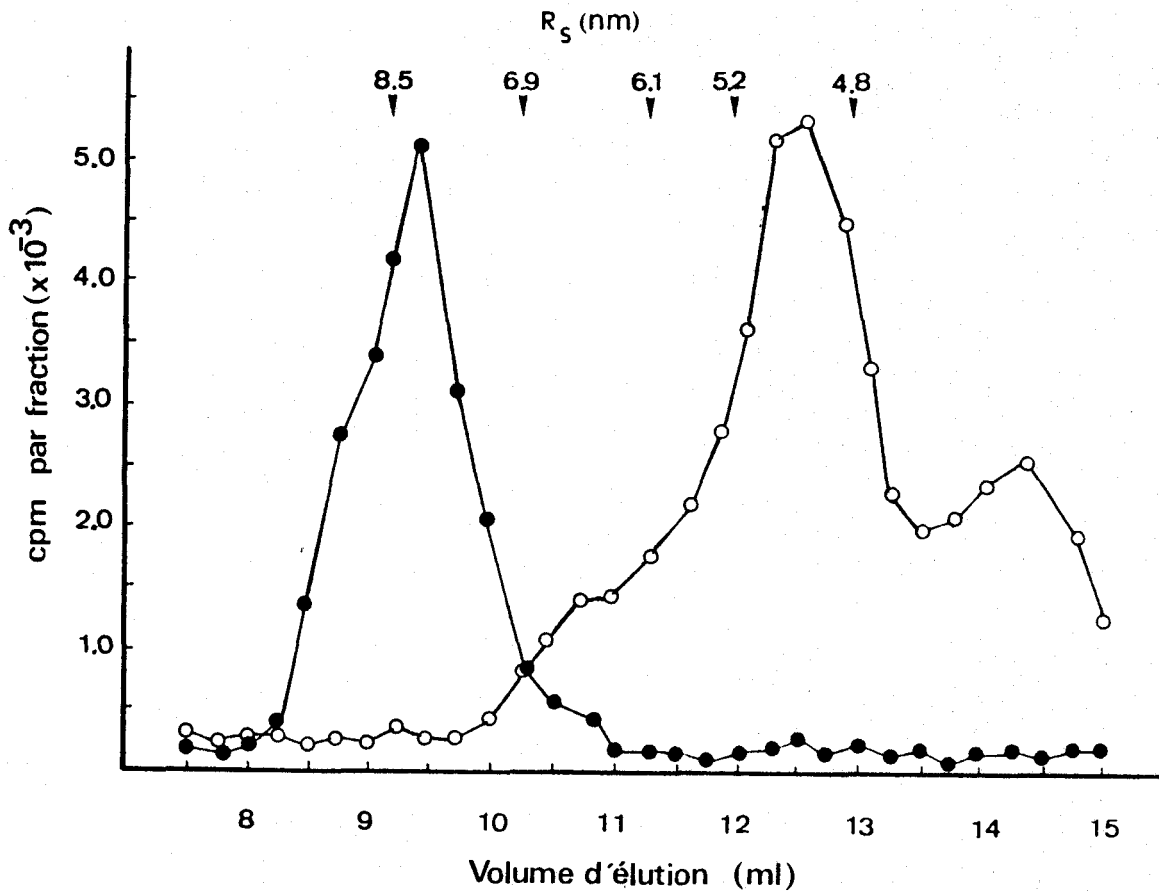


Figure 30 - Analyse par chromatographie d'exclusion de taille des complexes nucléaires GR-TA et GR-RU 486.

Les noyaux des thymocytes au préalable incubés 120 min à 37°C en présence de 20 mM de stéroïde tritié sont purifiés au travers d'une couche de sucrose 2,2 M. Les noyaux sont ensuite lavés 2 fois avec le tampon isotonique puis incubés 45 min en présence de 50 mM MgCl₂, à 4°C. L'extrait soluble est ensuite analysé. Le contenu en radioactivité des fractions de l'éluat est tracé en fonction du volume d'éluat pour les complexes [³H] TA-GR (○) et [³H] RU 486 (●●). Les complexes TA-GR ont été extraits d'une fraction nucléaire contenant 1,72 mg d'ADN avec 4 % d'activité résiduelle LDH, les complexes RU 486-GR à partir de 3,78 mg d'ADN, l'extrait nucléaire ayant 2 % d'activité LDH résiduelle.

que ce soit pour le RU 486 ou la TA (tableau XIII). De plus, leur extrapolation en vue d'une évaluation du transfert nucléaire est tout à fait compatible avec les données de la figure 21. Il faut remarquer que le rendement de purification des noyaux n'est pas maximal (60 % environ).

b) A partir du culot 4000G

Des expériences d'extraction et de caractérisation ont été réalisées de manière identique sur des culots 4000G. Une fois encore, les complexes extraits après incubation des thymocytes en présence d'agonistes sont sous la forme transformée (TA, Dex, cortisol), alors que les complexes liés au RU 486, à la progestérone ou à la déoxycorticostérone sont uniquement visualisés sous la forme 7-8 nm. La caractérisation des complexes GR-mésylate de dexaméthasone n'a pu être réalisée. En effet, si 22 % de la radioactivité nucléaire peut être solubilisé par 50 mM MgCl₂, le profil d'élution de l'extrait ne révèle aucune forme caractéristique du GR. Des résultats analogues ont été obtenus par Simons et al., 1983 dans les cellules HTC dans lesquelles seulement 1 % de l'extrait nucléaire 0,5 M NaCl, représentant 20 % de la radioactivité liée au noyau, s'avère être le GR marqué covalentiellement par ce dérivé. Il est donc fortement probable que la nature électrophile du mésylate de dexaméthasone soit responsable d'un marquage accru des composants nucléaires, distincts du GR et non extractibles dans ces conditions.

La caractérisation des complexes GR-agoniste et GR-antagoniste permet de mettre en évidence une différence de comportement très nette sans rapport avec la localisation intracellulaire des complexes. La localisation nucléaire des complexes n'est donc pas un reflet absolu de leur état de transformation. Wolfson, 1984 a également démontré la

	RU 486	Acétonide de Triamcinolone
Homogénat cellulaire :		
Nombre de cellules	1,4.10 ⁹	0,8.10 ⁹
Activité LDH (%)	100	100
Cpm liés spécifiquement	280560	92800
Teneur en DNA (mg) totale	12,32	7,12
Noyaux purifiés	7,56	3,44
Activité résiduelle en LDH (dans les noyaux purifiés)		
	2 %	4 %
Contamination théorique (cpm)	5611	4640
Cpm liés au GR extrait du noyau :		
en cpm	22652	37820
en pm/10 ⁹ cellules	0,32	1,30
Transfert nucléaire estimé	12 %	50 %

TABLEAU XIII - Purification des noyaux de thymocytes de rat ayant été incubés 120 min à 37°C en présence de 20 nM de stéroïde tritié. Y figurent les différents critères de pureté (LDH) et d'extraction (ADN, cpm) ainsi qu'une estimation du transfert nucléaire.

présence de récepteur de la progestérone non transformé dans les noyaux de cellules d'oviducte de poulet. De même, Picard et Yamamoto, 1987 ont constaté que l'accumulation nucléaire des complexes GR-Dex et GR-RU 486, visualisée par immunofluorescence, était comparable. Ces faits démontrent à nouveau la nature ambiguë de la mesure du transfert nucléaire par les méthodes classiques de fractionnement cellulaire. La transformation est très probablement un processus à deux étapes, dont la première (accumulation dans le noyau) n'est conditionnée que par la liaison du ligand, tandis que la seconde (liaison à l'ADN) n'est possible qu'en présence d'agonistes.

H- NATURE HETEROOLIGOMERIQUE DES COMPLEXES NON TRANSFORMES STABILISES PAR PAR LES ANTIGLUCOCORTICOIDES.

Les résultats obtenus dans les conditions définies précédemment et plus "physiologiques" mettent donc en cause la validité des résultats obtenus par les méthodes d'analyse in vitro. Il fallait donc vérifier si le complexe non transformé stabilisé par les antiglucocorticoïdes était identique, d'un point de vue composition moléculaire, au récepteur non transformé stabilisé par le molybdate. Nous avons donc utilisé des sondes immunologiques afin de définir les composants participant à la structure du récepteur non transformé.

L'anticorps noté GR 49 est un anticorps monoclonal dirigé contre le polypeptide liant le stéroïde du GR de rat, qu'il reconnaît à la fois sous sa forme native transformée ou non transformée, ou sous une forme dénaturée (Westphal et al., 1982, Housley et al., 1985). Le deuxième anticorps monoclonal utilisé est "Ac 88". Reconnaisant une protéine

majeure dans le cytosol du champignon aquatique *Achlya ambisexualis*, cet anticorps monoclonal s'est avéré être une sonde spécifique de la protéine de choc thermique (hsp 90) associé au GR (Sanchez et al., 1987, Mendel et al., 1986).

I - Le GR non transformé est associé à la hsp 90.

a) Analyse de la répartition de la hsp 90 dans l'éluat de chromatographie d'exclusion de taille.

La figure 31 résume les résultats concernant la répartition de la hsp 90 dans diverses situations. En présence de récepteur transformé (profil A), l'analyse en Western-blot du contenu de l'éluat en hsp 90 révèle une localisation de cette protéine dans la zone 6-7 nm. Son coefficient de sédimentation est d'environ 7S (voir fig. 34) et donc parfaitement en accord avec une structure dimérique ($M_{app} = 183$ KDa) déjà décrite par d'autres auteurs (Nemoto et al., 1987, Weslch et Feramisco, 1987).

La fixation d'une ou plusieurs molécules d'anticorps au récepteur est susceptible d'augmenter le rayon de Stokes du complexe. Dans ce cas, le pic de radioactivité sera déplacé vers la gauche. La répartition de la hsp 90 a été analysée dans le cas du GR non transformé (profil d'éluat B) et dans le cas du GR non transformé incubé en présence de GR 49 (profil d'éluat C). Dans le premier cas (B), la majorité du matériel révélé par Ac 88 reste localisée en 6-7 nm. Cependant, une faible partie s'avère être présente dans la région 7,2-7,4 nm, conjointement à l'activité de liaison du GR. Cette association activité de liaison/présence de la hsp 90 est confirmée, sans ambiguïté possible, par le résultat obtenu en C : la fixation du GR 49 au récepteur stabilisé sous sa forme non transformée

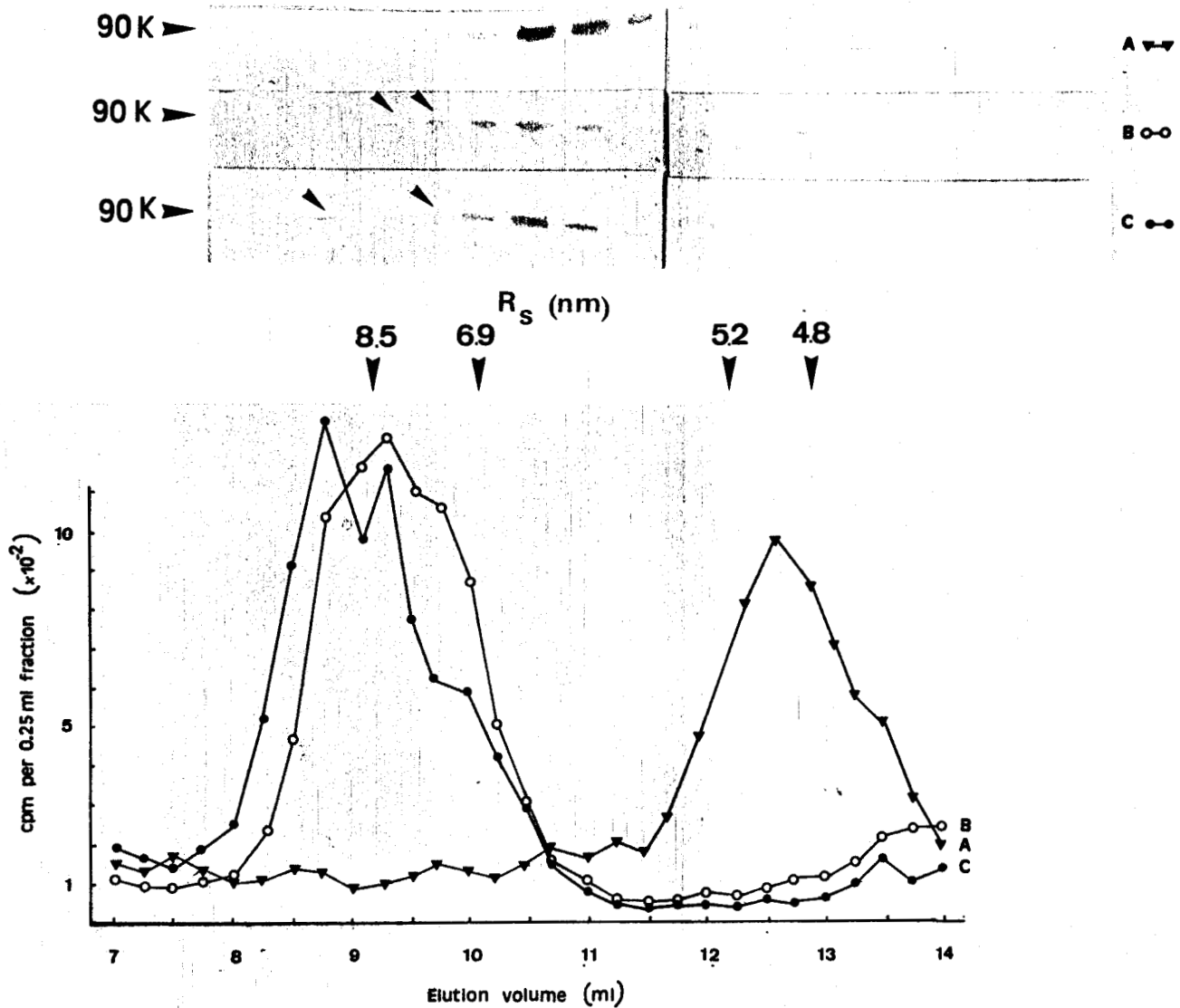


Figure 31 - Coélution des complexes GR-RU 486 et de la hsp 90 après chromatographie d'exclusion de taille.

Les profils d'élution A, B, C correspondent respectivement aux thymocytes incubés en présence de ^3H TA (30 nM, 30 min à 37°C) en présence de ^3H RU 486 avec une incubation ultérieure du cytosol avec l'anticorps GR 49 durant 1 nuit à 4°C (dilution finale 1/10). Les fractions des éluats A, B, C sont testées pour leur contenu en hsp 90 par western-blot (révélation par AC 88, la partie supérieure de la figure montre la zone correspondant aux poids moléculaires compris entre 110 KDa et 80 KDa)

provoque un déplacement concomitant de l'activité de liaison et d'une faible proportion de la hsp 90.

Ces faits démontrent donc clairement que le récepteur non transformé est associé à la hsp 90, dans des conditions physiologiques. Ce résultat est identique à celui obtenu par d'autres en présence de molybdate, et ne relève donc pas d'un artefact dû à son utilisation. L'hypothèse d'une association non spécifique provoquée par l'excès de hsp 90 dans le cytosol (0,5 % contre 0,01 % pour le récepteur) reste encore envisageable, mais très peu probable, si l'on se souvient que nous avons pu caractériser le récepteur non transformé à partir de noyaux purifiés où le taux en hsp 90 est sensiblement équivalent à celui du GR.

b) Hétérogénéité de la forme non transformée

Le profil d'éluion B de la figure 31 montre une nature hétérogène du GR non transformé. Le pic de $R_s = 8,3$ nm est observé de façon inconstante dans le cytosol de foie ou de thymocytes de rat. Cette forme semble très peu stable puisque diverses techniques de purification du GR aboutissent à une forme homogène de $R_s 7,2$ nm. La forme 8,3 nm s'avère sensible à l'action d'une ribonucléase spécifique des RNA double brin (RNase de venin de cobra) (Sablonnière *et al.*, 1988a).

Nous constatons que sur le profil d'éluion C que la forme 7,2 nm est déplacée par GR 49 vers une forme de 9,2 nm, alors que la forme 8,2 nm n'apparaît pas modifiée. Cependant, l'analyse en Western-blot de ce pic par GR 49 permet la révélation du GR en 90 kDa, suggérant que l'épitope reconnu par le GR 49, localisé dans la région A/B est masqué dans la forme 8,3 nm native par un RNA 5S (Sablonnière *et al.*, 1988b).

c) Utilisation de l'anticorps monoclonal Ac88.

L'anticorps Ac88 dirigé contre la hsp 90 ne reconnaît celle-ci que sous forme dénaturée ou native dimérique, non complexée du polypeptide liant l'anthéridiol du cytosol d'*Achlya ambixexualis*, ou au récepteur de la progestérone du cytosol d'oviducte de poulet (Riehl *et al.*, 1985). Le domaine reconnu par Ac 88 est donc masqué, ou subit une modification conformationnelle lors de l'association hsp 90-polypeptide liant le stéroïde.

Nous avons néanmoins voulu vérifier si l'Ac 88 était également incapable d'altérer les caractéristiques physicochimiques du GR de thymocytes de rat non transformé stabilisé par les antigluco-corticoïdes. Seule une incubation avec une forte concentration en Ac 88 nous a permis de mettre en évidence une altération du rayon de Stokes et du coefficient de sédimentation (fig. 32). En effet, le rapport antigène/anticorps absolument requis pour obtenir le déplacement peut être estimé à environ 1/5 environ (soit 50 μ l d'Ac 88 à 1,7 mg/ml pour 20 μ g de hsp 90). Le poids moléculaire apparent des complexes Ac 88-GR-RU 486 est compatible avec la fixation d'une molécule d'anticorps par molécule de récepteur non transformé (tableau XIV). Nous pouvons également remarquer que, contrairement à GR 49, cet anticorps est capable de déplacer presque totalement les formes 7,2 et 8,2 nm vers des formes de 9,2 et 11,2 nm respectivement. Nous avons vérifié par ailleurs que ce déplacement sélectif était également observé avec des préparations homogènes des formes 7,2 ou 8,2 nm.

Lors d'expériences similaires menées sur le dimère libre d'hsp 90, les résultats obtenus mettent en évidence une différence quant au

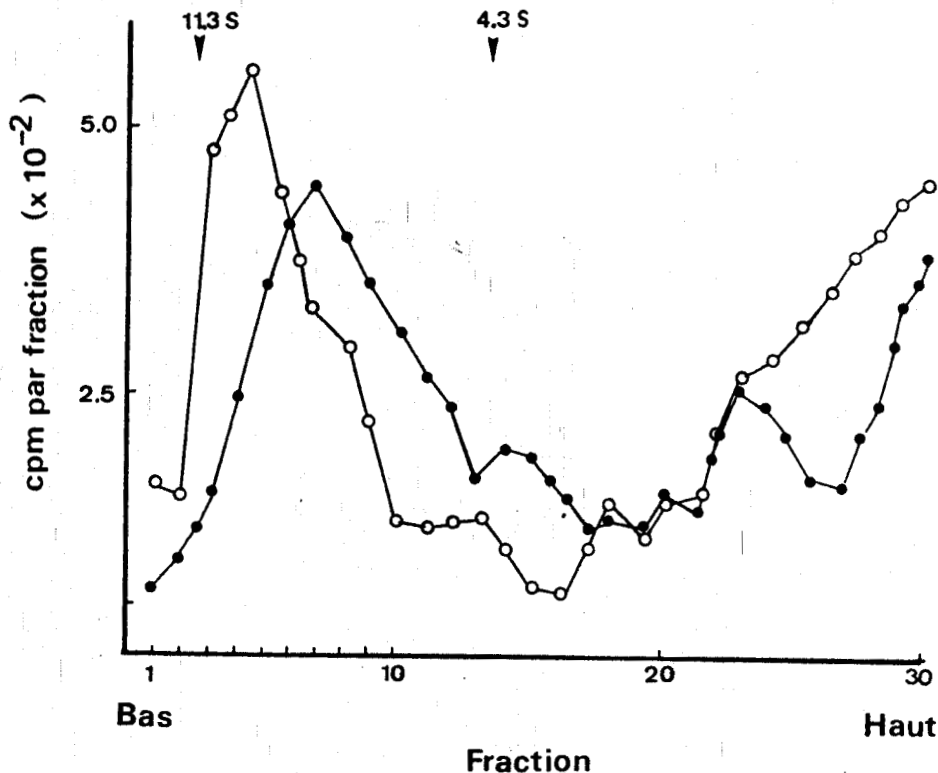
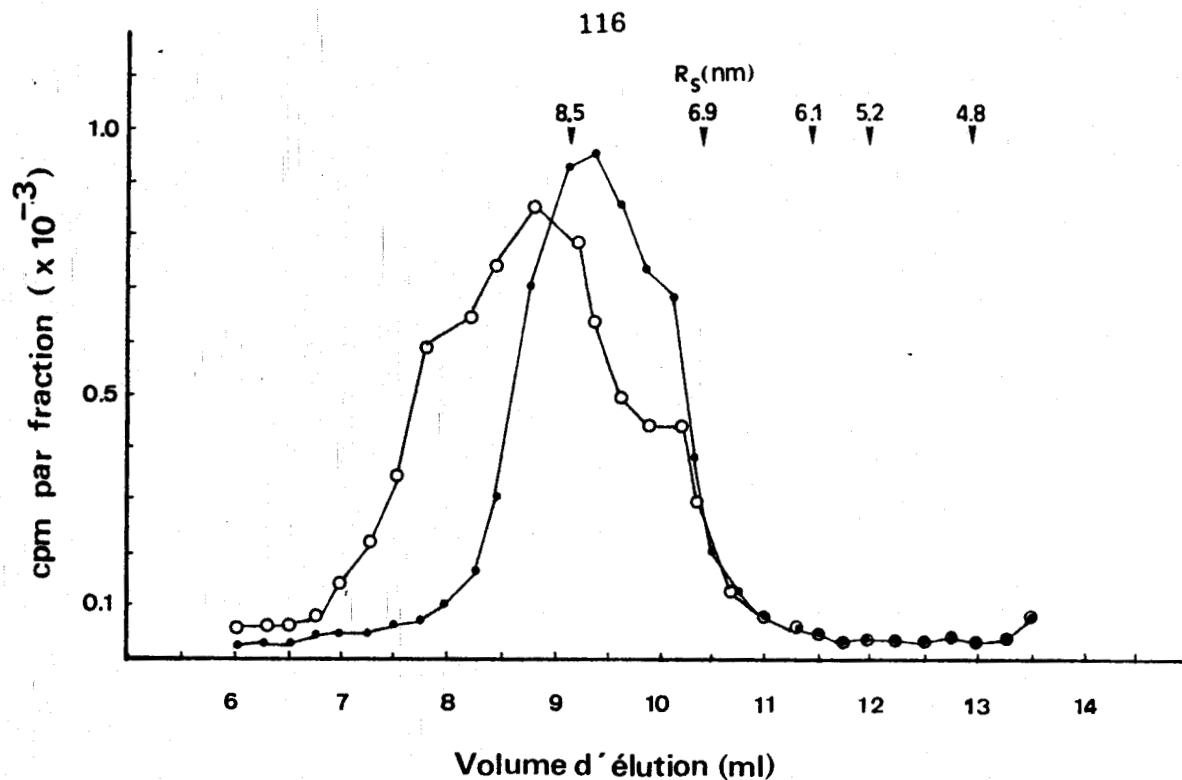
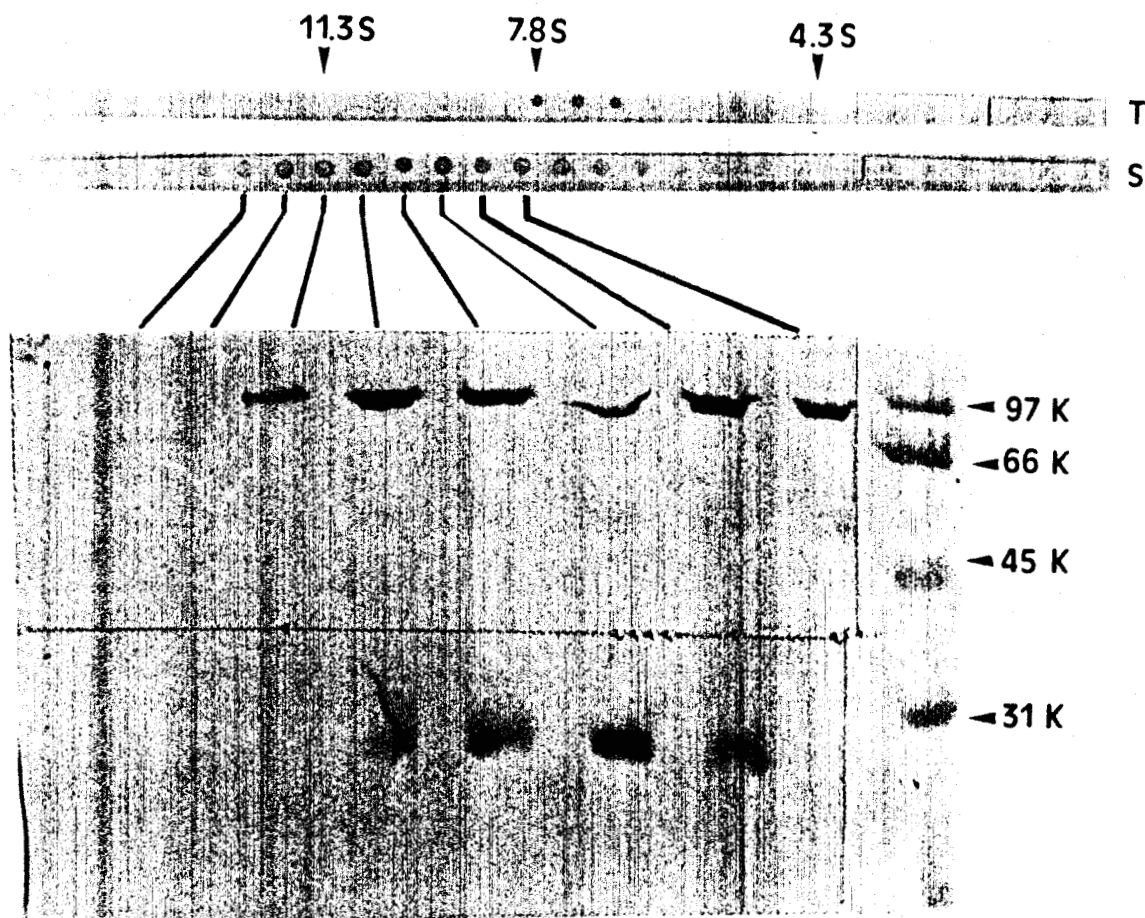


Figure 32 - Modification du rayon de Stokes (A) et du coefficient de sédimentation des complexes GR-RU 486 (●●) en présence de l'anticorps monoclonal AC 88 (○).

La chromatographie d'exclusion de taille est réalisée dans les conditions habituelles, le gradient de saccharose est préformé dans du tampon contenant du molybdate et centrifugé 17 h à 4°C, 45 000 rpm. Des incubations de contrôle en présence d'une même concentration d'IgG de souris, non spécifique ou d'un excès d'hsp 90 partiellement purifiée ne permettent pas la mise en évidence d'une variation ni du R_s , ni du coefficient de sédimentation. La liaison AC 88-GR non transformé est donc spécifique.

A. Gradient de saccharose



B. Exclusion de taille

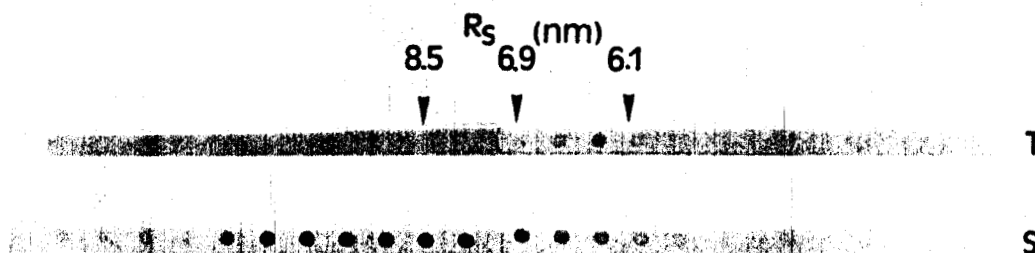


Figure 33 - Analyse par dot-blot et western-blot des fractions des gradients de saccharose et de chromatographie d'exclusion de taille pour leur contenu en hsp 90 libre et en hsp 90 liée à l'anticorps monoclonal AC 88. La bande observée en 31KDa n'est visualisée uniquement lorsque la concentration en antigène est importante et résulte donc probablement d'une protéolyse partielle ou d'une réaction croisée. T : témoin ; S : incubat en présence d'Ac 88.

Paramètre physicochimique	RU 486-GR		RU 486-GR + Ac 88		hsp 90 libre		hsp 90 + Ac 88	
Rayon de Stokes (Rs en nm)	7,2	0,2(n=5)	9,2	0,1(n=3)	6,7	0,28(n=2)	10,3	0,3(n=2)
	8,2	0,3(n=3)	11,32	0,11(n=3)				
Coefficient de sédimentation $S_{w,20}$	8,2	0,2(n=2)	9,9	0,12(n=2)	6,5	0,3(n=2)	10,5	0,1(n=2)
Poids moléculaire apparent (KDa)	249-284		385-473		183		457	
Différence de poids moléculaire			136-189				273	

TABLEAU XIV - Paramètres physicochimiques des complexes GR-RU 486 et de la hsp 90 en présence ou en l'absence de l'anticorps monoclonal AC88. Le poids moléculaire apparent M_{app} est calculé selon la formule $M_{app} = 4224 \times R_s \times S_{w,20}$, détaillée dans le tableau IX, p.89

nombre de molécules d'anticorps fixés (fig. 33 et tableau XIII). Dans ce cas, nous pouvons calculer que le dimère libre fixe deux molécules d'anticorps Ac 88.

Deux conclusions peuvent être déduites de ces observations :

(1) L'interaction hsp 90-PR ou hsp 90-récepteur à antheridiol pourrait ne pas être strictement identique à l'interaction hsp 90-GR. Il faut cependant garder à l'esprit que les tests effectués par Riehl *et al.*, 1985 l'ont été dans des conditions différentes des nôtres, notamment en regard de l'excès d'Ac 88 utilisé. En effet, il n'est possible de visualiser le déplacement des pics de radioactivité qu'en présence d'un fort excès d'Ac 88 (concentration finale de 0,34 mg/ml, excédant donc la concentration cytosolique en hsp 90 d'au moins 3 fois). Ceci pourrait expliquer nos résultats qui sont en contradiction avec ceux de Riehl *et al.*, 1986. De même Howard et Distelhorst, 1988 ne parviennent pas à immunoprécipiter le GR de souris non transformé en utilisant l'Ac 88 à une concentration finale de 0,05 mg/ml (donc un rapport hsp 90/Ac 88 sensiblement équivalent à l'unité). (2) L'interaction GR-hsp 90 ne permet la fixation que d'une seule d'Ac 88 alors que le dimère libre fixe deux molécules d'Ac 88. Dans l'hypothèse d'une association du GR à un dimère d'hsp 90, deux modèles peuvent expliquer les résultats obtenus et sont décrits dans la figure 34. Nous ne pouvons néanmoins exclure la possibilité de la présence d'une seule molécule d'hsp 90 dans le complexe non transformé. Il est nécessaire pour trancher entre ces deux hypothèses, de déterminer les domaines d'interaction hsp 90-Ac 88 et hsp 90-GR.

II - La hsp 90 n'est plus associée au GR après transformation

Les conditions de réaction des anticorps GR 49 et Ac 88 étant

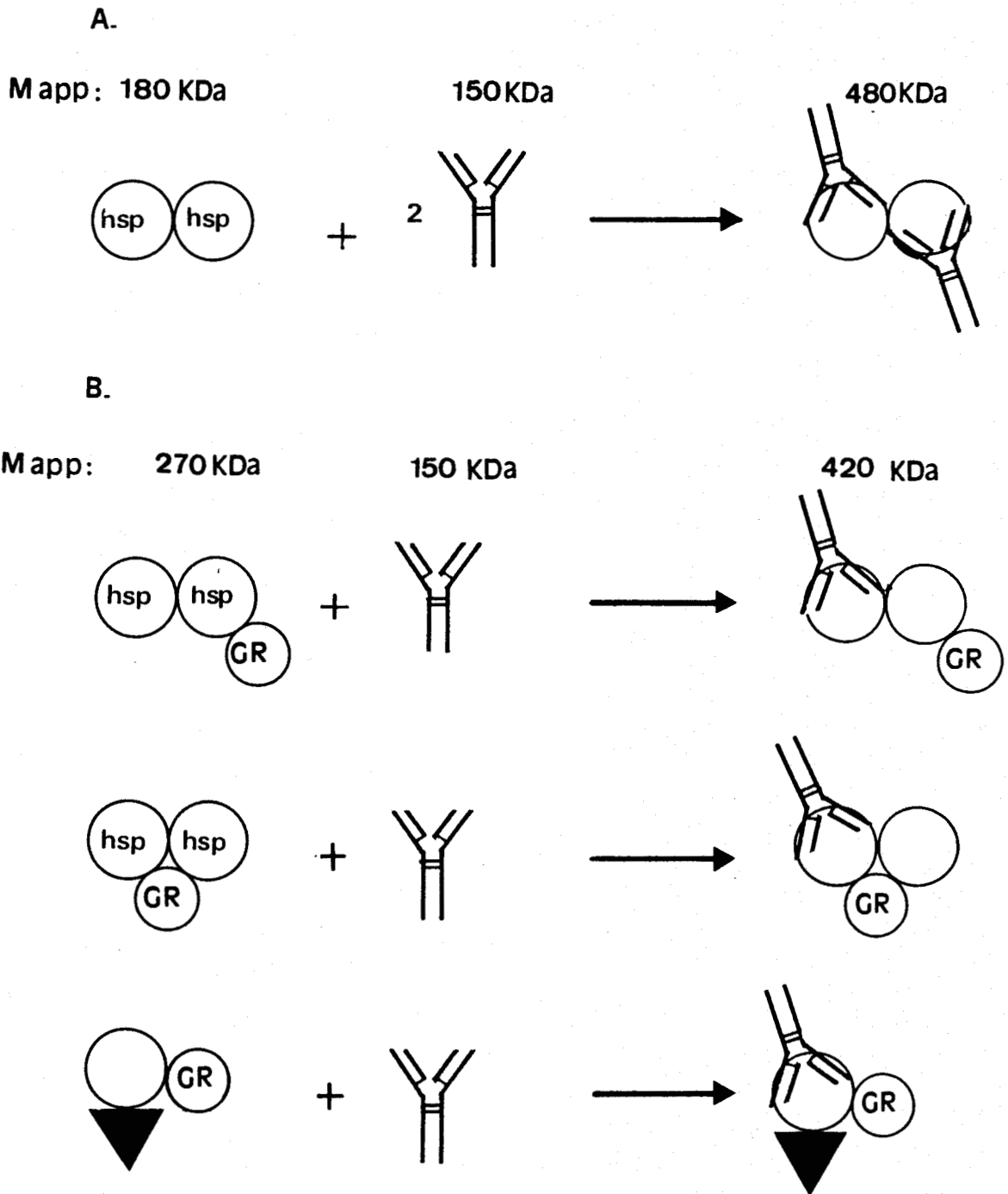


Figure 34 - Schémas d'interaction entre la protéine de choc thermique de 90 KDa dimérique libre (A) ou complexée à l'anticorps monoclonal AC 88 (B) permettant de rendre compte des résultats obtenus. (Mapp : poids moléculaire apparent calculé d'après les caractéristiques hydrodynamiques).

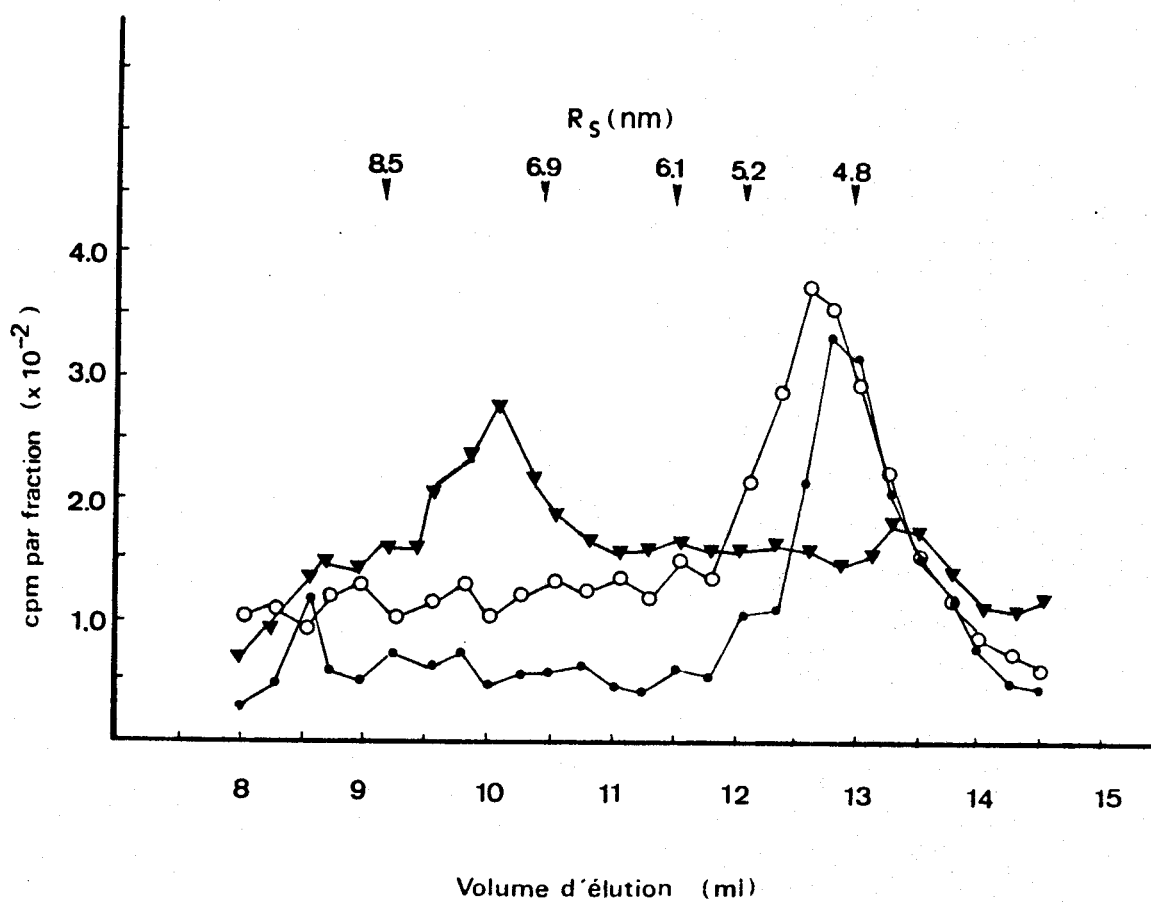


Figure 35 - Analyse par chromatographie d'exclusion de taille des complexes transformés Dexa-GR (●), Dexa-GR incubés une nuit en présence de AC 88 (○) ou GR 49 (▼).

bien précisées, nous avons donc effectué les mêmes analyses sur le récepteur transformé, de $R_s = 5$ nm. La figure 35 montre que seul GR 49, anticorps spécifique de la sous-unité liant le stéroïde, est capable de déplacer la radioactivité liée, éluée en 5 nm vers une forme de 7,2 nm. Cet accroissement de R_s (2,2 nm) est tout à fait similaire à celui obtenu pour les complexes non transformés. Ces résultats montrent donc que la hsp 90 se dissocie du GR lors de la transformation, processus déclenché uniquement en présence d'agonistes dans les cellules intactes.

I - CONCLUSION GENERALE. PERSPECTIVES.

L'estimation du transfert nucléaire, bien qu'utilisable uniquement dans un but comparatif, souligne clairement l'accroissement d'affinité pour le compartiment nucléaire des complexes récepteur des glucocorticoïdes-agonistes. Dans des conditions identiques, le transfert nucléaire induit par les antagonistes est nettement réduit. La localisation nucléaire de dérivés stéroïdiens tritiés est souvent considérée comme étant un témoin fidèle de l'état de transformation du récepteur ayant fixé ces stéroïdes. Nos résultats démontrent clairement qu'il n'en est rien, des récepteurs non transformés pouvant être extraits des noyaux purifiés. L'existence de sites de liaison nucléaire distincts du récepteur peut donc conduire à une évaluation erronée du transfert nucléaire. L'existence de tels sites surnuméraires a été décrite non seulement pour le RU 486, mais aussi pour la déoxycorticostérone dans les cellules pituitaires de rat At-T20 (Svec et Rudis, 1984). Aucun rôle physiologique ne leur a été attribué.

L'effet de stabilisation de la forme non transformée par tous les dérivés doués d'activité antiglucocorticoïde mérite d'être souligné. Que leur activité biologique résulte d'une modification en 11 ou en 17, les stéroïdes antiglucocorticoïdes ne génèrent, dans les cellules intactes à 37°C, et donc dans des conditions transformantes optimales, qu'une forme de GR de haut poids moléculaire composée d'une sous-unité liant le stéroïde et d'au moins une protéine de choc thermique de 90 KDa. La participation d'un RNA 5S à la structure de ce complexe est également mise en évidence.

La trifluoperazine, une phénothiazine se liant au GR avec une faible affinité, mais douée d'activité antiglucocorticoïde, est également capable de stabiliser le GR sous sa forme non transformée. De toute évidence, tous les antiglucocorticoïdes testés agissent selon un mécanisme d'action identique, par inhibition de la transformation, processus concomittant à une dissociation du complexe GR-hsp 90.

Nos résultats semblent en parfait accord avec les données obtenues par d'autres équipes ayant mené leurs expérimentations sur des cellules intactes, données qui soulignent également le problème de l'extrapolation de résultats obtenus sur des fractions acellulaires aux phénomènes se déroulant effectivement dans les cellules entières.

Rapjert et al., 1987 ont étudié la transformation des complexes RU 486-GR selon deux critères : (1) la fixation des complexes, formés et transformés dans le cytoplasme de cellules lymphoblastiques IM-9, à des séquences nucléotidiques du LTR de MMTV et du gène de l'hormone de croissance ; (2) la régulation négative du taux intracellulaire de GR, et la diminution de son temps de demi-vie, qui sont deux propriétés liées à

l'état transformé du GR dans les cellules intactes. Les complexes RU 486 - GR interagissent de manière comparable aux complexes Dex-GR avec les fragments de gène purifiés, alors que seule la Dex est capable de provoquer une baisse du taux de récepteur intracellulaire et une chute de son temps de demi-vie.

L'étude de la liaison du GR aux séquences d'ADN dites GRE aboutit aux mêmes discordances : les récepteurs partiellement purifiés et transformés, qu'ils soient liés à la Dex, au RU 486 ou non liés, interagissent de manière identique avec des séquences GRE purifiées (Willman et Beato, 1987), contrairement aux complexes générés dans les cellules intactes, lesquels ne protègent les GRE de la méthylation par le diméthylsulfate qu'en présence de Dex, et non de RU 486 (Becker *et al.*, 1987).

Un parallèle peut être établi avec les complexes formés par le mésylate de dexaméthasone. Les complexes covalents transformés *in vitro* sont également capables d'interagir avec les séquences de LTR de MMTV (Miller *et al.*, 1984), alors que dans les cellules intactes, les complexes GR-Dex-Mes sont totalement incapables d'induire les remaniements de la structure chromatinienne induits par les complexes GR-Dex (Sistare *et al.*, 1987, Richard-Foy *et al.*, 1987b). Il est donc remarquable que seuls les résultats obtenus sur les cellules intactes permettent la mise en évidence d'une différence de comportement notable des complexes agonistes-GR et antagonistes-GR.

Ces résultats, adjoints aux nôtres, étayent donc fortement l'hypothèse d'un mécanisme d'action commun des antigluco-corticoïdes, par inhibition de la transformation, dont une étape essentielle serait la

dissociation du complexe hétéroooligomérique formé d'une sous-unité liant le stéroïde et d'au moins une protéine de choc thermique hsp 90.

Les hypothèses apportées pour expliquer l'effet antiprogestatif du RU 486 souffrent de contradictions similaires à celles rencontrées dans le domaine des antigluco-corticoïdes : le taux de transformation *in vitro* du PR lié au RU 486 est moindre (Moudgil et Hurd, 1987), mais le PR transformé purifié, lié au RU ou non lié, se fixe avec une affinité identique aux séquences nucléotidiques régulatrices (Bailly *et al.*, 1986). D'autre part, Mullick et Katzenellenbogen, 1986 décrivent la formation d'un complexe de taille anormale (6S au lieu de 4S) lorsque des cellules intactes sont incubées en présence de RU 486.

Les dérivés triphénylés antioestrogéniques de la famille du tamoxifène sont doués d'activité biologique variable selon l'espèce, le tissu, la durée du traitement et le type de réponse étudiée. Ces dérivés sont capables de s'opposer à l'induction de synthèse de diverses protéines provoquée par les oestrogènes. Une transformation partielle et/ou altérée semble être en majeure partie responsable de ces effets, comme le suggèrent les données obtenues *in vitro* par le groupe de Rochefort (Rochefort *et al.*, 1983). Dans la cellule intacte, les informations obtenues sont nombreuses mais difficilement intégrables à un modèle d'action cohérent et univoque. En effet, si les effets antagonistes sur l'inhibition de synthèse de protéines semblent dus à une compétition pour la liaison au ER, l'effet antiprolifératif de ces composés pourrait non pas être médié par un effet génomique, mais par un effet antimitotique propre à ces dérivés, qui s'accumuleraient dans les noyaux des cellules via le récepteur (Rochefort, 1987).

Il est donc important de privilégier l'utilisation des antiglucocorticoïdes pour étudier plus avant le mécanisme d'action des antihormones stéroïdiennes puisque répondant à un modèle unique. Il nous semble indispensable de déterminer clairement la signification de l'association GR-hsp 90. Pour ce faire, deux approches expérimentales sont envisagées au laboratoire : (1) Provoquer la déplétion cellulaire en hsp 90, en ayant recours à l'ARN antisens de l'ARN-m de la hsp 84 de la souris. Si la hsp 90 possède un rôle de blocage de l'activité transcriptionnelle, les GR des cellules déplétées en hsp 90 seront actifs de façon constitutive. L'amplification de la réponse biologique par les glucocorticoïdes sera également visualisée en présence d'antiglucocorticoïdes. (2) La microinjection de complexes RU-486-GR transformés *in vitro* et partiellement purifiés doit permettre également la mise en évidence de l'induction d'une réponse biologique dans les cellules ainsi traitées.

Enfin, et à plus long terme, il faut parvenir à concevoir des approches expérimentales permettant de déterminer par quel biais les agonistes sont capables d'induire la transformation du GR. Une fois encore, une comparaison avec les dérivés antiglucocorticoïdes apparaît comme étant un outil de choix.

APPENDICE TECHNIQUE

I - PREPARATION ET INCUBATION DES THYMOCYTES DE RAT

1) Tampons et milieu

- Solution de Hank : $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,06g, KH_2PO_4 0,06g, NaCl 8,00g, MgSO_4 0,20g, glucose 1,00g, NaHCO_3 0,35g, H_2O qsp 1000 ml, pH 7,4 à 20°C.

- Milieu de culture : Minimal Essential Medium avec sels de Earle (Serva, Heidelberg) ajusté à pH 7,4 avec 20 ml d'une solution 1M d'Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine sulfonic acid) pH 7,6 à 20°C, 1 % de glutamine, 2 % Ultrosor SF (IBF).

- Solution de bleu trypan : 0,4 % de bleu trypan dans une solution de NaCl 0,9 % (p/v) tamponnée à pH 7,4 par 20 ml d'Hepès 1 M, pH 7,6 à 20°C.

2) Protocole

Les thymus sont prélevés sur des rats mâles Wistar (150-250g) tués par décapitation, surrénalectomisés 3 à 5 jours auparavant. Après avoir ôté les nodules et autres afférences, les thymus sont placés dans la solution de Hank. Les thymus sont dilacérés à l'aide de ciseaux jusqu'à obtenir une solution homogène, la suspension cellulaire est ensuite filtrée sur un filtre de nylon. Les thymocytes sont lavés 2 fois par la solution de Hank.

Lors d'une utilisation immédiate, les cellules sont ajustées à une concentration de $3 \cdot 10^8$ cellules par ml. Les thymocytes peuvent également être maintenus en survie durant 24 à 48 heures dans du milieu de culture (à une concentration de 10^7 cellules par ml) dans une atmosphère air/ CO_2 (95:5) à 37°C. La viabilité des cellules est estimée par le test d'exclusion du bleu trypan (mélange v/v de la suspension cellulaire et de

la solution de bleu trypan).

Les thymocytes sont incubés à 37°C dans du milieu de Hank ($3 \cdot 10^8$ cell./ml) en présence de stéroïde tritié, en présence ou en l'absence d'un excès (x 200) de stéroïde non marqué. L'incubation est arrêtée par l'ajout de 2 à 3 volumes de la solution de Hank à 4°C, les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec cette même solution.

II - PREPARATION DU CYTOSOL ET DES NOYAUX CELLULAIRES

1) Tampons

- Tampon isotonique (tampon A) : K_2HPO_4 16 mM, pH 7,4 à 4°C, 130 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 20 mM β -mercaptoéthanol, 1 mM EDTA;

- Tampon B : T.E.S. 20 mM, pH 7,4 à 4°C; 20 mM β -mercaptoéthanol, 3 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 0,25 M saccharose.

- Solution de saccharose 2,2 M: tampon A + 2,2 M saccharose.

2) Protocole

a) Séparation rapide des fractions cytoplasmiques et nucléaires :

Après incubation, les thymocytes sont dilués dans de la solution de Hank à 4°C, centrifugés et lavés 2 fois avec cette solution. Les cellules sont ensuite reprises dans le tampon A (0,1 ml pour 10^8 cellules) supplémenté avec 1 mM PMSF et 10 % glycérol, et homogénéisées avec un appareil de Dounce (On peut également obtenir une lyse totale des cellules avec 0,5 % de Triton X-100, procédé compatible avec une analyse ultérieure des complexes cytosoliques en chromatographie d'exclusion de taille).

L'homogénat est ensuite centrifugé à 4000 rpm durant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est considéré comme étant la fraction cytosolique, le culot est lavé deux fois avec le tampon A et est considéré comme étant la fraction

"nucléaire".

b) Purification des noyaux

b.1 - Préparation des noyaux

Les thymocytes incubés sont lavés deux fois par la solution de Hank et repris par le tampon B (0,4 ml pour 10^8 cellules). Les cellules sont lysées par un appareil de Dounce avec un piston à jeu large, l'homogénat est déposé sur une couche de sucrose 2,2 M (3 ml) préparée dans le tampon A. La centrifugation est effectuée à 35000 rpm durant 45 minutes à 4°C (rotor Beckman SW 60). Le surnageant et le culot sont recueillis. Le culot (fraction nucléaire purifiée) est ensuite lavé 2 fois avec le tampon B.

b.2 - Extraction des complexes nucléaires

Les fractions nucléaires sont remises en suspension dans le tampon A additionné de 0,4 M KCl ou 50 mM MgCl₂. La solution est mise en agitation lente à 4°C durant 45 min, puis centrifugée 10 min à 4000 rpm, 4°C. Le surnageant est analysé par chromatographie d'exclusion de taille, le culot est soumis à une extraction par le méthanol afin de déterminer la radioactivité résiduelle non extractible.

c) Dosages

c.1 - Dosage de l'activité de la lactate-déhydrogénase (LDH) :

La LDH catalyse la réduction du pyruvate en lactate en présence de NADH, H⁺. L'oxydation du NADH, H⁺ en NAD peut être suivie de la baisse de la D.O. à 340 nm.

Solution I : Tampon K_xHyPO₄, 50 mM, pH 7,4 contenant 1 mM de pyruvate de sodium (Sigma)

Solution II : Solution à 6,6 mg/ml de NADH₂ (Sigma) dans la solution I (préparation fraîche).

2,85 ml de solution I et 0,05 ml de solution II sont mélangées extemporanément avec 0,1 ml de la solution à tester. La D.O. est lue, après 30 secondes de stabilisation, toutes les 15 secondes pendant 2 minutes. Une unité d'activité LDH équivaut à la quantité d'extrait nécessaire à faire baisser la D.O. de 0,001 en 1 minute, pour un test à 24°C (la vitesse de réaction varie d'environ 7 % par degré). L'activité moyenne d'un cytosol avoisine 40 mUI/10⁶ cellules.

c.2 - Dosage du contenu en A.D.N.. (Burton, 1956)

L'ADN est soumis à une hydrolyse alcaline, le désoxyribose est dosée par colorimétrie après condensation à la diphénylamine. Une gamme étalon de 100 à 2 µg/ml d'ADN est préparée comme suit :

Une solution standard à 400 µg/ml d'ADN est préparée dans de la soude N/200. Cette solution est ensuite diluée au 1/2 par de l'acide perchlorique N, et portée à 70°C durant 15 min dans un tube fermé. Cette préparation constitue la solution avec laquelle sera réalisée la gamme étalon

µg DNA/ml	100	40	20	10	5	4	2	0
volume solution								
standard d'ADN (µl)	500	200	100	50	25	20	10	0
Volume HClO ₄ 1N(µl)	500	800	900	950	975	980	990	1000

L'échantillon à doser est hydrolysé par NaOH N/20 durant 90 minutes à 50°C, puis dilué avec HClO₄ 1N. A chaque tube est ajouté le réactif à la diphénylamine (2 volumes) composé comme suit : 150 mg diphénylamine, 10 ml acide acétique pur, 150 µl H₂SO₄ concentré auquel on ajoute 0,5 % de solution aqueuse d'acétaldehyde (0,41 ml acétaldehyde + 19,59 ml H₂O).

Les tubes sont fermés et placés une nuit dans un bain-marie à 30°C. La D.O. est lue à 600 nm. La valeur moyenne est de 7-8 µg DNA/10⁶ cellules.

III - EVALUATION DE LA REPARTITION CELLULAIRE DES COMPLEXES HORMONE-RECEPTEUR.

1) Matériel : Tampon A (voir B.1)

Tampon C : TES 20 mM, pH 7,4, 20 mM β-mercaptoethanol, 1,5 mM MgCl₂.

Solution de charbon-dextran : 1,0g de charbon végétal "Norit", 0,1g de dextran, tampon C qsp 100 ml.

2) Protocole :

Méthode I : Les fractions cytosolique et nucléaire sont préparées comme décrit en II.2.a. L'extrait nucléaire est préparé comme décrit en II.2.b

Méthode II : (Munck et Wira, 1975) Les cellules sont incubées en présence de stéroïde à une concentration de 3.10⁸ cellules par ml. La radioactivité liée à la cellule, dans le cytoplasme et au noyau est estimée comme suit :

a) un aliquot de 50 µl est prélevé et dilué dans 2,5 ml de solution de Hank à 4°C.

b) 20 µl de l'incubat sont placés dans 100 µl du tampon C contenant 1 % de charbon-dextran..

c) 20 µl de l'incubat placé dans 1 ml du tampon C.

Après agitation, les tubes sont laissés 15 minutes à 4°C puis centrifugés 5 minutes à 4000 rpm. On peut donc estimer en parallèle la radioactivité liée à la cellule intacte (culot, tube (a)), lié dans le cytoplasme (surnageant, tube (b)) et lié au noyau, (culot, tube (c)) .

IV. EVALUATION DES PARAMETRES PHYSICOCHEMISTIQUES DES COMPLEXES HORMONE-RECEPTEUR.

1) Gradients de saccharose

a) Gradient de saccharose conventionnel

Des gradients linéaires en saccharose (5-20 % p/v) sont préparés dans du tampon A supplémenté avec 10 % glycérol à l'aide d'une chambre à gradient (Beckman). Ces gradients sont coulés dans des tubes en polyallomère de 4,5 ml (Beckman). Les échantillons à centrifuger (0,2 ml) sont déposés sur ces gradients et soumis à une centrifugation à 4500 rpm durant 16 heures à 4°C (rotor Beckman SW 60). La mesure des coefficients de sédimentation est réalisée par comparaison avec des standards externes centrifugés dans les mêmes conditions (Catalase, 11,3S ; Aldolase, 7,8 S ; Sérualbumine, 4,3 S). Après centrifugation, des fractions de 6 gouttes sont collectées et comptées en radioactivité. La position des standards est déterminée par mesure de la densité à 280 nm ou à 595 nm après coloration au bleu de Coomassie (méthode de Bradford).

b) Gradient de saccharose centrifugés dans un rotor vertical.

Des gradients de saccharose (5-20 %), préparés comme précédemment, sont coulés dans des tubes en polyallomère de 5 ml (Quick-Seal Tubes, Beckman). Après le dépôt des échantillons à la surface du gradient, les tubes sont scellés et centrifugés à 65000 rpm durant 120 min à 4°C dans un rotor VFi-80 (Beckman). L'accélération est fixée à l'indice 5 (centrifugeuse Beckman LS-65) afin que la vitesse maximale soit atteinte en 12 minutes. L'arrêt de la centrifugeuse prend 10 minutes, ce temps n'est pas inclus au temps de centrifugation (Eastman-Reks et al., 1984). Après centrifugation, des

fractions de 10 gouttes sont recueillies et dosées pour leur contenu en radioactivité ou en protéines.

2) Chromatographie liquide d'exclusion de taille haute performance.

a) Matériel

Le système chromatographique est constituée d'une pompe 6000 A, d'un injecteur U6K équipé d'une boucle de 2 ml et d'un spectrophotomètre 480 LC (Waters, Milford, Ma). Les fractions sont collectées à l'aide d'un collecteur programmable Gilson 201 (Gilson, France). Les colonnes utilisées sont les modèles TSK G3000 SW et G4000 SW analytiques courtes (7,5 x 300 mm) (Toyo Soda, Japon). Le montage est constitué par une de ces colonnes et d'une précolonne TSK GSWP (7,5 x 75 mm) et d'un fritté métallique de 1 μ m placés en amont.

b) Elution

La colonne est équilibrée dans le tampon A filtré et dégazé à 4°C et les extraits injectés (cytosols ou extraits nucléaires) sont élués à un débit de 0,5 ml/min. Durant l'analyse, le tampon et la colonne sont maintenus à 4°C. Les fractions recueillies sont soumises à une mesure de radioactivité et éventuellement analysées en Western-blot, ou incubées en présence de ^3H TA (voir partie Résultats expérimentaux, E. d).

c) Calibration

Les protéines standards sont dissoutes à une concentration de 1-2 mg/ml et un aliquot de 0,1 ml est injecté sur la colonne. Les protéines utilisées proviennent d'un kit Pharmacia et sont ; la thyroglobuline ($R_s = 8,5$ nm), la ferritine ($R_s = 6,1$ nm), la catalase ($R_s = 5,2$ nm), l'aldolase ($R_s = 4,8$ nm), la sérualbumine ($R_s = 3,6$ nm). A été également utilisée la -galactosidase d'E. coli de $R_s = 6,9$ nm. Le volume d'exclusion est

visualisé par l'élution du bleu-dextran, le volume total est donné par le fabricant.

La droite de calibration est tracée selon la relation $K_{AV}^{1/3} = f(R_s)$, initialement décrite par Porath, 1963.

On a $K_{AV} = (V_e - V_o)(V_t - V_o)^{-1}$ où V_e est le volume d'élution de la protéine étudiée, V_o le volume mort et V_t le volume total de la colonne. La zone de linéarité de la courbe de calibration pour les deux colonnes utilisées est située entre 2 et 6 nm pour la TSK SW 3000 G et entre 3 et 11 nm pour la TSK SW 4000 G (Sablonnière *et al.*, 1987).

3) Electrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE-SDS), transfert des protéines sur un filtre de nitrocellulose (Western-blot) et dot-blot.

a) PAGE-SDS (Laemmli, 1970)

a.1 Matériel :

Solution d'acrylamide à 7,5 % :

- Acrylamide 75,00 g
- Bisacrylamide 2,00 g
- Tris 45,30 g
- TEMED (tétraméthyléthylènediamine) 0,300 ml
- SDS 1,00 g
- HCl 6N qsp pH 6,8
- H₂O qsp 1000 ml

Solution de concentration :

- Acrylamide 30,00 g
- Bisacrylamide 0,80 g
- Tris 15,10 g
- SDS 1,00 g

- TEMED 0,5 ml
- HCl 6N qsp pH 6,8
- H₂O qsp 1000 ml

Solution de persulfate d'ammonium à 10 % dans H₂O (p/v)

Tampon d'électrophorèse concentré (x 4) :

- Tris 12,00 g
- Glycocolle 57,20 g
- SDS 4,00 g
- HCl 6N qsp pH 8,3
- H₂O qsp 1000 ml

Kit "6 témoins" Pharmacia, protéines de faible poids

moléculaire : Myosine 200 KDa ; β -galactosidase 116 KDa ;

Phosphorylase b 97,6 KDa, Sérualbumine bovine 66,2 KDa ;

Ovalbumine 42,6 K ; Anhydrase carbonique bovine 31,0 KDa.

a.2 Protocole :

Un bouchon d'acrylamide est coulé (5 ml + 50 μ l de solution de persulfate) pour maintenir l'étanchéité du système (2 plaques de verre 150 x 100 mm ; 1,5 mm d'épaisseur). 30 ml de solution 7,5 % sont ensuite déposés (30 ml solution A + 60 μ l de persulfate). Après polymérisation du gel durant 10 min à 50°C, le gel de concentration est coulé (7,5 ml de solution B + 15 μ l de persulfate) et le peigne rajouté immédiatement. Après une préélectrophorèse, ces aliquots sont déposés avec 0,001 % de bromophénol après avoir été traités pendant 5 min à 100°C en présence de 2,5 % SDS et 5 % de β -mercaptoéthanol. L'électrophorèse est réalisée à 40 mA pendant 4 heures.

b) Electrotransfert des protéines sur la nitrocellulose

(Towbin *et al.*, 1979)

b.1 Matériel

Appareil LKB 2005 Transphor Electroblothing Unit (Broma, Sweden).

Nitrocellulose Schleicher et Schüll BA 85 (0,45 µm).

Tampon de transfert : Tris-HCl 25 mM, pH 8,3

Glycocolle 150 mM

Méthanol 20 %

b.2 Protocole

Le gel de polyacrylamide est placé en contact avec la feuille de nitrocellulose et le transfert est réalisé en 5 heures, à 60 V (0,3 A) à une température maintenue à 10-15°C.

c) Immunorévélation

c.1. Matériel

Tampons : - TBS : Tris-HCl 10 mM, pH 7,4

NaCl 150 mM

- TNT : Tampon TBS + Tween-20 1 % (p/v)

- PBS : H_xH_yPO₄ 10 mM, pH 7,4

NaCl 120 mM

KCl 3 mM

- Révélateur (préparation extemporanée) :

50 mg de 4-chloro-1-naphtol dissous dans 17 ml méthanol

TBS qsp 100 ml

H₂O₂ 60 µl

filtration du tampon par gravité, la membrane de nitrocellulose est récupérée puis soumise à une révélation immunologique identique à celle décrite en b.2.b.

V - DIVERS

1) Mesure de la liaison du stéroïde au récepteur

L'excès de stéroïde libre doit être éliminé pour estimer la radioactivité liée aux protéines. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode au charbon-dextran (Rousseau *et al*, 1972)

a) Matériel

Charbon activé Norit	1,0g
Dextran T70	0,1g
Tampon A	100 ml

b) Dosage

Les mesures sont effectuées en double : 0,2 ml d'incubat est mis en présence de 0,1 ml de solution de charbon dextran, agité 20 secondes par un Vortex et laissé en incubation 15 min. Les tubes sont ensuite centrifugés 3 minutes à 4000 rpm, le surnageant est prélevé pour mesure de la radioactivité.

2) Comptage de la radioactivité

La radioactivité est mesurée par un compteur à scintillation liquide LKB 1214. Les échantillons sont mis en solution dans 4,5 ml de liquide scintillateur LKB "Optiphase". Le rendement de comptage pour le tritium est de 50 %.

BIBLIOGRAPHIE

- Adler, S., Waterman, M.L., He, X., Rosenfeld, G.M. (1988)**
Steroid mediated inhibition of rat prolactin gene does not require the receptor DNA binding domain, *Cell*, 52 : 685-695
- Agarwal, M.K., Lombardo, G., Eliezer, N., Moudgil, V.K. (1985)**
Activation of the rat liver glucocorticoid receptor bound to the RU 38486, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 133 : 745-752
- Ali, M., Vedeckis, W.V. (1987)**
The glucocorticoid receptor binds to RNA, *Science*, 235 : 467-470
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Jonat, C., Karin, M. (1987)**
Phorbol-ester inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans activating factor, *Cell*, 49 : 729-739
- Antalky, T., Eisen, H.J. (1984)**
Immunocytochemical localisation of glucocorticoid receptor in intact target cells, *Endocrinology*, 115 : 1984-1989
- Arriza, J.L., Weinberger, C., Cerulli, G., Glaser, G., Handelin, B.L., Housman, D.E., Evans, R.M. (1987)**
Cloning of human mineralocorticoid receptor cDNA : structural and functional kinship with the human glucocorticoid receptor, *Science*, 237 : 268-271
- Atger, M., Milgrom, E. (1976)**
Mechanisms and kinetics of the thermal activation of glucocorticoid receptor complexes, *J. Biol. Chem.*, 251 : 4758-4762
- Atger, M., Milgrom, E. (1978)**
Interaction of glucocorticoid receptor complexes with rat liver nuclei, *Biochim. Biophys. Acta*, 939 : 41-53
- Bailly, A., LePage, C., Rauch, M., Milgrom, E. (1986)**
Sequence-specific binding of the progesterone receptor to the uteroglobin gene : effects of hormone, antihormone and receptor phosphorylation, *Embo J.*, 5 : 3235-3241
- Barrack, E.R., Coffey, D.S. (1983)**
The role of nuclear matrix in steroid hormone action, in *Biochemical Actions of Steroid Hormones*, G. Litwack Ed., Academic Press : 23-70
- Batman, A., Dell, A., Whitehouse, B.J., Vinson, G.P. (1986)**
Non-ACTH components of human pituitary extracts which stimulate adrenal steroidogenesis, *Neuropeptides*, 7 : 381-390
- Baulieu, E.E. (1984)**
Pharmacology of steroid receptors : from molecular and cellular studies to efficient antihormonal drugs, *Biochem. Pharmacol.*, 33 : 905-912
- Baulieu, E.E. (1987)**
Steroid hormone antagonists at the receptor level : a role for the 90 KDa heat shock protein, *J. Cell. Biol.*, suppl. 11A : 86-137

- Beato, M., Kalimi, M., Feigelson, P. (1972)**
Correlation between glucocorticoid binding to specific liver cytosol receptor and enzyme induction in vivo,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 47 : 1464-1473
- Beato, M. (1987)**
Induction of transcription by steroid hormones,
Biochim. Biophys. Acta, 910 : 95-112
- Becker, P.B., Renkawitz, R., Schutz, G. (1984)**
Tissue specific DNase I hypersensitive sites in the 5' flanking sequences of the tryptophane oxygenase and tyrosine aminotransferase genes,
Embo J., 3 : 2015-2020
- Becker, P.B., Gloss, B., Schmid, W., Strahle, U., Schutz, G. (1986)**
In vivo protein DNA interactions in a glucocorticoid response element require the presence of the hormone, *Nature*, 324 : 686-688
- Becker, P.B., Ruppert, S., Schutz, G. (1987)**
Genomic footprinting reveals cell-type specific DNA binding of ubiquitous factors, *Cell* : 435-443
- Bell, P.A., Jones, T.R. (1979)**
Interactions of glucocorticoids agonists and antagonists with cellular receptors, in *Antihormones*, M.K. Agarwal Ed., Elsevier, Amsterdam : 35-50
- Bell, P.A., Jones, T.R. (1982)**
Discrimination between agonists and antagonists by means of receptor binding studies, in *Hormone Antagonism*, M.K. Agarwal Ed., Walter de Gruyter, Berlin : 391-405
- Bell, P.A., Weatherhill, P.J. (1986)**
Physicochemical characteristics of the interaction of the RU 38486 with glucocorticoid receptor in vitro and the role of molybdate,
J. Ster. Biochem., 25 : 473-481
- Berentton, E.W., Beach, J.E., Holaday, J.M., Smalbridge, R.J.,
Fein, H.G. (1987)**
Release of multiple hormones by a direct action of IL-1 on pituitary cells
Science, 238 : 519-522
- Berg, J.M. (1988)**
Proposed structure for the zinc binding domains from transcription factor TFIIIA and related proteins, *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 99-102
- Berkenbosch, F., Vanders, J., Delrey, A., Tilders, F.,
Besedovsky, H. (1987)**
Corticotrophin releasing factor producing neurons in the rat activated IL-1, *Science*, 238 : 524-527

- Besedowski, H., Delrey, A., Sorkin, E., Dinarello, C.A. (1986)**
Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones, *Science*, 233: 652-655
- Blicq, S., Danzè, P.M., Dumur, V., Formstecher, P., Dautrevaux, M. (1988)**
Inhibition of glucocorticoid receptor transformation, subunit dissociation and temperature dependant inactivation by various N-substitued alkyl-maleimides, submitted to *Biochemistry*
- Bloom, E., Matukich, D.T., Lan, N.C., Higgins, S.J., Simons, S.S., Baxter, J.D. (1980)**
Nuclear binding of glucocorticoid receptor : relation between cytosol binding activation and biological response, *J. Ster. Biochem.*, 12 : 175-184
- Bodine, P.V., Litwack, G. (1988)**
Purification and structural analysis of the modulator of the glucocorticoid-receptor complex, *J. Biol. Chem.*, 263 : 3501-3512
- Bohmann, D., Bos, T., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P.K., Tjian, R. (1987)**
Human proto-oncogen c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1, *Science*, 238 : 1386-1392
- Bos, T.J., Bohman, D., Tsuchie, H.T., Tjian, R., Vogt, P.K. (1988)**
v-jun encodes a nuclear protein with enhancer binding properties of AP-1, *Cell*, 52 : 705-712
- Bourgeois, S., Newby, R.F. (1977)**
Diploid and haploid state of the glucocorticoid receptor gene of mouse lymphoma cell lines, *Cell*, 11 : 423-430
- Bourgeois, S., Pfahl, M., Baulieu, E.E. (1984)**
DNA binding properties of glucocorticoid receptors bound to the steroid antagonist RU 38486, *Embo J.*, 3 : 751-755
- Bradford, M.M. (1976)**
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.*, 72 : 248-252
- Bullock, L.P., Bardin, C.W., Sherman, M. (1978)**
Androgenic, antiandrogenic and synandrogenic action of progestins : Role of steric and allosteric interactions with androgen receptors, *Endocrinology*, 103 : 1768-1782
- Burdon, R.H. (1986)**
Heat shock and the heat shock protein, *Biochem. J.*, 240 : 313-324

Burton, K. (1956)

A study of the conditions of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA, *Biochem. J.*, 62 : 315-323

Carlstedt-Duke, J., Okret, S., Wrangle, O., Gustafsson, J.A. (1982)

Immunochemical analysis of the glucocorticoid receptor : identification of a third domain separated from steroid and DNA binding domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 : 4260-4264

Carlstedt-Duke, J., Wrangle, O., Okret, S., Gustafsson, J.A. (1984)

The rat hepatic glucocorticoid receptor, *Biochem. Pharmacol.*, 22 : 913-916

Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.A. (1987)

Structure and function of the glucocorticoid receptor, *J. Ster. Biochem.*, 27 : 99-104

Catelli, M.G., Binart, N., Jung-Testas, I., Renoir, J.M., Baulieu, E.E., Feramisco, J.R., Welch, W.J. (1985)

The common 90 KDa protein component of the non transformed 8S steroid receptors is a heat shock protein, *Embo J.*, 4 : 3131-3135

Cato, A.C., Henderson, D., Ponta, H. (1987)

The hormone response element of the MMTV DNA mediates the progestin and androgen induction of transcription in the proviral LTR region, *Embo J.*, 6 : 363-368

Chandler, V.L., Maler, B.A., Yamamoto, K.R. (1983)

DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor in vitro render a heterologous promoter hormone responsive in vivo, *Cell*, 33 : 489-498

Charron, J., Richard-Foy, H., Hager, G.L., Drouin, J. (1988)

Independent glucocorticoid regulation at physically linked glucocorticoid inducible and glucocorticoid inhibited transcription units submitted to *Nuc. Acid Res.*

Chasserot-Golaz, S., Beck, G. (1984)

An approach to the mechanism of action of the potent antiglucocorticoid RU 38486, *J. Ster. Biochem.*, 21 : 585-591

Chomczynsky, P., Qaska, P., Topper, T.J. (1986)

Transcriptional and post-transcriptional roles of glucocorticoids in the expression of the rat 25 KDa casein gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 134 : 812-818

Chrousos, G.P., Barnes, K.M., Sauer, M.A., Loriaux, D.R., Cutler, G.B. (1980)

Δ 1,9-11-deoxycortisol : an improved glucocorticoid antagonist, *Endocrinology*, 107 : 472-477

- Chrousos, G.P., Sauer, M.A., Loriaux, D.R., Cutler, G.B. (1982)**
 Δ -11-oxa-11-desoxycortisol : a new antiglucocorticoid with activity in vivo, *Steroids*, 40 : 425-431
- Chrousos, G.P., Cutler, G.B., Sauer, M., Simons, S.S., Loriaux, D.L. (1983)**
Development of glucocorticoid antagonists, *Pharmacol. Ther.*, 20 : 263-281
- Cidlowski, J.A., Cidlowski, N.B. (1981)**
Glucocorticoid receptors and the cell cycle : Evidence that the accumulation of receptors during S phase is dependant on RNA synthesis, *Endocrinology*, 110 : 1653-1659
- Colbert, R.A., Young, D.A. (1986)**
Glucocorticoid induced messenger ribonucleic acids in rat thymic lymphocytes : rapid primary effects specific for glucocorticoids
Endocrinology, 119 : 2598-2607
- Compton, M.M., Cidlowski, J.A. (1986)**
Rapid in vivo effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic DNA, *Endocrinology*, 118 : 38-45
- Compton, M.M., Cidlowski, J.A. (1987)**
Identification of a glucocorticoid induced nuclease in thymocytes, *J. Biol. Chem.*, 262 : 8288-8293
- Cordingley, M.G., Richard-Foy, H., Lichter, A., Hager, G. (1987a)**
The hormone responsive element of the mouse mammary tumor virus : a complex regulatory region, submitted
- Cordingley, M.G., Riegel, A.T., Hager, G.L. (1987b)**
Steroid dependant interaction of transcription factors with the inducible promoter of the mouse mammary tumor virus in vivo, *Cell*, 48 : 261-270
- Cordingley, M.G., Hager, G. (1988)**
Binding of multiple factors to the MMTV promoter in crude and fractionated nuclear extracts, *Nuc. Acid Res.*, 16 : 689-705
- Cote, G.J., Gagel, R.F. (1987)**
Dexamethasone differentially affects the level of calcitonin and calcitonin gene related peptide mRNAs expressed in a human medullary thyroid carcinoma cell line, *J. Biol. Chem.*, 261 : 15524-15528
- Coutard, D., Osborne, W., Pellegrin, J. (1979)**
Autoradiographic studies of glucocorticoid agonist and antagonist, *Exp. Tiss. Res.*, 197 : 531-538
- Dahmer, M.K., Housley, P.R., Pratt, W.B. (1984)**
Effects of molybdate and endogenous inhibitors on steroid receptors inactivation, transformation, translocation,
Ann. Rev. Physiol., 46 : 67-81

Danesch, U., Gloss, B., Schild, W., Schutz, G., Schule, R., Renkawitz, R. (1987)

Induction of rat tryptophane oxygenase gene is mediated by two widely separated glucocorticoid responsive gene element, *Embo J.*, 6 : 635-630

Danhaive, P.A., Rousseau, G.G. (1986)

Binding of glucocorticoid antagonists to androgen and glucocorticoid receptors in rat skeletal muscle, *J. Ster. Biochem.*, 24 : 481-487

Danielsen, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. (1986)

The mouse glucocorticoid receptor : mapping of functional domains by cloning, sequencing and expression of wild type and mutant receptor proteins, *Embo J.*, 5 : 2513-2522

Danze, P.M., Formstecher, P., Richard, C., Dautrevaux, M. (1987)

Microheterogeneity of agonist and antagonist glucocorticoid receptor complexes detected by isoelectric focusing and modifications following receptor activation, *Biochim. Biophys. Acta*, 927 : 129-138

Darbre, P.D., King, J.R.B. (1987)

Progression to steroid insensitivity can occur irrespective of the presence of functional receptors, *Cell*, 51 : 521-528

Dausse, J.P., Duval, D., Meyer, P., Gagnault, J.C., Marchandeu, C., Raynaud, J.P. (1977)

The relationship between glucocorticoid structure and effects upon thymocytes, *Mol. Pharmacol.*, 13 : 948-955

Davidson, F.F., Dennis, E.A., Powell, M., Glenney, J.R. (1987)

Inhibition of phospholipase A2 by lipocortins and calpactins. An effect of binding to substrate phospholipids, *J. Biol. Chem.*, 262 : 1698-1705

Degealen, J., Lareau, S., Brasseur, N., Rousseau, G.G. (1981)

Differences between the molecular interaction of agonists and antagonists with the glucocorticoid receptor, *Ann. Endocrinol.*, 42 : 282-283

Dellweg, H.G., Hotz, A., Mugele, K., Gehring, U. (1982)

Active domains in wild type and mutant glucocorticoid receptors, *Embo J.*, 1 : 285-289

Denis, M., Wikstrom, A.C., Gustafsson, J.A. (1987)

The molybdate stabilized non activated glucocorticoid receptor contains a dimer of Mr 90000 non-hormone binding protein, *J. Biol. Chem.*, 262 : 11803-11806

Dietrich, J.B., Chasserot-Golaz, S., Beck, G., Bauer, G. (1986)

Antagonism of glucocorticoid induction of Epstein-Barr virus early antigens by different steroids in Daudi lymphoma cells, *J. Ster. Biochem.*, 24 : 417-421

- Dougherty, J.J., Rabideau, D.A., Ianotti, A.M., Sullivan, W.P., Toft, D.O. (1987)**
Identification of the 90 KDa substrate of rat liver type II casein kinase with the heat shock protein which binds steroid receptors, *Biochem. Biophys. Acta*, 927 : 74-80
- Duax, N.L., Griffin, J.F. (1984)**
Structural characteristics of antagonists for mineralo and glucocorticoid receptors, in *Adrenal Steroid Antagonism*, M.K. Agarwal Ed., Walter de Gruyter : 15-41
- Durant, S., Duval, D., Homo-Delarche, F. (1986)**
Factors involved in the control of fibroblast proliferation by glucocorticoids : a review, *Endocrine Rev.*, 7 : 254-266
- Dwyer, N., Blobel, G. (1976)**
A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat isolated nuclei, *J. Cell. Biol.*, 70 : 581-591
- Eastman-Reks, S., Reker, C.E., Vedeckis, W.V. (1984)**
Structure and subunit dissociation of the mouse glucocorticoid receptor : rapid analysis using vertical tube rotor sucrose gradients, *Arch. Biochem. Biophys.*, 230 : 274-284
- Economidis, I., Rousseau, G.G. (1985)**
Association of the glucocorticoid receptor with ribonucleic acid, *Febs Lett.*, 181 : 47-53
- Eliard, P.H., Marcham, M., Rousseau, G.G., Formstecher, P., Marthy-Hartert, M., Belayew, A., Martial, J.A. (1985)**
Binding of the human glucocorticoid receptor to defined regions in the human growth hormone and placental lactogen genes, *D.N.A.*, 4 : 409-417
- Eliard, P.H., Rousseau, G.G. (1984)**
Thermodynamics of steroid binding to the human glucocorticoid receptor, *Biochem. J.*, 218 : 395-404
- Ennis, B.W., Stumpf, W.E., Gasc, J.M., Baulieu, E.E. (1986)**
Nuclear localization of progesterone receptor before and after exposure to progestins, *Endocrinology*, 119 : 2066-2072
- Evans, R.M., Hollenberg, S.M. (1988)**
Zinc fingers : Gilt by association, *Cell*, 52 : 1-3
- Formstecher, P., Dumur, V., Idziorek, T., Danze, P.M., Sablonniere, B., Dautrevaux, M. (1984)**
Inactivation of unbound rat liver glucocorticoid receptor by N-alkyl-maleimides at sub-zero temperatures, *Biochem. Biophys. Acta*, 802 : 306-313

- Gagne, D., Pons, M., Philibert, D. (1985)**
RU 38486 : a potent antiglucocorticoid in vitro and in vivo,
J. Ster. Biochem., 23 : 247-251
- Gagne, D., Pons, M., Crastes de Paulet, A. (1987)**
Analysis of the relation between receptor binding affinity and antagonist efficacy of antiglucocorticoids, *J. Ster. Biochem.*, 25 : 315-322
- Gasc, J.M., Renoir, J.M., Radyani, C., Joab, I., Tuohimaa, P., Baulieu, E.E. (1984)**
Progesterone receptors in the chick oviduct : an immunohistochemical study with antibodies to distinct receptor components,
J. Cell. Biol., 99 : 1193-1201
- Gasson, J.C., Ryder, T., Bourgeois, S. (1983)**
Role of de novo DNA methylation in the glucocorticoid resistance of a T-lymphoid cell line, *Nature*, 302 : 621-623
- Gehring, U., Arndt, H. (1985)**
Heteromeric nature of glucocorticoid receptors, *Febs Lett.*, 179 : 138-142
- Giguere, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M. (1986)**
Functional domains of the human glucocorticoid receptor,
Cell, 46 : 645-652
- Giguere, V., Ong, E.S., Segui, P., Evans, R.M. (1987)**
Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid,
Nature, 330 : 624-629
- Giguere, V., Yang, N., Segui, P., Evans, R.M. (1988)**
Identification of a new class of steroid hormone receptor,
Nature, 331 : 91-95
- Giniger, E., Ptashne, M. (1987)**
Transcription in yeast activated by a putative amphiphatic α -helix linked to a DNA binding unit, *Nature*, 330 : 670-674
- Godowski, P.J., Rusconi, S., Miesfield, R., Yamamoto, K.R. (1987)**
Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activator of transcriptional enhancement, *Nature*, 325 : 365-368
- Golaz, S., Beck, G. (1983)**
Nuclear localisation of a glucocorticoid antagonist in cultured hepatoma cells, *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, 110 : 719-725

Golaz, S., Beck, G. (1984)

Antagonism of glucocorticoid action in HTC cells,
J. Ster. Biochem., 20 : 259-262

Govindan, M.V. (1980)

Immunofluorescence microscopy of the intracellular translocation of glucocorticoid receptor complexes in HTC cells,
Exp. Cell. Res., 127 : 293-299

Grandics, P., Miller, M., Schmidt, T.J., Litwack, G. (1984)

Phosphorylation in vivo of rat hepatic glucocorticoid receptors,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 120 : 59-65

Grandics, P., Miller, M., Mittman, D., Litwack, G. (1984)

Purification of the unactivated glucocorticoid receptor and its subsequent in vitro activation, *J. Biol. Chem.*, 259 : 3173-3180

Green, S., Walter, P., Kumar, V., Bornet, J.M., Argos, P.

Chambon, P. (1986)

Human estrogen receptor cDNA : sequence, expression and homology to v-erb-A, *Nature*, 320 : 136-139

Green, S., Chambon, P. (1986)

A superfamily of potential oncogenic hormone receptors,
Nature, 324 : 615-618

Green, S., Chambon, P. (1987)

Estradiol induction of a glucocorticoid responsive gene by a chimaeric receptor, *Nature*, 325 : 75-77

Greene, G.L., Gilna, P.W., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y.,

Shine, J. (1986)

Sequence and expression of human estrogen receptor,
Science, 231 : 1150-1154

Gronemeyer, H., Turcotte, B., Queirin-Stricker, C., Bocquel, M.,

Meyer, M.E., Chambon, P. (1987)

The chicken progesterone receptor : sequence, expression and functional analysis, *Embo J.*, 6 : 3985-3994

Groner, B., Ponta, H., Beato, M., Hynes, N.E. (1983)

The proviral DNA of the mouse mammary tumor virus : its use in the study of molecular details of steroid hormone action,
Mol. Cell. Endocrinol., 32 : 101-116

Gross, D.S., Garrard, W.T. (1987)

Poising chromatin for transcription, *Trends Biochem. Sci.*, 13 : 293-297

Grove, J.R., Diekman, B.S., Schoerer, T.A., Ringold, G.M. (1980)

Isolation of glucocorticoid unresponsive rat hepatoma cells by fluorescence-activated cell sorting, *Cell*, 21 : 47-56

Groyer, A., Scheiwzer-Groyer, G., Cadepond, F., Marriller, M., Baulieu, E.E. (1987)

Antiglucocorticoid effect suggest why steroid hormone is required for receptors to bind DNA in vivo but not in vitro, *Nature*, 328 : 624-626

Guarrente, L. (1988)

UASs and enhancers : common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals, *Cell*, 52 : 303-305

Gustafsson, J.A., Carlstedt-Duke, J., Okret, S., Poellinger, F. (1987)
Biochemistry, molecular biology and physiology of the glucocorticoid receptor, *Endocrine Rev.*, 8 : 185-229

Hackney, J.F., Holbrook, N.J., Grasso, R.J. (1981)

Progesterone as a partial glucocorticoid agonist in L-929 mouse fibroblasts : effects on cell growth, glutamine synthetase induction and glucocorticoid receptors, *J. Ster. Biochem.*, 14 : 971-977

Hager, G.L. (1988)

The mouse mammary tumor virus as a model for gene expression in mammary tissue, *Nuc. Acid Res.*, in press

Holbrook, N.J., Bodwell, J.E., Jeffries, M., Munck, A. (1983)

Characterisation of non activated and activated glucocorticoid receptor complexes from intact rat thymus cells, *J. Biol. Chem.*, 258 : 6477-6485

Holbrook, N.J., Bodwell, J.E., Mendel, D.B., Munck, A. (1985)

Studies on glucocorticoid receptors in normal and neoplastic rodent and human leucocytes : structure, degradation and kinetic of formation and activation, in *Molecular Mechanisms of Steroid Hormone Action*, V. K. Moudgil Ed., Walter De Gruyter, Berlin : 637-657

Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerulli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Evans, R.M. (1985)

Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor, *Nature*, 318 : 635-641

Hollenberg, S.M., Giguere, V., Segui, P., Evans, R.M. (1987)

Colocalisation of DNA binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor, *Cell*, 49 : 39-46

Holtzman, E., Smith, I., Penman, S. (1966)

Electron microscopic studies of detergent-treated HeLa cell nuclei, *J. Mol. Biol.*, 17 : 131-135

Horner, H.C., Munck, A., Lienhardt, G.E. (1987)

Dexamethasone causes translocation of glucose transporter from the plasma membrane to an intracellular site in human fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, 262 : 17696-17702

Housley, P.R., Pratt, W.B. (1983)

Direct demonstration of glucocorticoid receptor phosphorylation in intact L-cells, *J. Biol. Chem.*, 258 : 4630-4636

Housley, P.R., Sanchez, E.R., Westphal, H.M., Beato, M., Pratt, W.B. (1985)

The molybdate-stabilized L-cell glucocorticoid receptor is associated with a 90-92 KDa non steroid binding component, *J. Biol. Chem.*, 260 : 13810-13817

Howard, K.J., Distelhorst, C.N. (1988)

Evidence for the intracellular association of the glucocorticoid receptor with the 90 KDa heat shock protein, *J. Biol. Chem.*, 263 : 3474-3481

Hromas, R., Pauli, U., Marcuzzi, A., Lafrenz, D., Stein, G. Van Ness, B. (1988)

Inducible protein-DNA interactions of the murine kappa immunoglobulin enhancer in intact cells : comparison with in vitro interactions, *Nuc. Acid Res.*, 16 : 953-967

Hynes, N., Van Ooyen, A.J.J., Kennedy, N., Heerlich, P., Ponta, H., Groner, B. (1983)

Subfragments of the large terminal repeat region cause glucocorticoid responsive expression of mouse mammary tumor virus and of adjacent gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 : 3637-3641

Idziorek, T., Formstecher, P., Danze, P.M., Sablonniere, B., Lustenberger, P., Richard, C., Dumur, V., Dautrevaux, M. (1985)

Characterisation of the purified molybdate-stabilized glucocorticoid receptor from rat liver, *Eur. J. Biochem.*, 153 : 65-74

Jantzen, H.M., Strahle, J., Gross, B., Stewart, F., Schmid, W., Boschart, M., Mischicek, R., Schutz, G. (1987)

Cooperativity of glucocorticoid response elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene, *Cell*, 49 : 29-37

Jantzen, K., Fritton, H.P., Cato, G.B., Igo, G.B., Mugele, K., Beato, M. (1987)

Partial overlapping of binding sequences for steroid hormone receptors and DNase 1 hypersensitive sites in the rabbit uteroglobin gene, *Nuc. Acid Res.*, 15 : 4535-4547

Joab, I., Radyani, C., Renoir, J.M., Buchou, T., Catelli, M.G., Binart, O., Mester, J., Baulieu, E.E. (1984)

Common non-hormone binding component in non-transformed chick oviduct receptors of four steroid hormones, *Nature*, 308 : 850-853

Jones, T.R., Bell, P.A. (1982)

Discrimination of glucocorticoid agonists and antagonists by means of receptor binding kinetics, *Biochem. J.*, 204 : 721-729

- Jordan, V.C. (1985)**
Anti-estrogens as antitumor agents, in *Hormonally Responsive Tumours*,
Hollander, V.P. Ed., Acad. Press Inc. : 219-232
- Jung-Testas, I., Baulieu, E.E. (1984)**
Anti-steroid action in cultured L-929 mouse fibroblasts,
J. Ster. Biochem., 20 : 301-306
- Kaiser, N., Milholland, R.J., Turnell, R.W., Rosen, N.F. (1972)**
Cortisol : binding to glucocorticoid receptors in rat thymocytes
and its mechanism of action, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 49 : 516-521
- Kaiser, N., Milholland, R.J., Rosen, F. (1974)**
Antiglucocorticoid action of progesterone in rat thymocytes,
J. Ster. Biochem., 5 : 348 (Abstracts)
- Kakigani, H., Ptashne, M. (1988)**
Gal4 activates gene expression in mammalian cells, *Cell*, 52 : 161-167
- Kalinyak, J.E., Dorin, R.I., Hoffman, A.R., Perlman, A.J. (1987)**
Tissue-specific regulation of glucocorticoid receptor m-RNA by
dexamethasone, *J. Biol. Chem.*, 262 : 10441-10444
- Katzenellenbogen, B.S., Miller, M.A., Eckert, R.L., Sudo, K. (1983)**
Anti-estrogen pharmacology and mechanism of action,
J. Ster. Biochem., 19 : 59-68
- Kaufman, S.H., Okret, S., Wikstrom, A.C., Gustafsson, J.A.,
Shaper, J.H. (1986)**
Binding of the glucocorticoid receptor to the rat liver nuclear matrix,
J. Biol. Chem., 261 : 11962-11967
- Kaufman, S.H., Quddus, F.F., Shaper, J.H. (1982)**
An alternative approach to the quantitation of glucocorticoid receptor
complexes in the nuclei of lymphoid cells, *Endocrinology*, 110 : 708-716
- Kaye, J.S., Pratt-Kaye, S., Bellard, M., Dretzen, G., Bellard, F.
Chambon, P. (1986)**
Steroid hormone dependence of four DNase 1 hypersensitive regions
located within the 7000 pb 5' flanking segment of the albumin gene,
Embo J., 5 : 277-285
- Kido, H., Fukusen, N., Katunuma, W. (1987a)**
Tumor promoter phorbol ester amplifies the induction of tyrosine
aminotransferase and ornithine decarboxylase by glucocorticoids,
Biochemistry, 26 : 2349-2353

- Kido, H., Fukusen, N., Kutunama, N. (1987b)**
Inhibition by an inhibitor protein kinase C of enzyme induction by glucocorticoids and nuclear translocation of glucocorticoid complexes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 144 : 152-160
- King, W.J., Greene, G.L. (1984)**
Monoclonal antibodies localize estrogen receptor in the nuclei of target cells, *Nature*, 302 : 744-747
- Kirsch, T.M., Miller-Diener, A., Litwack, G. (1986)**
The nuclear matrix is the site of glucocorticoid receptor complex action in the nucleus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 137 : 640-648
- Klein-Hitpass, L., Ryffel, G.U., Heitlinger, E., Cato, C.B.A. (1988)**
A 13 pb palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor, *Nuc. Acid Res.*, 16 : 647-663
- Klock, G., Strahle, U., Schutz, G. (1987)**
Estrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct, *Nature*, 329 : 734-737
- Klug, A., Rhodes, D. (1987)**
Zinc fingers : A novel protein motif for nucleic acid recognition, *Trends Biochem.*, 12 : 464-499
- Koyasu, S., Nishida, E., Kodanaki, T., Yahara, I. (1986)**
Two mammalian heat shock protein, hsp 90 and hsp 100, are actin binding proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 8054-8061
- Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornert, J.M., Chambon, P. (1986)**
The chicken estrogen receptor sequence : homology with v-erb-A and human estrogen and glucocorticoid receptors, *Embo J.*, 5 : 891-897
- Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jix, J.R., Chambon, P. (1987)**
Functional domain of the human estrogen receptor, *Cell*, 51 : 941-951
- Laemmli, U.K. (1970)**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227 : 680-687
- Lamontagne, N., Mercier, L., Pons, M., Thompson, E.B., Simons, S.S. (1984)**
Glucocorticoid versus antiglucocorticoid activity : Can a single functional group modification of glucocorticoid steroid always convey antiglucocorticoid activity, *Endocrinology*, 114 : 2252-2260
- 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

- Lee, S.W., Tsou, A.P., Chan, H., Thomas J., Petrie, K., Eugui, E.M., Allison, A.C. (1988)**
Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin-1 gene and decrease the stability of interleukin-1 m-RNA, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 85 : 1204-1208
- Lee, W., Mitchell, P., Tjian, R. (1987)**
Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA inducible enhancer element, Cell, 49 : 741-752
- Litwack, G. (1982)**
Activation of the glucocorticoid receptor complex, Physiol. Rev., 62 : 1132-1184
- Loose, D.S., Stover, E.P., Feldman, D. (1983)**
Ketoconazole binds to glucocorticoid receptor and exhibits glucocorticoid antagonist activity in cultured cells, J. Clin. Investigation, 72 : 404-408
- Lorch, Y., Lapointe, J.W., Kornberg, R.D. (1986)**
Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones, Cell, 49 : 203-210
- Lukola, A., Ackerman, K., Pessa, T. (1985)**
Human lymphocytes glucocorticoid receptors reside mainly in the cytoplasm, Biochem. Biophys. Res. Commun., 131 : 877-882
- Luttge, W.G., Gray, H.E., Densmore, C.L. (1984)**
Hydrodynamic and biochemical properties correlates of the activation of the glucocorticoid receptor, J. Ster. Biochem., 20 : 545-553
- Ma, J., Ptashne, M. (1987)**
A new class of transcriptional activator, Cell, 51 : 113-119
- Mac Cruden, A.B., Stimson, W.H. (1985)**
Steroid receptors in the thymus, Biochem. Soc. Trans., 13 : 371-372
- Mac Intyre, W.R., Samuels, H.H. (1985)**
Triamcinolone acetone regulates glucocorticoid receptor level by decreasing the half-life time of the activated nuclear receptor form, J. Biol. Chem., 260 : 418-427
- Makman, M.H., Nakagawa, S., White, A. (1967)**
Studies on the mode of action of adrenal steroids on lymphocytes, Rec. Prog. Horm. Res., 23 : 195-227

- Maniatis, T., Goodburn, S., Fischer, J.A. (1987)**
Regulation of inducible and tissue specific gene expression,
Science, 236 : 1237-1245
- Markovic, R.A., Litwack, G. (1980)**
Activation of liver and kidney glucocorticoid receptor complexes occurs in vivo, *Arch. Biochem. Biophys.*, 202 : 371-379
- Martin, R.G., Ames, B.N. (1961)**
A method for determining the sedimentation behavior of enzymes : applications to protein mixtures, *J. Biol. Chem.*, 236 : 1372-1380
- Martinez, E., Givel, F., Wahli, W. (1987)**
The estrogen responsive element as an inducible enhancer : DNA sequence requirements and conversion to a glucocorticoid responsive element, *Embo J.*, 6 : 3719-3727
- Mendel, D.B., Bodwell, J.E., Gametchu, B., Harrisson, R.W. (1986a)**
Molybdate-stabilized non activated glucocorticoid receptor complexes contain a 90 KDa non steroid binding phosphoprotein that is lost on activation, *J. Biol. Chem.*, 261 : 3758-3763
- Mendel, D.B., Bodwell, J.E., Munck, A. (1986b)**
Glucocorticoid receptors lacking hormone binding activity are bound in the nuclei of ATP depleted cells, *Nature*, 234 : 478-480
- Mendel, D.B., Bodwell, J.E., Munck, A. (1987)**
Activation of cytosolic glucocorticoid receptor complexes in intact WEHI-7 cells does not dephosphorylate the steroid binding protein, *J. Biol. Chem.*, 262 : 5644-5648
- Mercier, L., Thompson, E.B., Simons, S.S. (1983)**
Dissociation of steroid binding to receptors and steroid induction of biological activity in a glucocorticoid responsive cell, *Endocrinology*, 112 : 601-609
- Middelbrook, J.L., Wong, M.D., Ishii, N., Aronow, L. (1975)**
Subcellular distribution of glucocorticoid receptor in mouse fibroblasts, *Biochemistry*, 14 : 180-186
- Miesfield, R., Godowski, P.J., Maler, B.A., Yamamoto, K.R. (1987)**
Glucocorticoid receptor mutants that define a small region sufficient for enhancer activation, *Science*, 236 : 423-427
- Milgrom, E., Atger, M., Bailly, A. (1976)**
Interaction of rat liver glucocorticoid receptor with DNA, *Eur. J. Biochem.*, 70 : 1-11

- Miller, J.M., Mc Lachlan, A.D., Klug, A. (1985)**
Repetitive zinc binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*, *Embo J.*, 4 : 1605-1612
- Miller, P.A., Ostrowski, M., Hager, G.L., Simons, S.S. (1984)**
Covalent and non covalent receptor glucocorticoid complexes preferentially bind to the same region of LTR of mouse mammary tumor virus, *Biochemistry*, 23 : 6883-6889
- Misrahi, M., Atger, M., D'Auriol, L., Loosfelt, T.H., Meriel, G., Fridlanski, F., Galibert, F., Milgrom, E. (1987)**
Complete aminoacid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned DNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 143 : 740-748
- Miyabe, S., Harrisson, R.W. (1982)**
In vivo activation and nuclear binding of the At-T20 mouse pituitary tumor cell glucocorticoid receptor, *Endocrinology*, 112 : 2174-2180
- Modigliani, E., Gattegno, L. (1987)**
Le lymphocyte est une cellule endocrine, *Med. Sci.*, 3 : 275-281
- Moguilewski, M., Philibert, D. (1984)**
RU 38486 : Potent antiglucocorticoid activity correlated with strong binding to the cytosolic receptor followed by an impaired activation, *J. Ster. Biochem.*, 20 : 271-276
- Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.P. (1965)**
On the allosteric transitions : a plausible model, *J. Mol. Biol.*, 12 : 88-118
- Moudgil, V.K., Hurd, C. (1987)**
Transformation of the calf uterine progesterone receptor : analysis of the process when receptor is bound to progesterone or RU 38486, *Biochemistry*, 26 : 4993-5001
- Mullick, A., Katzenellenbogen, B.S. (1986)**
Antiprogestin-receptor complexes : differences in the interaction of the antiprogestin RU 38486 and the progestin R 5020 with the progesterone receptor of human breast cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 135 : 90-97
- Munck, A., Brinck-Johnsen, T. (1968)**
Specific and non specific physicochemical interactions of glucocorticoids and related steroids in vitro, *J. Biol. Chem.*, 243 : 5556-5565
- Munck, A., Wira, C. (1975)**
Methods for assessing hormone kinetics receptor with cells in suspension, *Meth. Enzymo.*, 36 : 255-264

- Munck, A., Leung, K. (1976)**
Glucocorticoids and mechanism of action, in *Receptors and Mechanism of Action of Steroid Hormones (II)*, J.R. Pasqualini Ed., Walter De Gruyter : 312-367
- Munck, A., Foley, R. (1976)**
Kinetics of glucocorticoid receptor complexes in rat thymus cells, *J. Ster. Biochem.*, 7 : 1117-1122
- Munck, A., Foley, R. (1979)**
Activation of steroid hormone receptor complexes in target cells in physiological conditions, *Nature*, 278 : 752-754
- Munck, A., Mc Guyre, P.M., Holbrook, N.J. (1984a)**
Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacology, *Endocrine Rev.*, 5 : 25-42
- Munck, A., Holbrook, N.J. (1984b)**
Glucocorticoid receptor in rat thymus cells : rapid kinetics behavior and a cyclic model, *J. Biol. Chem.*, 259 : 820-831
- Munck, A., Holbrook, N.J. (1987)**
Steroid hormone antagonism and a cyclic model of receptor kinetics, *J. Ster. Biochem.*, 26 : 173-179
- Munoz, A., Zenke, M., Gehring, U., Sap, J., Beug, H. Vennstrom, B. (1988)**
Characterisation of the hormone binding domain of the chicken c-erb-A/thyroid hormone receptor protein, *Embo J.*, 7 : 155-159
- Naray, A. (1983)**
Molybdate effect on the glucocorticoid receptor in cell-free system and in intact lymphocytes, *Biochem. Biophys. Acta*, 756 : 328-334
- Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Ota, M. (1987)**
Purification and characterisation of a non binding component of the non transformed glucocorticoid receptor from rat liver, *J. Biochem.*, 102 : 513-523
- Northrop, J.P., Danielsen, M., Ringold, G.M. (1986)**
Analysis of glucocorticoid unresponsive cell variants using a mouse glucocorticoid receptor c-DNA clone, *J. Biol. Chem.*, 261 : 11604-11070
- Okret, S., Wikstrom, A.C. (1985)**
Molybdate stabilized glucocorticoid receptor : evidence for a receptor heteromer, *Biochemistry*, 24 : 6581-6586
- Okret, S., Poellinger, L., Dong, Y., Gustafsson, J.A. (1986)**
Down-regulation of glucocorticoid receptor m-RNA by glucocorticoids and recognition by glucocorticoids of a specific binding site within a receptor c-DNA clone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 : 5899-5906

- Papamichail, M., Tsokos, G., Tsauroglou, V., Sekeris, G.E. (1980)**
Immunocytochemical demonstration of glucocorticoid receptor from different cell type and their translocation to the nuclei,
Exp. Cell. Res., 125 : 490-494
- Payvar, F., DeFranco, D., Firestone, G.L., Edgar, B., Wrange, O., Okret, S., Gustafsson, J.A. (1983)**
Sequence specific binding of glucocorticoid receptor to MTV DNA within and upstream of the transcribed region, *Cell*, 35 : 381-392
- Pearce, P.T., Khalid, B.A., Funder, J.W. (1983)**
Progesterone receptor in rat thymus, *Endocrinology*, 113 : 124-129
- Pelham, H.R.B. (1986)**
Speculations on the functions of the major heat shock and glucose regulated proteins, *Cell*, 46 : 959-961
- Perrot-Appianat, M., Logeat, F., Groyer, M.T., Milgrom, E. (1985)**
Immunocytochemical study of mammalian progesterone receptor using monoclonal antibodies, *Endocrinology*, 116 : 1473-1478
- Petersen, N.D., Magnuson, M.A., Granner, D.K. (1988)**
Location and characterisation of two widely separated glucocorticoid response elements in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene, *Mol. Cell. Biol.*, 8 : 96-104
- Petkovitch, M., Brand, N.J., Krust, A., Chambon, P. (1987)**
A human retinoic receptor which belongs to the family of nuclear receptors, *Nature*, 330 : 444-450
- Pfahl, M. (1982)**
Specific binding of glucocorticoid receptor to MMTV proviral promoter center, *Cell*, 31 : 475-482
- Phi-Van, L., Strahling, W.H. (1988)**
The matrix attachment regions of the chicken lysozyme gene co-map with the boundaries of the chromatin domain, *Embo J.*, 7 : 655-664
- Philibert, D. (1984)**
RU 38486 : An original multifaceted antihormone in vivo, in *Adrenal Steroid Antagonism*, M.K. Agarwal Ed., Walter de Gruyter, Berlin : 77-101
- Picard, D., Yamamoto, K.R. (1987)**
Two signals mediate hormone-dependant nuclear localisation of the glucocorticoid receptor, *Embo J.*, 6 : 3333-3340
- Ponta, H., Kennedy, N., Scroch, P., Hynes, N.E., Groner, B. (1985)**
Hormonal response region in the mouse mammary tumor virus long terminal repeat can be dissociated from the viral promoter and has enhancer property, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 : 1020-1024

Porath, J. (1963)

Some recently developed fractionation procedures and their application to peptides and protein hormones, *J. Pure Appl. Chem.*, 6 : 233-244

Pratt, W.B., Kaine, J.L., Pratt, D.V. (1975)

The kinetics of glucocorticoid binding to the soluble specific binding protein of mouse fibroblast, *J. Biol. Chem.*, 250 : 4584-4591

Pratt, W.B. (1987)

Transformation of glucocorticoid and progesterone receptor to the DNA binding state, *J. Cell. Biol.*, 35 : 51-68

Pratt, W.B., Jolly, D.J., Hollenberg, S.M., Giguere, V., Cadepond, F., Evans, R.M., Baulieu, E.E. (1988)

A region in the steroid binding domain determines the formation of the non-DNA binding, 9S glucocorticoid receptor complex, *J. Biol. Chem.*, 263 : 267-273

Ptashne, M. (1986)

Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance, *Nature*, 322 : 697-701

Raaka, B.M., Samuels, H.H. (1983)

The glucocorticoid receptor in GH1 cells, *J. Biol. Chem.*, 258 : 417-425

Raaka, B.M., Finnerty, M., Sun, E., Samuels, H.H. (1985)

Effect of molybdate on glucocorticoid receptor of GH3 cells, *J. Biol. Chem.*, 260 : 14009-14012

Rabindran, S.K., Danielsen, M., Stallcup, M.R. (1987)

Glucocorticoid-resistant lymphoma cells variants that contain functional glucocorticoid receptor, *Mol. Cell. Biol.*, 7 : 4211-4217

Radyani, C., Joab, I., Renoir, J.M., Richard-Foy, H., Baulieu, E.E. (1983)

Monoclonal antibody to the chicken oviduct progesterone receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 : 2854-2858

Radojcic, M., Okret, S., Wrangé, O., Gustafsson, J.A. (1985)

Characterisation of the non liganded glucocorticoid receptor in rat liver cytosol using indirect competitive enzyme immunoassay, *J. Ster. Biochem.*, 23 : 1-8

Rao, G.R. (1981)

Mode of entry of steroid and thyroid hormones into cells, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 21 : 97-108

Rapjert, E.J., Lemaigre, F.P., Eliard, P.H., Place, M., Lafontaine, D.A., Belayew, A., Martial, J.E., Rousseau, G.G. (1986)

Glucocorticoid receptors bound to the antagonist RU 486 are not down-regulated despite their capacity to interact in-vitro with defined gene regions, *J. Ster. Biochem.*, 26 : 513-520

Raynaud, J.P., Bonne, C., Bouton, M.M., Moguilewski, M., Philibert, D., Azadian, G. (1975)

Screening for antihormones by receptor studies,
J. Ster. Biochem., 6 : 615-622

Raynaud, J.P., Bouton, M.M., Ojasoo, T. (1980a)

The use of interaction kinetics to distinguish potential antagonists from agonists, Trends Pharmacol. Sci., 6 : 324-327

Raynaud, J.P., Bouton, M.M., Moguilewski, M., Ojasoo, T., Philibert, D., Beck, G., Labrie, F., Mornon, J.P. (1980b)

Steroid hormone receptors and pharmacology,
J. Ster. Biochem., 12 : 143-157

Reichman, M.E., Foster, G.M., Eisen, L.P., Eisen, H.J., Torain, B.F., Simons, S.S. (1984)

Limited proteolysis of covalently labelled glucocorticoid receptor as a probe of receptor structure, Biochemistry, 23 : 5376-5384

Renoir, J.M., Buchou, T., Baulieu, E.E. (1986)

Involvement of a non hormone binding 90 KDa protein in the non transformed form of the rabbit uterus progesterone receptor,
Biochemistry, 25 : 6404-6413

Richard-Foy, H., Hager, G.L. (1987a)

Sequence-specific positioning of nucleosomes over the steroid inducible MMTV promoter, Embo J., 6 : 2321-2328

Richard-Foy, H., Sistare, F.D., Riegel, A.T., Simons, S.S., Hager, G.L. (1987b)

Mechanism of dexamethasone-21-mesylate antiglucocorticoid action (II), Mol. Endocrino., 1 : 659-665

Riehl, R.M., Sullivan, W.P., Vroman, B.T., Bauer, V.J., Pearson, G.P., Toft, D.O. (1985)

Immunological evidence that the non hormone binding component of avian steroid receptors exist in a wide range of tissue and species,
Biochemistry, 24 : 6584-6591

Ringold, G.M., Yamamoto, K.R., Bishop, J.M., Varmus, H.E. (1977)

Glucocorticoid stimulated accumulation of MMTV RNA : increased rate of synthesis of viral RNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 : 2879-2883

Ringold, G.M. (1984)

Steroid hormone regulation of gene expression,
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 25 : 529-566

Rochefort, H., Borgna, J.L., Evans, E. (1983)

Cellular and molecular mechanism of action of antiestrogens,
J. Ster. Biochem., 19 : 69-74

Rocheffort, H. (1987)

Do antiestrogens and antiproggestins act as hormone antagonists or receptor-targeted drugs in breast cancer, *Trends Pharmacol. Sci.*, 8 : 126-129

Rosewic, S., Mc Donald, A.R., Maddux, B.A., Goldfine, I.D., Miesfield, R.L., Lodgson, G.D. (1988)

Mechanism of glucocorticoid receptor down-regulation by glucocorticoids, *J. Biol. Chem.*, 263 : 2581-2584

Rousseau, G.G., Baxter, J.D., Tomkins, G.M. (1972)

Glucocorticoid receptors : relation between steroid binding and biological effects, *J. Mol. Biol.*, 67 : 99-115

Rousseau, G.G., Baxter, J.D., Higgins, S.J., Tomkins, G.M. (1973)

Steroid induced nuclear binding of glucocorticoid receptors in intact hepatoma cells, *J. Mol. Biol.*, 79 : 539-554

Rousseau, G.G., Kirchhoff, J., Formstecher, P., Lustenberger, P. (1979)
17- β carboxamide steroids are a new class of glucocorticoid antagonists, *Nature*, 279 : 158-160

Rousseau, G.G., Cambon, P., Brasseur, N., Marcotte, L., Matton, P., Schmidt, J.P. (1983)

Glucocorticoid agonist and antagonist activity of 17-21 acetonide steroids, *J. Ster. Biochem.*, 18 : 237-244

Rousseau, G.G. (1984)

Control of gene expression by glucocorticoid hormones, *Biochem. J.*, 224 : 1-12

Rubin, M.M., Changeux, J.P. (1966)

On the nature of allosteric transitions : implications of non-exclusive ligand binding, *J. Mol. Biol.*, 21 : 265-274

Ruiz, A., Perry, H., Melton, D.A. (1987)

Xfin : an embryonic gene encoding a multifingered protein in *Xenopus*, *Embo J.*, 6 : 3065-3070

Rusconi, S., Yamamoto, K.R. (1987)

Functional dissection of the hormone and DNA binding activities of the glucocorticoid receptor, *Embo J.*, 6 : 1309-1315

Sabbah, M., Redheuil, G., Secco, C., Baulieu, E.E. (1987)

The binding activity of estrogen receptor to DNA and hsp 90 is dependant on receptor bound metal, *J. Biol. Chem.*, 262 : 8631-8635

- Sablonniere, B., Danzè, P.M., Formstecher, P., Lefebvre, P., Dautrevaux, M. (1986)**
Physical characterisation of the activated and non activated forms of the glucocorticoid receptor complexes bound to the steroid antagonist RU 486, *J. Ster. Biochem.*, 25 : 605-614
- Sablonniere, B., Lefebvre, P., Formstecher, P., Dautrevaux, M. (1987)**
Improved Stokes radius measurement of the glucocorticoid receptor using TSK G3000SW and TSK G4000SW high performance size exclusion columns, *J. Chromatogr.*, 403 : 183-196
- Sablonniere, B., Lefebvre, P., Richard, C., Formstecher, P., Dautrevaux, M. (1988a)**
Heterogeneity of the untransformed glucocorticoid receptor (I), Evidence that a ribonuclease sensitive factor is associated with the receptor, submitted to *Eur. J. Biochem.*,
- Sablonniere, B., Economidis, I.V., Place, M., Formstecher, P., Rousseau, G.G. (1988b)**
Heterogeneity of the untransformed glucocorticoid receptor (II), Sensitivity to substrate-specific ribonucleases and characterization of a RNA associated with the purified receptor, submitted to *Eur. J. Biochem.*
- Sakaue, Y., Thompson, E.B. (1977)**
Characterisation of two forms of glucocorticoid hormone receptor complexes by DEAE-cellulose column chromatography, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77 : 533-541
- Samuels, H.H., Tomkins, G.M. (1970)**
Relation of steroid structure to enzyme induction in hepatoma tissue culture cells, *J. Mol. Biol.*, 52 : 57-74
- 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 heat shock protein, *J. Biol. Chem.*, 260 : 12398-12401
- Sanchez, E.R., Meshinhi, S., Tienrungroj, W., Schlesinger, M.J., Toft, D.O., Pratt, W.B. (1987)**
Relationship of the 90 K murine heat shock protein to the transformed and untransformed states of the L-cell glucocorticoid receptor, *J. Biol. Chem.*, 262 : 6986-6991
- Sap, J., Munoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Ghysdael, J., Leutz, A., Beug, H., Vennstrom, B. (1986)**
The c-erb-A protein is a high affinity receptor for thyroid hormone, *Nature*, 324 : 635-640

- Sasson, S., Mayer, M. (1981)**
Antiglucocorticoid activity of androgens in rat thymus lymphocytes,
Endocrinology, 108 : 760-767
- Scatchard, G. (1949)**
The attraction of proteins for small molecules and ions,
Ann. N. Y. Acad. Sci., 51 : 660-666
- Schaumburg, B.P. (1970)**
Studies of the glucocorticoid binding protein from thymocytes,
Biochim. Biophys. Acta, 214 : 520-532
- Schmidt, T.J., Sekula, B.C., Litwack, G. (1981)**
The effect of 1-10 phenanthroline on the binding of activated rat hepatic glucocorticoid receptor complexes to DNA-cellulose,
Endocrinology, 109 : 803-812
- Schmidt, T.J., Litwack, G. (1982)**
Activation of the glucocorticoid receptor complex,
Physiol. Rev., 62 : 1132-1184
- Schmidt, T.J. (1986)**
In-vitro activation and DNA binding affinity of human lymphoid CEM-C7 cytoplasmic receptors labelled with the RU 486,
J. Ster. Biochem., 24 : 853-863
- Schmidt, T.J., Davidson, C.J. (1987)**
The antiglucocorticoid cortexolone fails to promote in-vitro activation of cytoplasmic glucocorticoid receptor from the cell line CEM-C7,
J. Ster. Biochem., 26 : 329-336
- Schuh, S., Yonemoto, W., Brugge, J., Bauer, V.J., Riehl, R.M., Sullivan, W.P., Toft, D.O. (1985)**
A 90 KDa non-binding protein common to both steroid receptors and the Rous sarcoma virus transforming protein pp 60 v-sarc,
J. Biol. Chem., 260 : 14292-14296
- Schule, R., Muller, M., Otsuka-Murakami, H., Renkawitz, R. (1988)**
Cooperativity of the glucocorticoid receptor and the CACCC-box binding factor, *Nature*, 332 : 87-90
- Seigler, L., Svec, F. (1984a)**
Physicochemical properties of the At-T20 cell glucocorticoid receptor during depletion, *J. Ster. Biochem.*, 21 : 21-27
- Seigler, L., Svec, F. (1984b)**
Characterization of the At-T20 cell repleting glucocorticoid receptor,
Biochim. Biophys. Acta, 800 : 111-118
- Sherman, M.R., Moran, M.C., Tuazon, F.B., Stevens, Y.W. (1983)**
Structure, dissociation and proteolysis of mammalian steroid receptors,
J. Biol. Chem., 258 : 10366-10377
- Siegel, L.M., Monty, K.J. (1966)**
Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by the use of gel filtration and density gradient centrifugation, *Biochim. Biophys. Acta*, 112 : 346-362

- Simons, S.S., Thompson, E.B., Johnson, D.F. (1979)**
Anti inflammatory pyrazolo-steroid : potent glucocorticoids containing bulky A ring substituents and no C3 carbonyl,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 86 : 793-799
- Simons, S.S., Thompson, E.B., Johnson, D.F. (1980)**
Unique long acting antiglucocorticoid in whole and broken cell systems,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 5167-5171
- Simons, S.S., Thompson, E.B. (1981)**
Dexamethasone-21-mesylate : an affinity label of glucocorticoid receptors for the rat hepatoma tissue culture cells,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 : 3541-3645
- Simons, S.S., Schleenbaker, R.E., Eisen, H.J. (1983)**
Activation of covalently labeled glucocorticoid receptor complexes,
J. Biol. Chem., 258 : 2229-2238
- Simons, S.S., Miller, P.A. (1984)**
Comparison of DNA binding properties of activated covalent and non covalent glucocorticoid receptors, Biochemistry, 23 : 6876-6882
- Simons, S.S. (1987a)**
Selective covalent labelling of cysteine in bovine serum albumine and in HTC cell glucocorticoid receptor by dexamethasone-21-mesylate,
J. Biol. Chem., 262 : 9676-9680
- Simons, S.S., Pumphrey, J.G., Rudikoff, S., Eisen, H.J. (1987b)**
Identification of cysteine 656 as the amino acid of hepatoma tissue culture cell glucocorticoid receptors that is covalently labelled by dexamethasone-21-mesylate, J. Biol. Chem., 262 : 9676-9680
- Sistare, F.D., Hager, G.L., Simons, S.S. (1987)**
Mechanism of dexamethasone-21-mesylate antiglucocorticoid action (I),
Molec. Endocrin., 1 : 648-658
- Smith, A.C., Elsasser, M.S., Harmon, J.M. (1986)**
Analysis of glucocorticoid receptor activation by high resolution two dimensional electrophoresis of affinity labelled receptors,
J. Biol. Chem., 261 : 13285-13292
- Stevens, J., Stevens, Y.W., Rhodes, J., Steiner, G. (1978)**
Differences in nuclear glucocorticoid binding between corticoid-sensitive and corticoid-resistant lymphocytes of mouse lymphoma P1768,
J. Natl. Cancer Inst., 61 : 1477-1483
- Stewart, T.A., Hollingshead, P.G., Pitts, S.L. (1988)**
Multiple regulatory domains in the MMTV LTR revealed by the analysis of fusion genes in transgenic mice, Mol. Cell. Biol., 8 : 473-478

- Strahle, U., Klock, G., Schutz, G. (1987)**
A DNA sequence of 15 pb is sufficient to mediate both glucocorticoid and progesterone induction of gene expression, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 : 7871-7875
- Sullivan, W.P., Vroman, B.T., Bauer, V.J., Ruri, R.K., Riehl, R.M., Pearson, G.R., Toft, D.O. (1985)**
Isolation of steroid receptor binding protein from chicken oviduct and production of monoclonal antibodies, Biochemistry, 24 : 4214-4222
- Sutherland, R.L., Watts, C.K., Ruenitz, P.C. (1986)**
Definition of two distinct mechanism of action of antiestrogens on human breast cancer cells proliferation using hydroxy-phenylethylenes with high affinity for the estrogen receptor, Biochem. Biophys. Res. Commun., 140 : 523-527
- Svec, F., Rudis, M. (1981)**
Glucocorticoids regulate the glucocorticoid receptor in At-T20 cells, J. Biol. Chem., 256 : 5984-5987
- Svec, F., Rudis, M. (1984)**
The binding of deoxycorticosterone by AtT20 cells, J. Ster. Biochem., 20 : 941-944
- Svec, F. (1985)**
Glucocorticoid receptor regulation, Life Sci., 36 : 2359-2366
- Tai, P.K., Maeda, Y., Nakao, K., Waken, N.G., Duhring, J.L., Faber, L.E. (1986)**
A 58 KDa protein associated with progesterone, androgen, estrogen and glucocorticoid receptors, Biochemistry, 25 : 5269-5272
- Theveny, B., Bailly, A., Rauch, C., Rauch, M., Delain, E., Milgrom, E. (1987)**
Association of DNA bound progesterone receptor, Nature, 329 : 79-81
- Thompson, E.B., Lippman, M.E. (1974)**
Mechanisms of action of glucocorticoids, Metabolism, 23 : 159-202
- Tienrungroj, W., Sanchez, E.R., Housley, P.R., Harrison, R.W., Pratt, W.B. (1987a)**
Glucocorticoid receptor phosphorylation, transformation and DNA binding, J. Biol. Chem., 262 : 17342-17349
- Tienrungroj, W., Meshinchi, S., Sanchez, E.R., Pratt, E.S., Grippo, J.F., Hollingeven, A., Pratt, W.B. (1987b)**
The role of sulfhydryl groups in permitting transformation and DNA binding of the glucocorticoid receptor, J. Biol. Chem., 262 : 6992-7000
- Toth, K., Aranyi, P. (1983)**
Effect of heat treatment on glucocorticoid receptor complex : dependance on steroid structure, Biochim. Biophys. Acta, 761 : 196-203

- Towbin, T., Staehelin, T., Gordon, J. (1979)**
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets : procedure and applications,
Proc. Natl. Acad. USA, 76 : 4350-4354
- Tur-Kaspa, R., Burk, R.D., Shav, Y., Shafritz, D.A. (1986)**
Hepatitis B virus DNA contains glucocorticoid responsive elements,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 : 1627-1631
- Turcotte, B., Guertin, M., Chevette, M., Larue, H., Belanger, L. (1986)**
DNase I hypersensitivity and methylation of the 5'flanking region of the α -1 fetoprotein gene, Nuc. Acid Res., 14 : 9827-9842
- Turnell, R.W., Kaiser, N., Milholland, R.J., Rosen, N.F. (1974)**
Glucocorticoid receptors in rat thymus : interaction with cortexolone,
J. Biol. Chem., 249 : 1133-1138
- Van Bohemen, C.G., Rousseau, G.G. (1982)**
Calmodulin antagonists competitively inhibit dexamethasone binding to the glucocorticoid receptor, Febs Lett., 143 : 21-25
- Vanderbilt, J.N., Miesfeld, D.R., Maler, B.A., Yamamoto, K.R. (1987)**
Intracellular receptor concentration limits glucocorticoid-dependant enhancer activity, Molec. Endocrino., 1 : 68-74
- Varmus, H.E. (1987)**
Oncogens and transcriptional control, Science, 238 : 1337-1340
- Vedeckis, V.W. (1983)**
Subunit dissociation as a possible mechanism of glucocorticoid receptor activation, Biochemistry, 22 : 1983-1989
- Von der Ahe, D., Renoir, J.M., Buchou, T., Baulieu, E.E., Beato, M. (1986)**
Receptors for glucocorticoids and progesterone recognize distinct features of a DNA regulatory element, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 : 2817-2821
- Walters, S.N., Reinhardt, T.A., Dominick, M.A., Horst, R.E., Littledick, E.T., (1986)**
Intracellular location of unoccupied 1,25 dihydroxyvitamin D3 receptors : a nuclear cytoplasmic equilibrium, Arch. Biochem. Biophys., 246 : 366-373
- Waterman, M.L., Adler, S., Nelson, C., Greene, G.L., Evans, R.M., Rosenfeld, M.G. (1988)**
A single domain of the estrogen receptor confers DNA binding and transcriptional activation of the rat prolactin gene,
Molec. Endocrino., 2 : 14-20
- Weatherhill, P.J., Wilson, A.P., Wakeling, A.E. (1987)**
Interaction of the antiestrogen ICI 164384 with the estrogen receptor, in Abstracts of the 8th International Symposium of the J. Ster. Biochem. : 67

- Webster, N., Jin, J.R., Green, S., Holliws, M., Chambon, P. (1988)**
The yeast UASg is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 trans-activator, *Cell*, 52 : 169-178
- Weinberger, C., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M. (1985a)**
Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the v-erb-A oncogene product, *Nature*, 318 : 670-672
- Weinberger, C., Hollenberg, S.M., Ong, E.S., Harmon, J.M., Brower, S.T., Cidrowski, J., Thompson, E.B., Rosenfeld, G.M., Evans, R.M. (1985b)**
Identification of human glucocorticoid receptor cDNA clone by epitope selection, *Science*, 228 : 740-742
- Weinberger, C., Thompson, C.C., Ong, E.S., Lebo, R., Gruol, D.J., Evans, R.M. (1986)**
The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor, *Nature*, 324 : 641-644
- Welsch, W.J., Feramisco, J.R. (1987)**
Purification of the major mammalian heat shock protein, *J. Biol. Chem.*, 257 : 1949-1957
- Welshons, W.V., Lieberman, M.E., Gorski, J. (1984)**
Nuclear localization of unoccupied estrogen receptors, *Nature*, 302 : 747-750
- Westphal, H.M., Moldenhauer, G., Beato, M. (1982)**
Monoclonal antibodies to the rat liver glucocorticoid receptor, *Embo J.*, 1 : 1467-1471
- Wheeler, R.H., Leach, K.L., Laforest, A.C., O'Toole, T.E., Wagner, R., Pratt, W.B. (1981)**
Glucocorticoid receptor activation and inactivation in cultured human lymphocytes, *J. Biol. Chem.*, 256 : 434-441
- Wikstrom, A.C., Bakke, O., Okret, S., Bronnegard, M., Gustafsson, J.A. (1987)**
Intracellular localization of the glucocorticoid receptor : evidence for cytoplasmic and nuclear localization, *Endocrinology*, 120 : 1232-1241
- Willman, T., Beato, M. (1986)**
Steroid free glucocorticoid receptor binds specifically to mouse mammary tumor virus DNA, *Nature*, 324 : 688-691
- Wira, C.R., Munck, A. (1970)**
Specific glucocorticoid receptors in rat thymus cells, *J. Biol. Chem.*, 245 : 3436-3439

Wira, C.R., Munck, A. (1974)

Glucocorticoid receptor complexes in rat thymus cells,
J. Biol. Chem., 249 : 5328-5336

Wolfson, A.J. (1984)

Non activated progesterone receptor extracted from nuclei of hen oviduct,
J. Ster. Biochem., 21 : 519-521

Yamamoto, K.R. (1985)

Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene network,
Ann. Rev. Genet., 19 : 209-252

Yang-Chou, J., Wan, J.Y., Sakiyama, T. (1988)

Regulation of rat liver maturation in vitro by glucocorticoids,
Mol. Cell. Biol., 8 : 203-209

Ziemecki, A., Catelli, M.G., Joab, I., Moncharmont, B. (1986)

Association of the heat shock protein hsp 90 with steroid hormone receptors
and tyrosine kinase oncogene product,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 138 : 1298-1307

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

A - FIGURES

I - Partie bibliographique

	Pages
Figure 1 - Axe hypothalamo-hypophysaire	8
Figure 2 - Quelques effets métaboliques des glucocorticoïdes	10
Figure 3 - Effets des glucocorticoïdes sur la production de cytokines par les différents composants du système immunitaire	13
Figure 4 - Sensibilité du récepteur des glucocorticoïdes (GR) à la protéolyse	14
Figure 5 - Localisation des domaines du GR de rat	16
Figure 6 - Homologies de séquences entre les récepteurs des hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes	17
Figure 7 - Structures primaire, secondaire et tertiaire des doigts à zinc de TFIIIA	20
Figure 8 - Modèle d'interaction entre une protéine possédant des doigts à zinc arrangés en tandem et l'ADN	20
Figure 9 - Structure de l'hélice alpha supposée être responsable de la fonction d'activation de la transcription	24
Figure 10 - Domaines fonctionnels des facteurs de transcription eucaryotiques	24
Figure 11 - Modèles proposés pour l'activation de la transcription par le récepteur des glucocorticoïdes	33
Figure 12 - Modèle classique de l'action des glucocorticoïdes	36
Figure 13A - Cinétique de formation par l'acétonide de triamcinolone des complexes dans la cellule intacte	40
Figure 13B - Influence de la température sur la cinétique de formation des différents types de complexes dans les thymocytes intacts	40
Figure 14A - Modèle cyclique simplifié de Munck et Holbrook	42
Figure 14B - Modèle à l'équilibre de Raaka et Samuels	42
Figure 15 - Représentation du cycle cellulaire du GR	48
Figure 16 - Courbe théorique dose-réponse pour les différentes classes de ligand du GR	53
Figure 17 - Structure chimique des 2 classes de composés stéroïdiens à propriétés antagonistes	53
Figure 18 - Modèle cyclique de Munck et Holbrook	65

II - RESULTATS EXPERIMENTAUX

Figure 19 - Représentations graphiques de la liaison hormone-récepteur	74
Figure 20 - Cinétique du transfert nucléaire de ^3H TA et ^3H RU 486 dans les thymocytes de rat incubés à 37°C	80

Figure 21 - Variation de la liaison du ^3H RU 486 aux noyaux de thymocytes de rat	82
Figure 22 - Etude de la localisation subcellulaire des sites surnuméraires liant le RU 486 avec ou sans Triton X-100	83
Figure 23 - Transfert nucléaire de divers stéroïdes dans les thymocytes de rat	85
Figure 24 - Structure chimique des ligands du GR utilisés	91
Figure 25 - Cinétique de transformation des complexes cytosoliques dans les thymocytes intacts en présence d'agonistes naturels ou de synthèse	93
Figure 26 - Cinétique de transformation des complexes cytosoliques préformés dans les thymocytes intacts en présence d'agonistes naturels ou de synthèse	94
Figure 27 - Profils d'élution des complexes macromoléculaires cytosoliques formés avec le cortisol, la cortéxolone et le mésylate de dexaméthasone	98
Figure 28 - Analyse des complexes GR-TFP par échange et Western-blot	100
Figure 29 - Exposition des complexes cytoplasmiques GR-TA ou GR-RU 486 à 0,4 M KCl ou 50 mM MgCl ₂	105
Figure 30 - Analyse par chromatographie d'exclusion de taille des complexes nucléaires GR-TA et GR-RU 486	108
Figure 31 - Coélution des complexes GR-RU 486 et de la hsp 90 après chromatographie d'exclusion de taille	113
Figure 32 - Modification du R_s rayon de Stokes et du coefficient de sédimentation des complexes GR-RU 486 en présence de l'anticorps Ac88	116
Figure 33 - Analyse par dot-blot et Western-blot des fractions des gradients de saccharose et de chromatographie d'exclusion de taille pour leur contenu en hsp 90 libre ou liée à l'anticorps Ac88	117
Figure 34 - Schéma d'interaction entre la hsp 90 dimérique libre ou complexée au GR avec l'anticorps Ac88	120

B - TABLEAUX

I - PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I - Effets des glucocorticoïdes sur le taux en ARN-m codant pour diverses protéines	27
Tableau II - Caractéristiques de différentes formes du GR de thymocytes de rat	36
Tableau III - Principaux ligands du GR	58

II - RESULTATS EXPERIMENTAUX

Tableau IV - Corrélation entre le taux de transformation et les caractéristiques physicochimiques des complexes GR-stéroïde	70
Tableau V - Correspondance entre l'état de transformation et les paramètres physicochimiques	73

Tableau VI - Variation de la liaison spécifique du ^3H RU 486 aux thymocytes intacts	77
Tableau VII - Comparaison de la liaison de différents stéroïdes aux thymocytes intacts et au cytosol thymique	78
Tableau VIII - Valeurs du transfert nucléaire du RU 486 en fonction de certains facteurs expérimentaux	87
Tableau IX - Paramètres hydrodynamiques et poids moléculaire apparent des complexes GR-TA, GR-Dex et GR-RU 486	89
Tableau X - Modification du rayon de Stokes, et de la localisation intracellulaire des complexes GR-stéroïde en fonction du temps, de la température et de la nature du stéroïde utilisé	96
Tableau XI - Corrélation entre activité de liaison, R_s et conditions d'analyse	103
Tableau XII - Extraction des complexes GR-stéroïdes localisés dans les noyaux préparés en présence de 0,1 % Triton X-100	107
Tableau XIII - Purification des noyaux de thymocytes de rat	110
Tableau XIV - Paramètres physicochimiques des complexes GR-RU 486 et de la hsp 90 en présence ou en l'absence de l'anticorps monoclonal Ac 88	118

TABLE DES MATIERES

	Pages
CHAPITRE I - PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	5
INTRODUCTION	6
A - Physiologie des glucocorticoïdes	7
I - Régulation de la sécrétion du glucocorticoïde endogène	7
II - Effets biologiques des glucocorticoïdes	9
a) Effets métaboliques	9
b) Effets sur les processus inflammatoires	11
c) Effets sur le système immunitaire	11
B - Le récepteur des glucocorticoïdes, facteur de transcription hormono-inductible	12
I - Structure et fonctions du polypeptide liant le stéroïde	14
a) La région A/B ou domaine immunogène	15
b) La région C, domaine de liaison à l'ADN	15
c) La région D	21
d) La région E ou domaine de liaison du stéroïde	21
e) Conclusion	23
II - Interaction du récepteur transformé avec l'ADN	25
a) Modulation du taux en ARN-m	26
b) Nature des sites d'interaction	28
c) Le concept d'élément de réponse aux hormones (HRE)	29
d) Existence d'une séquence consensus au sein des éléments de réponse aux GC (GRE)	30
e) Propriétés des GRE	31
f) Mécanisme d'action	32
C - Modulation de l'activité du récepteur des glucocorticoïdes	34
I - Localisation intracellulaire du GR	35
II - La transformation	37
a) La transformation <i>in vitro</i> , en milieu acellulaire	37
b) La transformation dans les cellules intactes et <i>in vivo</i> .	38
c) Structure du récepteur non transformé	43
d) Dissociation du complexe hétéroooligomérique lors de la transformation	45
e) Importance de la phosphorylation et de l'état d'oxydation du récepteur	45
f) Inhibition de la transformation par le molybdate	47

III - Modulation des réponses biologiques induites par les glucocorticoïdes	47
a) Régulation par le récepteur	49
b) Régulation par le ligand	51
1- Relation taux d'occupation du récepteur-amplitude de la réponse biologique	51
2- Classification des stéroïdes	52
3- Facteurs affectant l'affinité et l'activité du ligand	54
D - Les antiglucocorticoïdes	55
I - Description de l'activité antiglucocorticoïde de divers dérivés stéroïdiens	57
II - Particularités de comportement des complexes antiglucocorticoïdes-GR	59
a) Différence de comportement cinétique	59
b) Etude des caractéristiques physicochimiques des complexes antagonistes-GR	60
c) Modèles proposés pour expliquer l'activité des antiglucocorticoïdes	62
c.1 - Modèle de Samuels et Tomkins	62
c.2 - Modèle de Pratt	63
c.3 - Modèle de Bell et Jones	63
c.4 - Modèle de Raynaud	63
c.5 - Modèle de Munck	64
Conclusion	64
CHAPITRE II - RESULTATS EXPERIMENTAUX	67
A - Rappels des résultats acquis au laboratoire	68
B - Description des conditions expérimentales	71
I - Le matériel biologique	
II - Conditions d'incubation des cellules et d'analyse des complexes GR-ligands	72
C - Caractéristiques de la liaison d'une hormone à un récepteur. Aspects pratiques	73
D - Liaison des stéroïdes aux cellules intactes et répartition subcellulaire	75
I - Captation des stéroïdes tritiés par les thymocytes intacts	76
II - Transfert nucléaire du RU 486	79
III - Relation entre transfert nucléaire et activité biologique des stéroïdes	84
E - Etude comparative du rayon de Stokes et du coefficient de sédimentation des complexes RU 486-GR et TA-GR préformés dans les cellules intactes	88

F - Effets du ligand sur la cinétique de conversion	
7-8 nm/5 nm des complexes cytosoliques	90
I - Ligands agonistes	92
II - Ligands antagonistes	94
III - Distinction des composants macromoléculaires liant les stéroïdes	97
IV - Stabilisation de la forme non transformée par un antiglucocorticoïde non stéroïdien	97
V - Conclusion	102
G - Extraction et caractérisation des complexes nucléaires	104
I - Conditions de solubilisation	104
a) Purification des noyaux	104
b) Procédé d'extraction	104
II - Caractérisation des complexes nucléaires	106
a) A partir des noyaux purifiés	106
b) A partir du culot 4000G	109
H - Nature hétérooligomérique des complexes non transformés stabilisés par les antiglucocorticoïdes	111
I - Le GR non transformé est associé à la hsp 90	112
a) Analyse de la répartition de la hsp 90 dans l'éluat de chromatographie d'exclusion de taille	112
b) Hétérogénéité de la forme non transformée	114
c) Utilisation de l'anticorps monoclonal Ac88	115
II- La hsp 90 n'est plus associée au GR après transformation	119
I - Conclusion générale - Perspectives	121
CHAPITRE III - APPENDICE TECHNIQUE	127
CHAPITRE IV - BIBLIOGRAPHIE	139
Liste des illustrations	168

