

50376
1988



50376
1988

229 **Université des Sciences et Techniques** 229
de Lille Flandres-Artois
U.F.R. de Biologie

Année 1988

Thèse n° 280

Thèse

PRESENTÉE A L'UNIVERSITÉ DE LILLE I
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
Docteur en Biochimie

PAR

Bernard Sablonnière

ORGANISATION HETERO-OLIGOMERIQUE DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES

PRESENTÉE LE 24 NOVEMBRE 1988 DEVANT LA COMMISSION

JURY

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

A la mémoire de mon Père

*Deux choses instruisent l'homme de
toute sa nature : l'instinct et
l'expérience.*

Blaise PASCAL

Monsieur le Professeur M. DAUTREVAUX

J'espère avoir répondu à vos souhaits en accomplissant ce travail, malgré une charge hospitalière parfois ingrate. Je vous remercie vivement de vos précieux conseils.

Monsieur le Professeur J. MONTREUIL,

Je vous remercie d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Monsieur le Professeur G. ROUSSEAU,

C'est grâce à une collaboration étroite avec votre équipe que ce travail a pu être réalisé. Lors de mes nombreux déplacements à Bruxelles, j'ai pu apprécier votre rigueur scientifique, votre dynamisme et votre sympathie. Soyez assuré de ma plus profonde reconnaissance. J'espère que notre collaboration ne s'arrêtera pas après ce travail.

Monsieur le Professeur A. VERBERT,

Vous avez accepté de juger ce travail, suite du mémoire de DERBH. Je vous en remercie vivement.

Pierre FORMSTECHEUR,

Tu as guidé ce travail en sachant m'apporter autant de critiques constructives que d'encouragements.

Ton dynamisme nous permet de travailler en une véritable équipe. Je t'en remercie.

Je tiens à remercier tout particulièrement Ioannis ECONOMIDIS et Martine PLACE pour leur précieuse contribution à ce travail.

Que tous les membres du laboratoire soient également remerciés, pour leur aide, en particulier Claude RICHARD, Philippe LEFEBVRE, Bernadette MASSELOT, Françoise DELPORTE et Madame MORANDI.

RESUME

Les récepteurs stéroïdiens constituent une famille de protéines intracellulaires capables de stimuler l'activité transcriptionnelle de la cellule en se liant à des sites spécifiques au niveau du génome. Pour transmettre le signal hormonal, le récepteur subit une modification structurale, grâce à laquelle il devient capable d'activer spécifiquement certains gènes. Cette étape, extrêmement rapide *in vivo*, appelée "transformation" est importante car elle est strictement dépendante de la liaison de l'hormone et est bloquée par les ligands à activité antagoniste.

Les résultats fournis par l'utilisation des techniques de chromatographie d'affinité, du marquage d'affinité covalent et des sondes anticorps spécifiques nous ont permis d'étudier la composition moléculaire de la forme "non transformée" du récepteur des glucocorticoides. L'étude des caractéristiques physicochimiques du récepteur non transformé a été complétée par une mesure directe de la masse moléculaire de cette protéine oligomérique par l'utilisation d'un agent de réticulation. Les résultats obtenus suggèrent que le récepteur non transformé est constitué d'une sous-unité liant le ligand stéroïdien associée à deux protéines de choc thermique de 90000 daltons.

La précision apportée par la chromatographie liquide à haute performance des protéines nous a permis de caractériser une hétérogénéité de structure du récepteur non transformé caractérisée par deux formes de 8,3 nm et 7,1 nm respectivement, observée par analyse du récepteur natif; alors que le récepteur purifié est caractérisé par un rayon de stokes de 7,1 nm .

Une modification conformationnelle du récepteur est observée après traitement à la ribonucléase A (conversion 8,3 nm \rightarrow 7,1 nm). De plus, d'autres ribonucléases comme la ribonucléase de venin de cobra, spécifique des régions double-brin est capable de dissocier complètement le récepteur (forme non transformée) en la forme transformée (5,2 nm). Ces observations nous ont poussés à caractériser une molécule d'ARN de 120 nucléotides copurifiée avec le récepteur non transformé après chromatographie d'affinité. Cette molécule vraisemblablement associée dans la région N-terminale de la sous-unité liant le stéroïde pourrait moduler la liaison du récepteur sur l'ADN ou contribuer à la régulation des effets post-transcriptionnels des glucocorticoides.

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

B. SABLONNIERE, P. FORMSTECHE and M. DAUTREVAUX
Dimeric 17β -carboxamide steroids as a tool for glucocorticoid receptor subunit study.
7th International congress of Endocrinology, Quebec, Canada, 1-7 Juillet 1984.

B. SABLONNIERE, P. LEFEBVRE, P. FORMSTECHE et M. DAUTREVAUX
Intérêt de la chromatographie liquide haute performance en gel-filtration pour l'étude des complexes hormone-récepteur à glucocorticoides du foie de rat. XIe Forum des Jeunes Chercheurs (Société de Chimie Biologique) GRENOBLE 4-7 Septembre 1984.

T. IDZIOREK, P. FORMSTECHE, P.M. DANZE, B. SABLONNIERE, P. LUSTENBERGER, C. RICHARD, V. DUMUR and M. DAUTREVAUX (1985)
Characterization of the purified molybdate-stabilized glucocorticoid receptor from rat liver. An in vitro transformable complex. Eur. J. Biochem. 153, 65-74.

B. SABLONNIERE, P.M. DANZE, P. FORMSTECHE and M. DAUTREVAUX
Impaired activation of the ^3H RU 486 glucocorticoid receptor complex: physicochemical characterization of both the activated and non-activated states. VIIe International Congress on Hormonal Steroids. Madrid, Espagne, 21-26 Septembre 1986.

B. SABLONNIERE, P.M. DANZE, P. FORMSTECHE, P. LEFEBVRE and M. DAUTREVAUX (1986)
Physical characterization of the activated and non-activated forms of the glucocorticoid receptor complex bound to the steroid antagonist ^3H RU 486. J. Steroid Biochem., 25, 605-614.

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

I. ECONOMIDIS, B. SABLONNIERE, M. PLACE, P. FORMSTECHE and G.G. ROUSSEAU
Association of the glucocorticoid receptor with RNA molecules. EMBO Workshop on RNA-proteins interactions, Urbino, Italie, 29 Juin-1er Juillet 1987.

B. SABLONNIERE, I.V. ECONOMIDIS, P. LEFEBVRE, M. PLACE, C. RICHARD, P. FORMSTECHER, and M. DAUTREVAUX (1988)
RNA binding to the untransformed glucocorticoid receptor. Sensitivity to substrate-specific ribonucleases and characterization of a ribonucleic acid associated with the purified receptor. Eur. J. Biochem. (In press).

P. LEFEBVRE, B. SABLONNIERE, N. TBARKA, P. FORMSTECHER and M. DAUTREVAUX (1988)
Evidence for an asymmetric trimeric structure of the untransformed rat glucocorticoid receptor. Submitted.

B. SABLONNIERE, P. FORMSTECHER and M. DAUTREVAUX (1988)
Hydrophobic properties of the untransformed and transformed glucocorticoid receptor complexes. Comparison with the 90 Kda heat-shock protein. Submitted.

1ère PARTIE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

Les récepteurs des hormones stéroïdes représentent un groupe de protéines intracellulaires capables de réguler l'activité transcriptionnelle de la cellule. De ce fait, leur étude suscite actuellement un engouement important. Depuis la première caractérisation d'un complexe hormone-récepteur en 1968, d'importants progrès ont pu être réalisés grâce notamment aux techniques de purification des protéines, à l'utilisation de stéroïdes marqueurs d'affinité et à la production d'anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur. Conjointement aux résultats de la Biochimie des protéines, les efforts fournis par la Biologie moléculaire ont pu démontrer l'existence de sites de liaison des récepteurs au niveau du génome et ont permis d'obtenir la séquence de la plupart des récepteurs des hormones stéroïdes.

Le récepteur des glucocorticoides sous sa forme "non transformée" est incapable de se lier à l'ADN et de transmettre le message hormonal, rôle qu'il pourra accomplir une fois qu'il aura subi l'étape de la "transformation". La connaissance de la structure et de la composition moléculaire du récepteur non transformé, objet de ce travail, est importante, afin de mieux comprendre le mécanisme d'action des hormones glucocorticoides à l'échelon moléculaire et cellulaire.

I - L'HORMONE GLUCOCORTICOÏDE : MESSAGER HORMONAL PLURIFONCTIONNEL.

Les hormones glucocorticoides sont capables d'agir sur des fonctions aussi variées que le métabolisme glucidique, le système immunitaire ou le système nerveux. A ce titre, elles jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie. Leurs effets s'étendent à la plupart des tissus (LIPPMAN et THOMPSON, 1974 ; MUNCK et LEUNG, 1976). La diversité des systèmes et des organes sur lesquels ils agissent a été confirmée par la découverte de récepteurs dans la quasi-totalité des cellules dans lesquelles ils ont été recherchés. L'effet métabolique le plus important s'exerce au niveau du foie où l'on observe une stimulation de la glycogénogénèse par l'intermédiaire d'une stimulation de ses enzymes-clés, telle la phosphoenolpyruvate carboxykinase. Les substrats les plus importants de cette synthèse de glycogène sont des métabolites des acides aminés (gluconéogénèse). Le cortisol induit particulièrement la synthèse de la tryptophane-oxygénase et de la tyrosine aminotransférase. Ainsi, les acides aminés métabolisés proviennent du catabolisme protidique extra-hépatique stimulé par les hormones glucocorticoides. L'ensemble de ces modifications métaboliques aboutit à une augmentation de la concentration sanguine du glucose, aliment essentiel des cellules (Fig. 1).

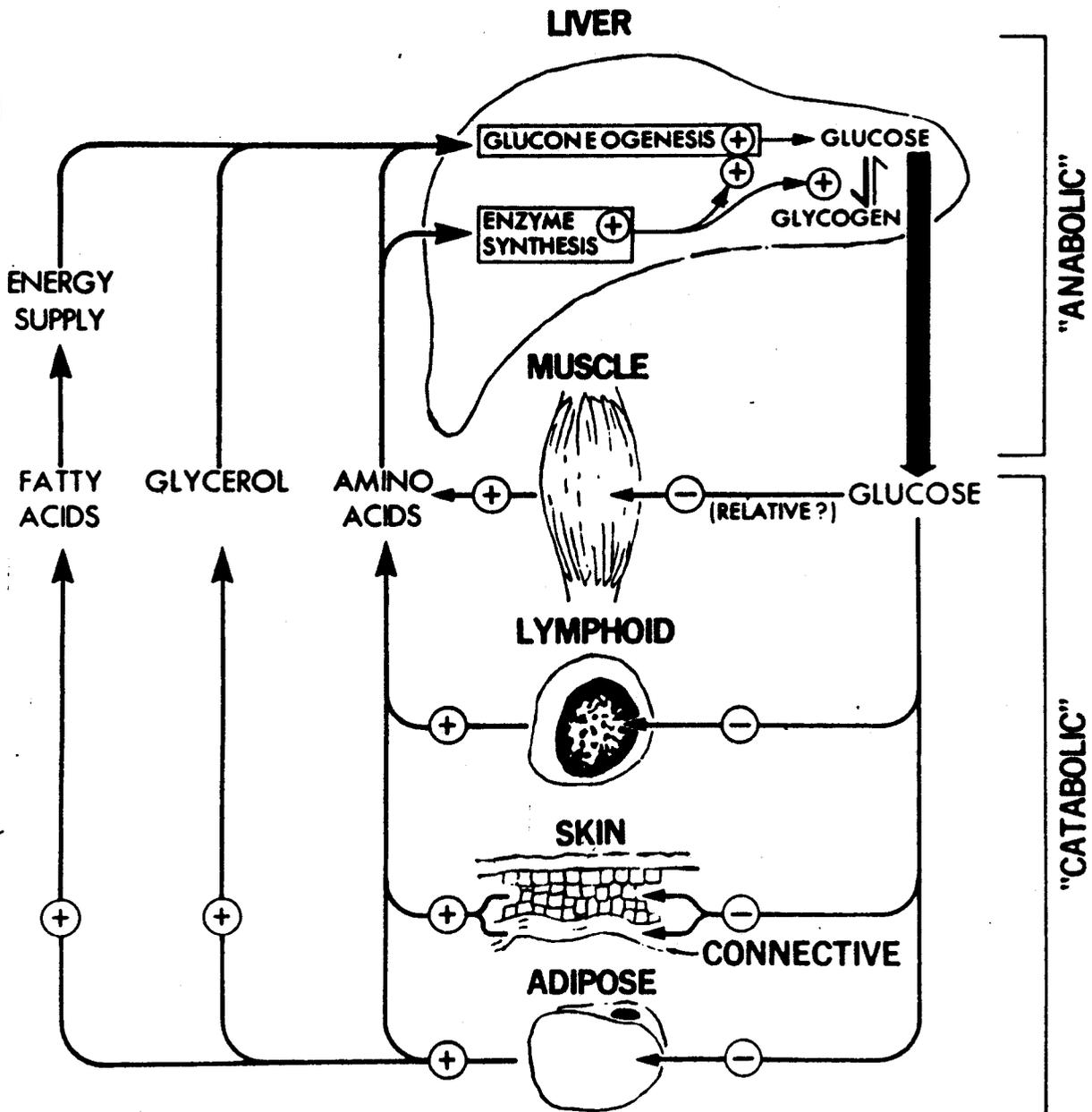


Figure 1. Représentation schématique de l'action des glucocorticoïdes sur le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. Les flèches indiquent le flux de substrat en réponse aux effets anaboliques et cataboliques des glucocorticoïdes (effets primaires) Les signes + et - représentent une stimulation ou une inhibition. (Selon BAXTER et FORSHAM, 1972).

A ce titre, les glucocorticoides sont considérés comme les hormones du stress, permettant d'augmenter la résistance de l'organisme à diverses agressions.

Les effets anti-inflammatoires et anti-allergiques des glucocorticoides sont largement utilisés en thérapeutique. En effet, ils inhibent la production des prostaglandines et des leukotriènes par l'intermédiaire d'une induction de la synthèse de la lipocortine. Cette protéine, piégeant les phospholipides, inhibera donc l'activité de la phospholipase A₂ (DAVIDSON *et al.*, 1987). Les glucocorticoides inhibent la production de l'interleukine 1 (LEE *et al.*, 1988) ; ils sont donc capables de réguler la fonction immunitaire (MUNCK *et al.*, 1984) en agissant par des effets variés. L'effet immunodépresseur chez l'homme serait lié à une altération de la circulation sanguine des cellules immunocompétentes, ainsi qu'à une inhibition de la sécrétion des cytokines. Récemment, grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur des glucocorticoides du rat, la distribution des récepteurs stéroïdiens dans le système nerveux central, a été précisée (Mc EWEN *et al.*, 1979 ; ANTAKLY et EISEN, 1984 ; AGNATI *et al.*, 1985). Les résultats obtenus permettent de suggérer qu'un grand nombre de neurones pourraient être régulés par les glucocorticoides. Les cellules immunoréactives sont retrouvées à la fois parmi les neurones monoaminergiques, peptidergiques et parmi les cellules gliales du type oligodendrocyte. Dans l'état actuel des recherches, les effets possibles des glucocorticoides au niveau du système nerveux central restent à préciser ; néanmoins, certaines orientations ont pu être apportées (Fig. 2). Ils pourraient ainsi

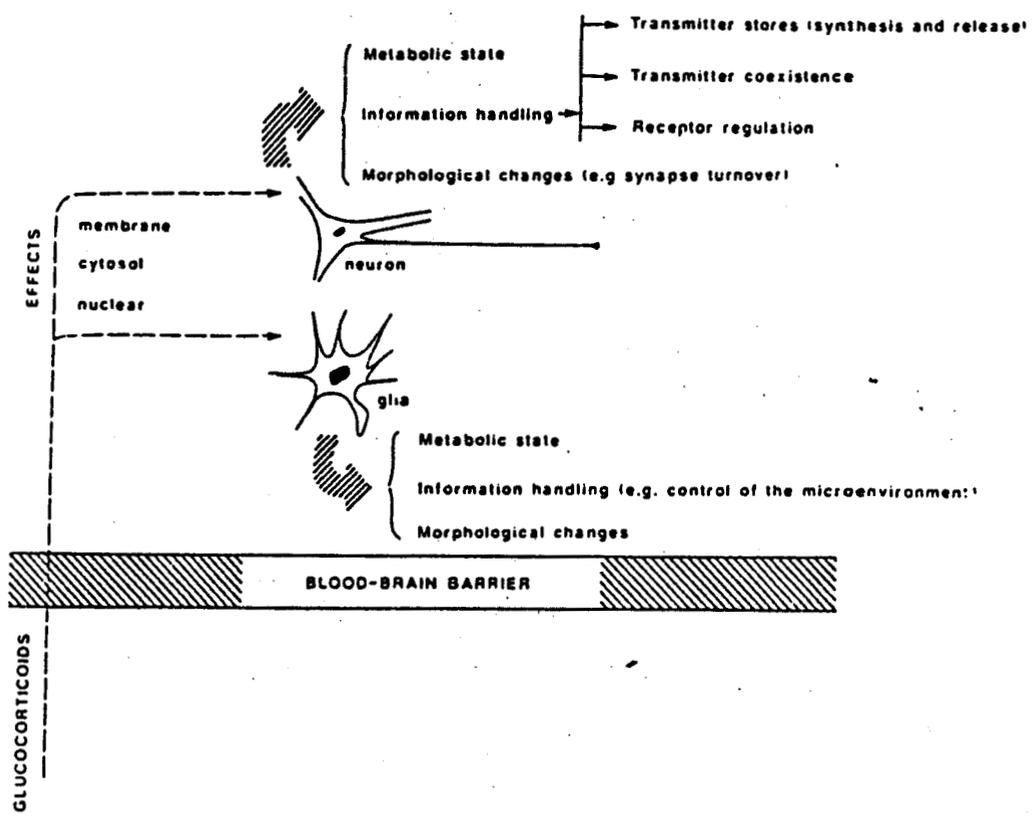


Figure 2. Effets possibles des glucocorticoïdes au niveau du système nerveux central (GUSTAFSSON *et al.*, 1987).

modifier l'état métabolique des neurones, modulant la synthèse des neurotransmetteurs ; ils pourraient d'autre part moduler la morphologie des neurones et en particulier le turn-over des synapses. La démonstration de la présence de récepteurs dans la grande majorité des neurones monoaminergiques permettrait d'expliquer les effets variés des glucocorticoides sur l'humeur, la vigilance, la mémoire et le sommeil (Mc EWEN *et al.*, 1979). D'autres résultats indiquent que les glucocorticoides régulent la neurotransmission β -endorphinique.

Ces derniers exemples soulignent la complexité des effets biologiques des glucocorticoides et leur intrication avec les systèmes immunitaires et nerveux. Les effets des glucocorticoides peuvent aussi être permissifs, c'est-à-dire favoriser l'effet primaire d'une autre hormone comme les catécholamines, le glucagon et l'hormone de croissance.

La régulation de la synthèse et de la sécrétion des glucocorticoides endogènes est assurée par le schéma bien connu de l'axe hypothalamo-hypophysaire : stimulation par le CRF hypothalamique (cortico releasing factor) de la production d'ACTH hypophysaire (Adreno corticotrophin hormone). Cette dernière stimulera la production des hormones glucocorticoides par la glande surrénale. Pour compléter la régulation, le taux de cortisol circulant inhibe directement la production de CRF par un mécanisme de rétro-contrôle négatif. De nombreux stimuli sensoriels (alternance veille-sommeil, stress, émotions) sont capables de stimuler la sécrétion de CRF par l'hypothalamus. D'autres stimuli peuvent augmenter la sécrétion d'ACTH tels l'interleukine 1 (BESEDOWSKI *et al.*, 1986). De même, les

lymphocytes activés secrètent un GIF (glucocorticoid increasing factor) stimulant la production d'ACTH (MODIGLIANI et GATTEGNO, 1987). L'intrication de ces différentes voies de régulation témoigne de la complexité du système hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien.

II - LE RECEPTEUR : VERITABLE TRANSDUCTEUR DU MESSAGE HORMONAL.

Depuis la mise en évidence d'une accumulation spécifique des glucocorticoides dans le noyau des cellules-cibles (BEATO *et al.*, 1970 ; ROUSSEAU *et al.*, 1973 ; HIGGINS *et al.*, 1973) ; de nombreux travaux ont tenté de comprendre les mécanismes d'interaction spécifiques entre le complexe hormone-récepteur et l'ADN. Pour expliquer la régulation spécifique de l'expression de certains gènes, YAMAMOTO et ALBERTS (1976) ont suggéré que la sélectivité de l'action hormonale dépend de la reconnaissance par le récepteur de séquences d'ADN spécifiques situées à proximité des gènes régulés. Le premier système décrit comme modèle d'induction de la transcription fut le virus tumorigène mammotrope de la souris (MMTV) (GRONER *et al.*, 1983 ; RINGOLD, 1984). L'étude de ce rétrovirus à l'expression cellulaire induite par les glucocorticoides a permis de localiser avec précision dans son fragment LTR (longue région terminale répétée), des séquences d'ADN spécifiques nécessaires au contrôle de la transcription du provirus par les glucocorticoides. Grâce à des expériences de protection contre l'action des nucléases, cinq régions spécifiques liant le récepteur des glucocorticoides ont été caractérisées (PAYVAR *et al.* 1982 ; GEISSE *et al.*, 1982 ; PAYVAR *et al.*, 1983 ; SCHEIDEREIT et BEATO, 1984). Des sites de liaison spécifiques similaires ont été décrits dans le gène de la métallothionéine IIA humaine (KARIN *et al.*, 1984), du lysozyme de poulet (RENKAWITZ *et al.*, 1984) ; de l'utéro-glo-

bine de lapin (CATO *et al.*, 1984) et de l'hormone de croissance humaine (MOORE *et al.*, 1985). La plupart de ces gènes contiennent des sites de liaison pour le récepteur des glucocorticoides situés de 200 paires de bases à plus de 5000 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription. Cependant, dans le cas de l'hormone de croissance humaine, ce site de liaison a été retrouvé au niveau du premier intron (ELIARD *et al.*, 1985 ; MOORE *et al.*, 1985).

L'ensemble des séquences d'ADN liant spécifiquement le récepteur des glucocorticoides et provenant de différentes espèces (homme, rongeurs, poulet) permet de dégager une séquence consensus commune pour la liaison du récepteur :

5' G G T A C A N N N T G T T C T 3' où N représente des bases variables. En particulier, le motif T G T T C T est retrouvé dans 90 % des séquences. La stoechiométrie de l'interaction serait de une molécule de récepteur par site de liaison (WRANGE *et al.*, 1986).

D'autre part, SCHEIDEREIT et BEATO (1984) ont démontré que le récepteur interagirait avec deux sites situés au niveau des grands sillons de deux hélices consécutives de l'ADN du LTR de MMTV. Un recouvrement presque complet existe entre le site de reconnaissance du récepteur des glucocorticoides et du récepteur de la progestérone (VON DER AHE *et al.*, 1985). Cependant, il ne semble pas que tous les récepteurs stéroïdiens transmettent leur signal en se liant au même site de liaison spécifique. La spécificité hormonale du récepteur vis-à-vis de la reconnaissance spécifique d'une séquence d'ADN est inscrite dans le domaine du récepteur qui se lie à l'ADN comme l'ont démontré GREEN et CHAMBON (1987) à l'aide de récepteurs chimériques.

Ainsi, chaque domaine apporte sa propre spécificité, indépendamment des informations données par les autres domaines.

L'existence de sites de liaison sur l'ADN ne prouve pas que ces sites soient directement impliqués dans la régulation de la transcription. En fait, ces sites de liaison pourraient stimuler la transcription de promoteurs situés à leur voisinage ou à distance. Cet effet est indépendant de l'orientation du site de liaison et relativement indépendant de la distance du promoteur (YAMAMOTO, 1985). Ils se comportent donc comme des sites "enhancers" et ont été baptisés "GRE" ou élément de réponse aux glucocorticoides. Le facteur spécifique qui permet le fonctionnement du GRE est bien le récepteur lui-même.

Pour de nombreux gènes, la régulation observée est positive (augmentation du taux de transcription). D'autres gènes sont régulés négativement par les glucocorticoides : gène de la pro-opiomélanocortine, par exemple (ROBERTS *et al.*, 1979 ; EBERWINE *et ROBERTS*, 1984) et plus récemment celui de l'interleukine 1B (LEE *et al.*, 1988). Le mécanisme exact par lequel les GRE exercent leur effet reste encore mal connu. Il a été démontré que l'induction par les glucocorticoides de cellules transfectées par une construction LTR de MMTV-TK, s'accompagne de l'apparition de sites hypersensibles à la DNase I correspondant au site de liaison du récepteur des glucocorticoides (ZARET *et YAMAMOTO*, 1984 ; PETERSON, 1985). Ainsi, la stimulation de l'activité transcriptionnelle par le GRE s'accompagnerait d'une modification locale de la structure de la chromatine, et d'un déplacement de nucléosomes (RICHARD-FOY *et HAGER*, 1987). Une autre

possibilité impliquerait l'action de facteurs de transcription spécifiques (NF₁, Fi) augmentant l'activité transcriptionnelle, une fois que la liaison GR-GRE a eu lieu (CORDINGLEY et HAGER, 1988). Mais comment les facteurs de transcription peuvent-ils se déplacer du GRE jusqu'au promoteur situé jusqu'à plus de 5000 paires de bases ? Pour expliquer ce mécanisme, PTASHNE (1986) a suggéré une perturbation de la structure quaternaire de l'ADN (formation d'une boucle) permettant de placer dans l'espace, la séquence GRE à proximité du promoteur. La formation de boucles d'ADN favoriserait l'interaction protéine-protéine indispensable à la formation d'un complexe de transcription efficace. Une autre possibilité est que les facteurs de transcription se fixent sur le GRE et se déplacent le long de l'ADN jusqu'au site promoteur (VON HIPPEL *et al.*, 1984). Un certain nombre de ces hypothèses sont schématisées dans la figure 3.

La majorité des effets des glucocorticoides s'exerce au niveau transcriptionnel ; cependant, certaines observations permettent de souligner l'existence d'effets post-transcriptionnels. Ces effets mettent en jeu des phénomènes de polyadénylation et d'épissage des ARNm et affectent leur durée de vie et leur transfert cytoplasmique (NEVINS, 1983). Différents travaux ont mentionné une stabilisation de certains ARNm sous l'effet des glucocorticoides (GUERTIN *et al.*, 1983; FULTON *et al.*, 1985). Cependant, l'activation de la transcription ne s'accompagne pas forcément d'une stabilisation des ARNm transcrits. Dans le cas du gène de l' α_1 -foetoprotéine, les glucocorticoides diminuent son taux de transcription alors qu'ils stabilisent les ARNm transcrits (GUERTIN *et al.*, 1983). Selon COTE et GAGEL (1986), la

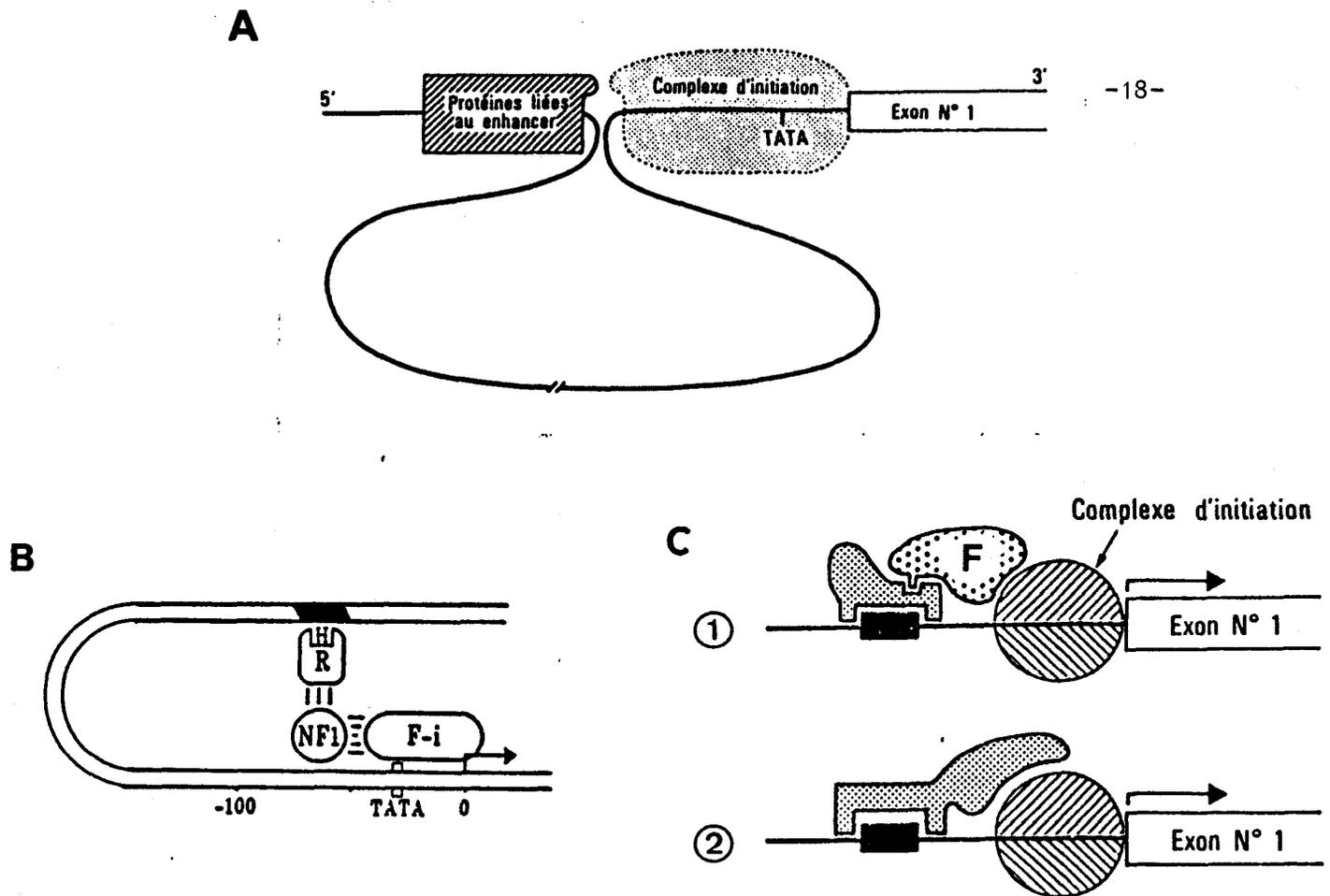


Figure 3. Modèles proposés pour l'activation de la transcription par le récepteur des glucocorticoïdes.

A. Interaction directe du complexe GR-GRE avec le complexe d'initiation par une perturbation de la structure quaternaire de l'ADN.

B. Interaction avec le promoteur par l'intermédiaire des facteurs de transcription NF1 et F_i.

C. 1) Interaction spécifique protéine-protéine entre le récepteur, un facteur de transcription F et le complexe d'initiation.

2) Le récepteur considéré comme un facteur de transcription bifonctionnel, c'est-à-dire capable de se lier à l'ADN par l'un de ces domaines, alors qu'un autre domaine assure l'effet transcriptionnel. (KAHN, 1987 ; CORDINGLEY et HAGER, 1988).

dexaméthasone pourrait agir en activant la transcription et en modifiant l'épissage du transcrit primaire (gène de la calcitonine). Dans ce cas, l'effet post-transcriptionnel des glucocorticoides pourrait s'expliquer par une action directe du complexe hormone-récepteur sur le fonctionnement des * "snurps" qui participent à l'épissage des ARNm. La stabilisation des ARNm pourrait également dépendre d'une interaction directe du produit de la traduction avec une boucle d'ARN formée à l'extrémité 5' non traduite de l'ARNm, comme cela a été récemment démontré dans le cas de la ferritine (STARZYK, 1988). Enfin, signalons qu'une modification post-traductionnelle des produits des gènes sous l'effet des glucocorticoides a été proposée dans le cas du système MMTV (FIRESTONE et YAMAMOTO, 1983). Elle se traduirait par une phosphorylation des protéines traduites et par une redistribution des glycoprotéines.

* Snurps : Small Nuclear Ribonucleoprotein particles.

III - LES DIFFERENTES FORMES MOLECULAIRES DU RECEPTEUR.

Les hormones glucocorticoides pénètrent passivement à travers la membrane de la cellule-cible bien que des processus de transport facilité aient été décrits (RAO , 1981). Après liaison spécifique à une protéine intracellulaire "réceptrice", selon une cinétique michaelienne, le complexe hormone-récepteur subit alors un phénomène apparemment irréversible, extrêmement rapide *in vivo* et dépendant de la liaison de l'hormone au récepteur, appelé "transformation". Ce phénomène s'accompagne d'une stabilisation de l'interaction récepteur-hormone (KALIMI *et al.*, 1973 ; HIGGINS *et al.*, 1973), d'une translocation vers le noyau, et de l'acquisition d'une capacité à lier l'ADN (revu par ROUSSEAU et BAXTER, 1979) (Fig 4).

Le phénomène de la transformation peut être reproduit *in vitro* par une élévation modérée de la température, une augmentation de la force ionique, une dilution , ou encore une élévation du pH (revu par SCHMIDT et LITWACK, 1982). Au cours de la transformation, le complexe hormone-récepteur subit une modification conformationnelle caractérisée par une réduction de sa taille moléculaire et également par une modification de sa charge (revu par VEDECKIS, 1985).

Il est donc maintenant bien établi que la transformation du récepteur s'accompagne de la conversion d'une forme moléculaire faiblement associée au noyau (forme non transformée) en une forme moléculaire possédant une affinité élevée pour les constituants de l'ADN (récepteur transformé).

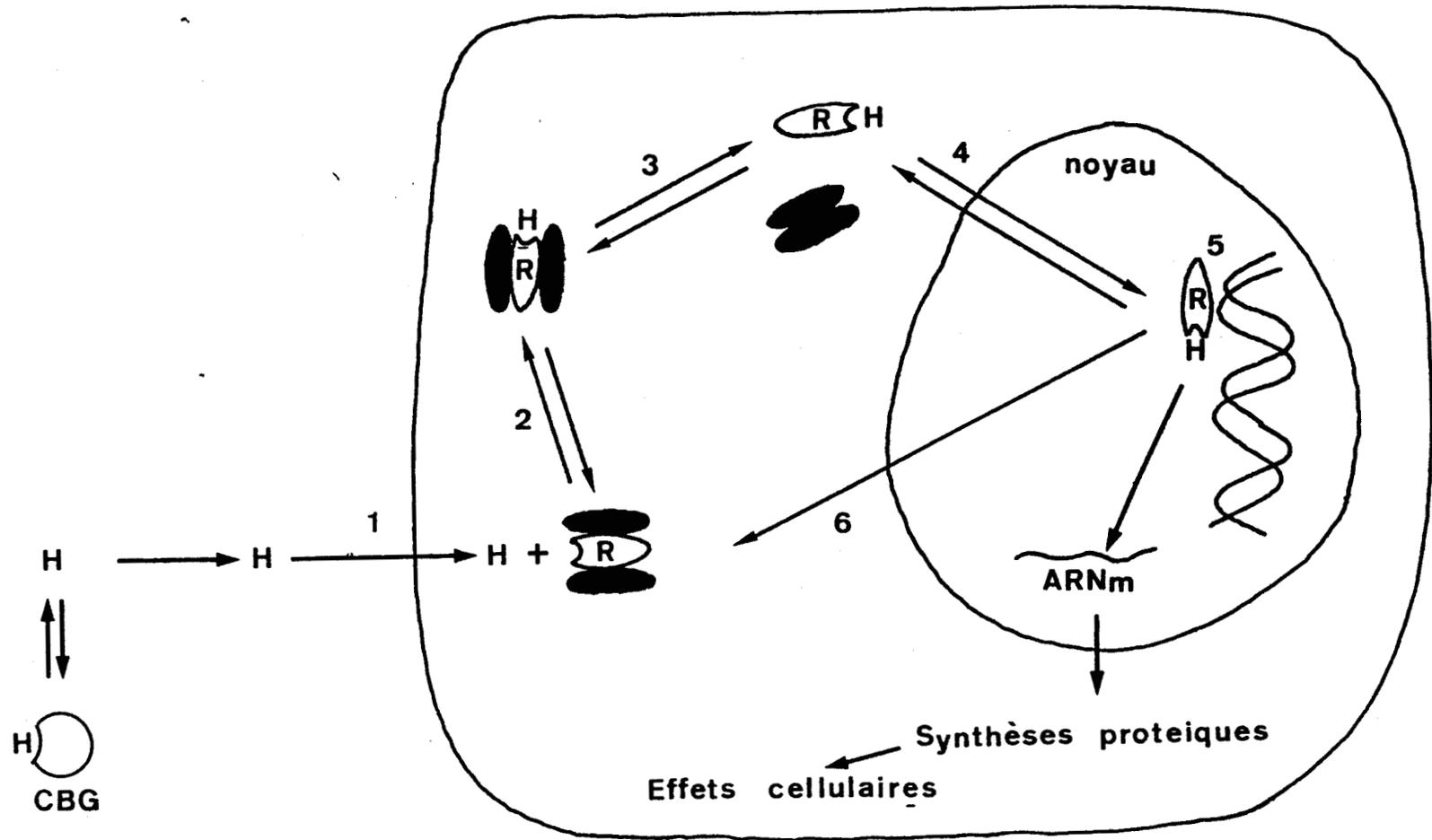


Figure 4 - Mécanisme d'action des hormones glucocorticoïdes au niveau des cellules cibles

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

Au cours des premiers travaux sur la caractérisation du récepteur, les auteurs ont cherché à extraire cette protéine par diverses concentrations salines. Par extraction en milieu de faible force ionique, BEATO *et al.* (1969), puis KOBLINSKI *et al.* (1972) caractérisent un complexe moléculaire d'une constante de sédimentation de 7 Unités Svedberg et d'une masse relative de 200 000. En milieu de force ionique élevée, les mêmes auteurs décrivent une protéine liant spécifiquement les glucocorticoides, sédimentant à 4 Unités Svedberg. MIDDLEBROOK et ARONOW (1977) réalisent une extraction nucléaire en milieu isotonique et décrivent une forme du récepteur de plus faible taille que la forme cytosolique analysée dans un milieu de force ionique identique. Ils en déduisent que la translocation nucléaire du récepteur s'accompagne d'une modification conformationnelle caractérisée par une réduction de la taille apparente du complexe. Cette dualité structurale trouva son explication lorsque MILGROM *et al.* (1973) démontrèrent que la transformation du récepteur des glucocorticoides pouvait être induite par une élévation de la force ionique.

1. Propriétés du récepteur non transformé.

La description d'un effet stabilisant des ions molybdate sur l'activité de liaison du récepteur des glucocorticoides (NIELSEN *et al.*, 1977) et d'un effet inhibiteur de la transformation (LEACH *et al.*, 1979) a permis d'améliorer sensiblement la caractérisation de la forme non transformée du récepteur. Celle-ci, en effet, se

dissociait facilement au cours de sa caractérisation (gel-filtration, ultracentrifugation) en une forme de taille moléculaire plus faible.

a) Charge

Elle a été essentiellement étudiée grâce à la technique de chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose. Le récepteur non transformé stabilisé par le molybdate de sodium est élué à une force ionique de 0,20-0,25 M KCl alors que le récepteur transformé est élué plus tôt à 0,08-0,10 M KCl (SCHMIDT *et al.*, 1980 ; NORRIS et KOHLER, 1981). A côté des supports échangeurs d'anions, les supports échangeurs de cations ont été utilisés. Dans ce cas, il n'y a pas d'adsorption du récepteur non transformé, que ce soit sur phospho-cellulose, DNA-cellulose, carboxyméthyl-Sephadex ou ATP-agarose (MILGROM *et al.*, 1973 ; KALIMI *et al.*, 1975 ; ATGER et MILGROM, 1976). L'isoélectrofocalisation a aussi été utilisée pour caractériser la charge de surface du récepteur. Cette analyse est délicate, compte-tenu de la perte d'activité de liaison du stéroïde, de la transformation spontanée du complexe et des phénomènes de protéolyse limitée. Divers travaux ont cependant précisé le point isoélectrique du récepteur non transformé, compris entre 4 et 6 (MIDDLEBROOK et ARONOW, 1977 ; HOUSLEY et PRATT, 1983 ; BEN OR et CHRAMBACH, 1983 ; DANZE *et al.*, 1987). ANDREASEN *et al.* (1981 ; 1982), utilisant une technique de partage entre deux phases aqueuses caractérisent une charge nette égale à -50 pour le récepteur non transformé (obtenue à partir de cellules S49 de souris). Le récepteur non transformé apparait donc comme une protéine acide riche en charges négatives.

b) Taille moléculaire

La difficulté d'obtenir des quantités appréciables de récepteur purifié homogène, explique que les caractéristiques de taille et de masse moléculaire du récepteur non transformé ont surtout été déterminées indirectement par l'étude des paramètres hydrodynamiques de préparations cytosoliques de récepteur non transformé (mesure du coefficient de sédimentation et du rayon de Stokes). La masse moléculaire et les paramètres de taille (rapport axial, dimensions moléculaires) sont obtenus par calcul (SIEGEL et MONTY, 1966 ; SHERMAN, 1975). Une analyse détaillée des résultats obtenus dans la littérature a d'ailleurs été rapportée dans un précédent mémoire (SABLONNIERE, 1987). L'ensemble des résultats publiés sur les caractéristiques hydrodynamiques du récepteur des glucocorticoides obtenu à partir de cellules et de tissus variés d'origine humaine ou murine donnent des valeurs assez homogènes (tableau I) : $S_{20,w}$: 9 à 9,5 S ; R_s 7-9 nm ; M_r 240-360 Kda. Une grande similitude existe entre les caractéristiques hydrodynamiques du récepteur des glucocorticoides et les autres récepteurs stéroïdiens, quelle que soit l'origine de tissu ou d'espèce (tableau II).

c) Réalité de la forme non transformée du récepteur des glucocorticoides

Pendant longtemps de nombreux auteurs ont attribué l'effet stabilisateur du molybdate à un phénomène d'artefact, mettant en doute

TABLEAU I - CARACTERISTIQUES HYDRODYNAMIQUES DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES (forme non transformée)
STABILISEE PAR LE MOLYBDATE DE SODIUM

SOURCE	S _{20,w}	R _s (nm)	Mr (kd)	f/fo	RAPPORT AXIAL a/b	REFERENCES
<u>A</u>						
Foie de rat	9,3	8,2	320	1,67	12	LEE <u>et al.</u> , (1981)
Cellules A _t T ₂₀ (tumeur pituitaire de souris)	9	8,3	317	1,70	14	VEDECKIS (1981, 1983b)
Foie de rat leucocytes humains, tumeur mammaire de souris	9,2-9,6	7,8-8,2	300-320	1,6-1,7	11-12	SHERMAN <u>et al.</u> (1982,1983)
Thymus de rat	9,2	8,3	330	1,7	12	HOLBROOK <u>et al.</u> (1983)
Thymus de rat, foie de rat	9,2-9,6	5,7-5,8	230-240	1,3-1,4	6-7	WEATHERILL <u>et BELL</u> (1982,1984)
Hamster cellules DDT ₁ MF ₂₅	9,5	7,8	350	1,67	12	MORRIS <u>et al.</u> (1983)
Cerveau de souris	9,2	7,7	297	1,60	11	LUTTGE <u>et al.</u> (1984)
Foie de rat	9,2	9,0	350	1,80	15	DISTELHORST <u>et BENUTTO</u> (1985)
Cellules HeLa	8,3-9,0	9,0-9,3	320-360	1,83	16	ROSSINI (1985)
<u>B</u>						
Foie de rat	9,4	7,3	300	1,64	12	GRANDICS <u>et al.</u> (1984)
Foie de lapin	9,0	6,3	235	1,42	7	LUSTENBERGER <u>et al.</u> (1985)
Foie de rat	9,4	7,0	280	1,50	9	IDZIOREK <u>et al.</u> (1985)

A : échantillons cytosoliques

B : récepteur purifié

TABLEAU II - CARACTERISTIQUES HYDRODYNAMIQUES DES RECEPTEURS STEROIDIENS (forme non transformée)

SOURCE	S _{20,w}	R _s (nm)	Mr (KDa)	f/fo	RAPPORT AXIAL	REFERENCES
- Récepteur des glucocorticoïdes						
. Foie de rat	9,2	8,3	320	1,68	13	VEDECKIS (1983b)
. Cellules lymphoïdes humaines	9,2-9,7	7,8-7,9	310-325	1,58-1,63	11-12	NIU <u>et al.</u> (1981)
- Récepteur des androgènes						
. Tumeur de prostate de rat	8-9	6,8-10,5	265-380	1,6 -2,4	11-16	WILSON et FRENCH (1975) COLVARD et WILSON (1981)
- Récepteur de la progestérone						
. Tumeur du sein humaine	9,6	7,9	320	1,60	11	NIU <u>et al.</u> (1981)
. Utérus humain	9,4	7,4	290	1,55	10	
- Récepteur des oestrogènes						
. Utérus de veau	8,6-9,2	6,5-7,5	240-290	1,60-1,65	11-12	PUCA <u>et al.</u> (1971)
. Tumeur du sein humaine	9,8-10,5	7,1-7,3	295-315	1,45-1,50	8-10	REDEUILH <u>et al.</u> (1981) MILLER <u>et al.</u> (1981)

la signification physiologique réelle de cette forme non transformée. En effet, les expérimentations qui décrivent cette forme du récepteur sont réalisées à partir d'extraits cytosoliques préparés à 0°C, en conditions de faible force ionique et en présence de 5×10^{-3} M à 20×10^{-3} M de molybdate de sodium. Lorsqu'on utilise une technique rapide d'analyse comme la chromatographie d'exclusion de taille en mode haute performance, les mêmes caractéristiques sont observées en l'absence de molybdate (LA POINTE *et al.*, 1986 ; SABLONNIERE *et al.*, 1987). La forme non transformée du récepteur stabilisée par le molybdate ne semble donc pas correspondre à un artefact d'agrégation provoqué par le molybdate lui-même. D'autre part, pour éliminer un éventuel artefact dû aux conditions de mesure du coefficient de sédimentation ou du rayon de Stokes, HOLBROOK *et al.* (1983) ont pu démontrer sans équivoque, que la forme 8-10S ($M_r \sim 300\ 000$) correspond bien à la forme non transformée du récepteur. Le complexe hormone-récepteur non retenu à partir d'une colonne de DNA-cellulose, est caractérisé par un rayon de Stokes de 8 nm et possède une forte affinité pour les colonnes de DEAE-cellulose. D'autre part, si un cytosol préalablement incubé à 37°C pendant 30 minutes est déposé sur une colonne de DNA-cellulose, le complexe retenu possède un rayon de Stokes de 5 nm (récepteur transformé). Inversement, la mesure de l'affinité pour la DNA-cellulose des complexes hormone-récepteur élués d'une colonne de chromatographie d'exclusion de taille aboutissent aux mêmes conclusions : seule la forme de plus faible taille moléculaire possède une affinité pour la colonne de DNA-cellulose. Ainsi, une corrélation étroite entre la taille moléculaire du récepteur et son état

fonctionnel "transformé" ou "non transformé" a pu être démontrée (LUTTGE *et al.*, 1984 ; SABLONNIERE *et al.*, 1986).

Selon RAAKA et SAMUELS (1983), RAAKA *et al.* (1985), et grâce à l'utilisation d'acides aminés marqués avec des isotopes lourds, le récepteur non lié à l'hormone serait sous forme oligomérique 10 S et sa liaison à l'hormone entrainerait une conversion très rapide *in vivo*, vers la forme 4 S (Fig. 5). La liaison à l'hormone déplacerait donc l'équilibre vers la forme 4 S qui se lierait alors à la chromatine. Ce modèle hypothétique est réversible, car après départ de l'hormone, la forme 4 S peut redonner la forme 10 S. Cependant, la plupart des arguments expérimentaux plaident en faveur d'une irréversibilité de la transformation (MUNCK et HOLBROOK, 1984, 1987 ; MENDEL *et al.*, 1987). La dissociation du complexe hormone-récepteur non transformé dans les cellules intactes est inhibée par le molybdate (RAAKA *et al.*, 1985) mais l'existence de complexes 9-10 S a été démontrée avant la description de l'effet du molybdate (GORSKI *et al.*, 1968). Ces observations, ainsi que la découverte récente d'une dissociation du récepteur et de la protéine de choc thermique (HSP 90) qui lui est associée (cf paragraphe V), sous l'effet de l'hormone dans les cellules intactes, conforte l'existence réelle de la forme non transformée du récepteur.

2 - Propriétés du récepteur transformé.

Ses caractéristiques ont le plus souvent été étudiées après transformation *in vitro*. Bien sûr, on ne peut éliminer totalement l'existence d'artefacts dûs aux conditions expérimentales utilisées,

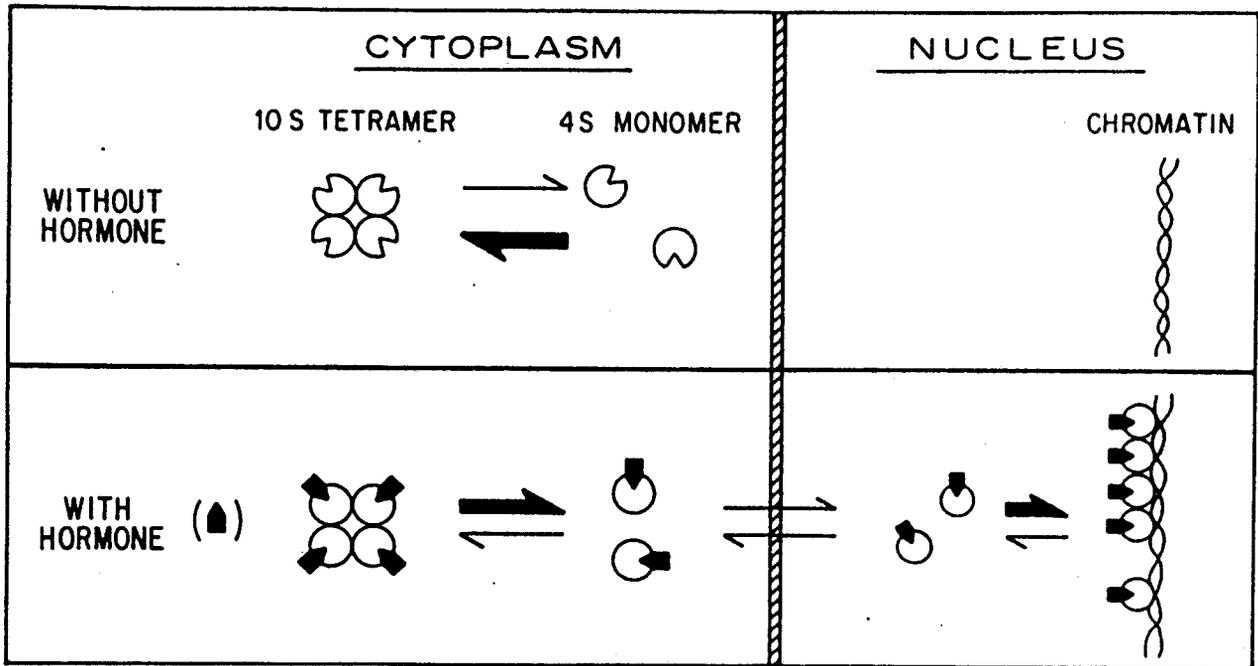


Figure 5. Modèle hypothétique de la distribution intracellulaire du récepteur des glucocorticoïdes (selon RAAKA et SAMUELS, 1983).

telle une élévation de la température, une dilution ou une élévation de la force ionique. L'extraction rapide du récepteur cytosolique en tampon isotonique provenant de thymocytes intacts incubés avec l'hormone à 37°C a permis de démontrer que le récepteur transformé possède des caractéristiques physicochimiques identiques à celles décrites classiquement après incubation d'un cytosol *in vitro*, en milieu hypotonique, en condition acellulaire, et soumis à une brève élévation thermique (LEFEBVRE *et al.*, 1988a).

a) Charge

L'analyse du récepteur transformé *in vitro* par élévation thermique, augmentation de la force ionique ou chromatographie d'échange ionique sur DEAE-cellulose démontre que celui-ci est élué à une force ionique beaucoup plus faible (0,06-0,10 M KCl) que le récepteur non transformé (PARCHMAN *et LITWACK*, 1977 ; SAKAUE *et THOMPSON*, 1977 ; SCHMIDT *et al.*, 1980). Ces propriétés sont communes aux différents récepteurs stéroïdiens à l'exception du récepteur de la progestérone dont la sous-unité *B est éluée en même position que le récepteur non transformé. Le récepteur transformé est capable de se lier aux supports anioniques comme la phospho-cellulose ou la DNA-cellulose (MILGROM *et al.*, 1973 ; KALIMI *et al.*, 1975 ; ATGER *et MILGROM*, 1976). Le carboxymethyl-cellulose, l'ATP-Sepharose et

* Le récepteur de la progestérone (forme non transformée) est constitué d'une sous-unité liante, soit de type A (79 Kda), soit de type B (110 Kda) associée probablement à deux protéines de choc thermique HSP 90.

l'héparine-agarose ont également été utilisés pour retenir le récepteur transformé. L'ensemble des résultats obtenus démontrent que le récepteur sous sa forme transformée est une protéine moins acide que la forme non transformée. Des résultats très variables ont été décrits en ce qui concerne la mesure du point isoélectrique du récepteur transformé allant de 4,8 à 7,0 (KALIMI *et al.*, 1975 ; MIDDLEBROOK et ARONOW, 1977 ; DANZE *et al.*, 1987). Sa charge nette mesurée par partage de phases serait de -10 (ANDREASEN, 1982). Ainsi la transformation du récepteur s'accompagne de la conversion d'un complexe très acide en une molécule moins acide. La liaison du récepteur transformé aux échangeurs à caractère anionique s'expliquerait par l'exposition d'une région très riche en charges positives à la surface d'une molécule à prédominance acide (CAKE *et al.*, 1978).

b) Taille moléculaire

Les caractéristiques hydrodynamiques du récepteur transformé ont largement été décrites dans la littérature. L'ensemble de ces résultats est résumé dans le tableau III. Quelle que soit son origine de tissu ou d'espèce, le récepteur des glucocorticoides possède sensiblement les mêmes caractéristiques. On peut cependant noter des variations en fonction des différentes classes de récepteur. Par exemple, le récepteur des oestrogènes possède la masse moléculaire la

TABLEAU III - CARACTERISTIQUES HYDRODYNAMIQUES DES RECEPTEURS STEROIDIENS (forme transformée)

SOURCE	S _{20,w}	R _s (nm)	Mr (KDa)	f/f ₀	RAPPORT AXIAL	REFERENCES
- Glucocorticoïdes						
♂.At T-20 souris	3,8	5,8	94	1,80	15	VEDECKIS (1983b)
Foie de rat	3,5-4,0	9,3-6,0	86-92	1,65-1,85	13-17	WRANGE et al. (1979)
- Androgènes						
Tumeur prostate de rat	4,5-5,0	5,8-6,1	117-120	1,84	16	WILSON et FRENCH (1975)
- Progestérone						
Oviducte de poule	4,5	4,5	84	1,42	8	MURAYAMA et al. (1980)
sous-unité B	4,2	6,3	114	1,80	16	SCHRADER et al. (1987)
sous-unité A	3,9	4,3	73	1,43	8	SHERMAN et al. (1976)
- Estrogènes						
Utérus de veau	4,1	4,0	71	1,34	7	REDEUILH et al. (1981)
♂.MCF7 humaines	4,1	4,4	76	1,45	8	ECKERT et al. (1982)
- Vitamine D						
Poule	3,5-3,7	3,6-3,8	53-59	1,33-1,36	6	WECKSLER et NORMAN
Rat	3,5-3,6	3,6	53-55	1,32	76	(1980)
Homme	3,5-3,7	3,2-3,4	47-53	1,25	5	

plus faible - 60-70 Kda, comparée à celle du récepteur des glucocorticoides 90 Kda ou de la progestérone 80-110 Kda.

Les résultats des données hydrodynamiques ont pu être confirmés par des expériences de marquage d'affinité du récepteur à l'aide de ligands radioactifs soit photoréactifs, soit possédant une réactivité chimique particulière leur permettant de se lier de manière covalente au site de liaison du récepteur (SIMONS et THOMPSON, 1981). Le récepteur des glucocorticoides marqué au 21-mésylate de dexaméthasone est ainsi caractérisé par une masse moléculaire de 90 Kda environ (SIMONS *et al.*, 1983), avec de légères différences selon l'espèce étudiée. Dans ces conditions, une détermination directe de la masse moléculaire est possible, même à partir de préparations de récepteur non purifié. Le récepteur de la progestérone de l'oviducte de poule a été caractérisé par marquage de photoaffinité au R-5020 tritié. En électrophorèse en milieu dénaturant, deux bandes radioactives distinctes, de 110 Kda et 80 Kda sont révélées. Cette dualité structurale du récepteur de la progestérone a pu être confirmée par l'étude de diverses sources de récepteurs, et pourrait s'expliquer par l'activité de deux gènes de structure différents (BIRNBAUMER *et al.*, 1983 ; HORWITZ *et ALEXANDER* , 1983). La masse moléculaire du récepteur humain des oestrogènes (cellules MCF7) a été déterminée par marquage covalent à l'aziridine de Tamoxifène tritié (KATZENELLENBOGEN *et al.*, 1983) donnant une valeur de 65 Kda. Par contre, le récepteur des androgènes marqué covalentiellement avec le 17-bromoacétate de dihydrotestostérone tritié est caractérisé par une masse moléculaire de 118 Kda (ROWLEY *et al.*, 1984). Les caractéristiques

physicochimiques comparées de la forme transformée et non transformée des récepteurs stéroïdiens sont résumées dans le tableau IV. De ces résultats on retiendra la grande dissymétrie moléculaire du récepteur (ellipsoïde allongé). Les observations obtenues par microscopie électronique (KUHN *et al.*, 1977 ; GOVINDAN *et al.*, 1982 ; PAYVAR *et al.*, 1983) confirment d'ailleurs ces données (Fig. 6).

3 - Propriétés des autres formes moléculaires du récepteur

a) Récepteurs intermédiaires transformés

Des formes moléculaires intermédiaires entre la forme non transformée et la forme transformée ont été décrites. Mais leur caractérisation est restée très délicate. En effet, à partir de préparations cytosoliques, une protéolyse non spécifique ou une dissociation de l'oligomère non transformé peuvent gêner la caractérisation de ces formes moléculaires, en particulier l'étude de leurs caractéristiques hydrodynamiques. En conséquence, il est difficile de tirer une conclusion définitive sur la structure moléculaire de ces formes et sur leur signification biologique. Des formes de taille 5-7 S ont ainsi été décrites pour le récepteur des glucocorticoides (Mc BLAIN et SHYAMALA, 1980 ; RAAKA et SAMUELS, 1983 ; VEDECKIS, 1983b), le récepteur des oestrogènes (SHERMAN *et al.*, 1980), le récepteur de la progestérone (NISHIGORI et TOFT, 1980) et le récepteur des androgènes (NORRIS et KOHLER, 1976). Une analyse plus précise a été poursuivie dans le cas du récepteur des glucocorticoides par le groupe de VEDECKIS (VEDECKIS, 1983b ; REKER *et al.*, 1985). Ces

General Features of Transformed Steroid Hormone Receptors

	Monomeric ^a	Oligomeric, intermediate
Size		
Sedimentation coefficient	3.5-4.5 S	5-7 S
Stokes radius	5.5-6.0 nm	5.7-8.3 nm
Molecular weight ($\times 10^3$)	60-120	126-245
Shape		
Frictional ratio (f/f_0)	1.34-1.89	1.58-1.85
Axial ratio	7-17	13-16
Charge		
Isoelectric point	pH 5.5-7.0	?
Net charge	--10	?
Column behavior		
	[KCl]	
DEAE-cellulose	0.06-0.15	?
Phosphocellulose	0.15-0.33	0.15-0.33
DNA-cellulose	0.10-0.20	?

^a The values for the Vitamin D receptor have not been included, since extensive studies of it are still lacking.

General Features of Untransformed Steroid Hormone Receptors

Size	
Sedimentation coefficient	8-10 S
Stokes radius	7-10 nm
Molecular weight ($\times 10^3$)	200-350
Shape	
Frictional ratio (f/f_0)	1.45-2.00
Axial ratio	8-20
Charge	
Isoelectric point	pH 4-6
Net charge	-50
Column behavior	
	[KCl]
DEAE-cellulose	0.18-0.30
Phosphocellulose	DT ^a
DNA-cellulose	DT ^a

^a DT, droptthrough (unadsorbed) fraction.

TABLEAU IV - CARACTERISTIQUES PHYSICOCHIMIQUES COMPAREES
DES FORMES TRANSFORMEES ET NON TRANSFORMEES
DES RECEPTEURS STEROIDIENS (selon VEDECKIS et al., 1985)

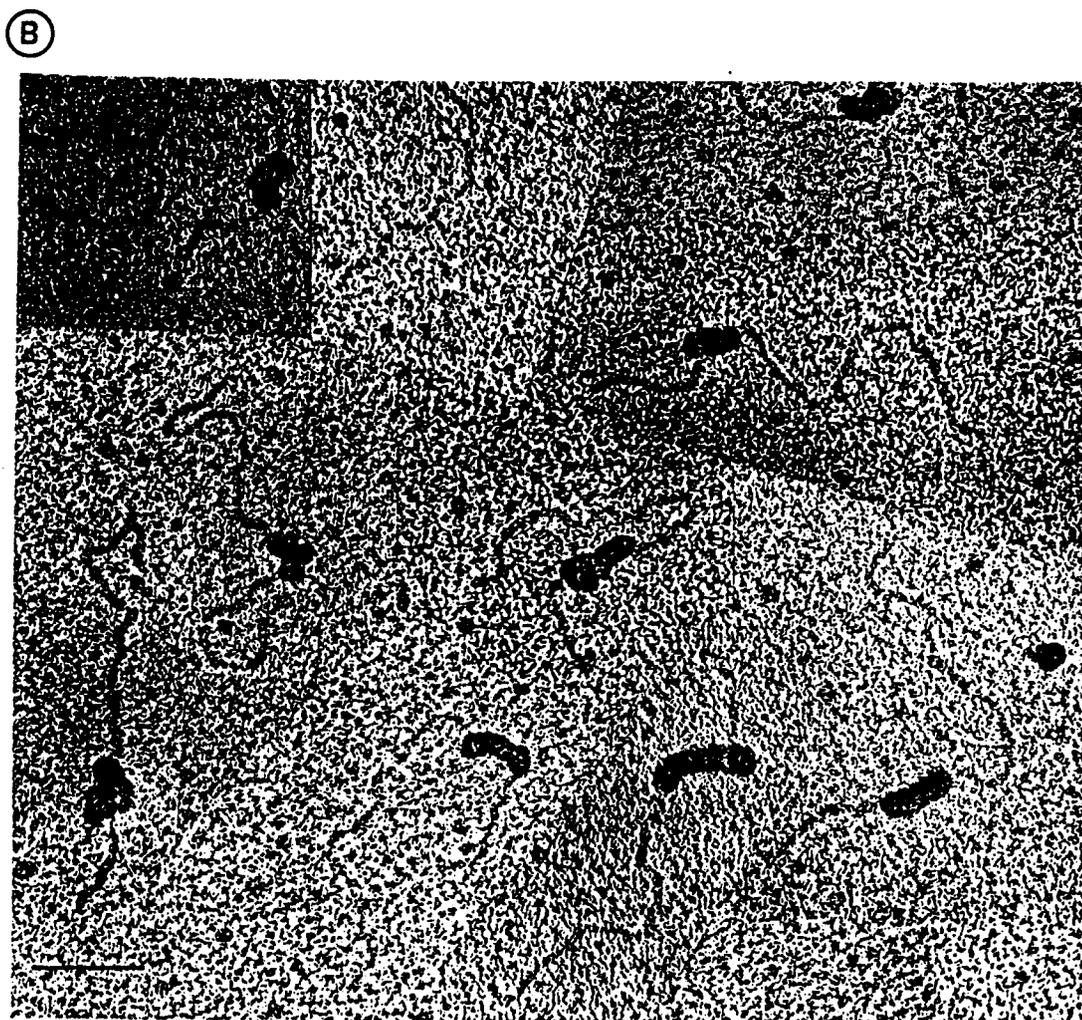
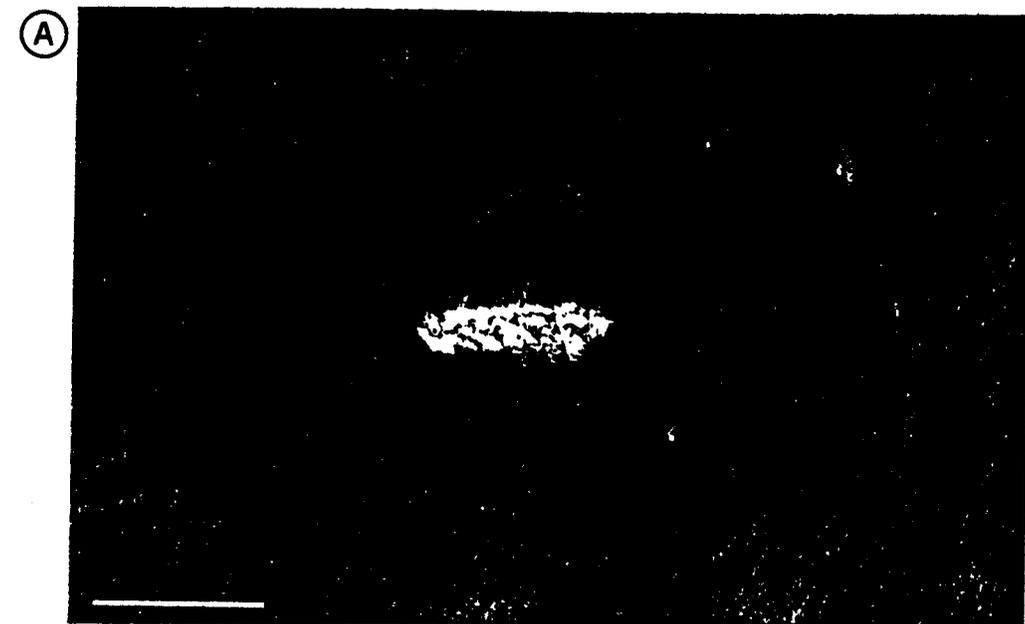


FIGURE 6. Visualisation du récepteur de la progestérone (A), et du récepteur des glucocorticoides (B), en microscopie électronique. Les barres représentent 10 nanomètres (KUH^N *et al.*, 1977 ; PAYVAR *et al.*, 1983).

auteurs décrivent, dans les cellules At-T20 de souris, un complexe sédimentant à 5,2 S en gradient de saccharose. Cette forme moléculaire peut être obtenue par filtration sur Sephadex G25, d'une préparation de récepteur non transformé. Elle correspond à une forme transformée du récepteur dont les caractéristiques hydrodynamiques (5,2 S, $R_s = 5,8$ nm) fournissent une masse moléculaire d'environ 130 Kda. Elle serait constituée du récepteur et d'une molécule associée, ne liant pas le stéroïde. Une forme intermédiaire du récepteur de la progestérone sédimentant à 5,5 S (SEELEY et COSTAS, 1983) a également été rapportée, mais son existence n'a pu être confirmée. La mise en évidence la plus nette d'une forme intermédiaire a été obtenue dans le cas du récepteur des oestrogènes (JENSEN *et al.*, 1968). En effet, la transformation de ce récepteur *in vitro* conduit à une forme 5,3 S similaire à celle obtenue à partir des noyaux cellulaires et animaux traités par l'hormone *in vivo*. La signification de telles formes du récepteur *in vivo* reste inconnue.

b) *Formes de protéolyse*

De nombreux résultats expérimentaux (CARLSTEDT-DUKE *et al.*, 1977 ; MIDDLEBROOK et ARONOW, 1977 ; STEVENS *et al.*, 1979 ; VEDECKIS, 1983a) ont documenté la présence de récepteurs dont les caractéristiques structurales sont très différentes des formes transformées et non transformées décrites jusqu'ici. Une forme de masse moléculaire 45 Kda apparaît fréquemment au cours du phénomène de la transformation *in vitro*, en particulier, sous l'influence d'une élévation de la force ionique ou de la température. Ainsi, CARLSTEDT-

DUKE *et al.*, (1977) démontrent qu'une forme de protéolyse limitée (Mr - 46000) du récepteur transformé possède la propriété de se lier à la fois aux noyaux isolés et au stéroïde. D'autres fragments de protéolyse, de taille plus faible, sont décrits par SHERMAN *et al.*, (1978). Ces fragments appelés "méro-récepteurs", d'une masse comprise entre 20 et 30 Kda, sont facilement identifiés après fractionnement d'un cytosol transformé, obtenu à partir de tissus particulièrement riches en protéases (cellules issues de certaines lignées tumorales, cellules rénales ...). Ces méro-récepteurs, s'ils sont encore capables de lier le stéroïde, ne sont plus capables de se lier à l'ADN. La description des formes de protéolyse du récepteur ont conduit les groupes de GUSTAFSSON (CARLSTEDT-DUKE *et al.*, 1982 ; GUSTAFSSON *et al.*, 1986) et de VEDECKIS *et al.*(1985) à proposer des modèles d'organisation en domaines du polypeptide monomère de masse 94 Kda constituant la forme transformée du récepteur des glucocorticoides (Fig. 7). Le récepteur peut ainsi être divisé en trois domaines relativement résistants aux protéases et séparés par des régions sensibles aux protéases. Le méro-récepteur ou domaine A (24-27 Kda) est impliqué essentiellement dans la liaison du ligand. On trouve en outre le domaine B, liant l'ADN (~ 30 Kda) et le domaine C (~ 45 Kda) qui contient l'épitope reconnu par la plupart des anticorps anti-récepteur décrits dans la littérature (GOVINDAN, 1979 ; OKRET *et al.*, 1981 ; WESTPHAL *et al.*, 1982). Le domaine C est aussi appelé domaine de régulation : ce qualificatif est justifié par la découverte (DELLWEG *et al.* 1982 ; GEHRING et HOLTZ, 1983), dans des souches mutantes de cellules de lymphome de souris résistantes aux

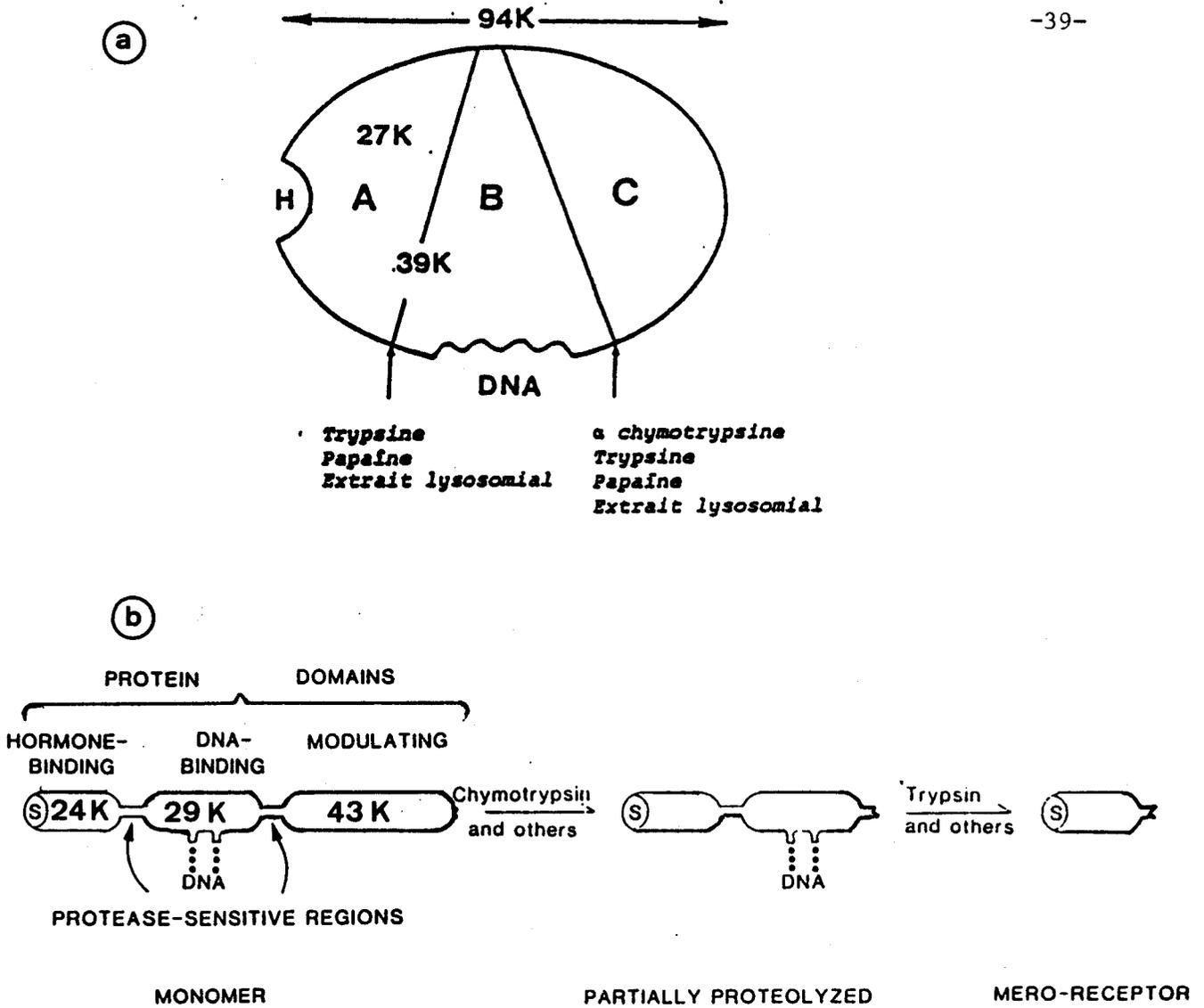


FIGURE 7. Modèles d'organisation en domaines du récepteur des glucocorticoides selon a) GUSTAFSSON *et al.*(1986); b) VEDECKIS *et al.*, (1985).

glucocorticoides, d'un récepteur anormal (mutant ntⁱ) d'une masse de 40 Kda et présentant une affinité élevée pour l'ADN, mais sans effet biologique. Cette forme moléculaire n'est pas reconnue par les anticorps anti-récepteurs et serait donc constituée uniquement des domaines A et B.

IV - STRUCTURE PRIMAIRE ET DOMAINES DE STRUCTURE DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES.

La découverte de la séquence nucléotidique du gène codant pour le récepteur des glucocorticoides de l'homme (HOLLENBERG *et al.*, 1985), du rat (MIESFELD *et al.*, 1986), et de la souris (DANIELSEN *et al.*, 1986) a permis une véritable "dissection moléculaire" du récepteur. L'identification de différents domaines fonctionnels pour la liaison de l'hormone, la liaison à l'ADN et la transactivation a été facilitée par l'utilisation de mutants du récepteur exprimés par transfection cellulaire de fragments du gène complet (GIGUERE *et al.*, 1986 ; HOLLENBERG *et al.*, 1987 ; PRATT *et al.*, 1988), Fig. 8. Les différents plasmides recombinants contenant les mutants sélectionnés de cDNA sont amplifiés et co-transfectés en présence d'un gène de fusion MTV-CAT. L'expression fonctionnelle du récepteur ainsi traduit est mesurée par son affinité pour la dexaméthasone, son activité de liaison au GRE et par son activité transcriptionnelle grâce à la mesure de l'activité de la chloramphenicol acetyl transférase. Ce sont les résultats obtenus par l'analyse de plus de 50 mutants de délétion qui ont permis de préciser le rôle des différents domaines du récepteur (Fig. 9). La comparaison des cDNA codant pour les différents récepteurs stéroïdiens (hGR, rGR, hER, cER, hPR, cPR, hMR) (revu par EVANS, 1988) a permis de distinguer quatre régions communes aux différents récepteurs, d'homologie plus ou moins forte. GIGUERE *et al.* (1986) définissent ainsi de l'extrémité aminée vers l'extrémité carboxylique:

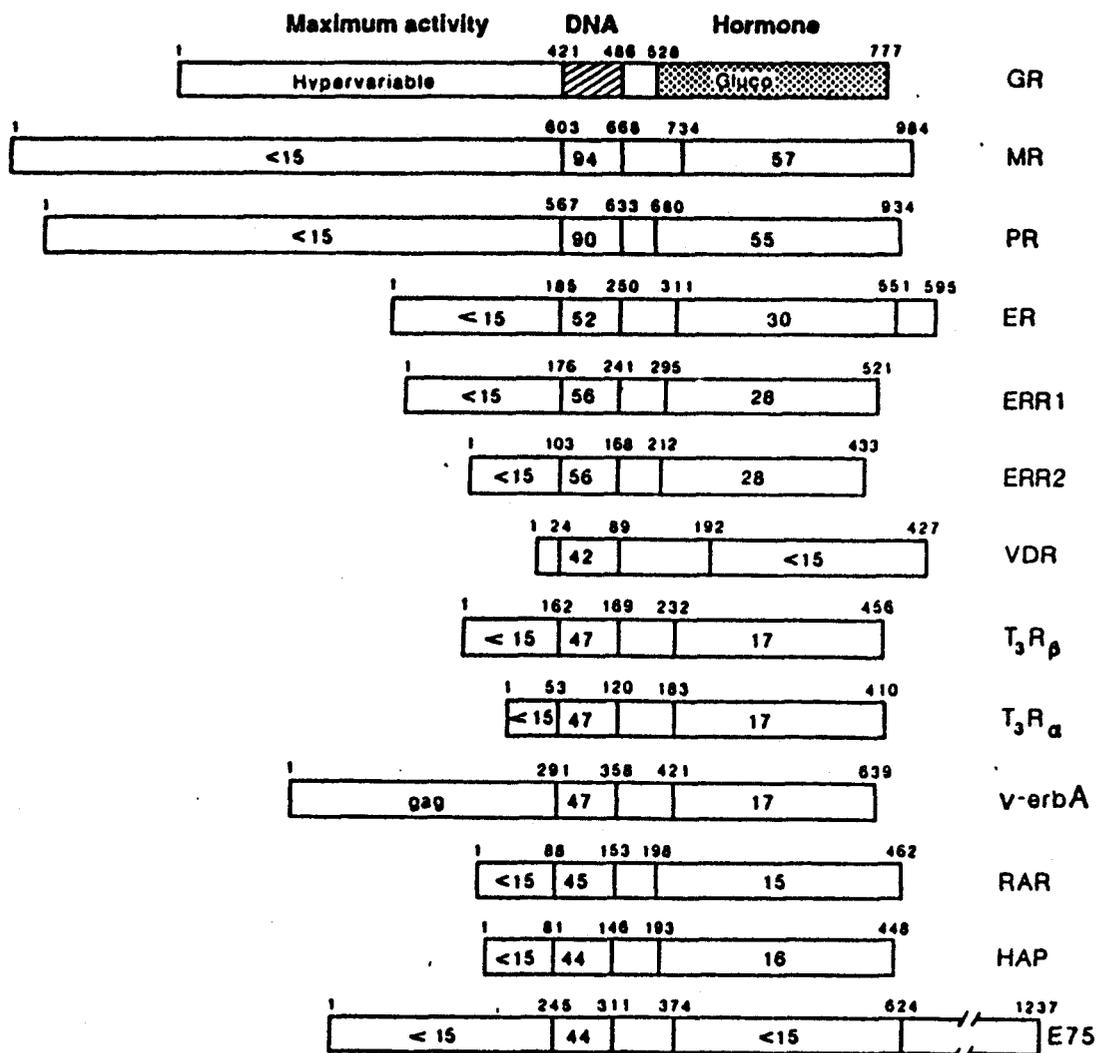
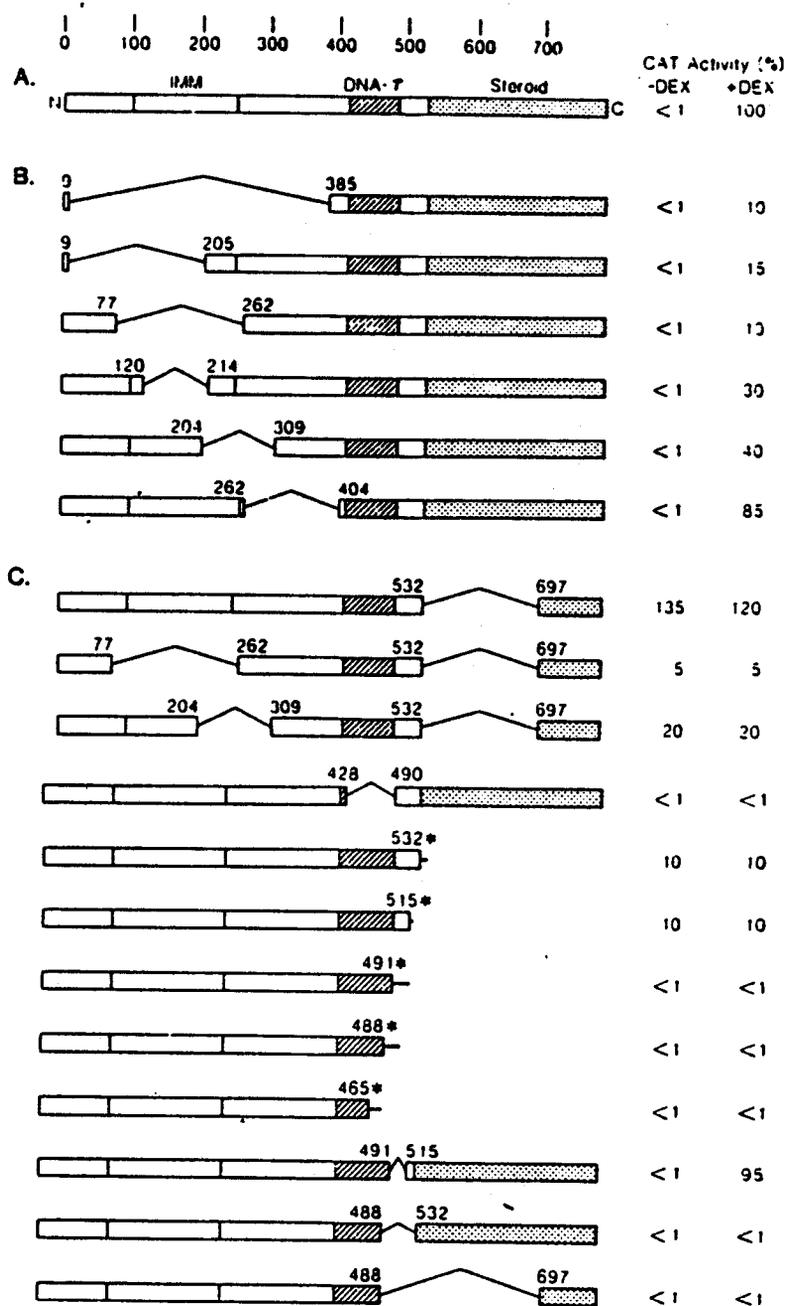


FIGURE 8. Comparaison schématique de la séquence en acides aminés des membres de la superfamille des récepteurs stéroïdiens. Les chiffres indiqués le long des différents domaines correspondent au pourcentage d'homologie par rapport au récepteur des glucocorticoides humains (GR)

- MR : Récepteur des minéralocorticoïdes
- PR : Récepteur de la progestérone
- ER : Récepteur des oestrogènes
- VDR : Récepteur de la vitamine D₃
- TR : Récepteur de l'hormone thyroïdienne
- RAR : Récepteur de l'acide rétinolique
- HAP : Protéine exprimée par un gène retrouvée dans une lignée d'adénocarcinome hépatique (EVANS, 1988)



-43-

Figure 9. Principales constructions de mutants de délétion du récepteur des glucocorticoides humains, et étude de leur activité fonctionnelle.

A : Récepteur natif témoin

B : Mutants de délétion de la région N-terminale

C : Mutants de délétion de la région C-terminale

(HOLLENBERG et al., 1987).

1 - La région immunogène (région A/B)

Elle comporte environ 410 résidus chez le rat, et supporte les épitopes reconnus par la majorité des anticorps anti-récepteur. Ce domaine est le moins conservé entre les différentes classes de récepteurs (moins de 15 % d'homologie). Bien que le rôle précis de ce domaine soit mal connu, un certain nombre d'observations ont démontré qu'il était indispensable pour permettre au récepteur d'exprimer une activité transcriptionnelle maximale (MIESFELD *et al.*, 1987 ; GIGUERE *et al.*, 1986). En particulier serait impliquée une région tau₁ (140-280) dont la délétion réduit l'activité transcriptionnelle de 3 à 20 fois (HOLLENBERG *et al.*, 1987). Cette zone correspond justement à une zone très hydrophile et particulièrement exposée à l'intérieur de la région N-terminale du récepteur. Ce résultat est à rapprocher de l'existence des mutants ntⁱ, incapables d'activer la transcription, et délétés de leur région N-terminale (YAMAMOTO *et al.*, 1976). L'importance de la région N-terminale dans l'activation de la transcription vient d'ailleurs d'être soulignée récemment par le groupe de CHAMBON dans le cas du récepteur de la progestérone (TORA *et al.*, 1988).

2 - La région C ou domaine de liaison à l'ADN

Cette région correspond au domaine le plus conservé des différentes classes de récepteur (plus de 50 % d'homologie). Limitée entre les résidus 440 et 505 chez le rat, cette séquence comporte 9 cystéines, 6 arginines et 5 lysines. Des mutants délétés de cette

région continuent de lier l'hormone, mais sont incapables de lier l'ADN et d'activer la transcription.

La répartition des cystéines dans cette région est similaire au motif décrit dans la séquence du facteur de transcription TFIIIA de Xénope (MILLER *et al.*, 1985). Une séquence analogue retrouvée entre les résidus 440-460 et 476-500 du récepteur de rat adopterait une conformation en forme de boucle dont la base est liée à un atome de zinc par l'intermédiaire d'au moins deux cystéines (doigt à zinc). BERG, (1988), (Fig. 10). Ces boucles interagiraient avec le grand sillon sur un demi-tour d'hélice d'ADN. L'homologie de cette séquence avec celle de nombreuses protéines agissant comme facteurs de transcription tels que la protéine GAL4 de levure ou les protéines SP1 et TDF des mammifères, suggère que cette séquence serait prédictive de l'existence d'un facteur de transcription (EVANS et HOLLENBERG, 1988). Chaque boucle serait organisée autour d'un atome de zinc (Zn^{++}) situé au centre d'un tétraèdre se liant par coordinence à quatre résidus de cystéine (protéine gal4, récepteurs stéroïdiens) ou à 2 résidus de cystéine et 2 résidus d'histidine (TFIIIA, SP1, TDF) (MILLER *et al.*, 1985; BROWN *et al.*, 1985). Le facteur TFIIIA contient 7 à 11 atomes de zinc par molécule, mesuré par spectroscopie d'absorption atomique (MILLER *et al.*, 1985).

Récemment, le groupe de YAMAMOTO (FREEDMAN *et al.*, 1988) a pu démontrer de façon remarquable qu'un peptide du récepteur des glucocorticoides (407-556) contient 2 atomes de zinc. D'autre part,

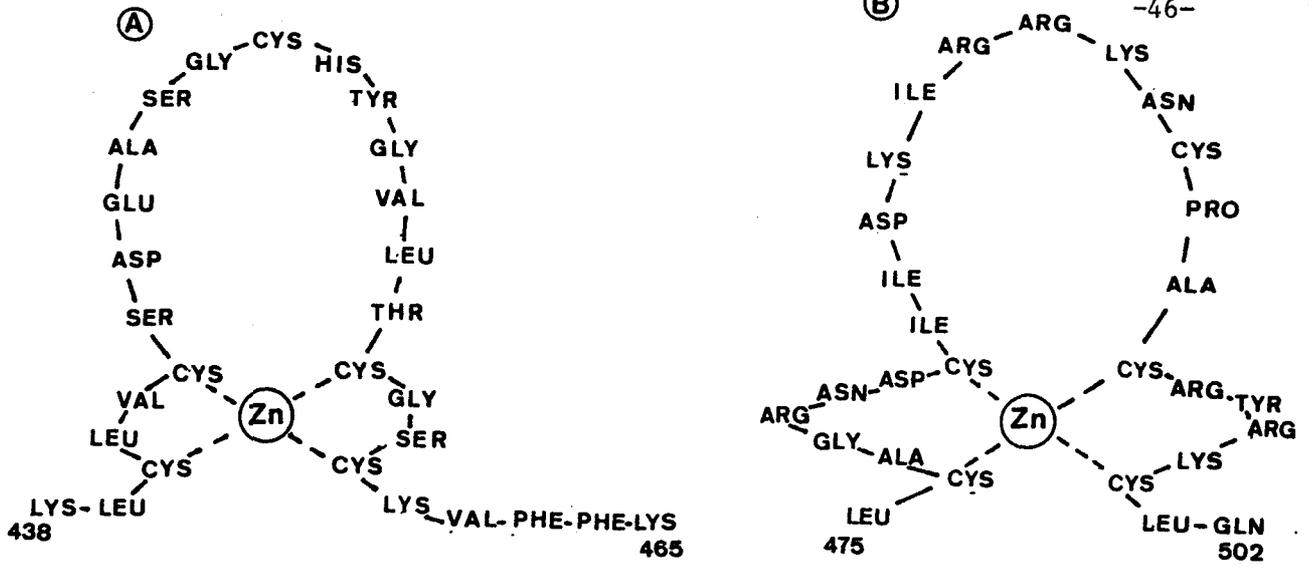


Figure 10. Structure hypothétique du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des glucocorticoides (boucles à zinc A et B).

Les régions structurées en hélice α sont situées dans les positions 443-446 et 460-475. Les régions structurées en feuillet β sont situées en position 451-455 et 481-487.

- Un modèle d'interaction entre une protéine constituée de deux boucles à zinc et l'ADN est représenté en bas. L'hélice α de chaque domaine se place dans le grand sillon de l'ADN, alors que les feuilletts β interagissent avec le squelette sucre-phosphate. La région charnière entre les deux boucles se place également dans le grand sillon. (d'après BERG et al., 1988).

grâce à la technique de * EXAFS , il prouve que chaque atome de zinc est effectivement relié par 4 coordinences dans une structure tétraédrique limitée par 4 cystéines.

3 - Région D (518-558)

A la jonction entre la région de liaison à l'ADN et le site de liaison à l'hormone, elle représente une zone charnière avec un site exposé aux protéases (au voisinage du résidu 518). Une mutation dans cette région (délétion 509-553) inactive complètement le récepteur, et l'empêche de lier le stéroïde (HOLLENBERG *et al.*, 1987). Le changement conformationnel du récepteur provoqué par la liaison du stéroïde pourrait se situer dans cette région. Une exposition du site de liaison à l'ADN serait consécutif à ce changement de conformation (GIGUERE *et al.*, 1986). Cependant, cette hypothèse reste purement spéculative puisqu'elle n'a jamais été démontrée.

4 - La région E ou domaine de liaison au stéroïde

Correspondant au méro-récepteur décrit par les études de protéolyse, elle s'étend entre le résidu 558 et l'extrémité carboxylique terminale (résidu 795) dans le récepteur du rat. La

* Extended X-Ray Absorption Fine Structure.

construction de mutants de délétion dans cette région a démontré clairement sa capacité à lier le stéroïde (RUSCONI et YAMAMOTO, 1987 ; GIGUERE *et al.*, 1986). Ce domaine est très riche en résidus hydrophobes (~ 65 %) et il existe une homologie moyenne (30 à 60 %) entre les différentes classes de récepteurs stéroïdiens, qui témoigne de la parenté structurale de leurs ligands respectifs.

Les résultats obtenus par l'activité de liaison au stéroïde de mutants de délétion d'une part (DANIELSEN *et al.*, 1986) et par identification des acides aminés marqués après photoaffinité et microséquençage, d'autre part (CARLSTEDT-DUKE *et al.*, 1988) ont permis de localiser les résidus Glu 558, Tyr 782 puis Cys 754 et Met 722 comme acides aminés indispensables à la liaison du stéroïde.

Si la fonction essentielle de cette région est la liaison du stéroïde, une séquence particulière (595-615) interviendrait dans la régulation de l'activité transcriptionnelle (DANIELSEN *et al.*, 1986 ; PRATT *et al.*, 1988). En effet, un mutant de délétion de cette région possède une activité transcriptionnelle constitutive, c'est-à-dire qu'il induit la transcription même en l'absence d'hormone (HOLLENBERG *et al.*, 1987). Par l'analyse de tels mutants, et de leurs propriétés physicochimiques, PRATT *et al.* (1988) ont pu démontrer que cette séquence serait impliquée dans la transactivation du récepteur induite par la liaison du stéroïde. Ce phénomène s'accompagne de la perte de l'interaction spécifique du récepteur avec la protéine HSP 90.

5 - Relation Structure-fonction

Dans l'attente d'une description précise de la structure tertiaire du récepteur (résonance magnétique nucléaire, dichroïsme circulaire, diffusion de neutrons), la biochimie classique ne peut qu'imaginer une éventuelle organisation tridimensionnelle du récepteur non transformé. A partir des données de prévision de structure secondaire (tableau V) quelques éléments peuvent apporter matière à réflexion. La région N-terminale du récepteur, et en particulier la zone 120-240, exposée, très hydrophile et peu structurée couvrirait en surface une large proportion de la région A/B. Il est intéressant de remarquer d'autre part, que cette région coïncide avec la séquence transactivatrice tau₁ décrite par GIGUERE *et al.* (1986). Son rôle dans la régulation positive de l'activité transcriptionnelle du récepteur pourrait mettre en jeu une interaction spécifique avec un facteur protéique du complexe d'initiation.

La structure des boucles à zinc et leur interaction avec la double hélice d'ADN reste la région du récepteur la mieux documentée (BERG, 1988 ; EVANS, 1988 ; FREEDMAN *et al.*, 1988). Plus étonnantes encore seraient les régions situées en amont et en aval de la région C. On peut remarquer, en particulier, la région 415-438, particulièrement riche en proline et en sérine, peu structurée et contenant 4 coudes β : elle pourrait intervenir dans une modification conformationnelle du récepteur. La zone située en aval, correspondant à la région D, pourrait aussi être impliquée dans une modification

TABLEAU V - PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DE LA PREVISION DE STRUCTURE SECONDAIRE DU RECEPTEUR DES
GLUCOCORTICOIDES DU RAT

POSITION	HYDROPHOBICITE	POURCENTAGE			* CHARGE NETTE	PARTICULARITES
		HELICE α	FEUILLET β	COUDE β		
1 - 150	42	48	20	20	0	Hélice poly gln en 75-99
151-200	10	18	0	25	0	Région très exposée
201-440	55	30	24	32	- 7	Région riche en proline (410-438)
440-505	55	60	27	24	+ 5	Présence de deux boucles à zinc
506-558	55	50	30	15	+ 4	Hélice riche en LYS-ARG (509-517)
559-795	68	60	20	10	+ 1	Région fortement structurée, très hydrophobe

* Charge nette dans les zones hydrophiles

conformationnelle du récepteur induite par la liaison de l'hormone. Plus en amont, délimitée par les résidus 510-517, se situe une séquence homologue à celle impliquée dans le transfert nucléaire de l'antigène T du virus SV40 (WOLFF et HANOVER, 1987). Cette séquence (Arg-Lys-Thr-Lys-Lys-Lys-Ile-Lys) pourrait intervenir dans la reconnaissance topologique de la chromatine et serait donc une séquence "signal". La région transactivatrice tau2 (509-535) (GIGUERE et al., 1986) coïnciderait avec le rôle charnière de la région D. Aucune séquence spécifique de translocation au noyau telle : Lys-Pro-Ala(Ile)-Ile(Phe)-Lys(Arg) décrite pour certaines protéines (protéine α_2 de levure, histones H2A et H2B; HALL et al., 1984) n'est retrouvée dans le récepteur. Si l'activité constitutive des mutants de délétion de la région E est bien connue, l'explication du rôle de régulation négative de cette région reste hypothétique. En fonction des résultats acquis, on pourrait supposer qu'en l'absence d'hormone, les domaines-clés du fonctionnement du récepteur soient verrouillés par une conformation structurale particulière du récepteur (DANIELSEN et al., 1986 ; GODOWSKI et al., 1987), ou plutôt par une structure quaternaire spécifique mettant en jeu la protéine HSP 90 (PRATT, 1987 PRATT et al., 1988). La fixation du stéroïde entraînerait une modification de la structure tertiaire du récepteur. Cette perturbation (probablement située dans la région C-terminale) permettrait via la zone charnière D, une exposition du site de liaison à l'ADN et du peptide signal. L'hypothèse peut même aller plus loin en supposant qu'après une modification locale de la structure de la chromatine, le récepteur se fixerait au complexe d'initiation par

l'intermédiaire d'un facteur protéique régulateur qui pourrait interagir avec la région A/B du récepteur.

V - STRUCTURE QUATERNAIRE DU RECEPTEUR

Depuis qu'il a pu être démontré que le molybdate, oxyanion d'un métal de transition, pouvait stabiliser l'activité de liaison au stéroïde du récepteur non lié et inhiber réversiblement le phénomène de la transformation (DAHMER *et al.*, 1984) ; plusieurs équipes se sont attachées à préciser l'organisation moléculaire de la forme non transformée du récepteur, stabilisée par le molybdate. L'analyse du récepteur purifié, stabilisé par le molybdate, a permis de déceler une hétérogénéité de structure. La purification du récepteur non transformé des cellules L de souris (HOUSLEY *et PRATT*, 1983) et du foie de rat (GRANDICS *et al.*, 1984a ; IDZIOREK *et al.*, 1985) permet de caractériser une protéine majeure de 90-100 Kda. Par ailleurs, lorsque des stéroïdes marqueurs d'affinité sont utilisés pour identifier la sous-unité liant l'hormone dans le récepteur de la progestérone stabilisé par le molybdate, deux protéines de 80 Kda et 110 Kda apparaissent radiomarquées, plus une protéine 90 Kda non marquée (RENOIR *et al.*, 1986 ; DOUGHERTY *et al.*, 1984). La même observation a pu être obtenue pour le récepteur des glucocorticoides des cellules L de souris, qui se compose d'une protéine de 100 Kda, identifiable par marquage spécifique au 21-mésylate de dexaméthasone et d'une protéine de 90 Kda ne liant pas le stéroïde. Dans le cas du récepteur des glucocorticoides du rat, cette individualisation est rendue plus délicate puisque la protéine liante (~ 94 Kda) ne se sépare quasiment pas en électrophorèse de la protéine 90 Kda non liante (WRANGE *et al.*, 1984 ; IDZIOREK *et al.*, 1985). Ces deux protéines furent clairement

différenciées grâce à des critères immunologiques. Un anticorps monoclonal préparé contre le récepteur de la progestérone d'oviducte de poule (RADANYI *et al.*, 1983) réagit spécifiquement avec cette protéine de masse 90 Kda et également avec la forme non transformée du récepteur des oestrogènes, des glucocorticoides et des minéralocorticoides (JOAB *et al.*, 1984). L'immunoabsorption du récepteur des glucocorticoides stabilisé par le molybdate, avec un anticorps monoclonal spécifique dirigé contre la sous-unité liant le stéroïde, entraîne la coélution de la protéine 90 Kda, contrairement à l'effet observé en présence de récepteur transformé (SANCHEZ *et al.*, 1985, 1987). L'ensemble de ces résultats a permis de démontrer que la forme non transformée des récepteurs stéroïdiens contient une protéine non liante de masse 90 Kda en plus de la protéine liant le stéroïde.

1 - Interaction avec la protéine HSP 90.

Grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques, SANCHEZ *et al* (1985) ont démontré que la protéine 90 Kda associée au récepteur est une protéine de choc thermique (HSP). Elle contient une région fortement conservée chez de nombreuses espèces et est retrouvée depuis les champignons jusqu'aux mammifères supérieurs (RIEHL *et al.*, 1985). Cette protéine est assez abondante puisqu'elle représente 0,5 à 1 % des protéines cytosoliques (SANCHEZ *et al.*, 1985). Elle est phosphorylée au niveau des résidus de sérine dans les cellules intactes (HOUSLEY *et al.*, 1985 ; MENDEL *et al.*, 1986) et serait

localisée essentiellement dans le cytoplasme des cellules (GASC *et al.*, 1984).

Le récepteur non transformé serait donc associé à la protéine HSP 90 pour former un complexe hétéromérique de masse moléculaire - 300 Kda. Cependant, la stoechiométrie exacte de cette composition n'est pas clairement établie, même si une association de deux molécules d'HSP et d'une molécule protéique liant spécifiquement le stéroïde parait le plus vraisemblable (cf 2e partie, chapitre V). Après transformation du récepteur, phénomène induit par la liaison de l'hormone, se produit une dissociation concomittante de la HSP90 (MENDEL *et al.*, 1986). Ce phénomène, reproduit à partir d'homogénats cellulaires par élévation de la température, ou retrouvé dans les cellules intactes incubées à 37°C, en présence du stéroïde ligand, dans des conditions physiologiques (LEFEBVRE *et al.*, 1988a); démontre que la dissociation HSP-récepteur constitue la modification physicochimique essentielle subie par le récepteur au cours de la transformation. La réalité de ce mécanisme parait d'autant plus significative qu'en présence de RU 486 et d'autres antigluco-corticoides, l'ensemble de ce processus est inhibé (LEFEBVRE *et al.*, 1988b).

On peut supposer que, dans ce dernier cas, une modification conformationnelle du récepteur induite par la liaison du stéroïde, et aboutissant à une déstabilisation du complexe HSP-récepteur ne pourrait survenir. Si la réalité physiologique d'une association HSP-récepteur apparaît de moins en moins contestée (PRATT *et al.*, 1988 ; HOWARD et DISTELHORST, 1988), son rôle précis reste encore à

déterminer. La synthèse d'HSP peut être augmentée par divers stress, tels une élévation de température supérieure à 40°C (KELLEY et SCHLESINGER, 1978) ou un apport de glucose chez des cellules préalablement soumises à une privation (KASAMBALIDES et LANKS, 1981).

Le fait que ces protéines existent depuis les eucaryotes primitifs jusqu'à l'homme, et que leur synthèse augmente considérablement en réponse au choc thermique, leur confère un rôle essentiel dans les processus de survie cellulaire (SCHLESINGER *et al.*, 1982). La fonction précise de la protéine HSP 90 reste cependant inconnue à l'heure actuelle. L'apparition de la HSP 90 dans le noyau des cellules a pu être visualisée dans des embryons de poulet soumis à deux chocs thermiques consécutifs (COLLIER *et al.*, 1986). D'autre part, des travaux récents ont montré que la protéine HSP 90 pouvait se lier aux filaments d'actine, selon un processus dépendant de la calmoduline (KOYASU *et al.*, 1986). Il est donc possible que la HSP puisse avoir un rôle de transport intracellulaire de certaines protéines. En ce sens, d'autres protéines seraient concernées comme la tyrosine kinase pp60^{v-src} capable de se lier de façon transitoire à l'HSP 90 avant l'intégration de la kinase dans la membrane (SCHUH *et al.*, 1985). Selon HOWARD et DISTELHORST (1988), la HSP 90 pourrait jouer un rôle dans la régulation de la dégradation intracellulaire du récepteur. Ces auteurs ont en effet pu observer que le temps d'association de la HSP avec le récepteur correspondait à la durée de demi-vie de celui-ci dans la cellule. En dépit de ces différentes hypothèses qui demandent à être confirmées, le rôle essentiel de la HSP 90 est sans doute d'inhiber la liaison du récepteur à l'ADN

(PRATT, 1987). Comme la HSP n'est pas capable de se lier à l'ADN, il est très probable qu'en s'associant au récepteur, elle masque le site de liaison du récepteur à l'ADN. Si cette hypothèse est la plus vraisemblable, il serait intéressant de tenter de comprendre le mécanisme moléculaire d'interaction entre ces deux protéines. La séquence maintenant connue de la HSP 84 de souris (MOORE *et al.*, 1987) permet de proposer par calcul, sa structure secondaire prédictive (tableau VI). Cinq régions essentielles peuvent être distinguées. On peut remarquer, en particulier, une région très chargée (150-320) à proximité de deux régions fortement hydrophobes.

Quatre observations expérimentales permettent de proposer un mécanisme possible d'interaction entre le récepteur et HSP 90. -(i) GEHRING et ARNDT (1985) ont observé que le récepteur mutant ntⁱ (protéine de 40 Kda, ne possédant que la région C-terminale et le site de liaison à l'ADN), existait à l'état non transformé stabilisé par le molybdate sous forme d'un complexe 8-9 S. -(ii) Un récepteur mutant, tronqué de sa région C-terminale active la transcription même en l'absence d'hormone (mutant constitutif), (MIESFELD *et al.*, 1986). -(iii) DANIELSEN *et al.* (1986) puis PRATT *et al.* (1988), par l'analyse de mutants spécifiques et de leurs caractéristiques hydrodynamiques, ont pu proposer l'existence d'une région particulière du récepteur localisée en position 595-615 dans la séquence du récepteur de rat, qui serait directement impliquée dans l'association avec la HSP 90. Cette région possède une forte homologie de séquence avec des régions équivalentes du récepteur de la progestérone, des oestrogènes et des minéralocorticoïdes. On peut penser que, dans le récepteur non

TABLEAU VI - PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DE LA PREVISION DE STRUCTURE SECONDAIRE DE LA PROTEINE HSP 84 DE SOURIS

POSITION	HYDROPHOBICITE	POURCENTAGE			* CHARGE	PARTICULARITES
		HELICE α	FEUILLET β	COUDE β		
1 - 150	65	43	24	18	- 5	Région 50 - 70 particulièrement chargée et exposée
151-320	15	50	20	15	-27	1 hélice chargée négativement :215-260 1 hélice chargée positivement 261-275
321-420	65	50	30	15	0	1 hélice chargée positivement 345-355
421-560	27	60	25	10	- 2	2 régions exposées 420-432 540-560
561-724	50	50	22	20	- 8	

* Charge nette des zones hydrophiles

transformé, cette région relativement hydrophobe interagirait avec un des domaines entourant la région hydrophile chargée de la HSP 90. Au cours de la transformation, la liaison du stéroïde induirait une modification conformationnelle de la région C-terminale du récepteur, entraînant la dissociation de la HSP, et exposant ainsi le site de liaison à l'ADN du récepteur. -(iiii) Récemment, REXIN *et al.*, (1988) utilisant des agents de couplage des protéines (réactifs bifonctionnels clivables) ont démontré que la région N-terminale du récepteur n'était pas en contact direct avec la protéine HSP 90 dans le récepteur non transformé des cellules S49 de souris.

Selon PRATT (1987), des groupements thiols joueraient un rôle essentiel dans l'interaction entre le récepteur et l'HSP 90. TIENRUNGROJ *et al.* (1987a) ont ainsi démontré que l'eau oxygénée était capable d'inhiber la conversion 9S \rightarrow 4S du récepteur cytosolique de cellules L et la dissociation de l'HSP. Cet effet peut être inhibé par l'addition de dithiothréitol. Des groupements thiols de cystéines localisées spécifiquement dans la région C-terminale du récepteur joueraient un rôle dans la transformation (BODWELL *et al.*, 1984 ; BLICQ *et al.*, 1988). Un facteur endogène, inhibiteur de la transformation, de faible masse moléculaire, de nature métallique (PRATT, 1987) ou phosphoglycéridique (BODINE et LITWACK, 1988) serait mis en jeu. Ce dernier facteur possède une action "molybdate-like" et est 250 fois plus actif que le molybdate lui-même.

Cependant, si l'action stabilisante du molybdate sur l'interaction récepteur-HSP peut s'expliquer par la formation d'un complexe entre cet ion métallique et des résidus de cystéine

adjacents (PRATT, 1987), le mécanisme d'action d'un modulateur phosphoglycéridique reste inconnu.

Une déphosphorylation du récepteur au cours de la transformation a également été proposée (SCHMIDT *et al.*, 1982 ; REKER *et al.*, 1987 ; MENDEL *et al.* 1987 ; TIENRUNGROJ *et al.*, 1987b). Mais ces résultats restent encore imprécis et une modification du degré de phosphorylation du récepteur ne peut expliquer directement la dissociation du récepteur non transformé.

2 - Interaction avec d'autres protéines

Compte-tenu d'une masse moléculaire d'environ 300 Kda, la composition la plus probable du récepteur non transformé serait de deux HSP pour une molécule de récepteur. Cependant, dans l'attente d'une preuve absolue, rien ne permet de prétendre que d'autres molécules ne puissent s'associer au récepteur non transformé. Ainsi, la purification du récepteur transformé par chromatographie sur phosphocellulose et DNA-cellulose, a permis d'obtenir un composant de masse 94 Kda liant spécifiquement le stéroïde et une protéine de 72 Kda (WRANGE *et al.*, 1984 ; WRANGE *et al.*, 1986). Cette dernière accompagnerait le récepteur avec un rapport molaire de 3 : 2. Elle est différente du récepteur car elle ne se lie pas à l'hormone et ne réagit pas avec un anticorps anti-récepteur. La protéine 72 Kda est incapable de se lier à l'ADN mais est associée au récepteur lorsque celui-ci se lie à l'ADN. L'identité et le rôle de cette protéine restent cependant inconnus. En particulier, il resterait à préciser si

cette protéine est une sous-unité fonctionnelle du récepteur ou si elle représente un composant co-purifié avec le récepteur.

Un autre composant, probablement associé au récepteur non transformé a été identifié par TAI *et al.* (1986). A partir d'un anticorps monoclonal préparé contre la forme non transformée du récepteur de la progestérone, deux protéines de masses 92 Kda et 59 Kda sont identifiées. La protéine 59 Kda est associée avec HSP 90 et l'épitope reconnu par l'anticorps est présent sur le composant 59 Kda. Cet anticorps entraîne l'immunoabsorption spécifique du récepteur des androgènes, des oestrogènes, des glucocorticoides et de la progestérone chez le lapin. Enfin, la digestion enzymatique partielle des composants 59 Kda et 92 Kda révèle que cette protéine 59 Kda est structuralement différente de HSP 90. Cette observation mériterait d'être confirmée par d'autres auteurs avant de conclure à la présence réelle d'une protéine 59 Kda dans le récepteur non transformé.

Finalement, WHEATHERILL et BELL (1987) ont observé une variation du rayon de Stokes du récepteur des glucocorticoides sous forme non transformée par passage sur une colonne de lipidex 1000, ou par traitement du récepteur à la phospholipase C, sans que ces traitements entraînent une transformation du récepteur. Ils en déduisent qu'un composant lipidique serait responsable du maintien de la forme non transformée du récepteur.

3 - Interaction avec les acides ribonucléiques

a) *Mise en évidence*

La liaison des récepteurs stéroïdiens avec la DNA-cellulose, peut être déplacée par des homopolyribonucléotides (LIAO *et al.*, 1980). Parmi ceux-ci, poly G et poly U sont les plus actifs alors que poly A et poly C ne sont pas actifs. L'efficacité de compétition de ces polynucléotides nécessite une longueur suffisante (15 à 20 nucléotides) et une structure simple brin.

Ces observations, rapportées d'abord pour le récepteur des androgènes, de la progestérone et des glucocorticoides ont pu être confirmées dans le cas du récepteur des oestrogènes (FELDMAN *et al.*, 1981). Un extrait d'ARN cellulaire total est capable d'inhiber la liaison du récepteur des glucocorticoides et des oestrogènes à la DNA-cellulose dans les cellules MCF7 (CHONG et LIPPMAN, 1982). D'autre part, le traitement du cytosol par les ribonucléases (RNases) A et T1 entraîne une augmentation significative du taux de liaison du récepteur à la DNA-cellulose (TYMOCZKO et PHILLIPS, 1983; ROSSINI, 1985). L'ensemble de ces observations suggère qu'une molécule d'ARN serait associée aux récepteurs stéroïdiens et pourrait couvrir le site de liaison à l'ADN. La dissociation de cet ARN, permettrait alors au récepteur de se transformer. Une association du récepteur des oestrogènes à des ribonucléoprotéines a également été décrite (LIANG et LIAO, 1974). L'effet des RNases sur les propriétés hydrodynamiques du récepteur des glucocorticoides fut rapporté pour la première fois

par TYMOCZKO et PHILLIPS (1983). L'addition de 500 U/ml de RNase A entraîne une dissociation partielle du complexe 8S en la forme 4S du récepteur, phénomène concomittant d'une affinité accrue de ces complexes pour la DNA-cellulose . La localisation nucléaire du récepteur des glucocorticoides et leur extraction par la RNase A suggère qu'une partie des complexes hormone-récepteur serait liée à des ARN nucléaires (ROSSINI et BARBIROLI, 1983 ; ROSSINI, 1984).

KOVACIC-MILIVOJEVIC *et al.* (1985) ont caractérisé une forme moléculaire du récepteur des glucocorticoides (5,2S), intermédiaire entre la forme non transformée 9S et la forme transformée 3,8S, dans les cellules AtT-20 de souris. Cette forme peut se dissocier en une forme sédimentant à 3,8S par une élévation de la force ionique (0,3 M KCl). Elle peut aussi être obtenue par addition d'un facteur cytosolique ne liant pas l'hormone, au récepteur 3,8S. Ce facteur non dialysable, stable à l'ébullition, est détruit par la RNase A. L'extraction de ce facteur par un mélange phénol-chloroforme suggère qu'il s'agit d'une molécule d'ARN (KOVACIC-MILIVOJEVIC *et al.*, 1985). Selon ces auteurs, la forme 5,2S serait donc constituée d'une molécule de récepteur (96 Kda) et d'une molécule d'ARN associé de 36 Kda. KOVACIC-MILIVOJEVIC et VEDECKIS (1986) montrent d'autre part, que la forme non transformée du récepteur (9S) est résistante à l'action de la RNase A (90 U/ml). Ce dernier résultat semble contredire les données rapportées précédemment qui démontraient qu'une conversion 8S 4S du récepteur des glucocorticoides induite par la RNase A est concomittante d'une augmentation de l'affinité du récepteur pour la DNA-cellulose (TYMOCZKO et PHILLIPS, 1983). Le même phénomène a

d'ailleurs été observé dans le cas des récepteurs des oestrogènes et de la progestérone (THOMAS et KIANG, 1985, 1986). Ces différents résultats permettent de supposer que l'hydrolyse d'une molécule d'ARN serait impliquée au cours de la transformation, soit en une étape (ROSSINI, 1985), soit en deux étapes avec apparition d'une forme intermédiaire (KOVACIC-MILIVOJEVIC *et al.*, 1985). Cette hypothèse peut d'ailleurs être confortée par le fait qu'un facteur cytosolique inactivé par la RNase A, permet de reconstituer la forme 8S native du récepteur, lorsqu'il est incubé avec le récepteur transformé, partiellement purifié (HUTCHENS *et al.*, 1982).

Selon SCHMIDT *et al.* (1986), le fait qu'une association d'ARN cytosoliques avec le récepteur soit un artefact semble peu probable puisque le récepteur transformé, purifié par chromatographie d'affinité, possède une affinité deux fois plus élevée pour la DNA-cellulose, après traitement à la RNase A (50 U/ml). Une étude originale de ECONOMIDIS et ROUSSEAU (1985) a pu démontrer que le récepteur était associé à une molécule d'ARN dans des cellules intactes. Ainsi, après marquage covalent du récepteur au mésylate de dexaméthasone tritié et pontage moléculaire au formaldéhyde ou par irradiation des cellules intactes, l'analyse du récepteur par ultracentrifugation en chlorure de césium démontre que celui-ci se comporte comme une ribonucléoprotéine.

b) Caractérisation d'une molécule d'ARN associée.

A partir d'une préparation de récepteur cytosolique purifié sous forme non transformée provenant de foies d'animaux préalablement soumis à une injection de phosphate marqué au phosphore 32, GRANDICS *et al.* (1984b) suggèrent qu'un composant de 24 Kda co-élué avec le récepteur pourrait être de nature polynucléotidique. A partir de cellules L de souris, HOUSLEY et PRATT (1984) détectent une bande de 21 Kda éliminée par traitement à la RNase A, copurifiée avec le récepteur non transformé purifié. La caractérisation d'une molécule d'ARN associée au récepteur non transformé a été poursuivie par WEBB *et al.* (1986). Ces auteurs, identifient, à partir d'une préparation de récepteur purifié 4000 fois, un ARN d'environ 110 nucléotides co-élué avec le récepteur au cours de la dernière étape de purification. Ce résultat va à l'encontre de l'observation de KOVACIC-MILIVOJEVIC et VEDECKIS (1986) qui ne parviennent pas à détecter un éventuel ARN associé dans une préparation de récepteur non transformé hautement purifié. Ce dernier résultat peut toutefois sembler critiquable, compte-tenu de la très faible quantité de récepteur analysé par ces auteurs (3 à 6 ml de préparation cytosolique). Une molécule d'ARN associée au récepteur transformé (ALI et VEDECKIS, 1987a, 1987b) a également été caractérisée. A partir de préparations cytosoliques, diverses molécules d'ARN sont isolées d'un complexe ARN-récepteur sédimentant à 6S, en gradient de saccharose. Ces ARN sont des ARN de transfert de 74 à 80 nucléotides parmi lesquels ont été identifiés

trNA^{arg}, trNA^{lys} et trNA^{his}. Ces molécules d'ARN de transfert sont capables de s'associer à la forme monomérique transformée (4S) du récepteur pour former un complexe 6S. Cependant, la signification d'une telle association reste à éclaircir. En effet, celle-ci peut être obtenue avec des trNA d'organismes aussi différentes que E.coli, la levure ou le lapin. D'autre part, l'apparition de tels complexes trNA-récepteur n'est obtenue qu'au prix d'un excès de 500 fois d'ARN par rapport au récepteur !.

c) Signification physiologique

La signification précise d'une éventuelle association du récepteur avec une molécule d'ARN est encore inconnue. La première hypothèse proposée par CHONG et LIPPMAN (1982) suggère que cette molécule masque le site de liaison à l'ADN dans le récepteur non transformé. Dans ce cas, la transformation pourrait dépendre de l'action d'une RNase endogène, comme l'a suggéré ROSSINI (1985), qui démontre que l'inhibiteur placentaire de la ribonucléase A (RNasine) peut inhiber la transformation des complexes hormone-récepteur normalement induite par une élévation de température. Cependant, ce résultat est contredit par TYMOCZKO et PHILLIPS (1983) qui observent que le même inhibiteur diminue l'affinité du récepteur pour l'ADN induite par l'action de la RNase A, mais pas par une élévation de température. La réalité de l'implication de l'hydrolyse d'un ARN associé, au cours de la transformation apparaît douteuse au vu des observations de ROSSINI (1985) et est infirmée par SCHMIDT *et al.*

(1986) qui démontrent que la protéine S de la ribonucléase (forme catalytiquement inactive de la ribonucléase A) peut entraîner le même effet de stimulation de la liaison du récepteur à l'ADN que la RNase A. Le site de liaison à l'ARN au niveau du récepteur pourrait moduler l'affinité du récepteur pour l'ADN (TYMOCZKO *et al.*, 1984). Ces auteurs vont même plus loin en proposant que le récepteur des glucocorticoides possède des sites séparés de liaison pour l'ADN et pour un ARN. En effet, le traitement du récepteur à la chymotrypsine diminue l'effet inhibiteur des ARN sur la liaison du récepteur à la DNA-cellulose, sans affecter la capacité de liaison propre du récepteur à l'ADN (TYMOCZKO *et LEE*, 1985).

D'autres hypothèses ont été proposées pour tenter de comprendre la signification physiologique d'une association récepteur-ARN (tableau VII). Ainsi, ce complexe pourrait jouer un rôle dans la translocation du récepteur vers le noyau (DE ROBERTIS, 1983) ou dans sa rétention intranucléaire selon un mécanisme analogue au système des SRP (signal recognition particles) (WALTER *et al.*, 1984 ; KING *et GREENE*, 1984 ; WELSHONS *et al.*, 1984). L'association ARN-récepteur pourrait être impliquée dans la régulation de l'activité transcriptionnelle, en modulant l'affinité du récepteur pour l'ADN, peut-être par la formation d'un hybride ARN-ADN qui faciliterait ainsi la liaison du récepteur à l'ADN (KOVACIC-MILIVOJEVIC *et al.*, 1985).

De nombreux auteurs supposent qu'un complexe ARN-récepteur pourrait agir à un niveau post-transcriptionnel (LIAO *et al.*, 1980 ; TYMOCZKO *et al.*, 1984). Le récepteur pourrait ainsi jouer un rôle dans la stabilisation des ARNm produits après stimulation hormonale (Mc

TABLEAU VII - PRINCIPALES HYPOTHESES CONCERNANT LA SIGNIFICATION BIOLOGIQUE D'UNE ASSOCIATION RECEPTEUR-ARN

HYPOTHESE	MECANISME	REFERENCES
(1) Une molécule d'ARN associée au récepteur non transformé empêche sa liaison à l'ADN	<ul style="list-style-type: none"> - Compétition entre l'ADN et l'ARN pour le site de liaison à l'ADN du récepteur - L'hydrolyse spécifique d'une molécule d'ARN sur un site distinct du site de liaison à l'ADN, entraîne une augmentation d'affinité du récepteur pour l'ADN 	<p>CHONG et LIPPMAN (1982) TYMOCZKO <u>et al.</u> (1984) TYMOCZKO et LEE (1985) SCHMIDT <u>et al.</u> (1986)</p>
(2) Rôle dans la translocation du complexe hormone-récepteur vers le noyau	<ul style="list-style-type: none"> - Analogie au système des SRP (transport intra-nucléaire) 	<p>ECONOMIDIS et ROUSSEAU (1985)</p>
(3) Régulation de l'activité transcriptionnelle	<ul style="list-style-type: none"> - Formation d'un hybride ADN-ARN, facilitant la liaison du récepteur à l'ADN. 	<p>KOVACIC-MILIVOJEVIC <u>et al.</u> (1985)</p>
(4) Rôle à un niveau post-transcriptionnel	<ul style="list-style-type: none"> - Stabilisation des mRNA induits par la stimulation transcriptionnelle. - Translocation et maturation des ARN-messagers transcrits selon un système analogue aux "snurps" 	<p>TYMOCZKO <u>et al.</u> (1984) "</p>
(5) Dégradation et recyclage intracellulaire du récepteur	<ul style="list-style-type: none"> - Système d'ubiquitination ATP-dépendant. 	<p>ALI et VEDECKIS (1987c)</p>

KNIGHT et PALMITER, 1979) ainsi que dans la maturation et la translocation intracytoplasmique des ARNm (TYMOCZKO *et al.*, 1984 ; GANNON *et al.*, 1979). La matrice nucléaire et en particulier les "Snurps", structures impliquées dans la maturation et l'épissage des ARNm, sont aussi des sites spécifiques de fixation des complexes hormone-récepteur (LIAO *et al.*, 1973 ; BARRACK, 1983) .

Une dernière hypothèse, concernant un rôle post-transcriptionnel éventuel d'un complexe tRNA-récepteur a été proposée récemment (ALI et VEDECKIS, 1987c). Elle met en jeu la dégradation du récepteur et d'autres protéines par le système ubiquitine-ATP dépendant (FINLEY et VARSHAVSKY, 1985). Grâce à ce système, le récepteur est attaché covalentiellement à l'ubiquitine par l'intermédiaire d'un complexe tRNA^{His}-récepteur. Ainsi, la dégradation rapide du récepteur transformé (Mc INTYRE et SAMUELS, 1985) pourrait dépendre d'un tel mécanisme.

Quoiqu'il en soit concernant le rôle exact d'une molécule d'ARN associée au récepteur, différents résultats ont souligné la présence d'une telle association dans l'ensemble des récepteurs stéroïdiens. Cette association ne semble pas correspondre à un artefact puisqu'elle est identifiée à partir de cellules intactes (ECONOMIDIS et ROUSSEAU, 1985) et que des molécules d'ARN ont été caractérisées à partir de préparations de récepteur purifié (WEBB *et al.*, 1986 ; SABLONNIERE *et al.*, 1988). Néanmoins, il nous a semblé intéressant de résumer les données les mieux documentées des systèmes intracellulaires où des interactions entre ARN et protéines spécifiques ont été décrites.

d) Mécanismes des interactions ARN-protéines

L'étude des interactions ARN-protéines est d'emblée délicate, dans la mesure, où, à l'opposé de l'ADN, chaque molécule d'ARN possède une structure tertiaire qui lui est propre. Ainsi, les mécanismes d'interaction d'une molécule d'ARN avec une protéine sont plus proches des interactions protéine-protéine que des interactions entre ADN et protéines (réemment revu par WICKENS et DAHLBERG, 1987).

Les principes généraux du mécanisme d'interaction entre ARN et protéines ont d'abord été obtenus par l'étude de systèmes simples où une seule protéine interagit avec une seule molécule d'ARN. Même si un faible nombre d'ARN n'a pu être analysé jusqu'ici, certaines caractéristiques structurales ont pu être précisées. On peut remarquer, en particulier la fréquence d'une adénosine non appariée. Etant isolée, cette adénosine serait exposée vers l'extérieur de l'hélice. Par exemple, dans l'interaction spécifique entre la protéine d'enveloppe du coliphage R17 et un ARN de 21 paires de bases, une adénosine essentielle pour la liaison à la protéine entraîne une distorsion d'une hélice de 7 paires de bases. De telles structures sont également retrouvées dans la zone d'interaction entre les ARN des "snurps" et leurs protéines comme dans le cas de l'ARN U₂ (MATTAJ et al., 1986). Il en est de même dans l'interaction de l'ARN 5S avec le facteur de transcription TFI_{IIA} (ANDERSEN, 1987). Enfin, de nombreuses protéines des ribosomes interagissent spécifiquement avec l'ARN 16S selon le même mécanisme (BRIMACOMBE, 1988). Des régions simple-brin sont également impliquées dans l'interaction avec les protéines :

ainsi l'interaction ARN U₁- "snurps" met en jeu une région simple-brin de la molécule d'ARN (LIAUTARD *et al.*, 1982).

Il semble qu'une séquence 5'A U U U U G 3', retrouvée dans la plupart des ARN des "snurps" (U₁, U₂, U₄) soit essentielle à la fixation des protéines (MATTAJ *et DE ROBERTIS*, 1985). Cependant l'interaction avec la protéine dépend fortement de la structure secondaire de l'ARN puisque deux hélices encadrant cette région simple-brin sont essentielles à la stabilité du complexe (Fig. 11) (MATTAJ *et al.*, 1986).

Dans le cas du facteur de transcription TFIIIA de xénope, une hélice de 70 nucléotides est impliquée spécifiquement dans la fixation de la protéine.

Un dernier exemple, le mieux étudié des interactions ARN-protéines est constitué par le ribosome (revu par BRIMACOMBE, 1988). Dans ce cas où la structure secondaire est très complexe, les sites d'interaction avec les protéines se situent au niveau des boucles soit disposées à l'extrémité d'une hélice, soit faisant saillie au milieu d'une hélice (Fig. 11). Les mécanismes d'interaction sont certainement, en réalité plus complexes puisqu'ils dépendent aussi d'une structure tertiaire propre à chaque molécule d'ARN. Qu'en est-il de la structure des protéines acceptrices, c'est-à-dire du deuxième partenaire ?. Le clonage des gènes codant pour les protéines A et C (spécifiques du complexe U₁ - "snurps") et des protéines U₁-A et U₂-B a permis d'obtenir la séquence primaire de certaines d'entre elles. De la comparaison de ces séquences, émerge une séquence consensus:

Arg(Lys)-Gly-Phe(Tyr)-Gly(Ala)-Phe(Tyr)-Val - X -Phe(Tyr)

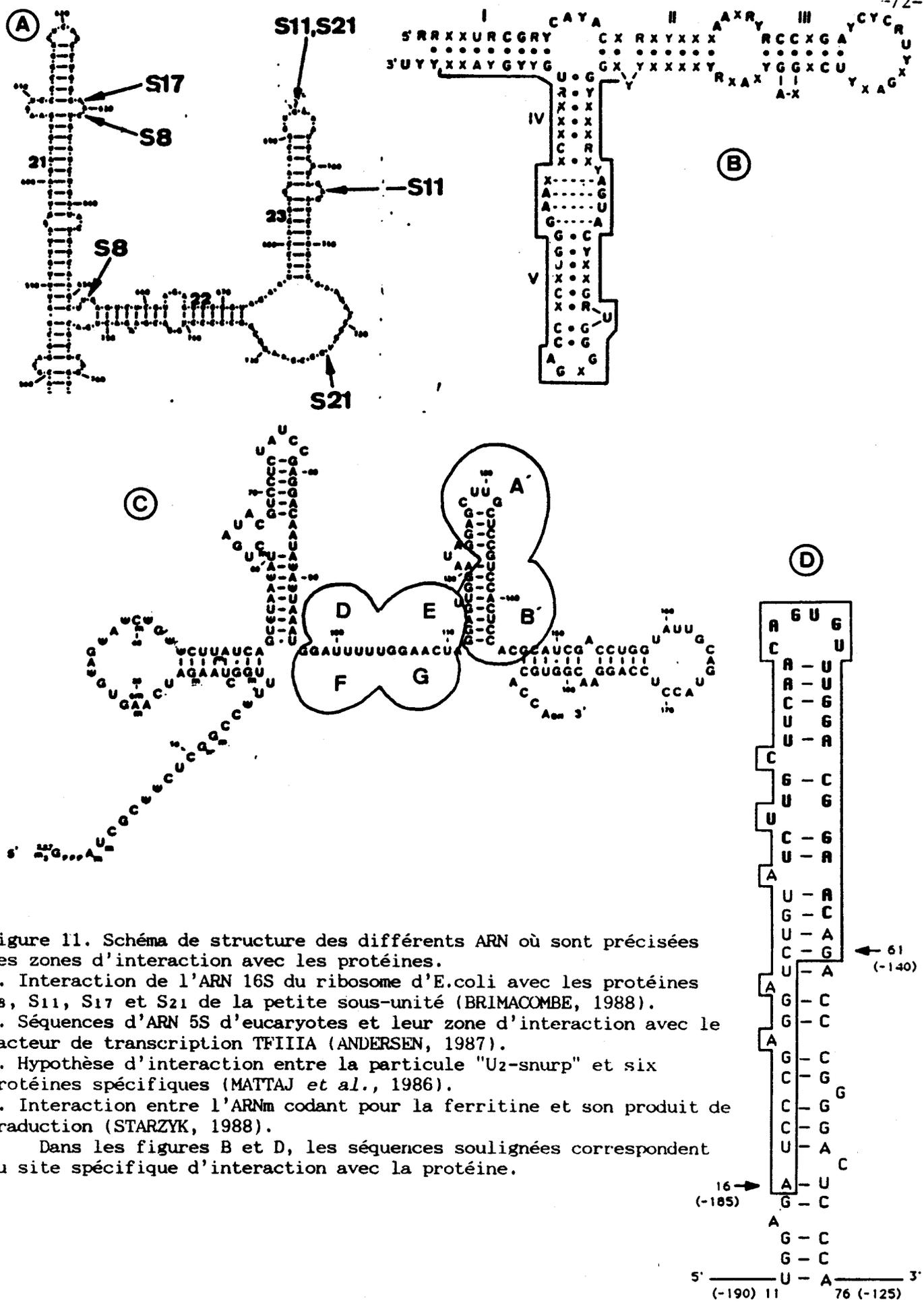


Figure 11. Schéma de structure des différents ARN où sont précisées les zones d'interaction avec les protéines.
 A. Interaction de l'ARN 16S du ribosome d'E.coli avec les protéines S8, S11, S17 et S21 de la petite sous-unité (BRIMACOMBE, 1988).
 B. Séquences d'ARN 5S d'eucaryotes et leur zone d'interaction avec le facteur de transcription TFIIIA (ANDERSEN, 1987).
 C. Hypothèse d'interaction entre la particule "U2-snurp" et six protéines spécifiques (MATTAJ *et al.*, 1986).
 D. Interaction entre l'ARN^m codant pour la ferritine et son produit de traduction (STARZYK, 1988).

Dans les figures B et D, les séquences soulignées correspondent au site spécifique d'interaction avec la protéine.

qui est également retrouvée dans la protéine liant le poly A, et dans les protéines A₁, A₂ et C des complexes * "hn RNP". Selon SWANSON et al.(1987), cet octapeptide pourrait être significatif d'une protéine capable de lier une molécule d'ARN. On peut supposer que, la succession de chaînes latérales cycliques hydrophobes puisse s'insérer entre les bases de la chaîne polynucléotidique de l'ARN. Le résidu d' arginine qui débute cette séquence forme une liaison saline avec les restes phosphate de la chaîne d'ARN. Cependant, cette séquence consensus n'est pas retrouvée dans toutes les protéines liant l'ARN, c'est le cas notamment des protéines des ribosomes ou des protéines capsidiques des virus à ARN (SWANSSON et al., 1987). D'autres types d'interactions pourraient exister entre les bases exposées non appariées faisant saillie à l'extérieur d'une hélice et certains acides aminés de la protéine ; mais aucune description précise de ce type d'interaction n'a été proposée.

Pour mieux comprendre ces interactions, les techniques de séquençage et de prévision de structure secondaire des ARNs sont indispensables. D'autre part, les méthodes utilisées pour l'étude des interactions ADN-protéines peuvent être appliquées et en particulier les techniques d'empreintes, de migration retardée en gel d'acrylamide et de mutagenèse dirigée. Plus récemment encore, l'utilisation de nucléotides photoactivables utilisés pour la réalisation de pontages moléculaires avec la protéine a été décrite (EXPERT-BEZANCON et WOLLENZIEN, 1985).

* hn RNP : Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein Particles.

L'étude de ces interactions, déjà très poussée dans le cas du ribosome, fait l'objet d'une attention particulière dans le phénomène de maturation des ARN messagers. Dans ce cas, une interaction spécifique entre sept protéines et cinq ARN et son organisation en un complexe (spliceosome) impliqué dans l'épissage et la maturation des ARNm précurseurs, représente un système où les interactions multiples ARN-ARN, ARN-protéines et protéines-protéines restent encore mal connues.

Les " snurps " sont localisés uniquement dans le noyau alors que les protéines libres de ces particules s'accumulent dans le cytoplasme. Ainsi, selon MATTAJ *et al.* (1986), un signal de transfert nucléaire serait donc formé grâce à une conformation spécifique d'un complexe U ARN-Snurp, exposant une séquence signal spécifique de transfert nucléaire portée à la fois par la protéine et par l'ARN.

L'ensemble de ces observations témoigne d'une grande variété et de l'importance des interactions ARN-protéines impliquées non seulement dans la traduction (ribosome) mais aussi dans la régulation des mécanismes post-transcriptionnels (snurps). Le mécanisme d'interaction d'une molécule d'ARN avec le récepteur des glucocorticoides reste inconnu. Si l'interaction possible d'un ARN avec le domaine B du récepteur a été proposée, aucune structure précise n'a encore été décrite, mise à part l'éventualité de l'existence d'un ARN de transfert (ALI et VEDECKIS, 1987b,c). Une interaction du type U₂ - snurps semble devoir être écartée dans la mesure où la séquence octapeptidique décrite par SWANSON *et al.* (1987) n'est pas retrouvée dans le récepteur.

2^{ème} PARTIE

RESULTATS

EXPERIMENTAUX

Lors de notre arrivée au laboratoire, notre tâche a été d'étudier la composition moléculaire du récepteur des glucocorticoides sous forme non transformée. Nous disposions pour cela de la technique de purification du récepteur par chromatographie d'affinité développée depuis 1981 par P.LUSTENBERGER et P.FORMSTECHEER et complétée par le travail de T.IDZIOREK. La synthèse et l'utilisation de stéroïdes bifonctionnels pour préciser le nombre de sous-unités liant le stéroïde n'a pas répondu aux résultats souhaités. L'utilisation de techniques chromatographiques en mode haute performance d'une part, et l'obtention d'anticorps monoclonaux nous ont ensuite facilité la tâche.

Une hétérogénéité de taille du récepteur non transformé nous a conduit à rechercher l'existence d'un autre constituant associé. Une collaboration active s'est alors développée avec I. ECONOMIDIS et M. PLACE de l'équipe du Professeur G. ROUSSEAU à BRUXELLES, qui avaient démontré l'association du récepteur à une molécule d'ARN. Ce sont les résultats de l'ensemble de ces efforts que nous allons présenter dans cette deuxième partie.

I - ETUDE DES CARACTERISTIQUES PHYSICOCHEMISTIQUES DU RECEPTEUR.

1 - Caractéristiques hydrodynamiques.

Elles sont obtenues par la mesure du coefficient de sédimentation, du rayon de Stokes et de la masse moléculaire. Trois méthodes permettent ces mesures. Il s'agit respectivement de l'ultracentrifugation, de la chromatographie d'exclusion de taille et de l'électrophorèse. Grâce à l'utilisation d'un ligand synthétique radioactif à haute affinité pour le récepteur et spécifique, le récepteur pourra être repéré grâce à la formation d'un complexe récepteur-ligand radiomarké. Ainsi, une étude de ces caractéristiques peut être facilement envisagée à partir de préparations impures (cytosol,* extrait sulfate de protamine) dans des conditions non dénaturantes, c'est-à-dire où l'interaction récepteur-ligand sera respectée.

a) Coefficient de sédimentation

Après liaison à l'acétonide de triamcinolone tritiée, un échantillon cytosolique contenant le récepteur est soumis à une ultracentrifugation en gradient de saccharose (5-20 %). Dans un tampon de faible force ionique ($\mu = 0,05$), le récepteur non transformé sédimente à $9,3 \pm 0,4$ S ($n = 6$) (Fig. 12). Dans un tampon de force ionique élevée ($\mu = 0,30$), les valeurs obtenues sont un peu plus faibles, respectivement de $8,3 \pm 0,4$ S ($n = 5$). De telles variations

* Extrait Sulfate de Protamine : on veut signifier par ce terme un échantillon de récepteur partiellement purifié par la technique de précipitation au sulfate de protamine.

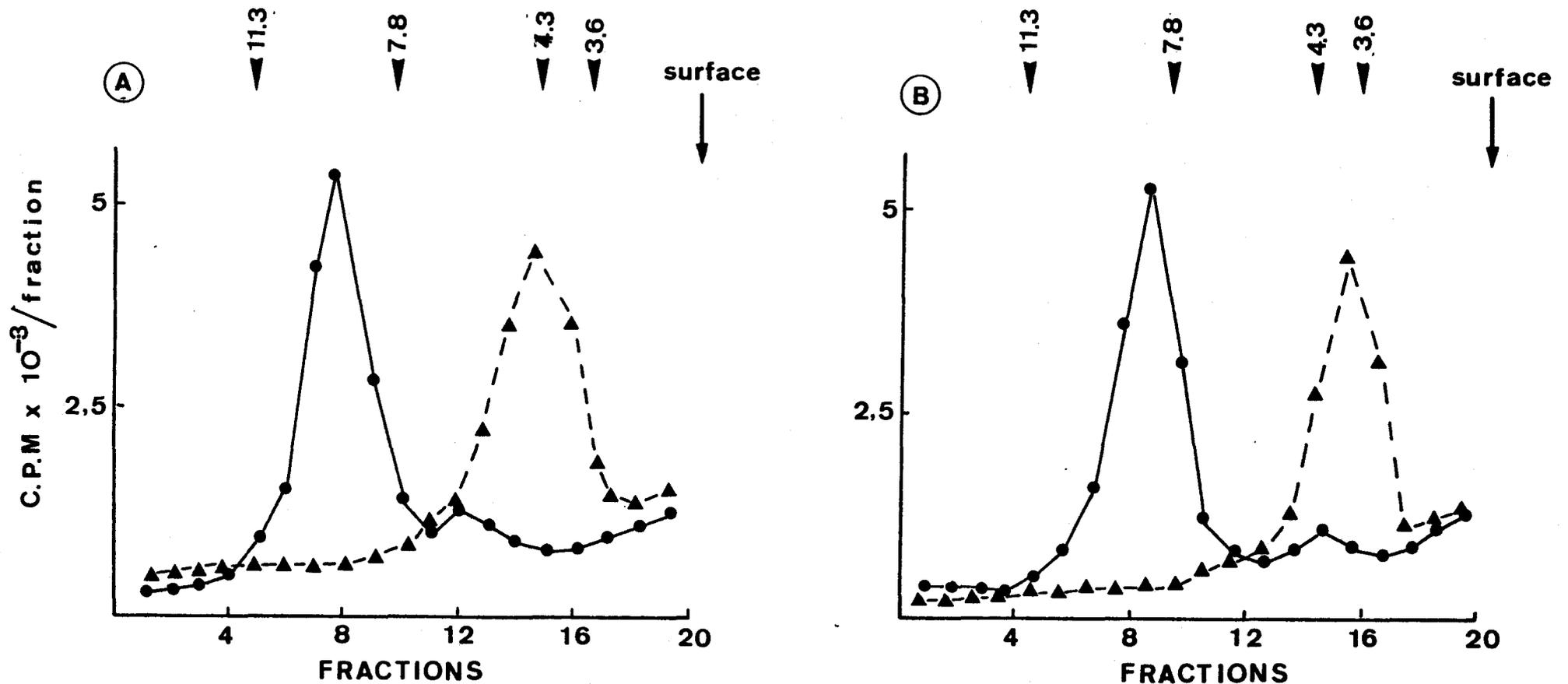


Figure 12 - Mesure du coefficient de sédimentation des formes non transformées et transformées du complexe $[^3\text{H}]$ -TA-récepteur par ultracentrifugation en gradient de saccharose (5-20 %). Un échantillon cytosolique préparé en tampon TMG Mo est incubé avec l'hormone tritiée avant d'être traité sur charbon-dextran pour éliminer l'excès de stéroïde libre. 0,2 ml sont alors déposés sur le gradient (●—●). Un autre échantillon cytosolique préparé sans molybdate (tampon TMG) est incubé dans les mêmes conditions avant d'être chauffé à 25°C pendant 30 min. 0,2 ml sont alors déposés sur le gradient (▲—▲). Après une centrifugation de 16h à 55000 tr/min, des fractions de 0,18 ml sont collectées et soumises à une mesure de radioactivité. Sont comparées ici les mesures obtenues dans un gradient préparé en faible force ionique (tampon KP₃₀ MGM) (A), et en milieu de force ionique élevée (tampon KP₁₆₀ MGMo) (B).

des valeurs des coefficients de sédimentation en fonction de la force ionique du tampon utilisé ont déjà été rapportées (SHERMAN *et al.*, 1982). Elles peuvent s'expliquer par une modification du degré d'hydratation moléculaire du récepteur, affectant directement la valeur du volume spécifique partiel. Malgré un temps d'analyse assez long (15 heures) on n'observe pas de dissociation importante du complexe oligomérique non transformé. L'utilisation récente au laboratoire d'un rotor vertical, qui permet de réduire le temps d'analyse à moins de 3 heures, donne des valeurs des coefficients de sédimentation sensiblement identiques.

b) Mesure du rayon de Stokes

Classiquement réalisée par chromatographie de gel-filtration, cette détermination a été réalisée ici par chromatographie d'exclusion de taille en haute performance, ce qui permet de réduire considérablement le temps d'analyse et d'améliorer la résolution. Le choix des conditions expérimentales et leur justification a d'ailleurs fait l'objet d'un précédent mémoire (SABLONNIERE, 1987). Nous avons étudié le rayon de Stokes des complexes hormone-récepteur à l'état non transformé et à l'état transformé, en utilisant une colonne TSK G4000 SW ce qui permet d'obtenir une séparation optimale pour des valeurs de rayon de Stokes comprises entre 3 et 11 nm (SABLONNIERE *et al.*, 1987).

Le récepteur natif non transformé, stabilisé par le molybdate est élué à 16-18 ml, donnant un pic d'allure hétérogène (Fig. 13A) contenant deux composants de taille respective de $8,3 \pm 0,2$ nm et

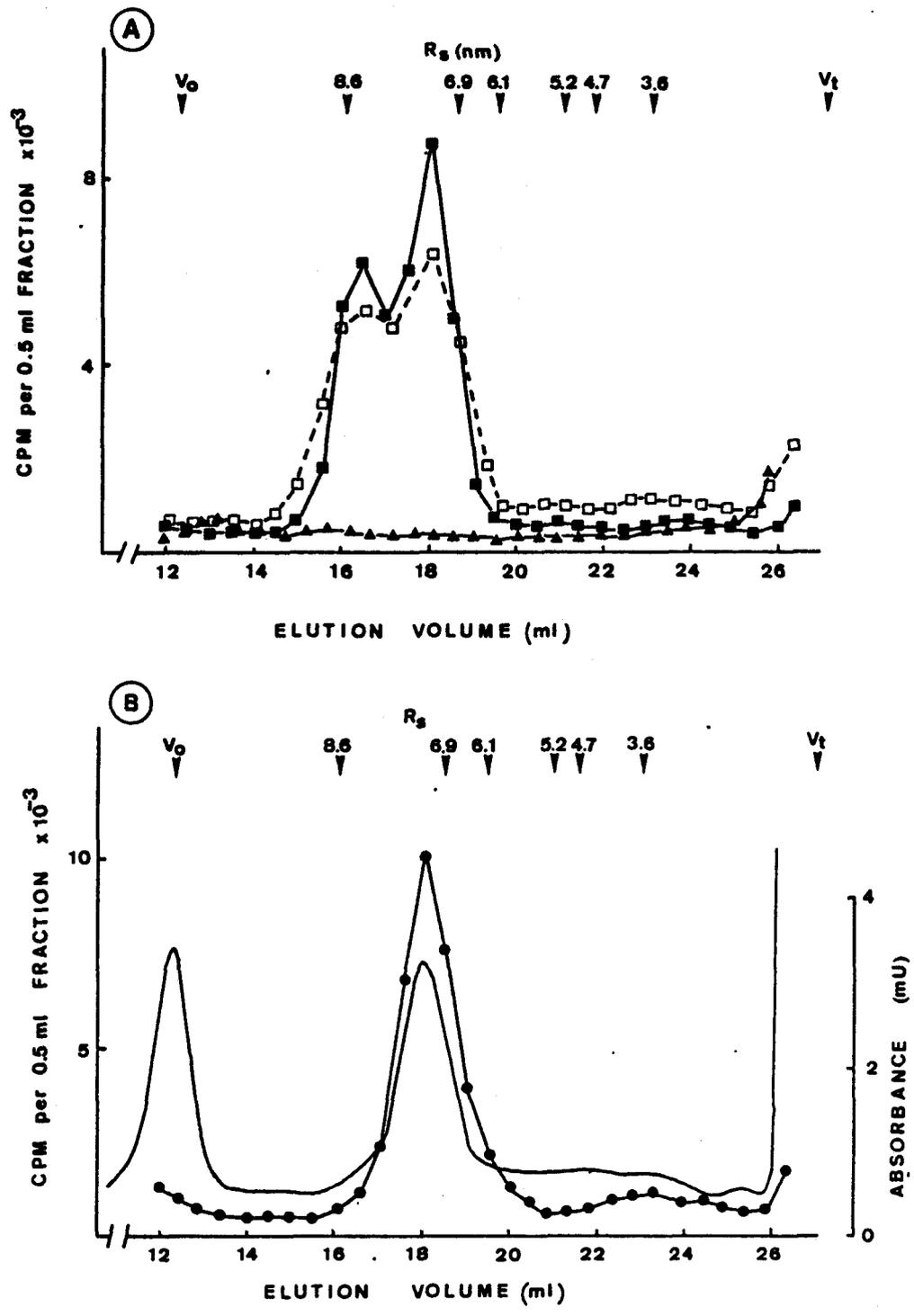


Figure 13. (A) Analyse du récepteur non transformé par chromatographie d'exclusion de taille sur colonne TSK G 4000SW. Un échantillon cytosolique (0.2 ml), préparé en tampon TMGM₀ et incubé pendant 4h avec l'acétonide de triamcinolone tritié est injecté sur la colonne (■). Un aliquot préparé en l'absence de molybdate (tampon TMG) est analysé dans les mêmes conditions (□); ainsi qu'après incubation en présence d'hormone tritiée et d'un excès d'hormone non radioactive (▲). L'éluion est réalisée en tampon KP160MM₀ à un débit de 0.5 ml/min et des fractions de 0.5 ml sont collectées et soumises à une mesure de radioactivité.

(B) Analyse du récepteur non transformé purifié. 0.2 ml d'éluat contenant le récepteur non transformé purifié par chromatographie d'affinité est injecté sur la colonne TSK G4000 SW. Une mesure de radioactivité est effectuée (●) de même qu'un enregistrement de l'absorbance à 280 nm (—). Les flèches indiquent l'éluion des protéines standards avec leur rayon de stokes en nanomètres.

7,1 ± 0,2 nm (n = 16). Ces deux pics correspondent à de la radioactivité liée spécifiquement au récepteur puisqu'ils ne peuvent être observés lorsqu'un échantillon cytosolique témoin est incubé en présence d'acétonide de triamcinolone radioactive et d'un large excès d'acétonide de triamcinolone non radioactive. On peut remarquer d'ailleurs l'existence d'un discret pic non spécifique dont le volume d'élution est proche de V_0 . Le pic de radioactivité élué à 27-29 ml correspond à l'élution de l'hormone libre. Un cytosol préparé en l'absence de molybdate de sodium a également été analysé avec un tampon d'élution dépourvu de molybdate de sodium. Le profil d'élution obtenu est similaire à celui observé en présence de molybdate, ce qui démontre que le molybdate n'entraîne pas de modification conformationnelle particulière du récepteur.

Par comparaison, le récepteur transformé obtenu par élévation thermique à 25°C pendant 30 minutes est caractérisé par un rayon de Stokes de 5,2 ± 0,2 nm (SABLONNIERE *et al.*, 1986).

Le récepteur non transformé stabilisé par le molybdate, obtenu après purification partielle par précipitation au sulfate de protamine possède des caractéristiques identiques (présence de 2 formes de 8,3 et 7,1 nm). Nous avons d'autre part mesuré le rayon de Stokes du complexe hormone-récepteur non transformé et purifié par chromatographie d'affinité selon un protocole décrit précédemment (IDZIOREK *et al.*, 1985). Un éluat de chromatographie d'affinité contenant le récepteur purifié 5000 fois est analysé sur une colonne TSK G4000 SW et identifié à la fois par la mesure de la radioactivité liée spécifique et par l'absorbance à 280 nm (Fig. 13B). On observe un

pic homogène et symétrique correspondant à un complexe hormone-récepteur dont le rayon de Stokes est égal à $7,1 \pm 0,2$ nm.

La forme 7,1 nm du récepteur cytosolique natif ne correspond pas à un artefact d'analyse chromatographique consécutif à une dissociation 8,3 nm \rightarrow 7,1 nm puisque la réinjection de la radioactivité liée spécifiquement dans le pic de $R_s = 8,3$ nm nous redonne un même pic élué avec $R_s = 8,3$ nm. L'absence de la forme de taille 8,3 nm dans le récepteur purifié laisse supposer la perte d'un facteur associé au récepteur pendant le protocole de purification, à moins que cette différence de taille apparente ne corresponde à une modification conformationnelle du récepteur. Une telle différence a d'ailleurs été rapportée dans le cas du récepteur de la progestérone (ARANYI *et al.*, 1988).

Afin de préciser les caractéristiques de ces deux formes du récepteur non transformé, celles-ci ont été analysées séparément par ultracentrifugation en gradient de saccharose (Fig. 14). Pour éviter la dissociation du complexe hormone-récepteur à la suite de l'étape chromatographique, l'échantillon contenant le récepteur (extrait sulfate de protamine) a été préalablement incubé avec le 21-mésylate de dexaméthasone tritié. Dans ces conditions, le profil chromatographique est le même que celui révélé précédemment, et l'ultracentrifugation conduit à un coefficient de sédimentation identique pour les deux formes du récepteur ($S_{20,w} = 9,3$ S).

L'expérience inverse a par ailleurs été réalisée. Un échantillon d'extrait sulfate de protamine, incubé avec l'acétonide de triamcinolone tritié est d'abord soumis à une ultracentrifugation. Le

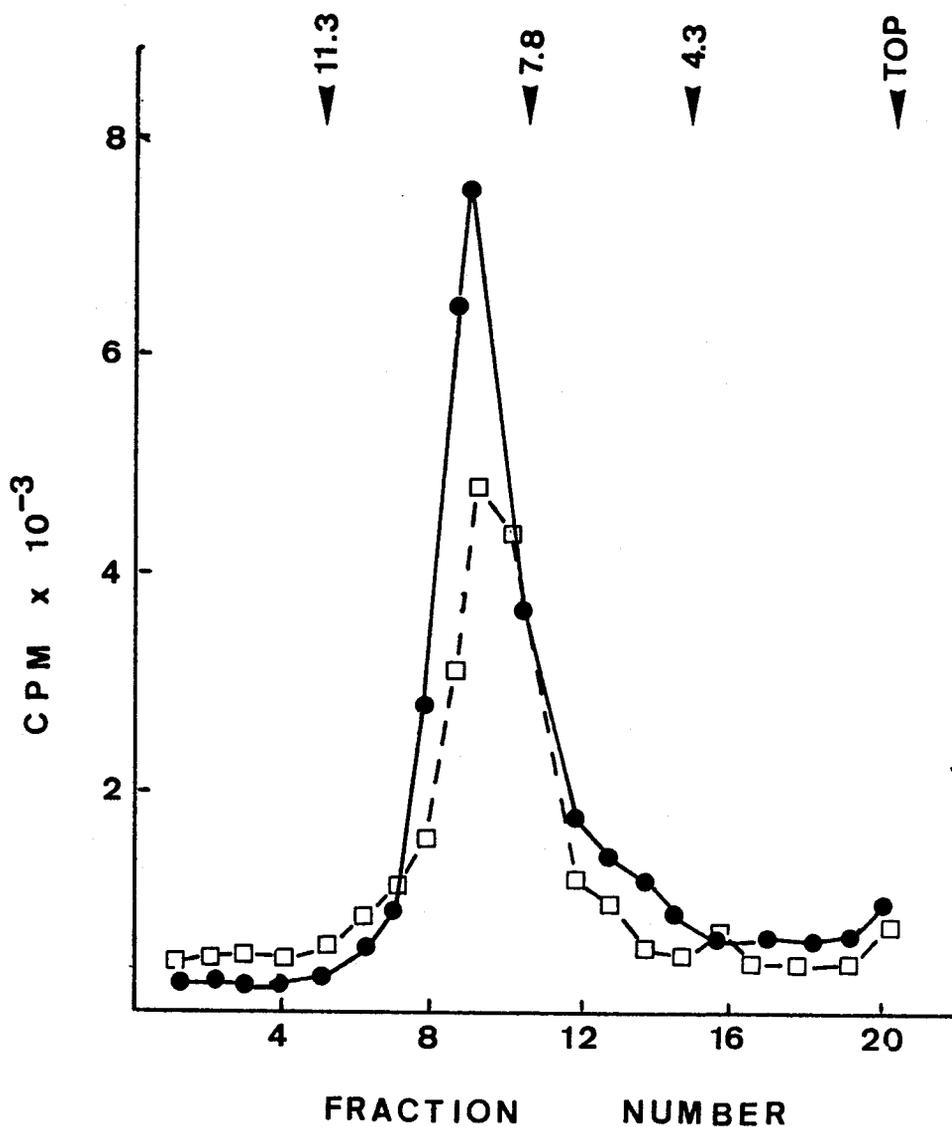


Figure 14. Mesure du coefficient de sédimentation des deux formes du récepteur caractérisées en chromatographie d'exclusion de taille.

Les formes 8.3 nm et 7.1 nm du récepteur sont collectées séparément après fractionnement sur colonne TSK G 4000SW (cf. Fig. 13 A). Chacune de ces deux formes est alors soumise à une ultracentrifugation en gradient de saccharose. Le profil de sédimentation du récepteur (forme 7.1 nm (●)), est comparé avec celui de la forme 8.3 nm (□). Les flèches indiquent le coefficient de sédimentation des protéines standards, exprimé en unités Svedberg.

pic 9S obtenu est recueilli à 0°C, dilué au 1/5 et analysé sur colonne TSK G4000 SW. Malheureusement, le profil obtenu est assez décevant (Fig. 15). On observe un pic très large avec un composant majeur de taille 7 nm suivi d'une trainée vers des tailles plus faibles. Cette allure hétérogène pourrait correspondre à une modification du comportement chromatographique du récepteur suite à son imprégnation préalable avec le saccharose. Toutefois, on ne peut observer de forme 8,3 nm. Dans ce cas, il serait intéressant de refaire la même expérience en opérant une ultracentrifugation à l'aide d'un rotor vertical qui permet une analyse beaucoup plus rapide.

Les données hydrodynamiques nous ont permis de calculer les valeurs respectives de la masse moléculaire et du rapport de friction des différentes formes moléculaires du récepteur comme nous l'avons décrit précédemment (SABLONNIERE, 1987). Les résultats ont été calculés en tenant compte d'un taux d'hydratation moléculaire de 0,2 gramme d'eau liée par gramme de protéine selon les observations de TANFORD (1963). On peut remarquer la forme très dissymétrique de ces molécules (ellipsoïde allongé) caractérisant à la fois les formes transformées et non transformées du récepteur (tableau VIII).

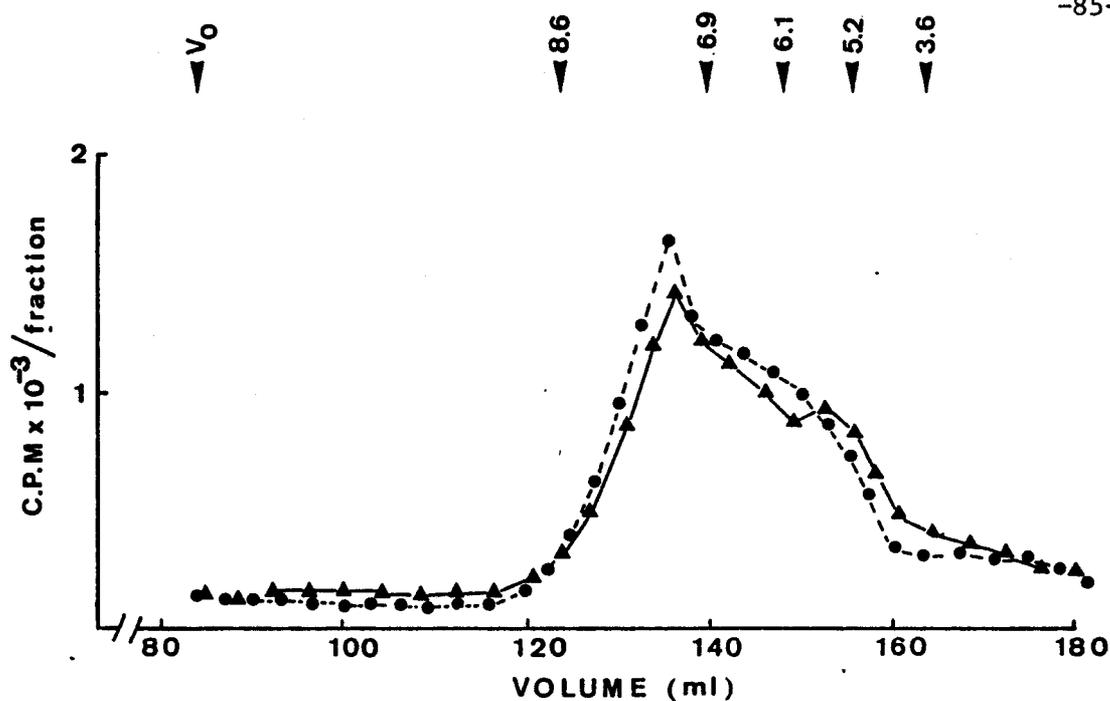


Figure 15. Mesure du rayon de Stokes du récepteur non transformé obtenu après ultracentrifugation en gradient de saccharose.

Un échantillon de récepteur partiellement purifié par précipitation au sulfate de protamine, et incubé en présence d'acétonide de triamcinolone tritié est soumis à une ultracentrifugation en gradient de saccharose. Le pic 9.3 S obtenu est collecté à 0°C et dilué au cinquième avant d'être analysé en chromatographie d'exclusion de taille (colonne TSK G4000 SW préparative). L'éluion est réalisée en tampon $KP_{160}MM_0$ à un débit de 3.5 ml/mn. Des aliquots de 0.8 ml des fractions collectées sont soumis à une mesure de radioactivité. Sont représentés respectivement les profils obtenus après injection de la partie ascendante du pic 9.3 S (●) et de la partie descendante (▲).

TABLEAU VIII

Caractéristiques hydrodynamiques des différentes formes moléculaires du récepteur des glucocorticoïdes. Comparaison avec les caractéristiques de la protéine de choc thermique HSP90

	VALEURS EXPERIMENTALES		VALEURS CALCULEES				
	R_S (nm)	$S_{20,w}^*$	$^{+}Mr(x10^{-3})$	$^{++}f/f_0$	a/b	a (Å)	b (Å)
RECEPTEUR	$8,3 \pm 0,2$	$9,3 \pm 0,4$	320 ± 15	1,70	12	250	21
	$7,1 \pm 0,2$	$9,3 \pm 0,4$	280 ± 12	1,52	9	200	22
	$4,7 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,4$	90 ± 8	1,48	9	140	15,5
PROTEINE HSP 90	6,5	6,2	180 (dimère)	1,67	12	210	17,5

* : valeurs mesurées en milieu de faible force ionique

+ : selon l'équation $Mr = 4224 \times R_S \times S_{20,w}$

++ : selon l'équation $f/f_0 = 13,93 \times (R_S/Mr)^{1/3}$

a et b : dimensions des demi-axes de l'ellipsoïde (hypothèse d'un ellipsoïde allongé)

** : données hydrodynamiques caractéristiques de la protéine HSP 90 selon Koyasu et al. (1986)

2 - Masse moléculaire

La mesure de la masse moléculaire directe par électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dénaturant a permis de caractériser le récepteur purifié transformé après coloration spécifique des protéines. Celui-ci apparaît en une bande homogène de masse 90-94 Kda. Le marquage covalent du récepteur au 21-mésylate de dexaméthasone tritié permet une appréciation directe de la masse moléculaire du récepteur sans nécessiter de purification.

Dans le cas du récepteur non transformé, la première approche déjà utilisée au laboratoire (IDZIOREK *et al.*, 1985), permet de révéler l'existence d'une bande unique à 90 Kda. Compte-tenu de la masse environ trois fois plus élevée du récepteur natif non transformé, il était aisé de supposer que le récepteur non transformé est constitué de différentes sous-unités (probablement 3) de masse moléculaire identique (cf paragraphe II). Cependant, aucune caractérisation directe de la masse moléculaire du récepteur non transformé n'avait pu être rapportée jusqu'ici. Nous avons donc tenté d'effectuer cette mesure par pontage intermoléculaire du récepteur non transformé suivi d'une électrophorèse en gel d'acrylamide de grande porosité. Pour faciliter la détection du récepteur, la préparation analysée (extrait sulfate de protamine) est préalablement incubée en présence de 21-mésylate de dexaméthasone tritié permettant un marquage covalent du récepteur, détectable en milieu dénaturant comme au cours de l'électrophorèse en présence de SDS. Après de multiples essais

infructueux utilisant les bis-imidates comme agent de réticulation, nous avons choisi un autre réactif, le glutaraldéhyde (Fig. 16). Le rendement de réticulation obtenu avec le diméthyl-subérimidate (toujours inférieur à 15 %) ne permettait pas une visualisation précise du récepteur ayant réagi. Le glutaraldéhyde a été utilisé à une concentration de 0,4 % pendant 1 heure, selon un protocole déjà appliqué au récepteur de la progestérone (RENOIR *et al.*, 1984), et qui permet d'obtenir un rendement de réticulation proche de 100 %. Le système gradient employé (4-8 % d'acrylamide) permet d'obtenir une bonne linéarité de calibration des masses moléculaires jusqu'à des valeurs de 350 Kda environ (Fig. 17). Les résultats obtenus montrent que le récepteur non transformé, stabilisé par le molybdate et réticulé au glutaraldéhyde migre avec une masse moléculaire d'environ 240 à 270 Kda (Fig. 17). Dans l'expérience rapportée ici, le récepteur témoin non réticulé a une masse apparente de 85 Kda, ce qui donne une masse trois fois plus élevée pour le récepteur non transformé.

Puisque les deux formes de taille 8,3 nm et 7,1 nm semblent caractérisées par une masse moléculaire calculée différente (320 Kda contre 280 Kda, il nous a semblé intéressant de mesurer directement leurs masses moléculaires respectives après réticulation au glutaraldéhyde et analyse électrophorétique. Après séparation des formes 8,3 nm et 7,1 nm par chromatographie d'exclusion de taille sur colonne TSK G4000 SW, les fractions éluées sont soumises à une réticulation au glutaraldéhyde avant d'être concentrées et analysées en électrophorèse. Le résultat obtenu ne peut mettre en évidence de

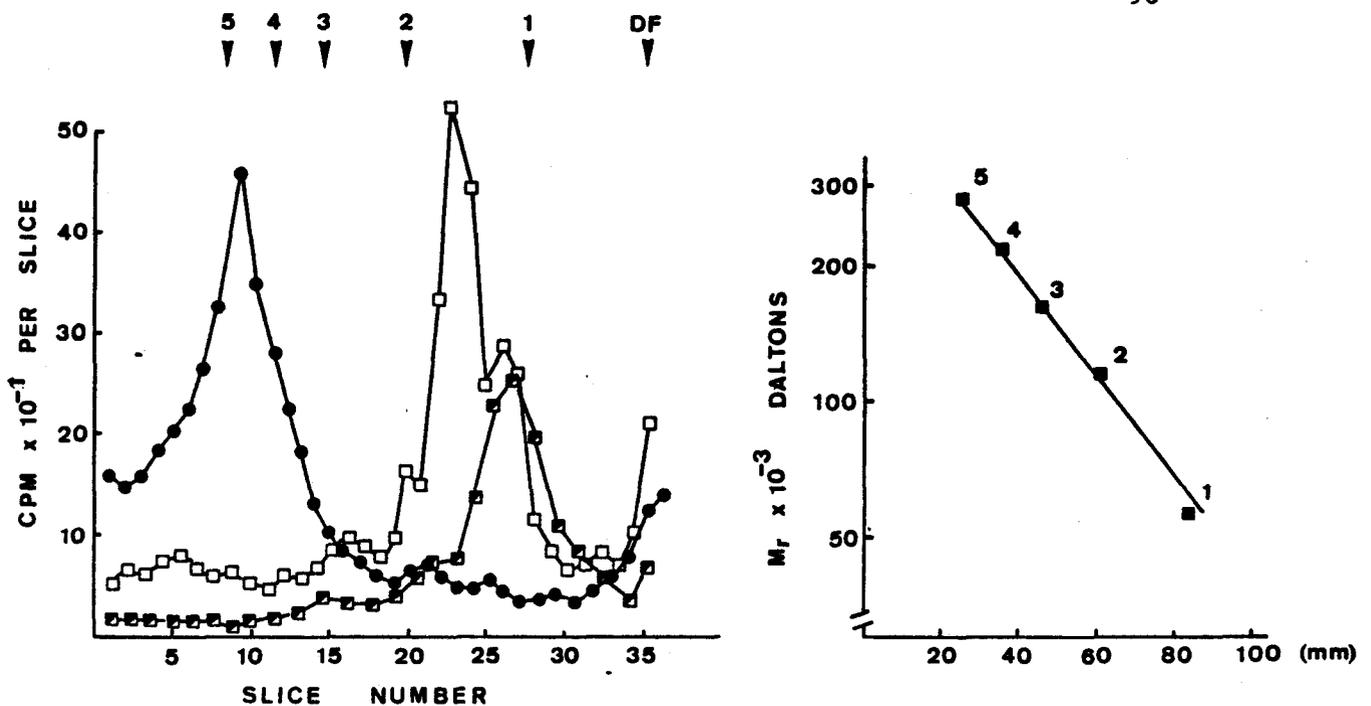


Figure 17. Electrophorèse en gel de polyacrylamide du récepteur non transformé, après pontage au glutaraldéhyde. Un échantillon de 1 ml d'extrait sulfate de protamine est incubé avec le 21-mésylate de dexaméthasone tritié avant d'être concentré 3 fois sur une membrane Amicon YM10. L'incubat est alors fractionné sur une colonne TSK G4000 SW. Les fractions éluées correspondant au complexe hormone-récepteur sont traitées avec 0,4 % de glutaraldéhyde pendant 1 heure à 0°C. Des aliquotes de 0,1 ml sont alors analysées en électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (3-8 % en acrylamide) (●). Un aliquot non incubé en présence de glutaraldéhyde est analysé (□), de même qu'un échantillon préalablement incubé en présence de 21-mésylate de dexaméthasone tritié et d'un excès de 500 fois en dexaméthasone non radioactive (■). Les flèches numérotées correspondent à la position des témoins de masse moléculaire visualisés après coloration au bleu de Coomassie :Penta (5), tétra (4), tri (3), bi (2) et monomère (1) du calibrant BDH de MM 280, 224, 168, 112 et 56 Kda respectivement. Après migration, le gel est découpé en tranches de 2 mm, dont la radioactivité est mesurée. La calibration du gel est indiquée sur le diagramme de droite.

différence de masse moléculaire apparente entre ces deux formes (Fig. 18). Deux explications peuvent être proposées :

-(i) La résolution de l'électrophorèse est médiocre. Les bandes de migration apparaissent en effet larges et très diffuses dans un gel d'acrylamide d'une telle porosité. Dans ce cas, une différence de 40 Kda n'est pas facile à visualiser.

-(ii) Il pourrait également s'agir d'une modification conformationnelle d'un même complexe moléculaire, expliquant ainsi des propriétés hydrodynamiques différentes pour une masse moléculaire réelle identique.

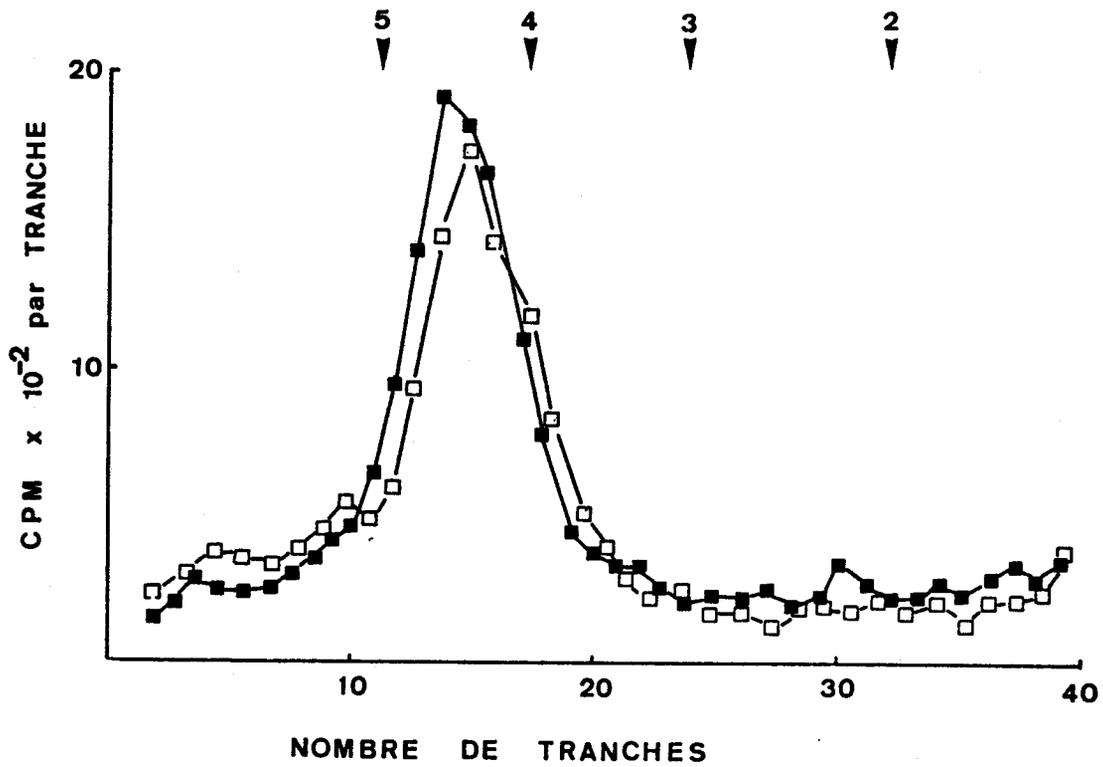


Figure 18. Electrophorèse en gel de polyacrylamide du récepteur non transformé après pontage au glutaraldéhyde (Analyse des formes 8,3 nm et 7,1 nm). Le protocole expérimental est identique à celui décrit dans la figure 17. Cependant, après fractionnement sur colonne TSK G4000 SW, les formes 8,3 nm (□) et 7,1 nm (■) du récepteur sont analysées séparément en électrophorèse, après pontage au glutaraldéhyde.

3 - Caractéristiques ioniques du récepteur non transformé
(formes 8,3 nm et 7,1 nm).

Les caractéristiques de charge électrique du récepteur non transformé ont déjà été abordées au laboratoire (IDZIOREK *et al.*, 1985; SABLONNIERE *et al.*, 1986 ; DANZE *et al.*, 1987). Nous avons voulu les comparer dans les formes 8,3 nm et 7,1 nm du récepteur non transformé (Fig. 19). Un échantillon de récepteur partiellement purifié par précipitation au sulfate de protamine et préalablement incubé avec le 21-mésylate de dexaméthasone tritié est soumis à une chromatographie d'échange d'ions sur colonne Ultropac DEAE-545 en mode haute performance. Les fractions éluées correspondant au récepteur sont ensuite concentrées avant d'être analysées en chromatographie d'exclusion de taille sur colonne TSK G4000 SW. Les résultats obtenus démontrent que la partie ascendante (30e fraction), moins acide, du pic obtenu en chromatographie d'échange d'ions est représentée surtout par la forme 8,3 nm alors que la partie descendante (34e fraction) est représentée essentiellement par la forme de taille 7,1 nm.

Ce résultat signifierait que la forme 8,3 nm possède moins de charges négatives exposées (ou plus de charges positives ?) que la forme 7.1 nm ,mais ne nous renseigne en rien sur la composition moléculaire précise de ces formes. Quoiqu'il en soit, ces deux formes moléculaires possèdent globalement les caractéristiques du récepteur non transformé puisqu'elles sont éluées par 0,20-0,25 M KCl.

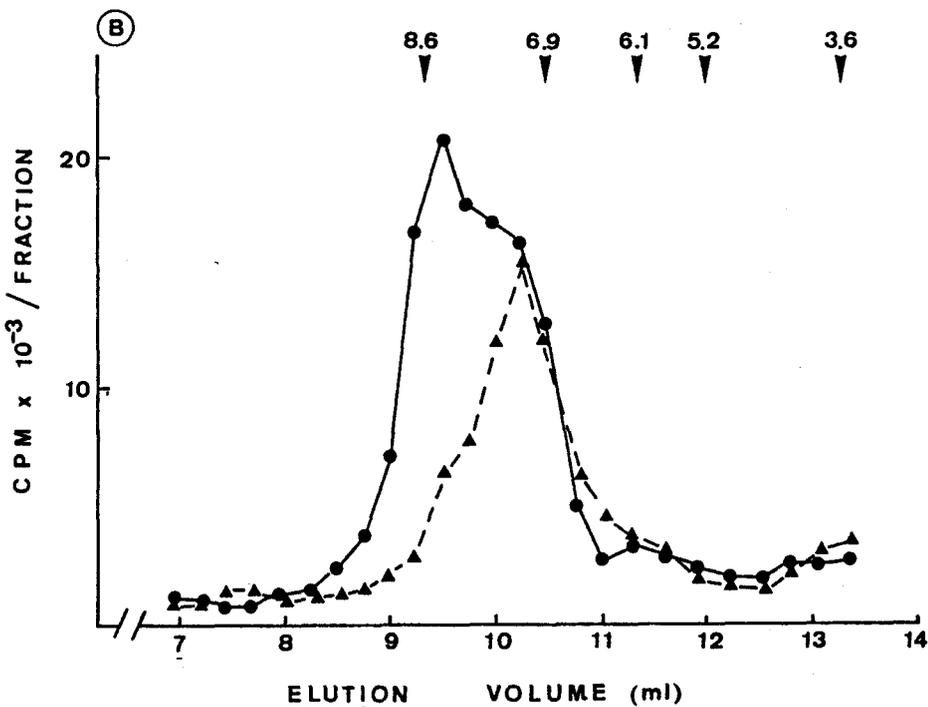
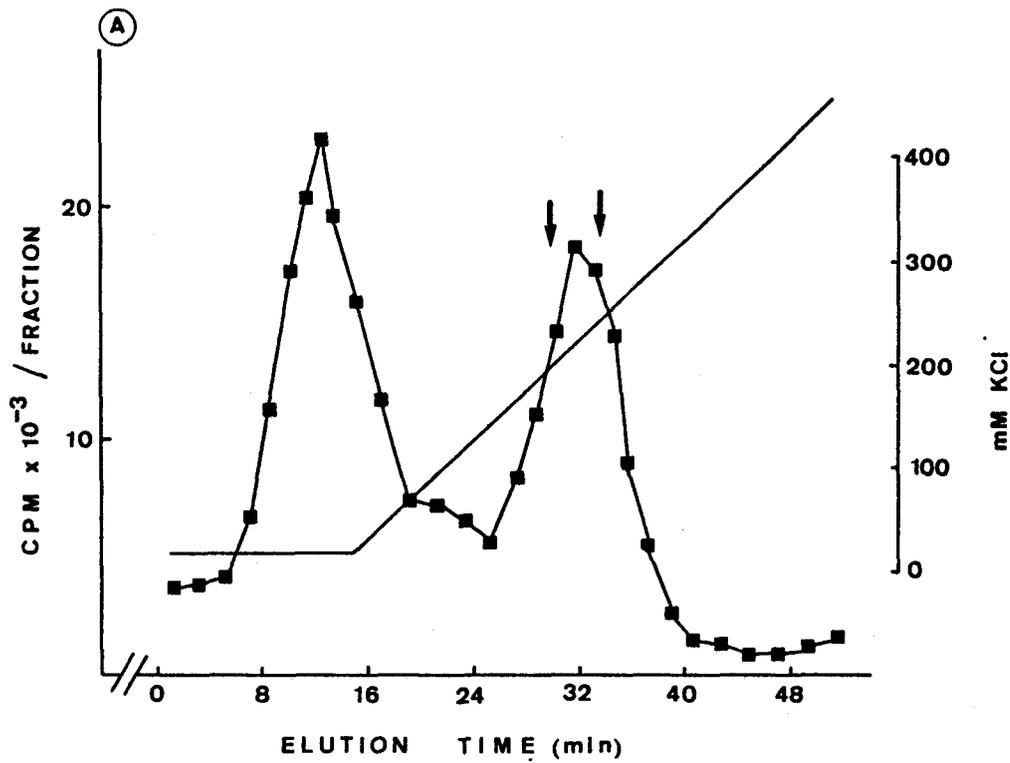


Figure 19. Propriétés ioniques des deux formes 8,3 nm et 7,1 nm du récepteur non transformé.
 Sur le diagramme A est représenté le profil d'éluion obtenu après injection de 3 ml d'extrait sulfate de protamine incubé avec le 21-mésylate de dexaméthasone tritié sur une colonne TSK-DEAE préparative. L'éluion est réalisée à un débit de 3,5 ml/min avec un gradient en KCl (—). Des fractions de 1 minute sont collectées et mesurées en radioactivité. Les fractions 30 et 34 (symbolisées par les flèches) sont ensuite récupérées et analysées séparément en chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne TSKG 4000 SW (B). On a représenté respectivement le profil obtenu par analyse de la fraction élue à la 30e minute (●) et de la fraction élue à la 34e minute (▲).

4 - Propriétés hydrophobes

La chromatographie d'interaction hydrophobe sur une colonne TSK 5PW a été utilisée ici pour préciser l'hydrophobicité relative du récepteur sous ses formes transformées et non transformées. Dans ce système chromatographique, un support (silice poreuse) est greffé avec des groupements hydrophobes (groupements phényles). L'adsorption des protéines sera donc d'autant plus aisée que leur hydrophobicité sera plus élevée. Pour faciliter cette adsorption, on réalise un gradient d'élution avec un sel dissociant tel le sulfate d'ammonium, en concentration décroissante (GOODING *et al.*, 1984 ; MELANDER *et al.*, 1984). L'adsorption des protéines hydrophiles sera facilitée par une concentration initiale élevée en sulfate d'ammonium. Il faut cependant choisir une concentration inférieure à la concentration précipitante. Au fur et à mesure de la décroissance de la force ionique, la molécule protéique se solvate et les interactions hydrophobes avec le support diminuent, permettant d'expliquer le phénomène d'élution.

Nous avons analysé le comportement respectif des récepteurs non transformé et transformé par élévation de la température à 25°C pendant 30 minutes (Fig. 20). On a d'abord observé que les complexes hormone-récepteur ne peuvent être visualisés par la radioactivité associée au ligand. Ceci s'explique par une dissociation du complexe hormone-récepteur en présence d'une concentration élevée en sulfate d'ammonium. La caractérisation des complexes hormone-récepteur a donc été effectuée après marquage covalent du récepteur par le 21-mésylate

de dexaméthasone tritié. D'autre part, le récepteur a été identifié par * "DOT-BLOT" en utilisant l'anticorps monoclonal anti-récepteur * GR49 et nous avons également recherché la présence de la protéine HSP 90 par l'utilisation de l'anticorps monoclonal * AC88 (Fig. 21).

Les résultats obtenus indiquent que le récepteur possède un comportement hydrophobe beaucoup plus marqué que la protéine HSP 90. Même dans le cas du récepteur non transformé, on ne peut noter de coexistence dans les mêmes fractions du récepteur lui-même et de la protéine HSP 90, ce qui suggère fortement que le complexe oligomérique est dissocié pendant l'élution. Pour éviter ce phénomène, un échantillon d'extrait sulfate de protamine contenant le récepteur préalablement marqué au 21-mésylate de dexaméthasone tritié a été réticulé au glutaraldéhyde avant d'être analysé sur la colonne TSK 5PW (Fig. 20B). Or, à notre grand étonnement la radioactivité éluée est observée à une position correspondante au récepteur transformé ! Ce résultat peut s'expliquer de deux façons : (i) - Une région hydrophobe située dans la région C-terminale du récepteur (proche du site de liaison au stéroïde) interagirait avec les groupes phényles de la colonne, et ne serait pas affecté par l'interaction entre le récepteur

* DOT-BLOT ou littéralement : transfert en puits. Technique de transfert de protéines sur nitrocellulose par l'intermédiaire de puits multiples, suivie d'une révélation de la protéine étudiée par une réaction immunologique.

* GR 49 : Anticorps monoclonal préparé contre la forme transformée partiellement purifiée du récepteur des glucocorticoïdes du rat (WESTPHAL et al., 1984).

* AC 88 : Anticorps monoclonal préparé contre la protéine 88 Kda d'*Achlya ambisexualis*, et réagissant contre la HSP 90 de la plupart des mammifères (RIEHL et al., 1985).

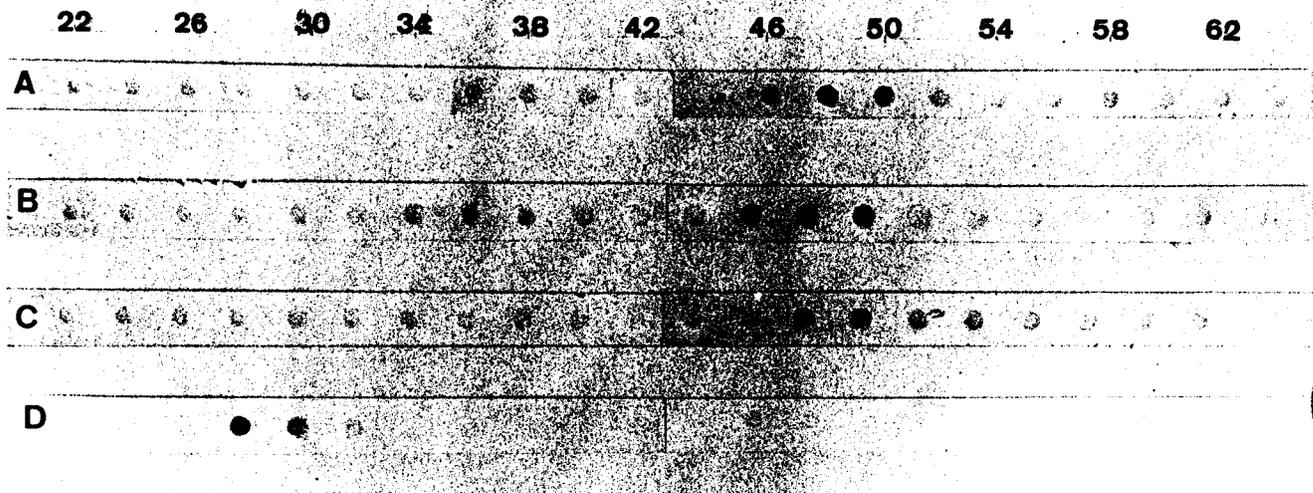


Figure 21. Caractérisation du récepteur et de la protéine HSP 90 après élution de la colonne d'interaction hydrophobe TSK 5 PW. Le récepteur est caractérisé par la technique de DOT-BLOT à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-récepteur GR 49 (lignes A ,B et C) ou avec l'anticorps monoclonal anti-HSP AC 88 (ligne D).
Ligne A : Echantillon de récepteur (extrait sulfate de protamine incubé avec le 21-mésylate de dexaméthasone tritié).
Ligne B : Echantillon cytosolique préparé en présence de molybdate de sodium incubé avec l'acétonide de triamcinolone tritié.
Ligne C : Echantillon cytosolique préparé en l'absence de molybdate de sodium et soumis à une élévation thermique (30 min à 25°C).
Ligne D : Echantillon identique à celui analysé sur la ligne A. Les numéros correspondent aux fractions d'élution de la colonne d'interaction hydrophobe.

et la HSP 90. (ii)- On ne peut exclure cependant l'effet d'une modification conformationnelle subie par le récepteur sous l'influence du sulfate d'ammonium, exposant ainsi une région hydrophobe du récepteur normalement enfouie dans la molécule native, que celui-ci soit ou non réticulé avec la protéine HSP 90. Ce résultat va à l'encontre des observations de ANDREASEN (1981, 1983) qui ont démontré, en utilisant un système de partage entre deux phases aqueuses que le récepteur transformé pouvait être caractérisé par un comportement plus hydrophobe que le récepteur non transformé.

II - COMPOSITION MOLECULAIRE DU RECEPTEUR NON TRANSFORME

1- Analyse du récepteur purifié par chromatographie d'affinité

Le récepteur non transformé stabilisé par le molybdate a été purifié environ 10 000 fois en rajoutant à la chromatographie d'affinité une étape finale de purification par chromatographie d'exclusion de taille sur TSK G4000 SW (Fig. 13B). Le récepteur obtenu, caractérisé par un pic homogène de $R_s = 7,1$ nm a ensuite été analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide, et révélé par la coloration de MARSHALL (1984) (Fig. 22). La présence d'une bande unique de masse moléculaire 90 Kda suggère donc fortement que le récepteur non transformé est constitué de plusieurs sous-unités de masse moléculaire sensiblement identiques. La comparaison des électrophorèses obtenues avant et après l'étape finale de chromatographie d'exclusion de taille permet de souligner l'intérêt de cette étape pour éliminer des contaminants de faible masse moléculaire (IDZIOREK, 1985).

La coloration de MARSHALL n'est cependant pas exempte de critiques. En effet, l'étape de décoloration, délicate, permet d'éliminer rapidement des bandes mineures visualisées lors de la coloration. Pour pallier cet inconvénient, nous avons marqué un éluat de chromatographie d'affinité avec un réactif des fonctions aminées libres présentes dans les peptides et les protéines : le N- succinimidyl-propionate ou réactif de Bolton-Hunter. Après marquage et élimination de l'excès de réactif libre par filtration sur gel,

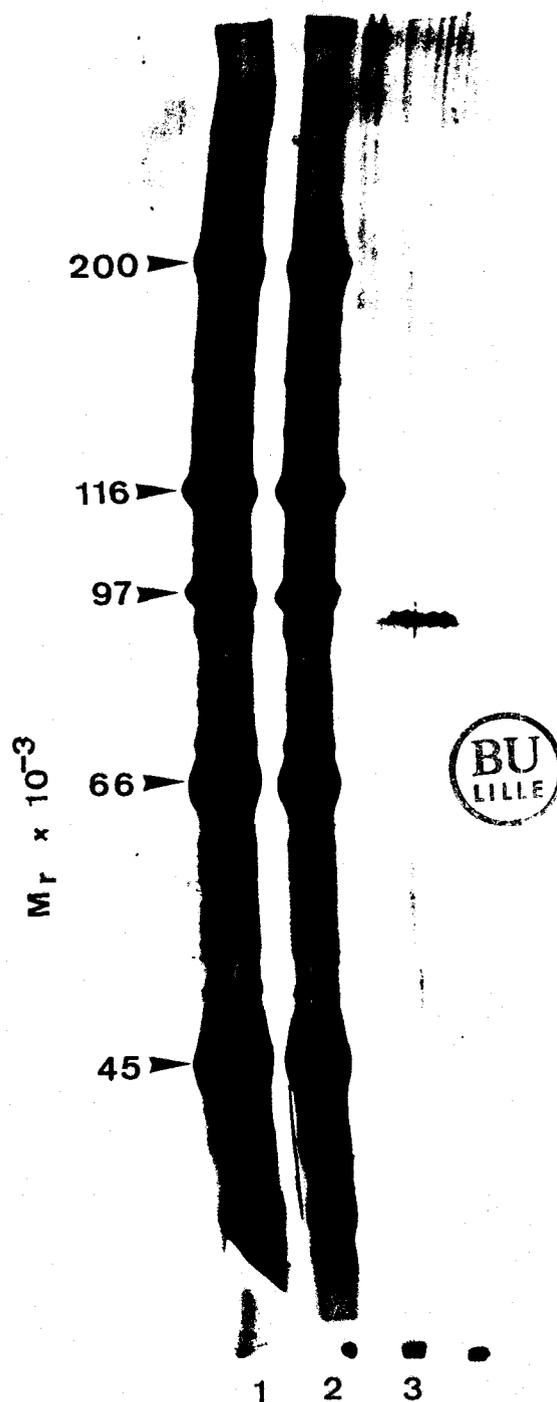


Figure 22. Electrophorèse en gel de polyacrylamide, du récepteur purifié non transformé.
Un éluat (0,05 ml) contenant le récepteur non transformé purifié par chromatographie d'affinité et par chromatographie d'exclusion de taille est analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide (gradient 5-15 % en acrylamide), piste 3. Les flèches indiquent la masse moléculaire des protéines témoins (pistes 1 et 2). La révélation des protéines utilise la méthode au nitrate d'argent selon MARSHALL (1984).

l'échantillon est soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide suivie d'un découpage du gel en tranches dont la radioactivité sera mesurée (Fig. 23A). Le résultat obtenu donne une bande majeure de 90 Kda et l'analyse de gels provenant de quatre expériences successives a permis de montrer que plus de 88 % de la radioactivité est localisée dans cette bande. Compte tenu du faible rendement de marquage obtenu dans ces expériences, nous n'avons pas pu visualiser le récepteur en autoradiographie. Nous avons donc marqué le récepteur par l'Iode 125 en présence de chloramine T selon le protocole de BOLTON *et al.*

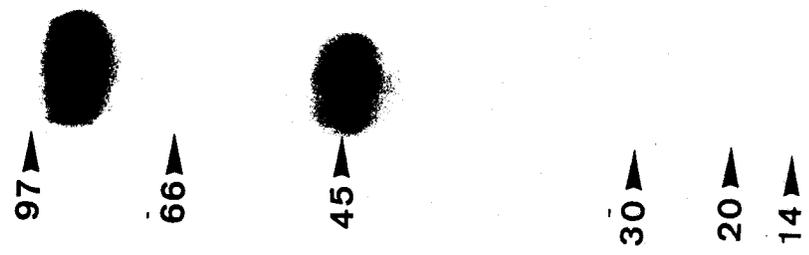
(1977). L'autoradiographie de ce matériel, après électrophorèse (Fig. 23B) permet de visualiser une bande majeure à 90 Kda. La présence d'une bande supplémentaire à 43 Kda est due à la protéine "ballast" (ovalbumine) utilisée lors du marquage, qui n'a pu être totalement éliminée lors de l'étape de gel-filtration qui a suivi le marquage.

L'ensemble de ces résultats témoignent sans ambiguïté de l'homogénéité de nos préparations de récepteur non transformé purifié. D'autre part, ils soulignent la composition oligomérique du récepteur non transformé.

2 - Identification du récepteur par marquage d'affinité.

Au cours du protocole de purification du récepteur par chromatographie d'affinité, le récepteur spécifiquement adsorbé sur le support peut être élué par un stéroïde capable de former une liaison covalente avec le site de liaison du récepteur : le 21-mésylate de dexaméthasone. Le complexe hormone-récepteur ainsi obtenu peut être

(B)



(A)

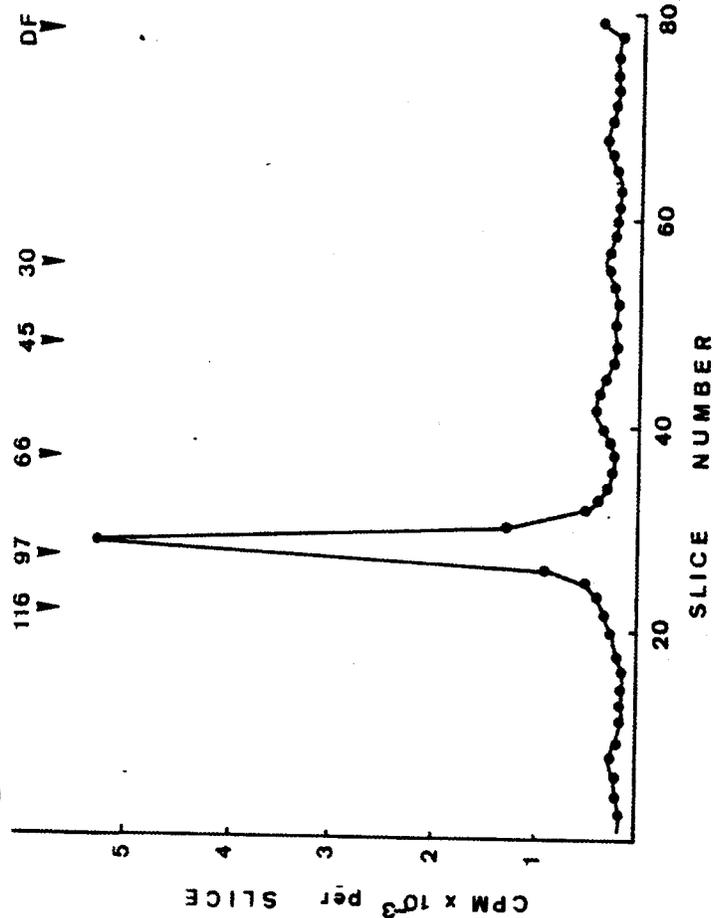


Figure 23. A) Electrophorèse en gel de polyacrylamide du récepteur purifié par chromatographie d'affinité et marqué au réactif de BOLTON et HUNTER.

Un échantillon d'éluat de chromatographie d'affinité est marqué de façon covalente avec le N-succinimidyl propionate tritié et soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide (gradient 5-15 % en acrylamide). Le couloir de migration est alors découpé en tranches de 2 mm, dont la radioactivité sera mesurée. Les flèches indiquent la position des témoins de masse moléculaire.

B) Autoradiographie d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide d'un échantillon de récepteur purifié marqué à l'¹²⁵Iode. La position des témoins de masse moléculaire est précisée par les flèches (en kilodaltons).

analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide suivie d'un découpage en tranches et d'une mesure de radioactivité (Fig. 24). On observe ainsi la présence d'une bande majeure à 85 Kda, témoin de la présence du récepteur. La même analyse électrophorétique a été également réalisée sur les formes de taille 8,3 nm et 7,1 nm d'échantillons de récepteur natif préalablement marqué au 21-mésylate de dexaméthasone tritié (Fig. 25). On remarque dans les deux formes 8,3 nm et 7,1 nm du récepteur, la présence de la protéine 85-90 Kda intacte liant spécifiquement le stéroïde. Ces résultats permettent donc de conclure qu'une protéolyse limitée du récepteur ne peut expliquer l'existence d'une hétérogénéité de taille caractérisée par les deux formes 8,3 et 7,1 nm. La présence de pics mineurs saturables, de masse 66 Kda et 45 Kda pourrait correspondre à des protéines non spécifiques capables de lier le mésylate de dexaméthasone comme cela a déjà été décrit (EISEN *et al.*, 1981).

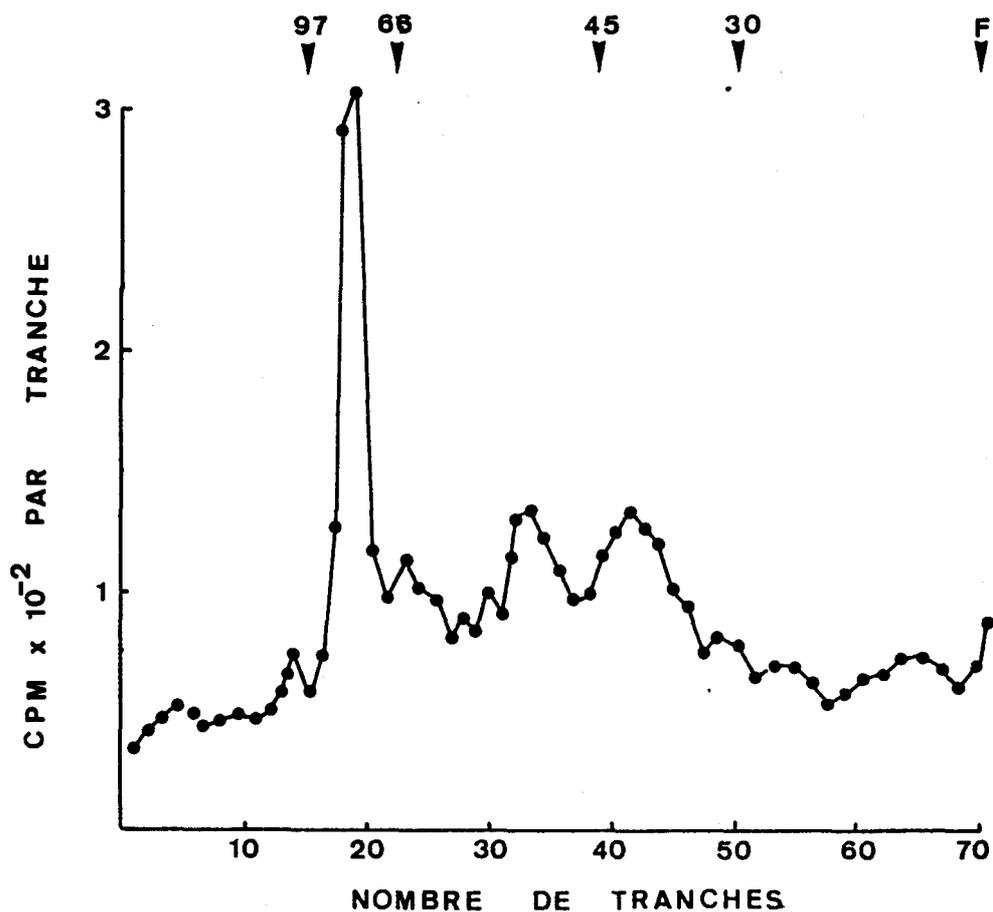


Figure 24. Analyse électrophorétique d'un échantillon de récepteur purifié marqué au 21-mésylate de dexaméthasone tritié. Le récepteur spécifiquement adsorbé sur le support utilisé en chromatographie d'affinité est élué avec le 21-mésylate de dexaméthasone tritié. L'éluat obtenu est alors analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide après précipitation des protéines à l'acide trichloroacétique. Après migration, le gel est découpé en tranches de 2 mm qui sont alors soumises à une mesure de radioactivité. Les flèches indiquent la migration des témoins de masse moléculaire.

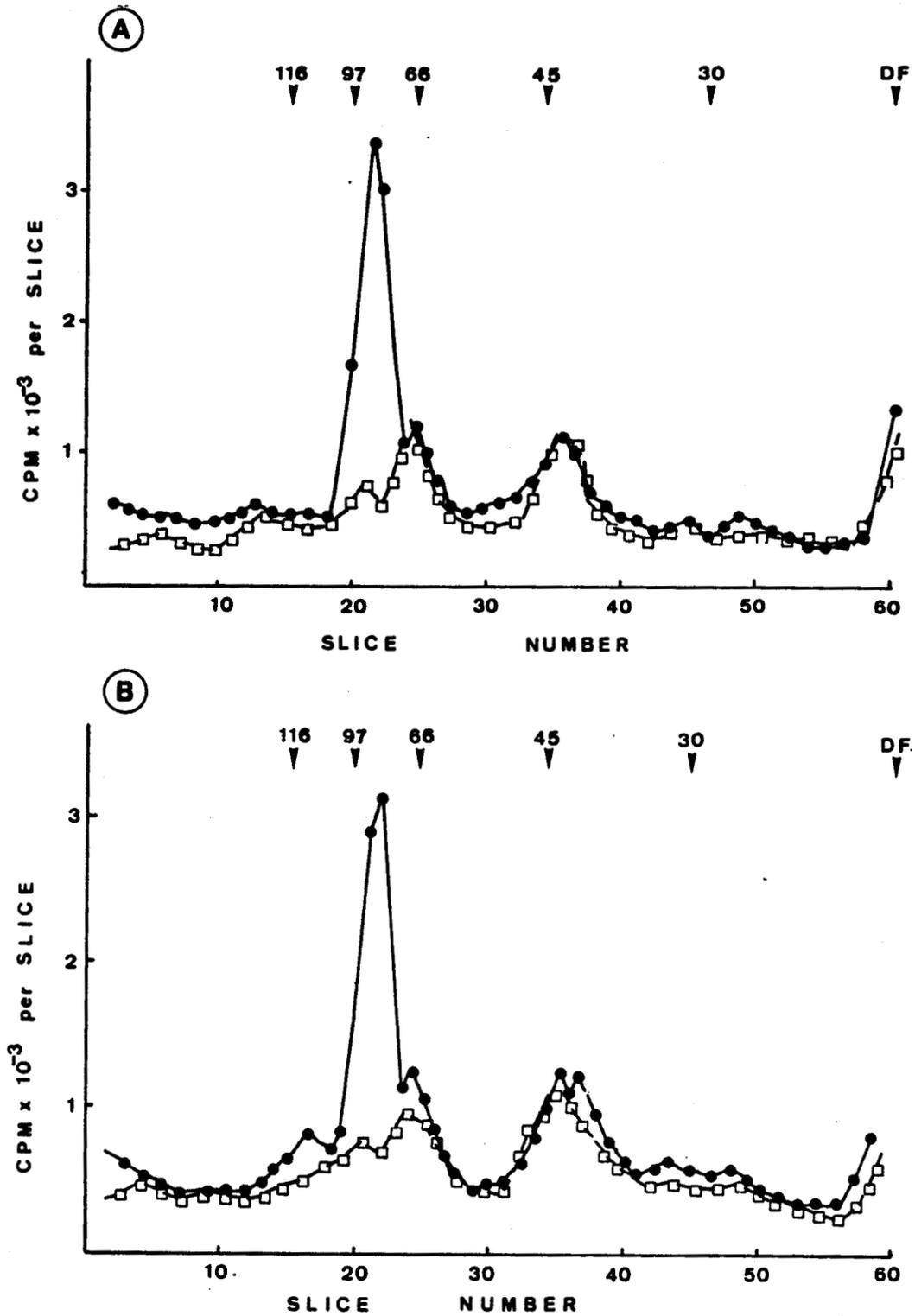


Figure 25. Electrophorèse en gel de polyacrylamide de deux formes 8,3 nm et 7,1 nm du récepteur séparées par chromatographie d'exclusion de taille. Des échantillons de 1 ml d'extrait sulfate de protamine sont incubés avec 50×10^{-9} M de 21-mésylate de dexaméthasone tritié en présence (□) ou en l'absence (●) de 10×10^{-6} M de dexaméthasone non radioactive. Les incubats sont alors concentrés quatre fois avant d'être analysés en chromatographie d'exclusion de taille. Les fractions éluées correspondant à la forme 8,3 nm (A) et 7,1 nm (B) du récepteur sont alors analysées en électrophorèse. Le gel est découpé après migration, en tranches de 2 mm qui sont soumises à une mesure de radioactivité. Les flèches indiquent la position des témoins de masse moléculaire.

3 - Caractérisation immunologique

a) Analyse par * "Western-blot"

Puisqu'une protéolyse limitée de la sous-unité liant le stéroïde ne peut être responsable de l'hétérogénéité de taille du récepteur non transformé, une analyse par "Western-blot" a été réalisée afin de déterminer si ces deux formes du récepteur contiennent la protéine associée HSP 90 (Fig. 26 A). Les résultats obtenus confirment nettement cette hypothèse. Par comparaison entre le récepteur non transformé non purifié (pistes 4 et 7) et purifié (pistes 2 et 5), aucune différence ne peut être remarquée. Puisqu'il apparaît qu'une bande majeure de 90 Kda est révélée par l'anticorps AC88 à la fois dans la forme 7,1 nm et 8,3 nm, un phénomène de protéolyse limitée ne semble pas être responsable de l'hétérogénéité de taille du récepteur natif non transformé. Toutefois, ce résultat doit être assorti d'une remarque : dans un certain nombre d'expériences la révélation par AC88 a permis de noter la présence d'une deuxième bande à ≈ 50 Kda (Fig. 26B). Cette bande n'apparaît que lorsque la concentration en récepteur est élevée. D'autre part, elle n'est jamais retrouvée par analyse du récepteur purifié. Enfin, elle semble retrouvée de façon prédominante dans la zone 6 - 7 nm d'un

* Technique de révélation immunologique d'une protéine spécifique après transfert d'un gel d'acrylamide sur une feuille de nitrocellulose.

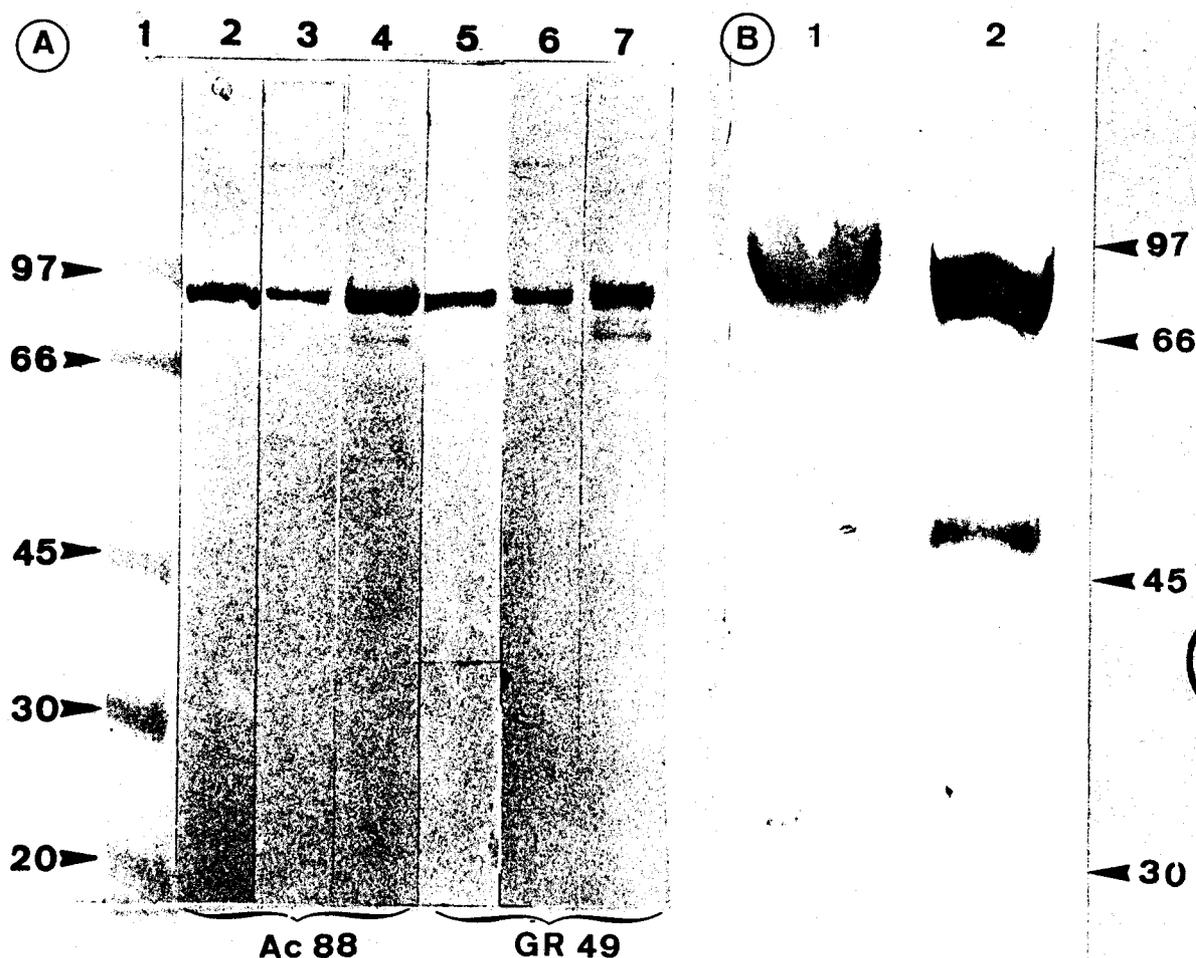


Figure 26. A) Révélation du récepteur et de la protéine HSP 90 dans les deux formes du récepteur non transformé par la technique de Western-blot. 0,2 ml d'échantillons cytosoliques incubés avec l'acétonide de triamcinolone tritié sont fractionnés sur une colonne TSK G4000 SW. Les fractions éluées correspondant aux formes 8,3 nm (pistes 4 et 7) et 7,1 nm (pistes 3 et 6) sont analysées en électrophorèse suivie de transfert sur nitrocellulose et d'une révélation immunologique. L'anticorps monoclonal AC88 est utilisé pour repérer la présence de la protéine HSP 90 et l'anticorps GR49 pour repérer la présence de la sous-unité liant le stéroïde. Les pistes 2 et 5 correspondent au récepteur non transformé, purifié par chromatographie d'affinité et analysé dans les mêmes conditions. La piste 1 indique la migration des témoins de masse moléculaire en Kda, révélés par le rouge ponceau.

B) Analyse par Western-blot d'un échantillon d'extrait sulfate de protamine (piste 2) ou d'un éluat de chromatographie d'affinité (piste 1) fractionnés sur TSK G4000 SW. Après élution de la colonne, le pic correspondant au récepteur ($R_s = 7-8$ nm) est concentré avant d'être analysé par Western-blot (anticorps AC88).

profil d'élution de chromatographie d'exclusion de taille. Nous pensons que ce composant correspondrait à une forme de protéolyse du dimère d' HSP libre présent en très large excès dans les échantillons cytosoliques, ou à la présence d'une réaction croisée d'une autre protéine avec AC88.

b) Interaction des anticorps avec le récepteur natif.

Pour mieux préciser l'organisation structurale respective des formes de taille 8,3 et 7,1 nm, les caractéristiques hydrodynamiques des complexes récepteur-anticorps GR49 et récepteur-anticorps AC88 ont été étudiées, en association avec P. LEFEBVRE au laboratoire. Pour cela, deux échantillons de cytosol caractérisés par des proportions différentes des formes 8,3 nm et 7,1 nm ont été choisis (Fig. 27). La forme 7,1 nm analysée après incubation avec un excès d'anticorps GR49 anti-récepteur donne un complexe de taille 9,2 nm (Fig. 27A). Un profil identique est d'ailleurs obtenu lorsqu'une incubation parallèle est effectuée en présence d'un excès d'anticorps AC88 (Fig. 27B). En fonction des résultats d'OKRET *et al.* (1985), une différence d'environ 2 à 2,5 nm entre le complexe anticorps-récepteur (9,2 nm) et le récepteur seul (7,1 nm) est compatible avec la liaison d'une seule molécule d'IgG. Par contre, les résultats obtenus avec la forme 8,3 nm sont différents (Fig. 27 C et D). Le complexe formé entre la forme 8,3 nm et l'anticorps AC 88 est élué avec un rayon de Stokes de 10,8 nm environ, alors que le complexe formé entre la forme 8,3 nm du récepteur et l'anticorps GR 49 donne un rayon de Stokes plus faible. Ces observations permettent de suggérer que l'épitope reconnu par l'anticorps anti-récepteur dans la forme 7,1 nm n'est plus accessible dans la forme 8,3 nm.

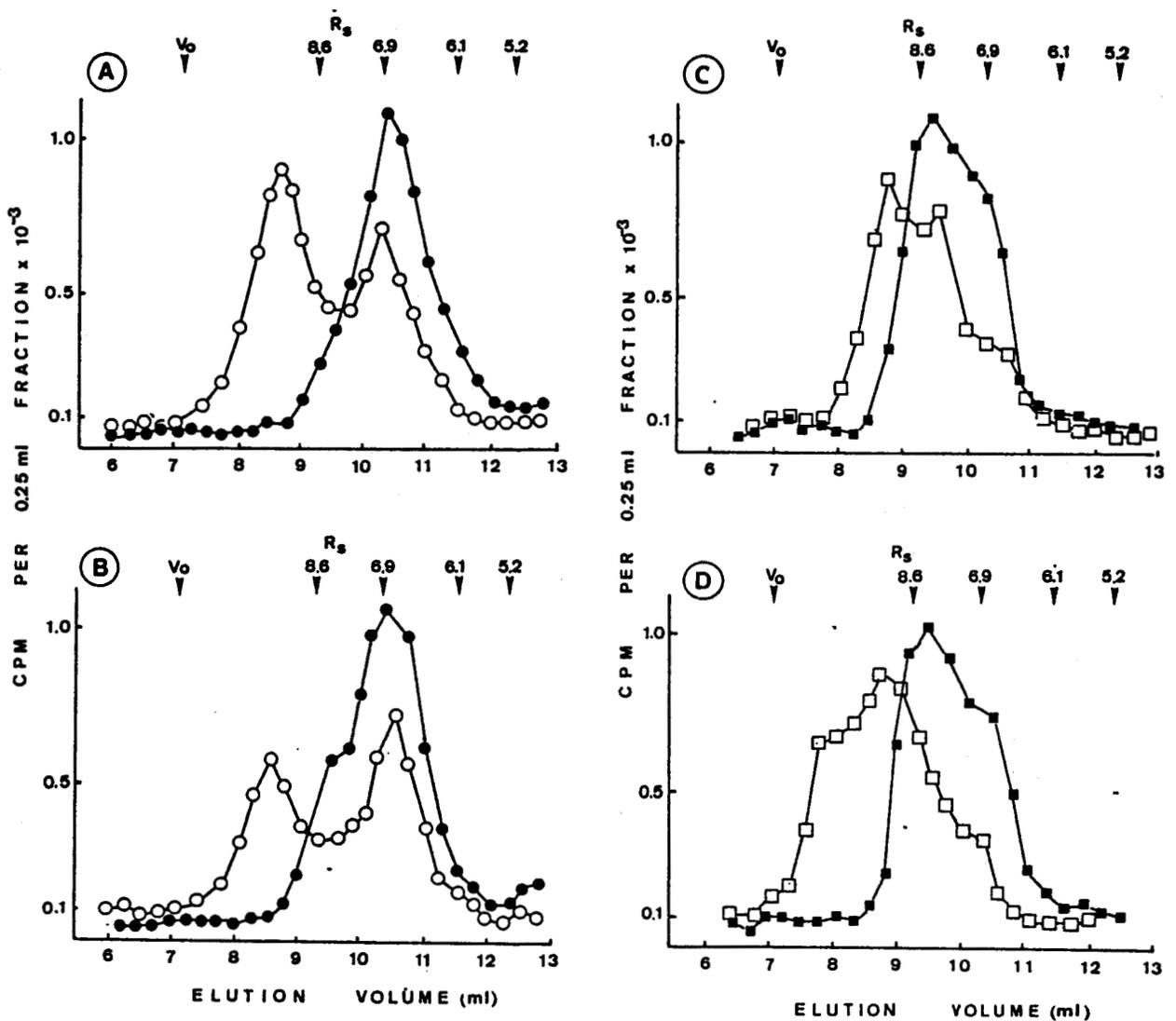


Figure 27. Chromatographie d'exclusion de taille du récepteur non transformé en l'absence et en présence d'anticorps anti-récepteur et anti-HSP 90. Des échantillons cytosoliques (0.2 ml) préparés à partir de thymus de rat, sont incubés pendant 2h à 0°C avec l'acétone de triamcinolone tritié. Les diagrammes A et B correspondent à un échantillon cytosolique contenant la forme 7.1 nm majeure du récepteur (symboles pleins); les diagrammes C et D correspondent à la forme 8.3 nm majeure du récepteur (symboles pleins). Les échantillons cytosoliques sont incubés pendant 16h à 0°C avec 20 µl d'un liquide d'ascite contenant l'anticorps GR 49 (symboles ouverts des diagrammes A et C), ou avec 40 µl d'un liquide d'ascite contenant l'anticorps AC 88 (symboles ouverts des diagrammes B et D). L'analyse chromatographique est effectuée sur une colonne TSK G4000 SW (7.5 x 300 mm) à un débit de 0.5 ml/mn.

4 - Mesure du nombre de sites de liaison à l'hormone dans le récepteur non transformé.

Si le nombre de sites de liaison, c'est-à-dire le nombre de molécules de récepteur constituant la forme non transformée ne fait plus de doute à l'heure actuelle, ce problème a soulevé de nombreuses hypothèses il y a quelques années. Ainsi, avant l'utilisation des anticorps, les études hydrodynamiques des différentes formes du récepteur avaient permis de supposer une structure homopolymérique du récepteur non transformé (VEDECKIS, 1983b ; RAAKA et SAMUELS, 1983). En 1984, afin de préciser si le récepteur non transformé pouvait contenir un ou plusieurs sites de liaison, nous avons synthétisé des stéroïdes bifonctionnels, qui, si ils étaient capables de se lier à deux sites de liaison en même temps pourraient permettre d'obtenir une polymérisation du récepteur (Fig. 28). Pour réaliser ces expériences, il fallait disposer de stéroïdes bifonctionnels ayant une bonne affinité pour le récepteur. Divers dérivés ont ainsi été préparés au laboratoire, et en particulier des bis-carboxamides de la dexaméthasone où les fonctions carboxamides en position 20 des deux stéroïdes sont reliées par l'intermédiaire d'un bras espaceur de longueur et de polarité variable (FORMSTECHER, 1986). Pour pouvoir interpréter ces expérimentations, il faut que la concentration en stéroïde bifonctionnel n'excède pas la concentration en sites de liaison (c'est-à-dire en récepteur) de la préparation. D'autre part, il faut que la concentration en stéroïde bifonctionnel soit suffisante

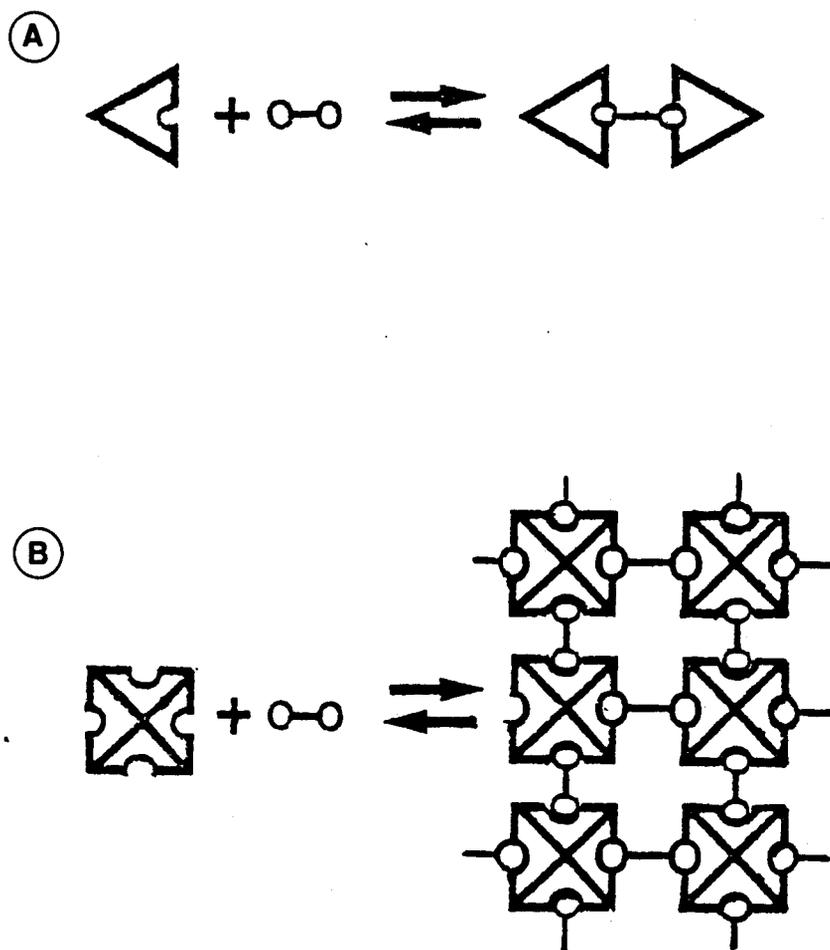


Figure 28. Principe de l'utilisation des stéroïdes bifonctionnels pour la détermination de l'existence d'un seul (A), ou de plusieurs (B) sites de liaison au stéroïde sur le récepteur.

(supérieure au K_i) pour permettre une saturation suffisante des sites de liaison. Les résultats obtenus avec l'un de ces composés sont précisés dans la figure 29. Le K_i mesuré est de $0,075 \cdot 10^{-6}$ M. La taille des complexes obtenus a été mesurée par chromatographie d'exclusion sur une colonne TSK G4000 SW. On remarque un pic de taille 7 nm de temps de rétention correspondant à celui du récepteur témoin, incubé en présence de 10^{-7} M de dexaméthasone tritiée. Par contre en présence du bis-carboxamide utilisé, l'élution du récepteur donne deux pics, dont l'un est situé à l'exclusion. Le rapport de ce pic exclu par rapport au récepteur de taille 7 nm ne change pas lorsque la concentration en bis-17 β carboxamide varie de 0,5 à 5 par rapport à la concentration en sites de liaison. Ces résultats peuvent s'interpréter par la formation d'agrégats de récepteur, non spécifiques, dûs vraisemblablement à l'existence d'interactions hydrophobes introduites par le bis-carboxamide utilisé. Quoiqu'il en soit, ces résultats ne peuvent mettre en évidence l'existence d'une polymérisation spécifique du récepteur induite par le bis-carboxamide. D'autre part, la stoechiométrie nécessaire pour une interprétation correcte de ces résultats n'est pas respectée en raison de la constante d'affinité trop élevée de ces molécules par rapport à la concentration maximale en récepteur que nous pouvons obtenir ($0,05 \mu\text{M}$).

La préparation d'autres dérivés n'a pas permis d'obtenir des composés à affinité suffisante pour poursuivre ce type d'expériences. La preuve de l'existence d'une seule sous-unité liant le stéroïde dans le récepteur non transformé a été apportée un an plus tard par OKRET *et al.* (1985) et par GEHRING et ARNDT (1985). Les premiers utilisant

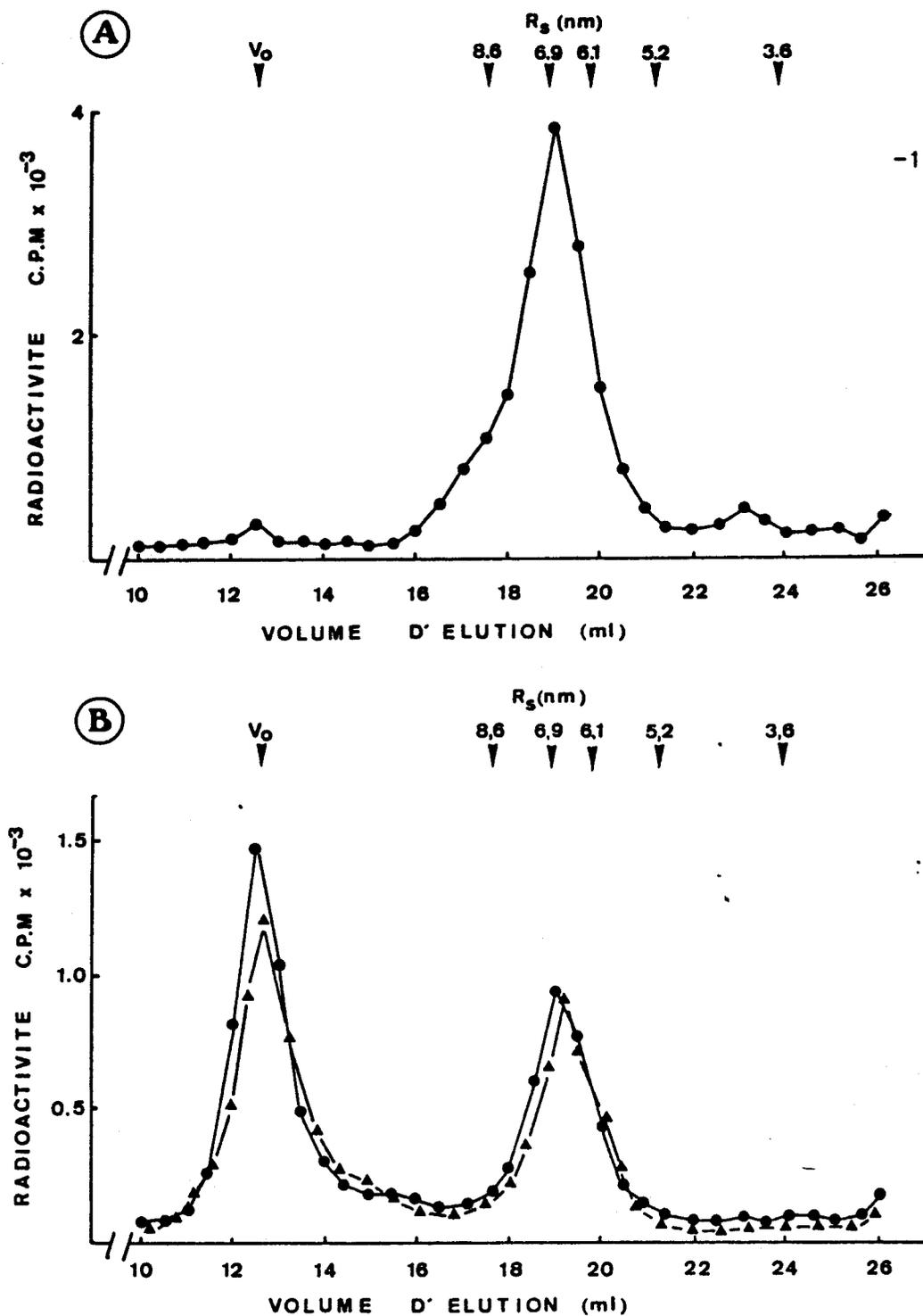


Figure 29. Mesure du rayon de Stokes du récepteur non transformé après incubation en présence d'un stéroïde bifonctionnel (dérivé bis-17 β carboxamide).

(A) Profil d'éluion obtenu après injection d'un échantillon témoin (extrait sulfate de protamine) incubé en présence de dexaméthasone tritiée.

(B) Profil d'éluion obtenu après injection d'un échantillon incubé avec le bis-17 β carboxamide tritié utilisé en concentration équimoléculaire (rapport des concentrations bis-17 β carboxamide/récepteur = 0,5 : 1 \blacktriangle ou en excès (rapport = 5 : 1 \bullet)).

Les analyses sont réalisées sur une colonne TSK G4000 SW (7,5 \times 600 mm) à un débit de 0,5 ml/mn.

un anticorps anti-récepteur, ont démontré par mesure des caractéristiques hydrodynamiques du complexe récepteur non transformé-anticorps, que celui-ci ne pouvait contenir qu'une seule molécule d'anticorps. GEHRING et ARNDT ont comparé la taille moléculaire du récepteur non transformé natif et la masse du polypeptide liant le stéroïde de récepteurs normaux et de mutant nt¹. Leurs résultats démontrent de façon non équivoque qu'un seul polypeptide lie le stéroïde dans la forme non transformée du récepteur des glucocorticoides.

5 - Signification de l'hétérogénéité du récepteur natif non transformé.

L'existence d'une hétérogénéité de taille du récepteur non transformé peut être interprétée par plusieurs hypothèses :

- 1) la possibilité d'une protéolyse d'une des sous-unités pouvant expliquer la conversion 8 \rightarrow 7 nm est écartée, compte tenu des résultats de l'étude de la composition moléculaire de chacune de ces deux formes, présentés dans le paragraphe II. Ce résultat est important à souligner puisqu'une telle conversion d'une forme de taille 8,3 nm en une forme de plus faible taille par des protéases, conversion inhibée par des inhibiteurs de protéases, a été rapportée dans la littérature (SHERMAN *et al.*, 1983).
- 2) les proportions variables de ces deux formes du récepteur dans les échantillons étudiés (leur rapport variant de 0,3 à 1,2) laisse supposer qu'une molécule inconnue d'une taille d'environ 40 Kda pourrait s'associer à la forme 7,1 nm du récepteur en conduisant à un complexe de taille 8,3 nm. Les proportions de ces deux formes dans le profil d'élution d'une colonne chromatographique restent d'ailleurs inchangés selon que le cytosol a été préparé en présence ou en l'absence d'antiprotéases diverses. D'autre part, l'analyse d'un cytosol préparé à partir de lymphocytes thymiques, aboutit au même profil, bien que le thymus soit très pauvre en protéases par rapport au tissu hépatique.

3) Le composant probablement associé à la forme 8,3 nm est particulièrement labile. Ainsi, comme nous l'avons présenté plus haut, il n'est pas retrouvé après purification par chromatographie d'affinité du récepteur non transformé. La conversion en la forme 7,1 nm peut être induite par une élévation de la force ionique, ou par une gel-filtration sur une colonne d'ACA 202 (tableau IX).

4) On ne peut préjuger d'une éventuelle modification conformationnelle du récepteur expliquant une diminution apparente du rayon de Stokes de 8,3 à 7,1 nm. Cette différence apparente de taille n'est cependant pas retrouvée en ultracentrifugation ou en électrophorèse après réticulation moléculaire au glutaraldéhyde (cf paragraphe I, page 92). Il faut insister ici sur l'optimisation des conditions expérimentales (SABLONNIERE *et al.*, 1987), qui seulement à ce prix, permet de visualiser une hétérogénéité du récepteur non transformé. En particulier, l'utilisation d'une colonne d'exclusion de taille deux fois plus courte (300 mm) à un débit d'élution deux fois plus élevé (1 ml/min) ne permet pas d'observer cette hétérogénéité. Ceci explique probablement qu'une telle hétérogénéité n'ait pas été observée par d'autres (LA POINTE *et al.*, 1986). La présence de ces deux formes du récepteur n'est pas affectée par la composition ionique du tampon (hypo ou isotonique) ni par la présence de molybdate de sodium. Par contre, puisque la forme 8,3 nm ne peut être observée à partir de préparations de récepteur hautement purifié, on ne peut exclure l'association éventuelle au récepteur d'un facteur cytosolique qui serait éliminé au cours de la purification du récepteur. Des

TABLEAU IX

LABILITE DE LA FORME 8,3 nm DU RECEPTEUR

Cytosol	Pourcentage des deux formes du récepteur	
	8,3 nm	7,1 nm
A) Natif	70	30
B) Après filtration sur colonne d'ACA 202	* 50 + 10	* 50 + 90
C) Après incubation en présence de KCl 0,5 M	25	75

Un échantillon cytosolique préparé en présence de molybdate de sodium est incubé en présence d'acétonide de triamcinolone tritié. La répartition des formes 8,3 nm et 7,1 nm des différentes aliquotes A, B et C est ensuite étudiée par chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne TSK G4000 SW.

B : Aliquotes analysées en chromatographie d'exclusion de taille 30 minutes (*) après filtration, ou 240 minutes (+) après filtration.

différences semblables ont d'ailleurs été rapportées dans le cas du récepteur de la progestérone (RENOIR *et al.* 1982; ARANYI *et al.* 1988).

5) Une dernière possibilité suppose que le composant associé au récepteur dans la forme 8,3 nm pourrait être de nature ribonucléoprotéique. Cette hypothèse nous a paru intéressante à vérifier puisque de nombreuses observations de la littérature ont démontré la possibilité d'une association à un ARN, du récepteur des glucocorticoides et aussi des différents autres récepteurs stéroïdiens (LIAO *et al.*, 1980 ; TYMOCZKO *et* PHILLIPS, 1983 ; KOVACIC-MILIVOJEVIC *et al.*, 1985 ; ECONOMIDIS *et* ROUSSEAU, 1985 ; WEBB *et al.*, 1986 ; ALI *et* VEDECKIS, 1987a *et* 1987b).

III - SENSIBILITE DU RECEPTEUR NON TRANSFORME A L'ACTION DES RIBONUCLEASES

1 - Action de la ribonucléase A sur les caractéristiques hydrodynamiques du récepteur non transformé, en présence de molybdate de sodium.

L'incubation du récepteur cytosolique stabilisé par le molybdate avec différentes concentrations de ribonucléase A (RNase A) pendant 1 h à 25°C modifie la proportion respective des deux formes du récepteur (Fig. 30A) avec une diminution sensible de la forme 8,3 nm. Des résultats identiques sont obtenus par incubation en présence de RNase A à 0°C pendant 16 heures. La spécificité de l'effet de la RNase A est démontrée par son inhibition spécifique en présence d'inhibiteur placentaire de ribonucléase (RNasine) (Fig. 30B). De plus, lorsque la forme 8,3 nm récupérée après fractionnement par chromatographie, est traitée par la RNase A et réinjectée sur colonne d'exclusion de taille, une conversion vers la forme 7,1 nm est alors observée (Fig. 30B). Ces effets ne peuvent être provoqués par une activité protéolytique contaminante puisque d'une part, la ribonucléase utilisée est soumise à une ébullition avant usage et que l'addition d'antiprotéases (leupeptine, chymostatine) ne modifie pas le résultat obtenu. La possibilité d'une conversion spontanée 8,3 nm → 7,1 nm par des ribonucléases endogènes pendant la préparation du cytosol semble

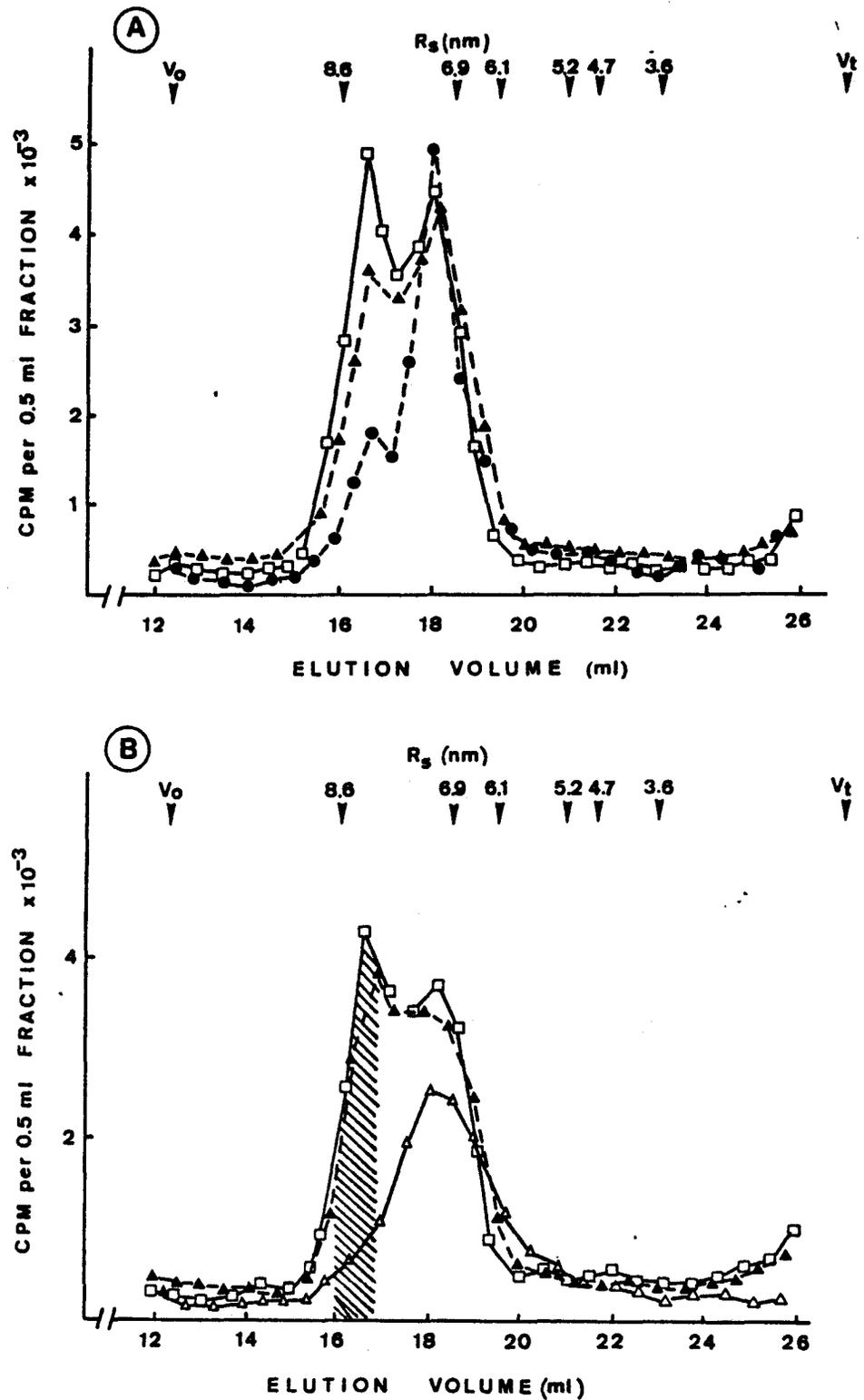


Figure 30. Effet de la RNase A sur le rayon de Stokes du récepteur non transformé, en présence de molybdate de sodium. Les échantillons cytosoliques incubés avec l'acétonide de triamcinolone tritié en tampon TMGM₀ sont traités par la RNase A dans diverses conditions. Dans le diagramme A, des aliquots de 0.2 ml sont incubés à 25°C pendant 1 heure en l'absence (□) ou en présence de RNase A à 8 U/ml (▲) ou 45 U/ml (●). Dans le diagramme B, un aliquot est incubé en présence d'inhibiteur de RNase A à 500 U/ml (□); alors qu'un autre est incubé à la fois en présence de RNase A (45 U/ml) et d'inhibiteur de RNase A (2000 U/ml) à 25°C pendant une heure (▲). Le troisième profil (△) correspond au matériel élué (en hachuré) d'une première chromatographie et incubé ensuite en présence de RNase A (45 U/ml) pendant 1 heure à 25°C. Toutes les injections sont réalisées sur une colonne TSK G4000 SW (7.5 x 600 mm) à un débit de 0.5 ml/mn.

peu probable puisque la répartition des deux formes du récepteur reste inchangée lorsqu'un cytosol est préparé en présence de 500 U/ml de RNAsine (Fig. 30B).

2- Action de diverses ribonucléases en présence de molybdate de sodium.

Diverses ribonucléases ont été testées dont la nucléase S₁, spécifique des régions simple-brin et la nucléase CVE spécifique des régions double-brin (TOOTS *et al.*, 1981). Les résultats obtenus montrent que si une conversion partielle de la forme 8,3 nm vers la forme 7,1 nm peut être observée (Fig. 31), aucun effet superposable à celui obtenu avec la ribonucléase A ne peut être démontré. La ribonucléase S₁ dont l'action sur le récepteur n'est pas représenté sur la figure, est inefficace. Cependant, en aucun cas, on ne peut noter de dissociation du récepteur non transformé vers la forme transformée de taille 5,2 nm. Une observation comparable rapportée par TYMOCZKO et PHILLIPS (1983) permet de supposer que le molybdate pourrait inhiber l'activité catalytique des ribonucléases utilisées. La vitesse d'hydrolyse d'ARN soluble par la ribonucléase A n'est pas affectée par la présence de molybdate de sodium. Par contre, on peut supposer que le molybdate empêche la dissociation du complexe oligomérique non transformé par un mécanisme indépendant de l'hydrolyse d'une molécule d'ARN éventuellement associée au récepteur.

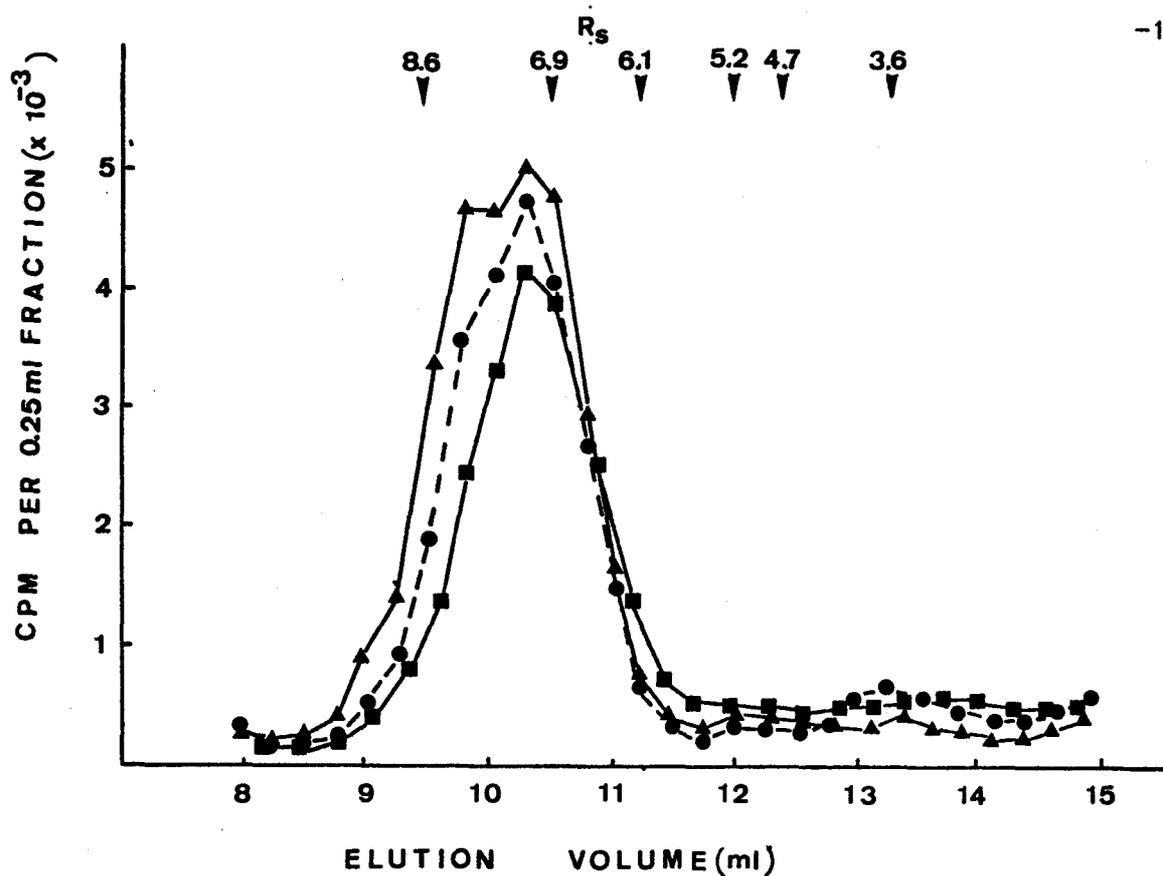


Figure 31. Effet de diverses ribonucléases sur le rayon de Stokes du récepteur non transformé, en présence de molybdate de sodium. Les échantillons cytosoliques contenant le complexe hormone-récepteur tritié, sont incubés avec les ribonucléases pendant 16h à 0°C en présence de molybdate de sodium. Des aliquots de 0,1 ml d'un cytosol contrôle (▲), d'un cytosol traité à la RNase A (85 U/ml, ■) et d'un cytosol traité à la ribonucléase CVE (10 U/ml, ●) sont injectés sur une colonne TSK G4000 SW (7,5 x 300 mm) à un débit de 0,5 ml/mn. Les flèches indiquent la position des protéines standards.

3 - Sensibilité du récepteur non transformé à l'action de diverses ribonucléases, en l'absence de molybdate de sodium.

Une pré-incubation d'un cytosol, préparé en l'absence de molybdate avec 85 à 170 U/ml de RNase A à 0°C entraîne une conversion partielle vers la forme transformée de taille 5,2 nm (Fig. 32). Cet effet n'est pas observé lorsque la RNase A est utilisée à une concentration inférieure à 85 U/ml. Lorsque la RNase S protéine est utilisée à une concentration de 1 mg/ml, elle est inefficace (Fig 32). Ce résultat suggère que la conversion partielle 7-8 nm → 5,2 nm observée en présence de RNase A requiert l'activité catalytique complète de l'enzyme. Le pourcentage de dissociation observé (15-25 %) est comparable aux résultats de TYMOCZKO et PHILLIPS qui utilisent jusqu'à 500 U/ml d'enzyme pour obtenir un taux de dissociation qui n'excède pas 30 % !

Devant cet effet relativement peu marqué de la ribonucléase A, nous avons pensé que d'autres enzymes ayant des spécificités catalytiques différentes pourraient être essayées. En fait, deux nucléases ont été choisies, dont la description des effets catalytiques sur des molécules d'ARN, ont été précisées (TOOTS *et al.*, 1981 ; FAVOROVA *et al.*, 1981 ; LOCKARD et KUMAR, 1981). La nucléase S₁ agit préférentiellement sur les régions simple-brin des acides nucléiques, alors que la nucléase CVE possède une action endonucléasique spécifique des régions double-brins des ARN, sans spécificité de bases (Fig. 33). L'incubation d'un échantillon cytosolique en présence de nucléase S₁,

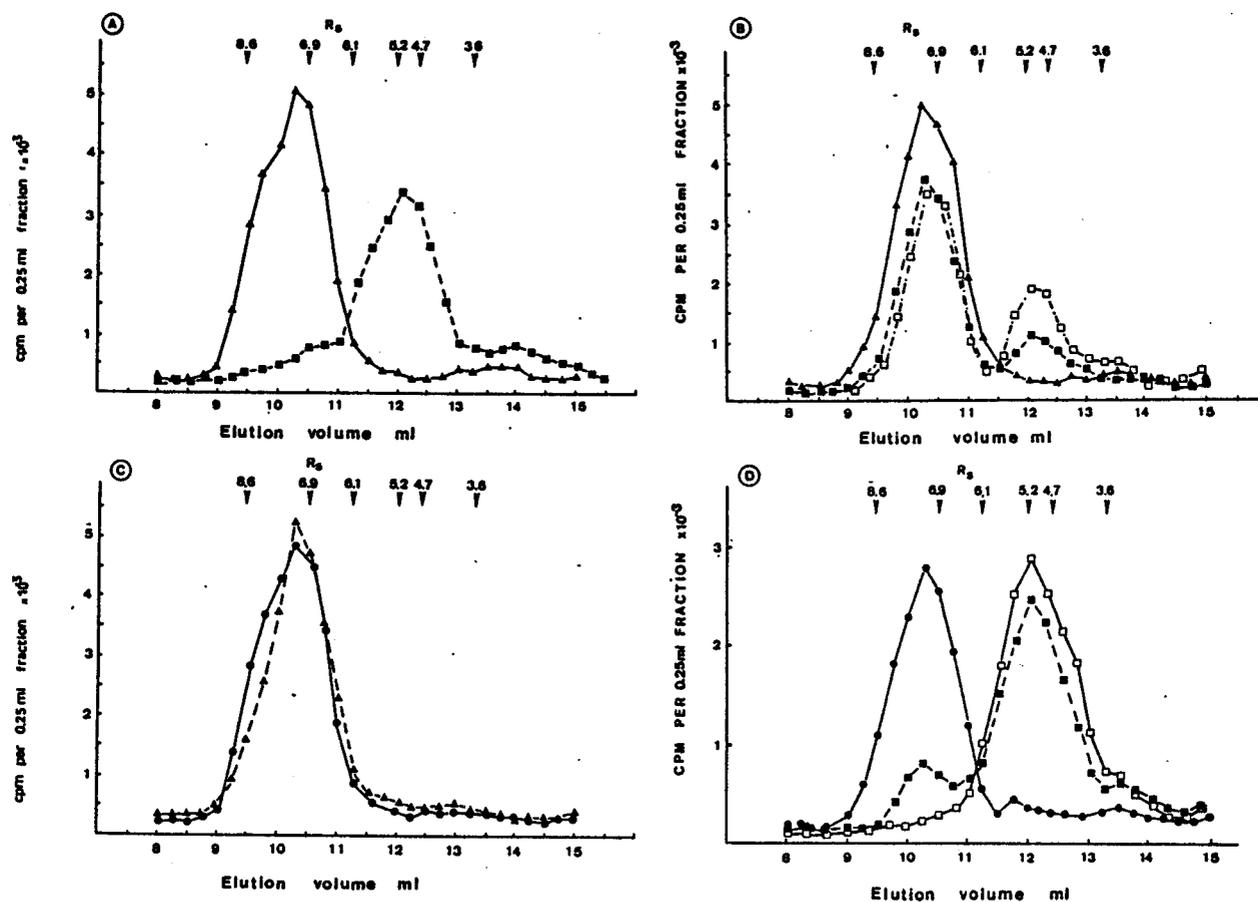


Figure 32. Effet des ribonucléases sur la taille du récepteur non transformé en l'absence de molybdate de sodium. Les échantillons cytosoliques contenant le complexe hormone-récepteur tritié sont incubés avec diverses ribonucléases à 0°C pendant 16h. Le diagramme A montre les profils contrôles obtenus à partir d'un cytosol maintenu à 0°C (▲, récepteur non transformé) ou chauffé à 25°C pendant 30 min (■, récepteur transformé). Dans le diagramme B des échantillons sont traités avec la RNase A à 85 U/ml (■), à 170 U/ml (□); ou avec la protéine S de la RNase A (1 mg/ml, ▲) avant l'analyse chromatographique. Dans le diagramme C, les échantillons sont incubés avec la nucléase S₁ à 1000 U/ml (●) ou 10000 U/ml (▲). Enfin, le diagramme D montre l'effet de la ribonucléase CVE à 5 U/ml (■); 10 U/ml (□) ou à 10 U/ml en présence de 20 mM d'EDTA (●). Les échantillons sont injectés sur une colonne TSK G4000 SW et élués à un débit de 0,5ml/mn.

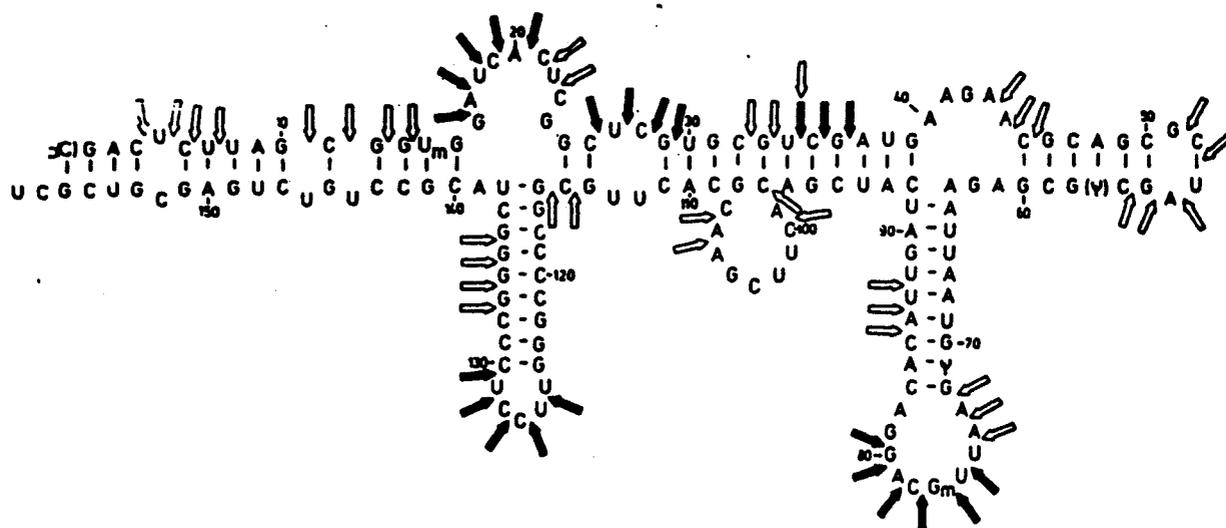


Figure 33. Structure secondaire de l'ARN 5,8 S de foie de rat, où sont précisées les sites de coupure par la nucléase S₁ (flèches grasses) et la nucléase CVE (flèches claires). D'après TOOTS *et al.* (1981).

n'entraîne pas de réduction apparente de la taille du récepteur non transformé (Fig. 32C). La concentration en enzyme utilisée ici est élevée (1000 à 10 000 U/ml), car à pH 7,40, l'activité enzymatique est réduite de 500 fois par rapport à son activité optimale observée en milieu acide à pH 4,6 (TOOTS *et al.*, 1981). Par contre, la ribonucléase CVE entraîne, à une concentration de 10 U/ml, une dissociation complète du récepteur non transformé en la forme 5,2 nm (Fig. 32D). La spécificité de cet effet a pu être démontrée en inhibant l'action catalytique de l'enzyme par l'addition de 20 mM d'EDTA. Puisque les différentes ribonucléases utilisées ici peuvent mimer (avec plus ou moins d'efficacité) la dissociation du récepteur non transformé induite par une élévation de température *in vitro*, nous avons cherché si la RNasine pouvait inhiber la dissociation du récepteur induite par la chaleur (Fig. 34). Les résultats obtenus indiquent qu'il n'en est rien. Ceci suggère (mais ne démontre pas) que la dissociation du récepteur au cours de la transformation n'est pas consécutive à l'activité d'une ribonucléase endogène. Cependant, la RNasine n'inhibe pas toutes les activités ribonucléasiques. Les différents effets observés sur la réduction de taille du récepteur par diverses ribonucléases permet de nous renseigner sur la structure d'un éventuel ARN associé au récepteur non transformé. L'effet très net de la RNase CVE suggère que des régions en hélice seraient particulièrement exposées. Par contre, l'absence ou la faible action obtenue respectivement avec les RNases A ou S₁, permet de penser que l'ARN possède peu de régions accessibles à ces enzymes, ou que ces régions sont protégées par le récepteur.

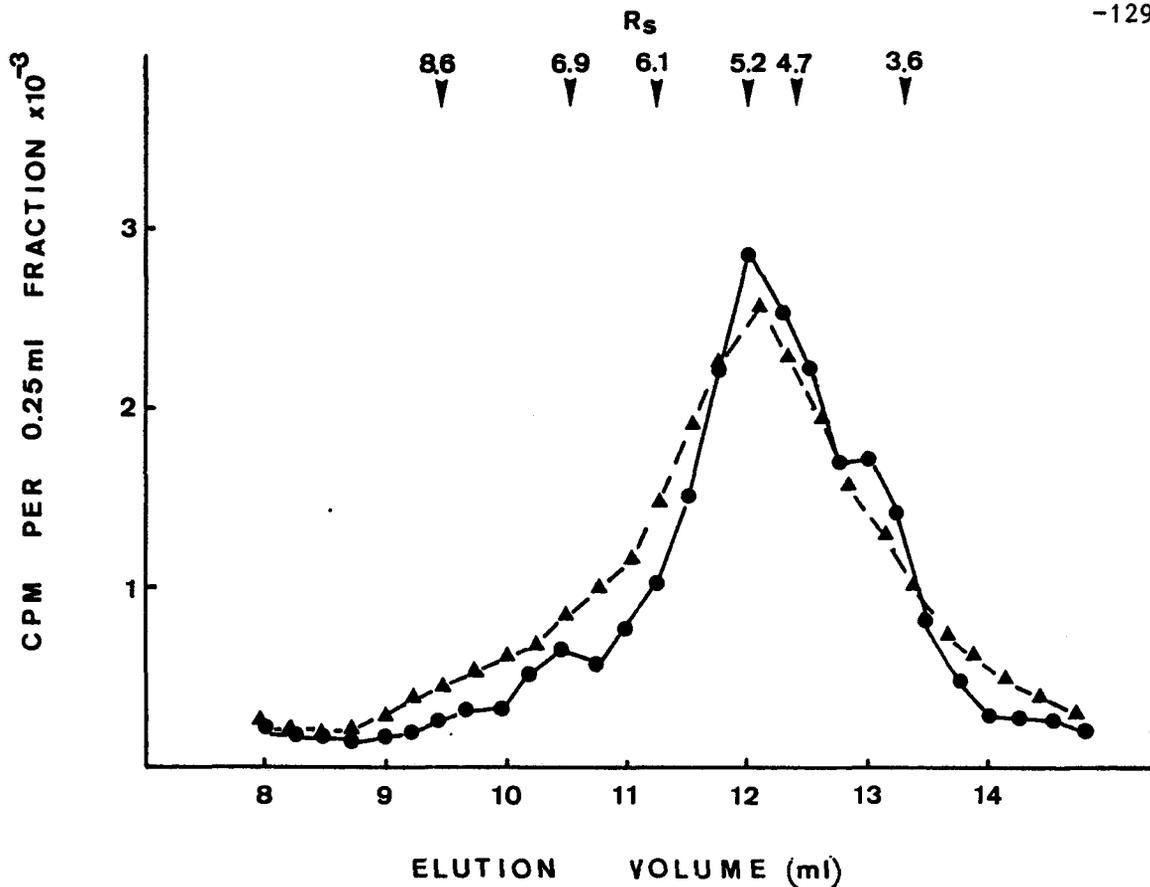


Figure 34. Insensibilité d'action de l'inhibiteur de RNase A (RNasine) sur la réduction de taille du récepteur non transformé soumis à une élévation thermique.

Les échantillons cytosoliques sont incubés en présence d'acétonide de triamcinolone tritié, en l'absence de molybdate. Un aliquot (0,1 ml) est incubé à 25°C pendant 30 min (●) et un autre aliquot supplémenté avec 3000 U/ml de RNasine est incubé dans les mêmes conditions (▲). L'analyse est réalisée sur une colonne TSK G4000 SW à un débit de 0,5 ml/mn. Les flèches indiquent la position des protéines standards.

Il est curieux de constater que la RNase A possède un effet marqué sur la conversion 8,3 \rightarrow 7,1 nm alors qu'elle ne possède que peu d'effet sur la dissociation 7,1 \rightarrow 5,2 nm. On peut supposer que dans la forme 8,3 nm, une région simple brin ou une boucle d'ARN associé serait accessible à la RNase A. En effet, dans des conditions non dénaturantes, les ribonucléases pancréatiques (RNase A, T₁, T₂) entraînent des coupures préférentielles dans des segments simple-brin des molécules d'ARN (HORZ et ZACHAU, 1973). La sensibilité de la forme 8,3 nm à l'action de la RNase A et l'effet remarquable de la RNase CVE sur la réduction de taille du récepteur nous ont amené à rechercher et à caractériser une molécule d'ARN associée au récepteur non transformé.

IV - CARACTERISATION D'UNE MOLECULE D'ARN ASSOCIEE AU RECEPTEUR

Cette étude a été réalisée grâce à la collaboration de Ioannis ECONOMIDIS et Martine PLACE à l'Unité de recherches sur le métabolisme et les hormones de l'Institut Cellulaire et Moléculaire de Pathologie (Université Catholique de Louvain, BRUXELLES) sous la direction du Professeur G.G. ROUSSEAU.

1- Recherche d'une molécule d'ARN associée à la forme 8,3 nm du récepteur cytosolique.

Après purification partielle du récepteur stabilisé par le molybdate, par précipitation au sulfate de protamine, les échantillons sont soumis à une chromatographie d'exclusion de taille préparative. Les deux pics élués correspondant aux formes 8,3 nm et 7,1 nm du récepteur sont alors recueillis séparément et analysés pour leur contenu en ARN (Fig. 35, pistes 1 et 2). L'électrophorèse des ARN récupérés de ces fractions et marqués au phosphore 32 montre l'existence de nombreuses bandes entre 250 nucléotides et moins de 100 nucléotides. Par contre, aucune différence qualitative n'a pu être notée par comparaison entre la répartition des ARN élués du pic 8,3 nm et ceux élués du pic 7,1 nm. D'autre part, après traitement à la RNase A des échantillons d'extrait sulfate de protamine, la répartition des espèces d'ARN est peu modifiée (Fig. 36). Ces résultats sont donc difficilement interprétables ; cependant, compte-tenu du faible taux de purification du récepteur de ces préparations (20 à 60 fois), la

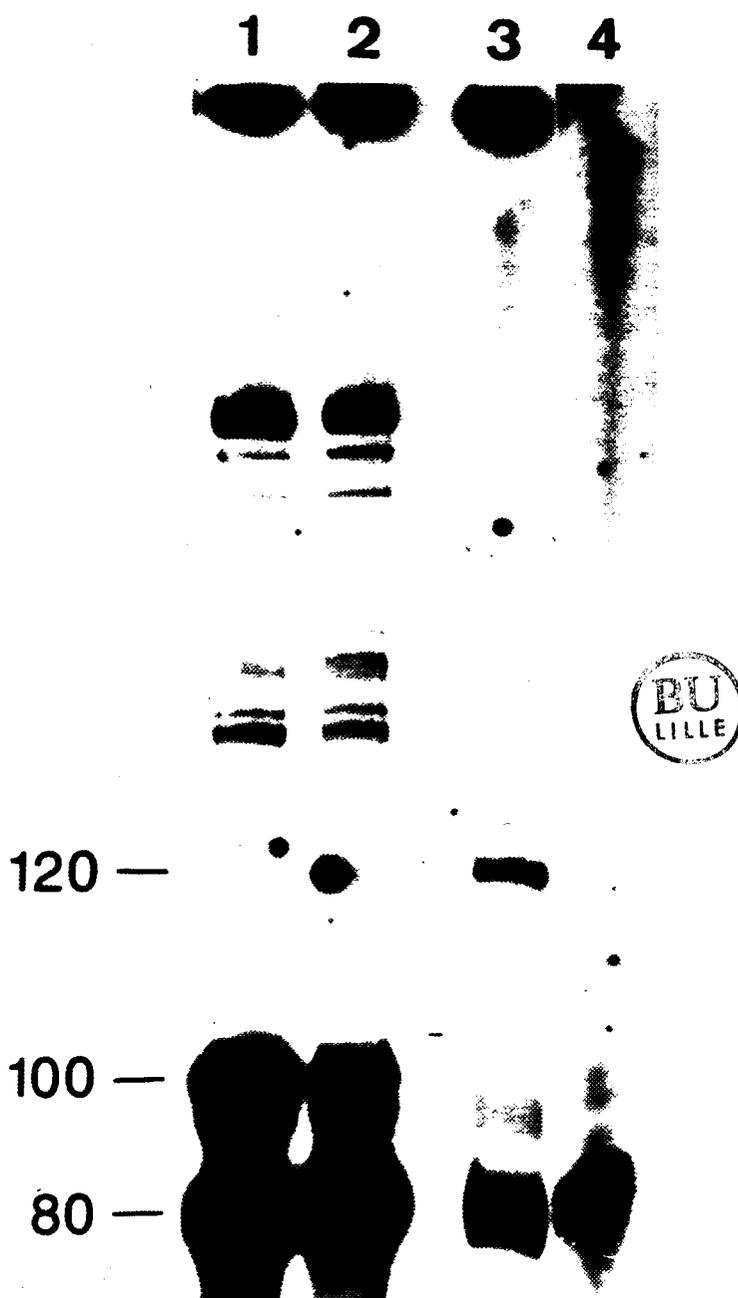


Figure 35. Analyse électrophorétique des molécules d'ARN copurifiées avec le récepteur non transformé.

Les molécules d'ARN étudiées sont isolées des fractions éluées après chromatographie d'exclusion de taille du récepteur non transformé.

Après extraction, les ARN sont marqués au phosphore 32 avant d'être analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée 7M. La révélation est assurée par autoradiographie du gel.

Les pistes 1,3 et 4 correspondent à la forme 7,1 nm du récepteur et la piste 2, à la forme 8,3 nm du récepteur. Sur les pistes 1 & 2, le récepteur est soumis à une purification partielle par précipitation au sulfate de protamine avant l'étape de chromatographie d'exclusion de taille. Sur la piste 3, le récepteur est purifié par chromatographie d'affinité suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille. La piste 4 montre l'analyse d'un éluat de chromatographie d'affinité dont le récepteur a été préalablement saturé en présence de 50 μ M d'acétonide de triamcinolone non radioactive, pour bloquer l'adsorption spécifique du récepteur sur le support d'affinité. Les nombres dans la marge indiquent la taille des ARN exprimée en nucléotides.

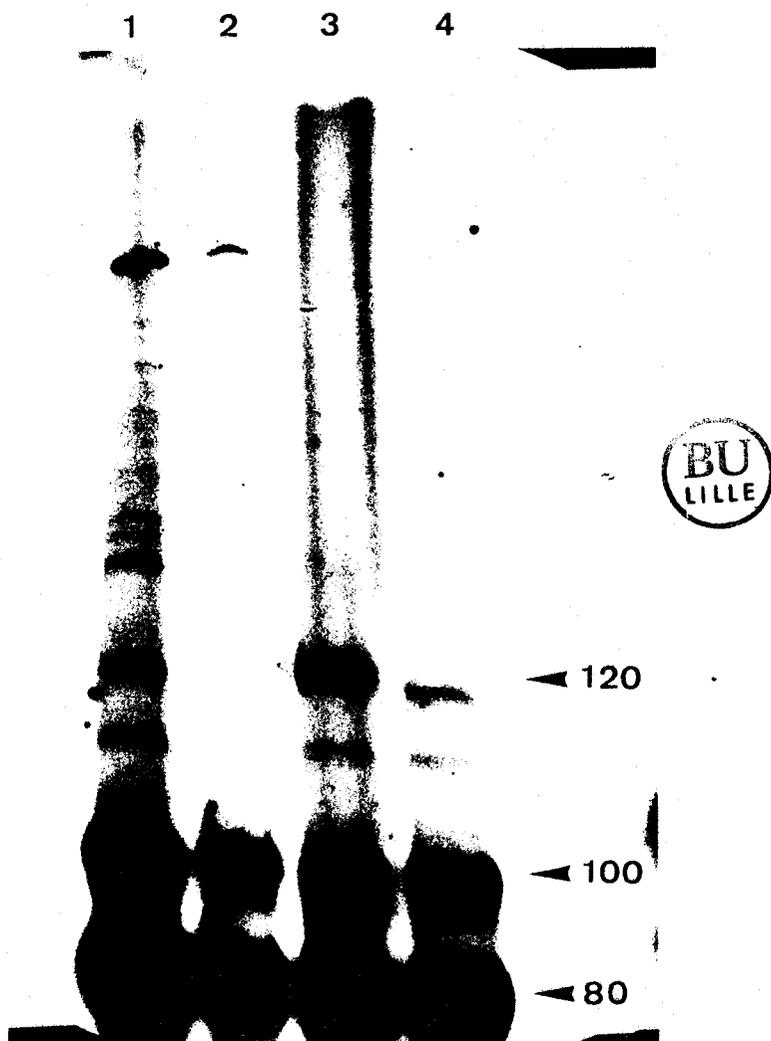


Figure 36. Analyse électrophorétique des molécules d'ARN co-éluées avec le récepteur non transformé. Après fractionnement d'échantillons d'extraits sulfate de protamine contenant le récepteur non transformé, sur une colonne TSK G4000 SW, les fractions correspondant aux formes 8,3 nm et 7,1 nm sont analysées en électrophorèse après extraction et marquage de leur contenu en ARN. Les pistes 1 & 2 correspondent respectivement aux formes 8,3 nm et 7,1 nm du récepteur. Un autre échantillon préalablement traité à la RNase A (45 U/ml pendant 90 min à 25°C) a été fractionné dans les mêmes conditions (piste 3: forme 8,3 nm; piste 4: forme 7,1 nm).

discrimination entre un éventuel ARN associé au récepteur et d'autres ARNs coélués devient impossible.

2 - Recherche d'une molécule d'ARN associée au récepteur non transformé, purifié par chromatographie d'affinité.

Lorsque le récepteur purifié par chromatographie d'affinité (taux de purification 3000 à 4000) est ensuite soumis à une chromatographie d'exclusion de taille sur colonne TSK G4000 SW, il peut être obtenu purifié 10 000 fois. Sa caractérisation en électrophorèse analytique après coloration au nitrate d'argent met en évidence la présence d'une bande apparemment unique d'une masse relative de 90 000 (Fig. 22). L'analyse du contenu en ARN des fractions éluées de la colonne d'exclusion de taille correspondant au récepteur purifié, fait apparaître l'existence de trois espèces d'ARNs de taille 120, 100 et 80 nucléotides (Fig. 35, piste 3). Afin de déterminer si ces molécules sont spécifiquement associées au récepteur, une purification de contrôle a été réalisée dans les mêmes conditions après saturation préalable du récepteur par $50 \cdot 10^{-6}$ M d'acétonide de triamcinolone. Dans ces conditions, le récepteur associé au stéroïde libre en excès ne peut s'adsorber sur le support d'affinité, et l'éluat de chromatographie d'affinité ne contient quasiment plus de récepteur. Après analyse des ARN contenus, on remarque la disparition de la bande de 120 nucléotides dans cette expérience contrôle, alors qu'un ARN de 80 nucléotides persiste. Ce dernier résultat peut paraître surprenant. En effet, pour expliquer la

présence de ces ARN d'une taille identique à celle des ARN de transfert (80 nucléotides) , on doit supposer que ceux-ci peuvent s'adsorber non spécifiquement sur la matrice d'affinité, supporter un lavage à une force ionique $> 0,5$ M et enfin être coélués en chromatographie d'exclusion de taille dans une région ($R_s = 7$ nm) où ils ne devraient pas être retrouvés !. Ils pourraient également représenter des contaminants ribonucléoprotéiques ou correspondre à une dégradation partielle d'un ARN de taille plus élevée.

3 - Recherche d'une molécule d'ARN associée au récepteur transformé, purifié par chromatographie d'affinité.

Puisqu'une molécule d'ARN semble associée au complexe hormone-récepteur non transformé et que la ribonucléase CVE entraîne une dissociation du complexe vers la forme transformée, à 0°C ; nous avons supposé qu'un ARN ne devait plus être associé au récepteur après transformation. Nous avons donc analysé le contenu en ARN d'un échantillon de récepteur purifié transformé. Pour cela, un protocole de purification particulier a été utilisé. Après adsorption du récepteur stabilisé par le molybdate sur le support d'affinité, l'élution par l'hormone radioactive est alors réalisée en l'absence de molybdate de sodium. Le caractère transformé du récepteur purifié ainsi récupéré a été déterminé par la mesure de son affinité pour une colonne de DNA-cellulose (Fig. 37). L'analyse des ARN contenus a été effectuée après purification ultime par chromatographie d'exclusion de taille de l'échantillon de récepteur purifié. Les résultats obtenus

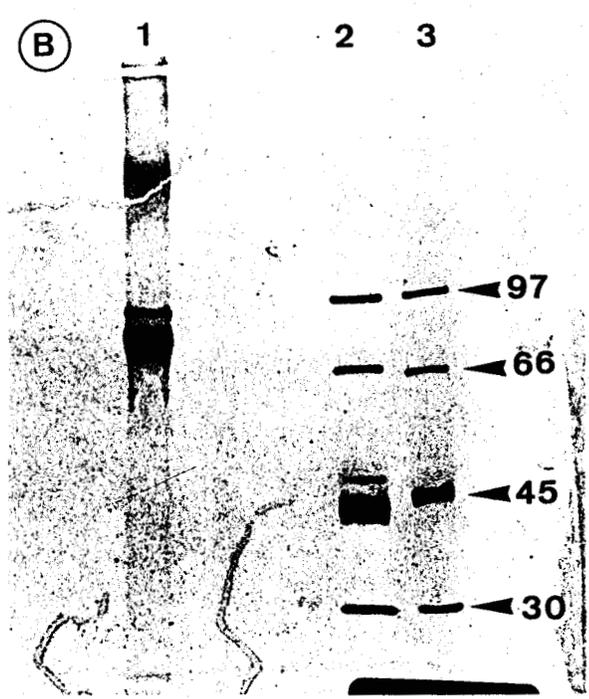
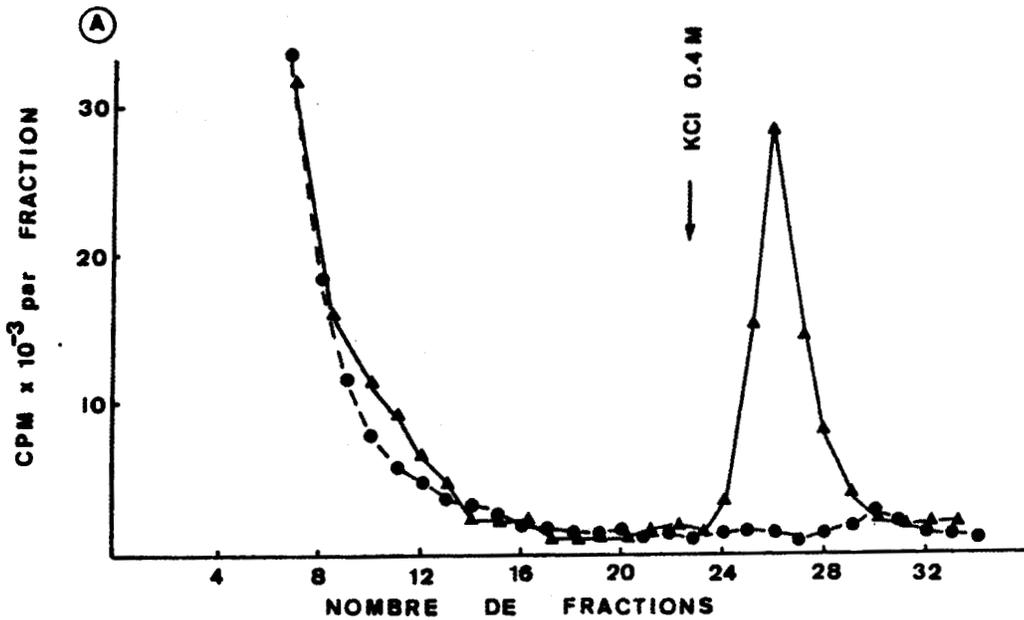


Figure 37. Caractérisation du récepteur purifié transformé. Après adsorption sur le support d'affinité, le récepteur est élué en l'absence de molybdate, par un excès d'acétonide de triamcinolone tritiée. L'activité de liaison du récepteur ainsi purifié est stabilisée par l'ajout de 0,5 mg/ml de sérum-albumine. (A) Mesure de la liaison à la DNA-cellulose. Une colonne de 1,5 ml de DNA-cellulose est équilibrée en tampon tris, 10 mM, EDTA 1,5 mM, molybdate de sodium 10 mM, glycérol 10% pH 7,40. 0,25 ml d'éluat (▲) ou de solution éluante contenant l'hormone seule (●), sont déposés sur la colonne. Après cinq minutes de contact, la colonne est lavée avec 18 ml de tampon suivie d'une élution avec 10 ml du même tampon supplémenté en KCl 0,4 M. Le débit est de 0,75 ml/mn et les fractions sont collectées pour une mesure de radioactivité. (B) Caractérisation du récepteur purifié transformé, en électrophorèse sur gel de polyacrylamide. 0,1 ml d'éluat contenant le récepteur purifié transformé est analysé (piste 1). La révélation des protéines utilise la coloration de MARSHALL. Les pistes 2 & 3 correspondent aux témoins de masse moléculaire exprimés en Kda.

(Fig. 38) montrent qu'une bande correspondant à un ARN de 120 nucléotides est fortement diminuée après transformation. La même expérience réalisée avec d'autres échantillons de récepteur purifié n'a cependant pas permis de reproduire clairement cette observation. Deux explications peuvent être fournies. D'une part, il est difficile d'obtenir une transformation complète du complexe hormone-récepteur dans les conditions utilisées ici; d'autre part, le récepteur transformé est élué avec un rayon de Stokes sensiblement identique à celui des ARN d'environ 100 nucléotides.

Une caractérisation plus précise de cet ARN associé aurait pu être poursuivie, notamment grâce à son clonage. D'autre part, des expériences de reconstitution par l'addition d'ARN à des échantillons de récepteur purifié devraient permettre une meilleure approche de leur mécanisme d'interaction avec le récepteur. Cependant, les difficultés rencontrées, notamment pour obtenir une quantité appréciable de récepteur purifié n'ont pu permettre de poursuivre ce travail.

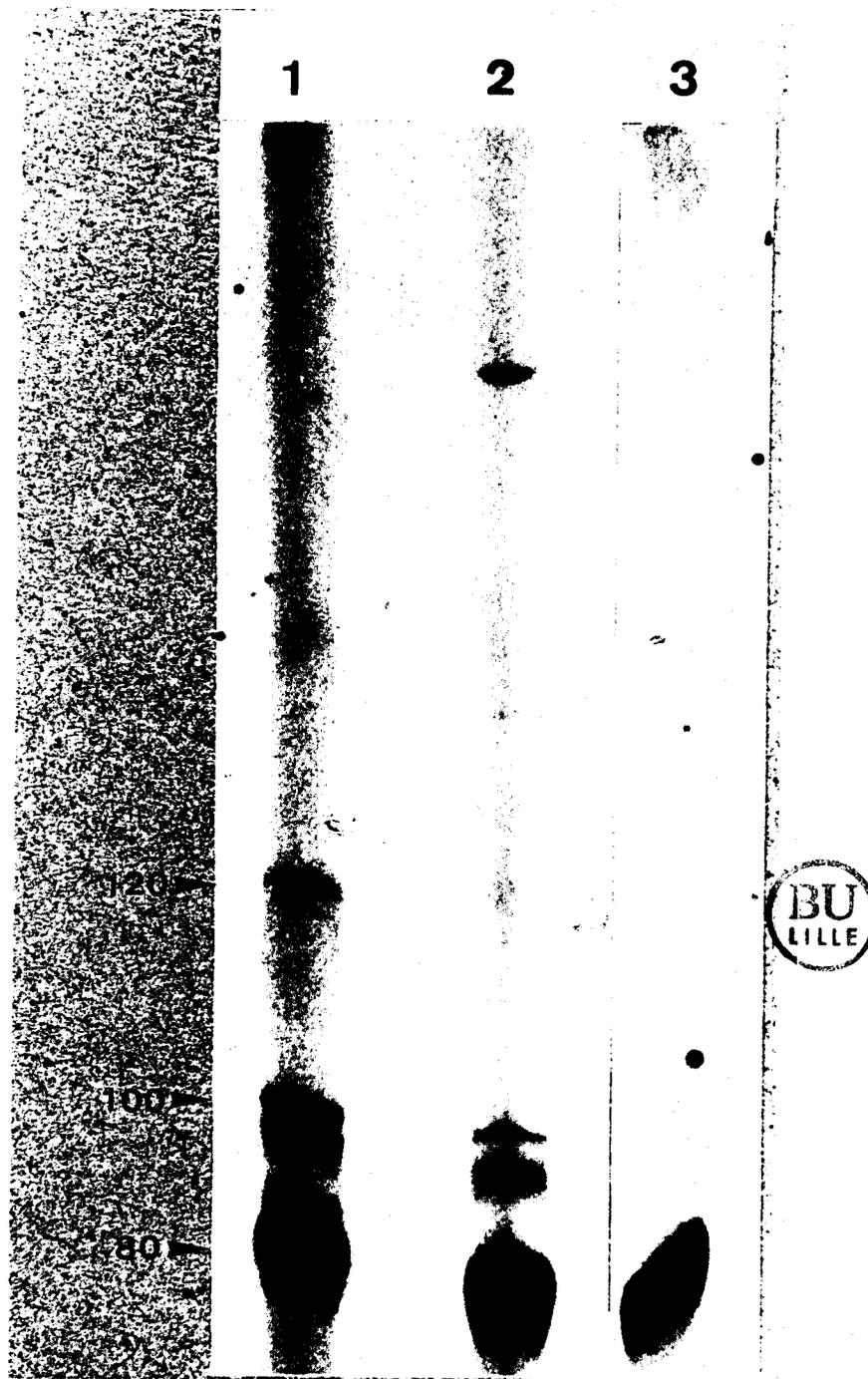


Figure 38. Analyse électrophorétique des molécules d'ARN co-éluées avec le récepteur transformé purifié. Après adsorption du récepteur sur la colonne de chromatographie d'affinité, l'éluat est réalisée en l'absence de molybdate de sodium. L'éluat obtenu est alors analysé après extraction des ARN (piste 2). La piste 1 correspond à un échantillon de récepteur non transformé purifié (cf Fig. 35). La piste 3 correspond à l'analyse d'un éluat de chromatographie d'affinité dont le récepteur a été préalablement saturé en présence d'un excès d'acétone de triamcinolone.

V - MODELE D'ORGANISATION DU RECEPTEUR NON TRANSFORME

Les résultats obtenus par l'analyse des caractéristiques hydrodynamiques d'une part, et les résultats des expériences de réticulation d'autre part, démontrent que la masse moléculaire du récepteur non transformé est comprise entre 260 et 320 Kda. Les données hydrodynamiques n'apportent pas de précision suffisante compte-tenu, en particulier de la modification de l'hydratation moléculaire au cours des expériences de réticulation. Les expériences de réticulation ne permettent pas non plus de conclure quant à la masse moléculaire précise du récepteur non transformé. Par contre, elles démontrent sans équivoque que le récepteur non transformé a une masse relative trois fois plus élevée que le récepteur transformé. La présence d'une molécule d'HSP associée et le fait que cette molécule existe naturellement à l'état de dimère dans la cellule, suggèrent fortement que le récepteur non transformé est constitué de deux molécules d'HSP associées à une molécule de récepteur. Ces hypothèses ont d'ailleurs été récemment démontrées (DENIS *et al.*, 1987; MENDEL et ORTI, 1988). L'organisation tridimensionnelle de ce complexe trimérique reste encore hypothétique. Cependant, les résultats fournis par l'analyse hydrodynamique (tableau VIII) montrent que le récepteur non transformé est très dissymétrique et les calculs des dimensions moléculaires suggèrent fortement que les trois molécules composant le complexe (1 récepteur pour 2 HSP 90) seraient associées entre elles le long de leur grand axe. La forme très dissymétrique du récepteur (forte ellipticité pour un diamètre moléculaire de 4 nm) lui permet de

passer facilement à travers les pores nucléaires. Cependant, si la taille des pores conditionne en partie la pénétration des protéines kariophiliques, d'autres facteurs interviendraient (PAINE *et al.*, 1975 ; BONNER, 1978). De ce point de vue, la liaison d'un ARN permettant la translocation du récepteur non transformé vers le noyau, par analogie au système des " snurps " ne peut être écartée (ZELLER *et al.*, 1983 ; DE ROBERTIS, 1983). Les résultats présentés ici sur l'action des ribonucléases et les données obtenues par l'analyse des complexes récepteur-anticorps en chromatographie d'exclusion de taille (II.3b) suggèrent fortement qu'un facteur cytosolique sensible à la ribonucléase A serait associé à la région N-terminale du récepteur. Prétendre que la molécule d'ARN caractérisée ici est effectivement associée dans cette région du récepteur reste néanmoins purement hypothétique. Mais puisque ce dernier paragraphe termine cette thèse, nous avons pensé qu'un modèle moléculaire, même hypothétique, permettrait de schématiser une organisation spatiale possible du récepteur non transformé (Fig. 39). Pour la clarté de ce schéma, seulement une molécule d'HSP est représentée ici, mais en réalité, c'est bien un dimère d'HSP qui serait associé au récepteur non transformé. Cette association serait d'ailleurs assymétrique puisqu'à l'état libre, le dimère HSP 90 est capable de se lier à deux molécules d'anticorps AC 88 ; alors que le récepteur non transformé ne peut fixer qu'une seule molécule d'AC 88 (LEFEBVRE *et al.*, 1988; résultats soumis à publication). L'interaction entre le récepteur et l'HSP 90 pourrait s'effectuer par une région hydrophobe de la HSP avec le domaine C-terminal du récepteur. De plus, on peut supposer qu'une

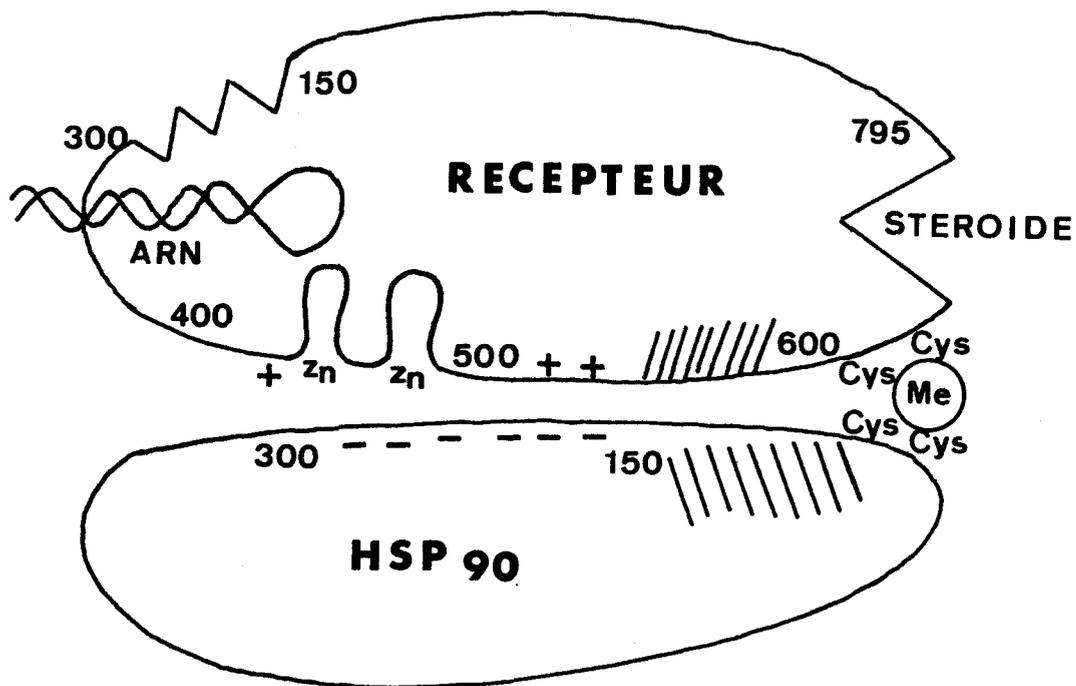


Figure 39. Schéma hypothétique de l'organisation oligomérique du récepteur des glucocorticoïdes (forme non transformée).
Les nombres indiquent la position des résidus d'acides aminés de la séquence primaire.
Les zones d'interaction entre le récepteur et la protéine HSP 90 sont précisées: + - (liaisons salines); hachuré: interactions hydrophobes.
Zn : Atomes de zinc.
Me : Métal relié à des résidus de cystéine, stabilisant le complexe oligomérique non transformé.
⚡ : zone de liaison des anticorps anti-récepteur.

région hydrophile riche en charges négatives de la HSP pourrait interagir avec la région C du récepteur et avec une région adjacente (hélice 509-517), riche en charges positives. Une molécule d'ARN associée pourrait se lier préférentiellement dans la région A/B du récepteur, dans une zone voisine de la fixation de l'anticorps anti-récepteur. Si un ARN de 120 nucléotides (\approx 36 Kda) est associé au récepteur, la forme 8,3 nm retrouvée au niveau cytosolique, pourrait correspondre à l'association d'un ARN de taille plus importante ou à la présence d'une ribonucléoprotéine ?. Mais aucune évidence expérimentale ne permet de confirmer cette supposition.

La dissociation du complexe récepteur-HSP, sous l'effet de la ribonucléase CVE est d'interprétation délicate.

L'hydrolyse d'une molécule d'ARN associée au récepteur pourrait-elle entraîner une modification conformationnelle susceptible de faciliter la dissociation entre le récepteur et l'HSP ?

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La signification d'une association entre le récepteur et la protéine de choc thermique HSP 90 formant un complexe trimérique en l'absence d'hormone reste inconnue. Le rôle éventuel de ce complexe dans la régulation de la liaison du récepteur à l'ADN, ou dans sa translocation vers le noyau n'a pu être confirmé. La probabilité de l'association d'une molécule d'ARN, résultat rapporté maintenant à l'ensemble des récepteurs stéroïdiens ne fait qu'accentuer la complexité de l'organisation du récepteur non transformé. Le rôle éventuel d'une telle molécule d'ARN reste cependant à éclaircir. Il pourrait en particulier intervenir dans la modulation de l'activité transcriptionnelle médiée par le récepteur, ou expliquer certains effets post-transcriptionnels des glucocorticoides.

Les résultats obtenus grâce à la purification du récepteur stabilisé par le molybdate et à l'utilisation d'anticorps spécifiques ont permis de proposer une structure hétéro-oligomérique du récepteur non transformé. Les résultats apportés par les équipes de biologistes moléculaires permettent de préciser le rôle de certaines régions du récepteur. La perspective d'étude physique du récepteur non transformé purifié par dichroïsme circulaire, diffusion de neutrons ou diffraction aux rayons X reste encore inabordable, compte-tenu des difficultés pratiques, et en particulier de l'obtention d'une quantité appréciable de récepteur purifié.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'interaction moléculaires entre les différents composants du récepteur non transformé et donc son rôle physiologique, une approche immunologique paraît prometteuse. Dans cette perspective, nous préparons actuellement des peptides synthétiques correspondant à des régions choisies de la structure du récepteur. L'obtention d'anticorps contre ces peptides permettra, peut-être, de disposer d'outils intéressants pour mieux préciser la structure quaternaire du récepteur sous sa forme non transformée et donc de mieux comprendre le phénomène de la transformation des récepteurs stéroïdiens. Cette étape est en effet fondamentale pour la transmission du message hormonal à l'intérieur des cellules, et de sa régulation.

3^{ème} PARTIE

APPENDICE TECHNIQUE

I - PREPARATION DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES

A) Préparation du cytosol de foie

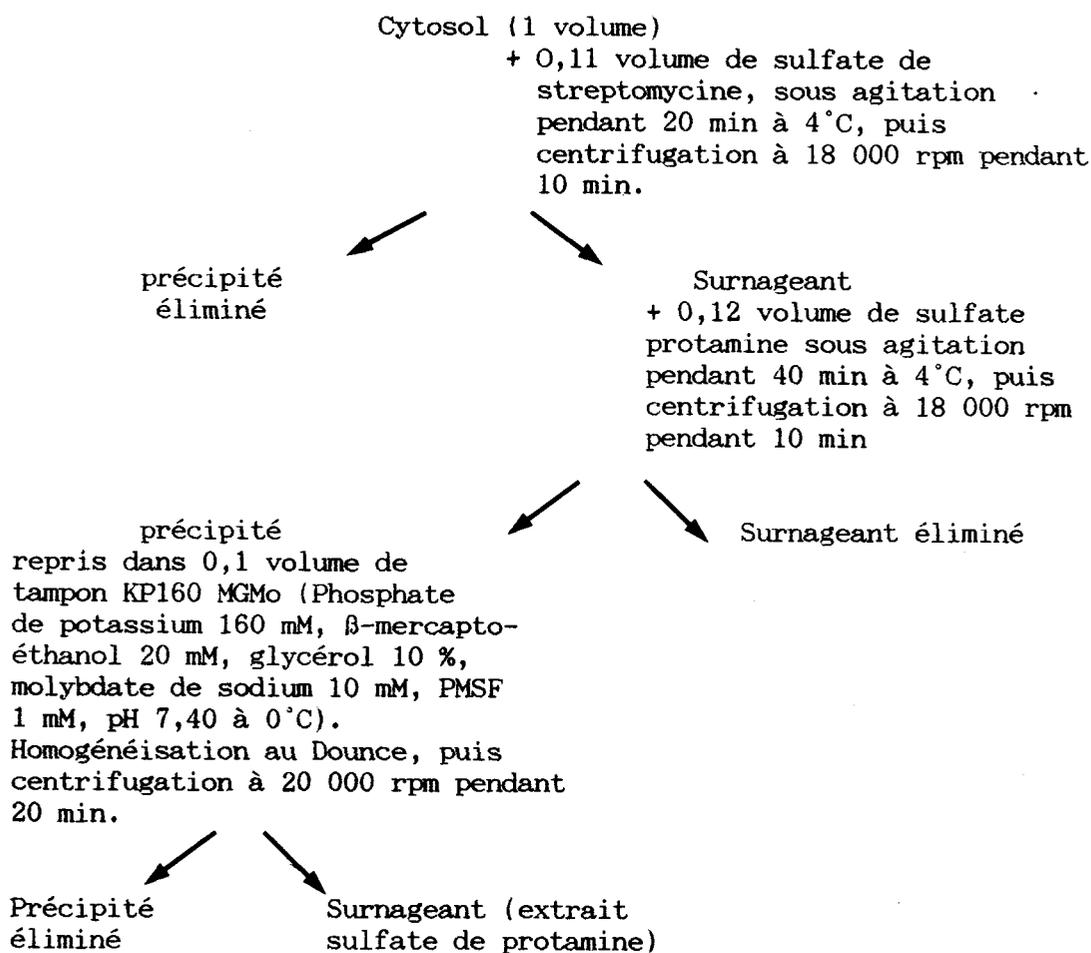
En dehors des cas où cela est précisé, toutes les manipulations sont opérées à 0-4°C. Des rats Wistar mâles (250 g de poids corporel) sont surrénalectomisés 3 à 5 jours avant d'être sacrifiés par décapitation sous anesthésie à l'éther éthylique. Leur foie est prélevé et perfusé à 0°C avec une solution de NaCl à 0,9 p. 100 puis avec le tampon d'homogénéisation. Les foies sont ensuite épongés de l'excès de tampon, pesés et homogénéisés à raison de 1,5 ml de tampon par gramme de tissu. Les tampons utilisés sont soit le TMGMo (Tes 10 mM, β -mercaptoéthanol 20 mM, glycérol 10 % (v/v), molybdate de sodium 10 mM et PMSF 1 mM, pH 7,40 à 0°C), soit le TMG (tampon identique mais ne contenant pas de molybdate de sodium). L'homogénéisation est effectuée 10 secondes au mixer (Ultra-Turax) et est complétée à l'appareil de Potter (téflon-verre) par cinq allers-retours à 2000 rpm. Après ultracentrifugation de l'homogénat à 55 000 rpm pendant 30 min (200 000 xg en rotor SW 60 Beckman), le surnageant clair est récupéré après élimination de la couche lipidique supérieure, ajusté à pH 7,40 et constitue le cytosol.

B) Liaison à l'hormone radioactive et transformation du récepteur *in vitro*.

Les échantillons cytosoliques sont incubés pendant 16 h. (ou 4h dans certaines expériences) avec 30×10^{-9} M d'acétonide de triamcinolone tritié (Amersham, 28 Ci/mmole) . La liaison non spécifique est mesurée par incubation en parallèle d'aliquotes des mêmes échantillons avec un excès de 500 fois d'acétonide de triamcinolone non radioactive. L'activité de liaison est mesurée après élimination du stéroïde libre en excès par adsorption sur charbon dextran (ROUSSEAU et al., 1972). Un volume d'échantillon cytosolique incubé avec l'hormone radioactive est mélangé avec un demi-volume d'une suspension contenant 3 % de charbon activé (Norit A) et 0,3 % de Dextran T-70. Après 10 secondes d'agitation au vortex, le mélange est laissé 15 min à 0°C et centrifugé 5 min à 4000 rpm. La transformation est effectuée à partir d'échantillons cytosoliques préparés en tampon TMG et chauffés au bain-marie à 25°C pendant 30 min.

C) Purification partielle du récepteur par extraction au sulfate de protamine (GOVINDAN et SEKERIS, 1978).

Après précipitation partielle des acides nucléiques par le sulfate de streptomycine à 10 % dans l'eau, le récepteur est précipité par addition de sulfate de protamine (0,75 % dans l'eau) selon le protocole suivant.



Le surnageant est utilisé immédiatement ou conservé à - 70°C en présence de 0,2 volume de glycérol. Des aliquotes sont récupérées pour dosage de l'activité de liaison et dosage des protéines. Ce protocole permet classiquement d'obtenir un échantillon de récepteur purifié six fois environ par rapport au cytosol, et contenant 8-10 mg/l de protéines et 30 à 50 x 10⁻⁹ M de récepteur.

D) Purification du complexe hormone-récepteur non transformé,
par chromatographie d'affinité.

Le protocole utilisé, détaillé dans un travail précédent (IDZIOREK, 1985) est résumé ici dans ses principales étapes : le gel d'affinité est réalisé au laboratoire par couplage de dexaméthasone oxydée sur un support Sepharose CL 4B préalablement activé au bromure de cyanogène, par l'intermédiaire d'un bras espaceur diamino-nonane (taux de greffage en stéroïde : 0,2 à 0,5 $\mu\text{mole/ml}$ de gel). 1 ml de gel d'affinité est mis en suspension pendant 15 h à 0°C avec 50 ml d'extrait sulfate de protamine. A l'arrêt du batch, le mélange est transféré sur une colonne IBF 25 et le gel est lavé à 0°C par trois tampons successifs (tampon KP160 MGMO 10 volumes, tampon KP20 MGMO 10 volumes, tampon KP20 MGMO complété avec 0,4 M KCl, 10-15 volumes puis tampon KP 160 MGMO 10 volumes). L'ensemble de ces lavages n'excède pas 60 min. Le récepteur est ensuite élué du gel d'affinité par incubation en présence de 5×10^{-6} M d'acétonide de triamcinolone tritié (activité spécifique finale : 5-7 Ci/mmole) pendant 4 h ou 15 h à 0°C. Le tampon d'éluion (KP160 MGMO) est utilisé à raison de 3 ml pour 1 ml de gel. L'éluat est alors recueilli et l'activité de liaison immédiatement mesurée par technique au charbon dextran ou par chromatographie de gel-filtration sur une colonne TSK GSWP (7,5 x 100 mm) selon le protocole de IDZIOREK (1985). L'éluat ainsi obtenu contient le récepteur purifié 3000 à 5000 fois (10 à 50 $\mu\text{g/ml}$ en protéines et 20 à 50 $\times 10^{-9}$ M en récepteur). Une purification

supplémentaire est réalisée par chromatographie d'exclusion de taille sur colonne TSK G4000 SW qui porte le taux de purification final à 9000-10 000 fois.

Une modification de ce protocole a été apportée afin d'obtenir le récepteur purifié à l'état transformé (Fig 37). Pour cela, un lavage supplémentaire du gel est effectué en tampon TRIS 10mM, NaCl 150 mM, dithiothréitol 2 mM, glycérol 10% pH 7.40. Puis, l'élution du récepteur est opérée immédiatement par le même tampon supplémenté en sérum-albumine "nuclease-free" (0.5 mg/ml) pendant 6h à 0°C en présence d'acétonide de triamcinolone tritié (5×10^{-6} M, activité spécifique 7 Ci/mmole).

II - MARQUAGE D'AFFINITE DU RECEPTEUR AU 21-MESYLATE DE DEXAMETHASONE TRITIE.

1) Le récepteur, précipité au sulfate de protamine, est repris en tampon KP160 Gmo (phosphate de potassium 160 mM, pH 8,0, molybdate de sodium 10 mM, 10 % glycérol et 1 mM PMSF). Les échantillons sont alors incubés avec 60×10^{-9} M de 21-mésylate de dexaméthasone tritié (activité spécifique : 50 Ci/mmole, NEN, Dupont de Nemours, France) pendant 90 min à 0-4°C. La liaison non spécifique est mesurée dans un échantillon incubé en parallèle en présence d'un ajout de $10 \cdot 10^{-6}$ M de dexaméthasone non radioactive.

2) Dans le cas particulier où le récepteur purifié a été caractérisé après liaison covalente au 21-mésylate de dexaméthasone

tritié (Fig. 24), le protocole suivant a été utilisé : lors de l'étape de chromatographie d'affinité, le récepteur est élué avec le tampon KP160 GMo en présence de 5×10^{-6} M de 21-mésylate de dexaméthasone tritié (activité ,spécifique finale 2,5 Ci/mmole) pendant 4 h à 0°C.

III - ETUDE DES PROPRIETES PHYSICOCHEMICHES DU RECEPTEUR NON TRANSFORME.

1) Mesure de la constante de sédimentation.

Elle est effectuée par ultracentrifugation en gradient de saccharose. Des gradients linéaires en saccharose (5 à 20 %, p/v) sont préparés soit en tampon KP160 MGMo, soit en tampon KP30 MGMo à l'aide d'une chambre à gradient (Beckman) et coulés à 0°C dans des tubes en pollyallomère de 4,5 ml. Les échantillons à centrifuger (quatre par série) sont déposés sur ces gradients et les tubes sont soumis à une centrifugation de 16h à 0°C à 55 000 rpm dans un rotor SW60 (Beckman) à godets horizontaux. La mesure des coefficients de sédimentation est réalisée par comparaison à des standards centrifugés dans le même rotor, et dont les coefficients de sédimentation ($S_{20,w}$) sont connus : catalase (11,3S), aldolase (7,8S), sérum albumine (4,3S) et peroxydase (3,6S). Pour assurer leur détection, ces standards ont été préalablement marqués au tritium par l'utilisation de ^3H N-succinimidyl-propionate selon la technique de BOLTON et HUNTER (1973). A l'arrêt de la centrifugation, les tubes sont ponctionnés par le fond

et des fractions de six gouttes sont recueillies et soumises à une mesure de radioactivité.

2) Mesure du rayon de Stokes

Elle est effectuée par chromatographie d'exclusion de taille à haute performance.

A - *Matériel :*

Le système chromatographique utilise une pompe 6000 A, un injecteur U6K équipé d'une boucle de 2 ml, et un spectrophotomètre 480 LC (Waters, Milford, Ma, USA). La récupération des fractions est assurée à l'aide d'un collecteur programmable, modèle 201 (Gilson, France). L'enregistrement de la densité optique à 280 nm et éventuellement de la pression en sortie de pompe est pratiquée par un enregistreur à deux canaux (LKB). On utilise une colonne TSK G4000 SW analytique (7,5 x 600 mm ou 7,5 x 300 mm) selon les cas. Dans certaines expériences, une colonne TSK G4000 SW préparative (21,5 x 600 mm) a été utilisée. Le système analytique est protégé par l'utilisation d'une précolonne TSK GSWP (7,5 x 100 mm).

B - *Elution*

Les échantillons injectés vont de 0,25 ml maximum dans le cas d'une colonne de 7,5 x 300 mm, 0,5 ml maximum (colonne de 7,5 x 600 mm) ou 2 ml (colonne de 21,5 x 600 mm) et sont filtrés dès l'entrée de la précolonne par la mise en place d'un fritté métallique (pores de

1 μm). L'élution est réalisée en tampon KP160 MMo sauf dans les expériences destinées à une analyse du contenu en ARN ou un tampon Tes 10 mM, NaCl 0,15 M, β -mercaptoéthanol 20 mM, molybdate de sodium 10 mM, pH 7,40 a été utilisé. Le débit varie de 0,5 ml/min (colonnes analytiques) à 3,5 ml/min (colonnes préparatives). Pendant toute la durée de l'analyse, la colonne et le réservoir de tampon sont placés dans un bain de glace. La pression obtenue en sortie de pompe est de 1,0 à 2 Mpa dans le cas des colonnes analytiques et de 4-4,5 Mpa pour la colonne préparative. Des fractions de 0,25 ml ou 0,50 ml (colonnes analytiques) ou de 1,75 ml (colonne préparative) sont collectées et soumises à une mesure de radioactivité. Le tampon d'élution est dégazé et filtré sur membrane Millipore HATF (0,45 μm) avant utilisation.

C - Calibration

On utilise un kit commercial (Pharmacia) contenant de la thyroglobuline ($R_s = 8,6$ nm), de la ferritine ($R_s = 6,1$ nm), de la catalase ($R_s = 5,2$ nm), de l'aldolase ($R_s = 4,7$ nm) et de la sérum albumine ($R_s = 3,6$ nm). Pour obtenir une calibration précise, nous y avons ajouté de l'IgM de rat pure ($R_s = 11,8$ nm) et de la β -galactosidase d'E. coli ($R_s = 6,9$ nm). Ces protéines standard sont utilisées à une concentration de 1 à 3 mg/ml et 0,1 ml sont injectées sur la colonne. Leur volume d'élution est détecté par absorbance UV à 280 nm. Le volume d'exclusion est mesuré par l'élution du Bleu dextran 2000 et par l'ADN de thymus de veau ($M_r = 2 \times 10^7$). Le volume total de la colonne est mesuré par l'élution du bichromate de potassium. La

calibration obtenue selon le modèle de PORATH (1963) est linéaire pour des valeurs de R_s comprises entre 3 et 11 nm (SABLONNIERE, 1987).

2 - Mesure des caractéristiques ioniques par chromatographie d'échange d'ions.

On utilise une colonne Ultropac TSK DEAE 545 préparative (21,5 x 150 mm) greffée par des groupements diéthylaminoéthyles. Le système gradient est réalisé par un chromatographe haute performance, en utilisant deux pompes 6000A pilotées par un programmeur de gradient M 660 (Waters, Milford, USA). La colonne est équilibrée en tampon K_2HPO_4 30 mM, molybdate de sodium 10 mM pH 7,40. Après injection, un délai de 20 min est respecté avant de démarrer le gradient d'élution en tampon K_2HPO_4 30 mM, molybdate de sodium 10 mM, KCl 0,5 M, pH 7,40, pendant 40 minutes à un débit de 3,5 ml/min. Des fractions de 3,5 ml sont collectées et des aliquotes de 0,35 ml sont mesurées en radioactivité. Des aliquotes sont également dosées en potassium par photométrie de flamme pour le contrôle du gradient d'élution en KCl. Un échantillon de 3 ml d'extrait sulfate de protamine préalablement incubé avec le mésylate de dexaméthasone est dilué avec un tampon K_2HPO_4 10 mM, pH 7,40 pour ajuster la force ionique finale à 30 mM en potassium. L'échantillon est alors concentré 3 à 4 fois sur membrane Diaflo YM 30, avant d'être injecté sur la colonne.

3 - Caractérisation des propriétés d'hydrophobicité des complexes hormone-récepteur.

Elle est réalisée par chromatographie d'interaction hydrophobe en mode haute performance en utilisant une colonne TSK phenyl 5 PW (7,5 x 75 mm) (Beckman, France). Le système chromatographique utilise deux pompes 6000 A contrôlées par un programmeur de gradient M660 (Waters, Milford, USA). La colonne est équilibrée en tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,0 contenant 1,8 M de sulfate d'ammonium, à température ambiante. 10 minutes de lavage à un débit de 0,5 ml/min sont respectées avant le démarrage du gradient, linéaire en tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,00 pendant 30 min. Les tampons sont dégazés et filtrés sur membrane Millipore HATF de 0,45 µm de porosité avant utilisation. Des échantillons de 0,15 à 0,20 ml sont injectés sur la colonne et des fractions de 0,5 ml sont collectées tout au long du gradient. Le gradient est contrôlé par un (pH-ions) conductimètre (IBF, Villeneuve-la-Garenne, France). Des aliquotes de 0,1 ml des fractions sont mesurées en radioactivité.

IV - METHODES ELECTROPHORETIQUES (ANALYSE DES PROTEINES)

L'analyse de la masse moléculaire est effectuée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl-sulfate de sodium (SDS) selon la technique de LAEMMLI (1970).

A - Matériel

La solution d'acrylamide est utilisée, soit en concentration constante dans le gel de migration (7,5 %), soit en gradient linéaire (5-15 %) ou (4 à 8 %) selon les indications précisées dans le texte. La polymérisation s'effectue en tampon Tris 10 mM, pH 6,8 en présence de 0,1 % SDS et 0,03 % de TEMED. Le rapport acrylamide/bisacrylamide est de 37,5. Le gel de concentration est utilisé dans le tampon Tris 10 mM, pH 6,8 avec une concentration de 3 % en acrylamide. Le tampon d'électrophorèse est constitué de Tris 2,5 mM, pH 8,3, glycolle 200 mM, SDS 0,1 %.

B - Protocole

Un bouchon d'acrylamide est coulé (5 ml + 50 µl de persulfate d'ammonium à 10 % (p/v)) entre deux plaques de verre de 150 x 100 mm maintenant une épaisseur de gel de 1,5 mm. 30 ml de la solution d'acrylamide sont ensuite déposés en présence de 60 µl de persulfate d'ammonium. Après 10 minutes de polymérisation à 50°C, le gel de concentration est coulé (7,5 ml) et un peigne à 10 dents est ajouté immédiatement. Après une pré-électrophorèse, des aliquotes de 0,05 à 0,1 ml des échantillons à analyser sont déposés dans les puits avec

0,001 % de bleu de bromophénol après dénaturation pendant 5 min à 100°C en présence de 2,5 % SDS, 5 % de β -mercaptoéthanol et 10 % de glycérol. Le champ électrique est appliqué à courant constant de 35 mA pendant 4 heures. La cuve d'électrophorèse est maintenue à température constante pendant l'analyse grâce à un courant d'eau à 15°C.

C - Conditions particulières, propres à certaines expériences

1 - Révélation des protéines après migration en électrophorèse

Dans le cas de l'analyse du récepteur purifié (Fig. 22 et 37), la technique de révélation au nitrate d'argent a été utilisée (MARSHALL, 1984) et résumée ci-après dans ses grandes lignes : le gel est fixé avec une solution d'acide acétique 10 % et de méthanol à 50 % pendant une nuit. Il est ensuite incubé à 60°C en présence de 0,1 % de formaldéhyde. Il est alors coloré avec le nitrate d'argent ammoniacal, jusqu'à l'obtention d'un miroir d'argent. La décoloration s'effectue en présence d'une solution saline de sulfate de cuivre ammoniacale contenant du thiosulfate de sodium, puis est terminée par l'utilisation d'un bain éclaircissant (Kodak).

2) Révélation du récepteur marqué covalentiellement au 21-mésylate de dexaméthasone.

Pour augmenter la concentration en récepteur dans les échantillons analysés en électrophorèse, les fractions provenant du fractionnement sur colonne TSK G 4000 SW sont concentrées sur membrane AMICON YM10 en utilisant un appareil DIAFLO alimenté en azote (2 bars). Le taux de concentration obtenu varie de 3 à 8 avec un

rendement de 60 à 80 %. Dans le cas où la concentration protéique est inférieure à 30 µg/ml, on réalise une précipitation des protéines avec 12 % d'acide trichloroacétique en présence de 0,1 mg/ml de désoxycholate de sodium (Fig. 24). Ces opérations permettent d'augmenter la concentration finale en récepteur détectée en électrophorèse, compte-tenu du fait que le rendement de liaison covalente du mésylate n'excède pas 10 à 15 %.

Après migration électrophorétique, le gel est coloré avec du méthanol 25 %, acide trichloroacétique 25 % contenant 1 g/l de bleu de Coomassie R250, pendant 2 heures. Il est ensuite décoloré avec du méthanol 25 %, acide acétique 8 %. Les couloirs de migration sont alors découpés en tranches de 2 ou 3 mm de large selon les cas. Chaque tranche de gel est ensuite dissoute avec 0,2 ml d'eau oxygénée (30 %) à 55°C pendant 16 heures. Le contenu en radioactivité est alors mesuré au compteur à scintillation.

D) Calibration

Elle utilise un kit commercial (BIORAD, HMW et LMW) contenant de la myosine (Mr 200 000), de la β -galactosidase (Mr 116 000), de la phosphorylase B (Mr 97 400), de la sérumalbumine (Mr 67 000), de l'ovalbumine (45 000), de l'anhydrase carbonique (30 000) et de l'inhibiteur trypsique de soja (21 000).

Dans le cas des expériences de pontage au glutaraldéhyde, un kit de protéines polymérisées (BDH, ref. 44 230 2R) a été utilisé. Sa masse moléculaire s'échelonne de 56 000 pour le monomère à 280 000 pour le pentamère.

V - MARQUAGE COVALENT DES PROTEINES A L'AIDE D'UN TRACEUR RADIOACTIF

1 - Marquage au réactif de BOLTON et HUNTER (1973)

Le réactif 2,3 ^3H N-succinimidyl-propionate (100 Ci/mmole) est utilisé en formant une liaison covalente avec les ϵ -NH₂ des résidus de lysine. Le récepteur purifié (30 à 100 picomoles) est précipité par l'acide trichloracétique pendant 1h à 0°C dans un tube micro-vial (PIERCE) de 1 ml. Après élimination du surnageant et ajustement à pH 8,00 avec 5 μl de soude normale, un excès de 4 fois du réactif (120 à 400 picomoles) est ajouté et incubé avec 100 μl de tampon borate de sodium 0,1 M, pH 8,50 pendant 30 min à 0°C. A la fin de la réaction, le récepteur est débarrassé de l'excès de réactif libre par filtration sur gel, sur une colonne de haute performance TSK GSWP (7,5 x 100 mm). Les fractions récupérées à l'exclusion contenant le récepteur radioactif sont aliquotées et utilisées immédiatement en électrophorèse.

2 - Marquage à l'Iode 125 (BOLTON, 1977).

1 ml d'éluat de chromatographie d'affinité (30 $\mu\text{g/ml}$ en protéines) est concentré sur membrane YM30 (DIAFLO) après lavage de la membrane par 0,5 mg d'ovalbumine, pour éviter la perte de récepteur par adsorption non spécifique sur la membrane. Après concentration, l'échantillon récupéré (0,15 ml) est incubé avec 0,5 mCi d'iodure de sodium (I^{125} Na, 16,7 mCi/ μg , AMERSHAM, FRANCE) et 10 μl de chloramine T

(solution à 10 mg/ml) pendant 2 minutes à 20°C, en agitant au Vortex. Sont alors ajoutés immédiatement 25 µl de métabisulfite de sodium (solution à 10 mg/ml) puis 50 µl d'Iodure de sodium (2 mg/ml en tampon phosphate de sodium 0,05 M, pH 7,50 contenant 2 mg/ml de lysozyme). L'incubat est ensuite fractionné sur une colonne TSK G3000 SW (7,5 x 300 mm). Le pic élué ($R_s = 7$ nm) est récupéré et analysé en électrophorèse suivie d'autoradiographie. Après séchage du gel, celui-ci est mis en contact avec un film KODAK X-AR-5 pendant 15 jours à -70°C.

VI - RETICULATION DU RECEPTEUR AU GLUTARALDEHYDE

Après fractionnement sur colonne TSK G4000 SW, les fractions contenant le récepteur sont rassemblées et incubées pendant 1 h à 0°C avec 0,4 % de glutaraldéhyde. La réaction est alors arrêtée par l'addition de TRIS ajusté à une concentration finale de 50 mM. L'incubat est alors concentré à 3 à 4 fois sur appareil DIAFLO avec une membrane YM10, et le concentrat est utilisé directement pour la mesure de la masse moléculaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu SDS, en utilisant un gradient de 4 à 8 % en acrylamide.

VII - REVELATION IMMUNOLOGIQUE DU RECEPTEUR ET DE LA PROTEINE HSP 90.

1 Technique du Western-blot (TOWBIN *et al.*1979).

Après électrophorèse en gel de polyacrylamide (7,5 % en acrylamide) des échantillons à étudier, le gel est placé en contact d'une feuille de nitrocellulose Schleicher et Schull BA 85 dans un appareil d'électrotransfert LKB 2005 contenant un tampon TRIS 25 mM, pH 8,3, glycolle 150 mM, méthanol 20 %. Le transfert est effectué en 5 heures à 60V ou en 16 heures à 20V en maintenant la cuve à température constante par une circulation réfrigérante à 10-12°C. La feuille de nitrocellulose est ensuite incubée en tampon TBS (Tris 10 mM, pH 7,40, NaCl 150 mM) contenant 5 % de lait en poudre. Elle est incubée alors avec l'anticorps choisi (GR 49, liquide d'ascite dilué au 1:400^e), soit anticorps AC88 (liquide d'ascite dilué au 1:1000^e) en tampon TBS contenant 0,1 % de TWEEN 20 pendant 2 heures à température ambiante. Les anticorps non fixés sont lavés par trois fois avec le tampon TBS. La révélation des complexes antigène-anticorps est alors réalisée à l'aide d'une incubation de 2 heures avec des anticorps de chèvre anti-souris conjugués à la peroxydase de Raifort (Institut Pasteur). Après trois lavages en TBS, les bandes d'antigènes sont révélées par incubation de la feuille de nitrocellulose avec le 4-chloro-naphtol (50 mg dissous dans 17 ml de méthanol) et ajustées à 100 ml avec du TBS, supplémenté extemporanément avec 60 µl d'eau oxygénée à 30 %.

2 - Technique du Dot-Blot

Des échantillons de 0,2 ml sont déposés dans des puits à l'aide d'un appareil de microfiltration Bio-Dot (96 trous, Bio-Rad, USA) et imprègnent une feuille de nitrocellulose par gravité pendant 2 heures. Le nombre élevé de puits permet de tester un fractionnement chromatographique complet. L'incubation avec les anticorps utilisés (anticorps monoclonal anti-récepteur GR 49 ou anticorps AC88 anti-HSP 90) ainsi que les lavages et la révélation par les anticorps marqués à la peroxydase sont utilisés dans les mêmes conditions que celles rapportées dans le paragraphe précédent.

VIII - PREPARATION DES 17 β -CARBOXAMIDES BIFONCTIONNELS

Le protocole détaillé de synthèse de ces dérivés a été précédemment décrit (FORMSTECHEER, 1986). 1 mCi (25 nanomoles) de 1,2(n)³H dexaméthasone subit une oxydation périodique (solution d'acide périodique à 10 % dans le méthanol) pendant 5 heures à 20°C. La dexaméthasone oxydée radioactive est purifiée par HPLC en phase inverse sur une colonne Nucléosil C18 (colonne de 4,7 x 250 mm). On prépare ensuite l'ester activé par incubation avec l'hydroxybenzotriazole en présence de dicyclohexyl carbodiimide. Le couplage à l'amine est alors effectué en présence d'un excès 2 fois molaire de diammonononane par rapport à la concentration en 17 β -carboxamide pendant 3 heures à 20°C, dans le tétrahydrofurane. La purification du produit obtenu (bis-17 β -carboxamide) est réalisée par HPLC en phase inverse. A chaque étape, des contrôles analytiques des produits

obtenus sont réalisés par chromatographie sur couche mince en utilisant des plaques de gel de silice 0,25 mm F254 (Merck). Le système solvant utilise un mélange chloroforme-méthanol (4/1) en atmosphère saturée d'ammoniaque.

IX - CARACTERISATION D'UNE MOLECULE D'ARN

1 - Conditions d'incubation avec les ribonucléases

La ribonucléase A (pancréas de boeuf, 90 U/mg, 10 mg/ml) est chauffée à 100°C pendant 20 min pour inactiver les protéases et les désoxyribonucléases. Le tube doit être refroidi lentement à température ambiante pour éviter une dénaturation irréversible de l'enzyme. Les autres ribonucléases (protéine S de la ribonucléase, nucléase S1 d'*Aspergillus orizae* (100 000 U/mg) et la ribonucléase de venin de cobra (*naja naja oxiana*, 10 U/mg) qui ne peuvent être chauffées sans dénaturation irréversible, sont utilisées en présence d'inhibiteurs de protéases (1 mM leupeptine et 1 mM de chymostatine). Le cytosol est complété avec 1 ml ZnCl₂ et 1 mM MgCl₂ lorsque la nucléase S₁ est utilisée et supplémentée par 10 mM MgCl₂ lorsque la ribonucléase de venin de cobra est utilisée.

2 - Précautions particulières à respecter pour l'analyse du contenu en ARN des fractions de chromatographie

La verrerie utilisée tout au long de la préparation de l'extrait sulfate de protamine et du récepteur purifié est stérilisée à 250°C pendant 4 heures. Le matériel plastique est autoclavé. Tous les tampons sont incubés en présence de 0,1 % de diéthylpyrocarbonate pendant 16 heures avant d'être autoclavés. Le support d'affinité utilisé est lavé avec une solution d'urée 8M puis avec du méthanol à 50 %. Le port de gants en latex est respecté pendant toute les manipulations de préparation des tampons et de purification du récepteur. D'autre part, les extraits de sulfate de protamine utilisés pour la purification du récepteur sont supplémentés en inhibiteur placentaire de ribonucléase A (RNasine, 30 à 50 U/ml).

3 - Marquage et identification des molécules d'ARN

Les fractions à analyser (0,5 à 2 ml) sont traitées par du phénol pur (v/v) puis par du chloroforme (v/v) (trois extractions). La phase aqueuse récupérée est extraite par 2,5 volumes d'éthanol et 0,1 volume de tampon acétate de sodium 3 M. Après centrifugation, le culot contenant l'ARN précipité est repris dans l'eau et incubé avec 100 µCi de cytidine 3'-5' 5'-³²P bis phosphate (3000 Ci/mme, 1 mCi/ml, Amersham, France), 2 à 4 U de T4 RNA ligase (Boehringer) et 3,3 µmoles d'ATP pendant 5 heures à 4°C, selon le protocole de marquage des ARN (extrémités 3') de D'ALESSIA (1982). L'efficacité de marquage est

contrôlée par mesure de la radioactivité insoluble après précipitation d'une aliquote de 2 μ l de l'incubat avec une solution d'acide trichloroacétique à 10 % et recueil sur filtres de GFC. La réaction est stoppée par ajout d'un volume égal de phénol et l'ARN est précipité de la phase aqueuse par précipitation à l'éthanol. Le culot est ensuite dissous dans la formamide à 80 %, dénaturé pendant 2 min à 100°C et déposé en électrophorèse. La migration s'effectue dans un gel d'acrylamide à 10%, contenant 0,37% de bis-acrylamide et de l'urée 7M; selon les conditions décrites par D'ALESSIA (1982). La calibration du gel utilise un extrait d'ARN cellulaire total (préparé à partir de cellules HTC préalablement incubées *in vitro* en présence d'Uridine tritiée, ECONOMIDIS et ROUSSEAU, 1985) soumis également à l'électrophorèse. L'identification de la taille des ARN est réalisée par comparaison aux données de ZIEVE (1981). Après migration, le gel est séché et exposé sur un film XAR-5 (Kodak) en présence de deux écrans intensifiants (Dupont) pendant 1 à 8 jours selon les cas.

X - DIVERS

La radioactivité (tritium) est mesurée avec un compteur bêta à scintillation (1214 Rack B LKB-Wallac, Suède). On utilise des scintifioles de 6 ml contenant 4 ml de cocktail scintillateur (Aqualyte) et donnant une efficacité de comptage de 50 %.

Le dosage des protéines est réalisé selon une modification du protocole de READ et al. (1981) décrite par IDZIOREK (1985). Après liaison du bleu de Coomassie G 250 aux protéines en milieu acide, l'absorbance est mesurée à 595 nm (méthode automatisée sur analyseur

COBAS BIO), avec une prise d'essai de 15 à 60 μ l selon la gamme d'étalonnage de sérum-albumine utilisée.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Agnati, F.F., Fuxe, K., Yu, Z.U., Harfstrand, A., Okret, S., Wikstrom, A.C., Golstein, M., Zoli, M., Vale W., Gustafsson, J.A. (1985)
Morphometrical analysis of the distribution of corticotrophin releasing factor, glucocorticoid receptor and phenylethanolamine-N-methyltransferase immunoreactive structures in the paraventricular hypothalamic nucleus of the rat. *Neuro. Sci. Lett.* 54 : 147.

Ali, M. and Vedeckis, W.V. (1987a)
Interaction of RNA with transformed glucocorticoid receptor. I. Isolation and purification of the RNA. *J. Biol. Chem.* 262 : 6771-6777.

Ali, M. and Vedeckis, W.V. (1987b)
Interaction of RNA with transformed glucocorticoid receptor. II. Identification of the RNA as transfer RNA. *J. Biol. Chem.* 262 : 6778-6784.

Ali, M. and Vedeckis, W.V. (1987c)
The glucocorticoid receptor protein binds to transfer RNA. *Science*, 235 : 467-469.

Andersen, J. (1987)
A model for the interaction of nucleic acid with transcription factor TFIIIA. *FEBS LETT.* 217 : 197-202.

Andreasen, P.A. and Gehring, U. (1981)
Activation and partial proteolysis of variant glucocorticoid receptors, studied by two-phase partitioning. *Eur. J. Biochem.* 120 : 443-449.

Andreasen, P.A. (1982)
Changes in net charge of glucocorticoid receptors by activation, and evidence for biphasic activation kinetics. *Mol; Cell. Endocrinol.* 28 : 563-586.

Andreasen, P.A. (1983)
Mol. Cell. Endocrinol. 30 : 229-239.

Antakly, T., Eisen, H.J., (1984)
Immunocytochemical localization of glucocorticoid receptor in target cells. *Endocrinology* 115 : 1984-1988.

Aranyi, P., Radanyi, C, Renoir, J.M. Devin, J. and Baulieu, E.E. (1988)
Covalent stabilization of the nontransformed chick oviduct cytosol progesterone receptor by chemical cross-linking. *Biochemistry* 27 : 1330-1336.

Atger, M., Milgrom, E. (1976)

Chromatographic separation on phosphocellulose of activated and nonactivated forms of steroid receptor complex. Purification of the activated complex. *Biochemistry* 15 : 4298-4304.

Barrack, F.R. (1983)

The nuclear matrix of the prostate contains acceptor sites for androgen receptors. *Endocrinology* 113 : 430-433.

Baxter, J.P. and Forsham, P.H. (1972)

Tissue effects of glucocorticoids. *Amer. J. Med.* 53 : 573-584.

Beato, M., Biesewig, D., Braendle, W. and Sekeris, C.E. (1969)

On the mechanism of hormone action. Subcellular distribution and binding of ^3H cortisol in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 192 : 494-507.

Beato, M., Braendle, W., Biesewig, D. and Sekeris, C.E. (1970)

On the mechanism of hormone action. Transfer of ^3H cortisol from the cytoplasm to the nucleus of rat liver cells. *Biochim. Biophys. Acta* 208 : 125-136.

Ben-Or, S., Chrambach, A. (1983)

Heterogeneity of the glucocorticoid receptors : molecular transformation during activation detected by electrofocusing. *Arch. Biochem. Biophys.* 221 : 343-353.

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.

Besedowski, H., Delrey, A., Sorkin, E., Dinarello, C.A. (1986)

Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 233 : 652-655.

Birnbaumer, M., Schrader, W.T. and O'Malley, B.W. (1983)

Assesment of structural similarities in chick oviduct progesterone receptor subunits by partial proteolysis of photoaffinity-labeled proteins. *J. Biol. Chem.* 258 : 7331-7337.

Blicq, S., Danzé, P.M., Dumur, V., Formstecher, P. and Dautrevaux, M. (1988)

Inhibition of glucocorticoid receptor transformation, subunit dissociation and temperature-dependent inactivation by various N-substituted maleimides. *Biochemistry*, in press.

Bodine, P.V. and G. Litwack (1988)

Purification and structural analysis of the modulator of the glucocorticoid-receptor complex. *J. Biol. Chem.* 263 : 3501-3512.

- Bodwell, J.E., Holbrook, N.J., Munck, A. (1984)**
Evidence for distinct sulfhydryl groups associated with steroid and DNA binding domains of rat thymus glucocorticoid receptors. *Biochemistry* 23 : 4337-4242.
- Bolton, A.E. and Hunter, W.M. (1973)**
The labeling of protein to high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}I containing acylating agent. *Biochem. J.* 133 : 529-539.
- Bolton, A.E. (1977)**
The radioiodination technique (review 18) Ed. by The Radiochemical Center, Amersham, England.
- Bonner, W.M. (1978)**
Protein migration and accumulation in nuclei. In "The cell nucleus" (Ed. H. Busch) 6 : 97-148, New-York, Acad. Press.
- Brimacombe, R. (1988)**
The emerging three-dimensional structure and function of 16S ribosomal RNA. *Biochemistry* 27 : 4207-4213.
- Brown, R.S., Sander, C. and Argos, P. (1985)**
The primary structure of the transcription factor TFIIIA has 12 consecutive repeats. *FEBS Lett.* 186 : 271-274.
- Cake, M.H., Di Sorbo, D.M. and Litwack, G. (1978)**
Effect of pyridoxal phosphate on the DNA-binding site of activated hepatic glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 253 : 4886-4891.
- Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.A. and Wrangé, O. (1977)**
Formation and characterization of hepatic dexamethasone-receptor complexes of different molecular weight. *Biochim. Biophys. Acta* 497 : 507-524.
- Carlstedt-Duke, J., Okret, S., Wrangé, 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., Stromstedt, P.E., Persson, B., Cederlund, E., Gustafsson, J.A. and Jornvall, H. (1988)**
Identification of hormone-interacting amino-acid residues within the steroid-binding domain of the glucocorticoid receptor in relation to other steroid hormone-receptors. *J. Biol. Chem.* 263 : 6842-6846.
- Cato, A.C., Geisse, S., Wenz, M., Westphal, H.M. and Beato, M. (1984)**
The nucleotide sequences recognized by the glucocorticoid receptor in the rabbit uteroglobin gene region are located far upstream from the initiation of transcription. *EMBO J.*, 3 : 2771-2778.

- Chong, M.T. and Lippman, M.E. (1982)**
Effects of RNA and ribonuclease on the binding of estrogen and glucocorticoid receptors from MCF-7 cells to DNA-cellulose. *J. Biol. Chem* 237 : 2996-3002.
- Collier, N.C., Schlesinger, M.J. (1986)**
The dynamic state of heat shock proteins in chicken embryo fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 103 : 1495-1507.
- Colvard, D.S. and Wilson, E.M. (1981)**
Identification of an 8S androgen receptor-promoting factor that converts the 4.5S form of the androgen receptor to 8S. *Endocrinology* 109 : 496-505.
- Cordingley, M.G., and Hager, G. (1988)**
Binding of multiple factors to the MMTV promoter in crude and fractionated nuclear extracts. *Nucl. Acid. Res.* 16 : 689-705.
- Cote, G.J. and Gagel, R.F. (1986)**
Dexamethasone differentially affects the levels of calcitonin and calcitonin gene-regulated peptide mRNAs expressed in a human medullary thyroid carcinoma cell line. *J. Biol. Chem.* 33 : 15524-15528.
- 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.
- D'Alessia, J.M. (1982)**
in "Gel electrophoresis of nucleic acids", 1st edn (Rickwood D. and Hames B.D. eds) pp 173-197, IRL Press, Oxford.
- Danielsen, M., Northrop, J.P. and 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.
- Danzé, P.M., Formstecher, P., Richard, C., Dautrevaux, M. (1987)**
Microheterogeneity of agonist and antagonist glucocorticoid receptor complexes detected by isoelectric focusing and modifications induced by receptor activation. *Biochim. Biophys. Acta* 927 : 129-138.
- 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.
- Dellweg, H.G., Hotz, A., Mugele, K. and Gehring, U. (1982)**
Active domains in wild-type and mutant glucocorticoid receptors. *EMBO J.* 1 : 285-289.

Denis, M., Wikstrom, A.C. and Gustafsson, J.A. (1987).
The molybdate-stabilized nonactivated glucocorticoid receptor contains a dimer of Mr 90,000 non-hormone binding proteins. *J. Biol. Chem.* 262 11803-11806.

De Robertis, E.M. (1983)
Nucleocytoplasmic segregation of proteins and RNAs. *Cell.*, 32 : 1021-1025.

Distelhorst, C.W. and Benutto, B.M. (1985).
Activation of the rat liver cytosol glucocorticoid receptor by Sephacryl S-300 filtration in the presence and absence of molybdate. *J. Biol. Chem.*, 269 : 2153-2160.

Dougherty, J.J., Puri, R.K. and Toft, D.O. (1984).
Polypeptide components of two 8S forms of chicken oviduct progesterone receptor. *J. Biol. Chem.*, 259 : 8004-8009.

Eberwine, J.H. and Roberts, J.L. (1984).
Glucocorticoid regulation of pro-opiomelanocortin gene transcription in the rat pituitary. *J. Biol. Chem.*, 259 : 2166-2170.

Eckert, R.L. and Katzenellenbogen, B.S. (1982).
Physical properties of estrogen receptor complexes in McF7 human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 257 : 8840-8846.

Economidis, I.V. and Rousseau, G.G. (1985).
Association of the glucocorticoid hormone receptor with ribonucleic acid. *FEBS Lett.*, 181 : 47-52.

Eisen, H.J., Schleenbaker, R.E. and Simons, S.S. (1981).
Affinity labeling of the rat liver glucocorticoid receptor with dexamethasone 21-mesylate. *J. Biol. Chem.*, 256 : 12920-12925.

Eliard, P.H., Marchand, M.J., Rousseau, G.G., Formstecher, P., Mathy-Hartaert, M., Belayew, A. and Martial, J.A. (1985).
Binding of the human glucocorticoid receptor to defined regions in the human growth hormone and placental lactogen genes. *DNA*, 4 : 409-417.

Evans, R.M. (1988)
The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240 : 889-895.

Evans, R.M. and Hollenberg, S.M. (1988).
Zinc fingers : Gilt by association. *Cell*, 52 : 1-3.

Expert-Bezancon, A. and Wollenzien, P. (1985).
Three-dimensional arrangement of the *Escherichia Coli* 16S ribosomal RNA.

Favorova, O.O., Fasiolo, F., Keith, G, Vassilenko, S.K. and Ebel, J.P. (1981).

Partial digestion of tRNA-aminoacyl-tRNA synthetase complexes with cobra venom ribonuclease. *Biochemistry*, 20 : 1006-1011.

Feldman, M., Kallos, J. and Hollander, V.P. (1981).

RNA inhibits estrogen receptor binding to DNA. *J. Biol. Chem.*, 256 : 1145-1148.

Finley, D. and Varshavsky, A. (1985).

The Ubiquitin system : functions and mechanisms. *TIBS*, 10 : 343-347.

Firestone, G.L. and Yamamoto, K.R. (1983).

Two classes of mutant mammary tumor virus-infected HTC cells with defects in glucocorticoid-regulated gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 3 : 149-155.

Formstecher, P. (1986).

Le site de liaison aux stéroïdes du récepteur des glucocorticoïdes. Caractérisation à l'aide de sondes moléculaires diverses.

Thèse de Doctorat ès-Sciences naturelles. Université des Sciences et Techniques de Lille 1.

Freedman, L.P., Luisi, B.F., Korszun, Z.R., Baravappa, R., Sigler, P.B. and Yamamoto, K.R. (1988).

The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature*, 334 : 543-546.

Fulton, R., Birnie, G.D. and Knowler, J.T. (1985).

Post-transcriptional regulation of rat liver gene expression by glucocorticoids. *Nucleic Acids Res.*, 13 : 6467-6473.

Gannon, F., O'Hare, K., Perrin, F., Le Pennec, J.P., Benoist, C., Cochet, M., Breathnach, R., Royal, A., Garapin, A., Cami, B. and Chambon, P. (1979).

Organisation and sequences at the 5' end of a cloned complete ovalbumin gene. *Nature*, 278 : 428-434.

Gasc, J.M., Renoir, J.M., Radanyi, C., Joab, I., Tuohimä, P. and Baulieu, E.E. (1984).

Progesterone receptors in the chick oviduct. *J. Cell. Biol.*, 99 : 1193-1201.

Gehring, U. and Arndt, H. (1985).

Heteromeric nature of glucocorticoid receptors, *FEBS Lett.*, 179 : 138-142.

Gehring, U. and Holtz, A. (1983).

Photoaffinity labeling and partial proteolysis of wild-type and variant glucocorticoid receptors. *Biochemistry*, 22 : 4013-4018.

Geisse, S., Scheidereit, C., Westphal, H.M., Hynes, N.E., Groner, B. and Beato, M. (1982).

Glucocorticoid receptors recognize DNA sequences in and around murine mammary tumor virus DNA. *EMBO J.*, 1 : 1613-1619.

Giguere, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G. and Evans, R.M. (1986).
Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*, 46 : 645-652.

Godowski, P.J., Rusconi, S., Miesfeld, R. and Yamamoto, K.R. (1987).
Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activators of transcriptional enhancement. *Nature*, 325 : 365-368.

Gooding, D.L., Schmuck, M.N. and Gooding, K.M. (1984).
Analysis of proteins with new, mildly hydrophobic high-performance liquid chromatography packing materials. *J. Chromatogr.*, 296 : 107-114.

Gorski, J., Toft, D.O., Shyamala, G., Smith, D. and Notides, A. (1968)
Hormone receptors : studies on the interaction of estrogen with the uterus. *Rec. Prog. Horm. Res.*, 24 : 45-80.

Govindan, M.V. (1979)

Purification of glucocorticoid receptors from rat liver cytosol. Preparation of antibodies against the major receptor proteins and application of immunological techniques to study activation and translocation. *J. Steroid. Biochem.*, 11 : 323-331.

Govindan, M.J. and Sekeris, C.E. (1978).

Purification of two dexamethasone-binding proteins from rat liver cytosol. *Eur. J. Biochem.*, 89 : 95-104.

Govindan, M.V., Spiess, E. and Majors, J. (1982).

Purified glucocorticoid receptor-hormone complex from rat liver cytosol binds specifically to cloned mouse mammary tumor virus long terminal repeats *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 79 : 5157-5161.

Grandics, P., Miller, A., Schmidt, T.J., Mittman, D. and Litwack, G. (1984 a).

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

Grandics, P., Miller, A., Schmidt, T.J. and Litwack, G. (1984 b).

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

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

Oestradiol induction of a glucocorticoid-responsive gene by a chimeric receptor. *Nature*, 325 : 75-78.

- Groner, B., Ponta, H., Beato, M. and 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. Endocrin.*, 32 : 101-116.
- Guertin, M., Baril, P., Bartkowiak, J. Anderson, A. and Belanger, L. (1983).
Rapid suppression of α_1 -foetoprotein gene transcription by dexamethasone in developing rat liver. *Biochemistry*, 12 : 4296-4302.
- Gustafsson, J.A., Carlstedt-Duke, J., Wrangé, O., Okret, S. and Wikstrom, A.C. (1986).
Functional analysis of the purified glucocorticoid receptor. *J. Steroid. Biochem.*, 24 : 63-68.
- Gustafsson, J.A., Carlstedt-Duke, J., Poellinger, L., Okret, S., Wikstrom, A.C., Bronnegard, M., Gillner, M., Yu, D., Fuxe, K., Cintra A., Harfstrand, A. and Agnati, L. (1987).
Biochemistry, Molecular Biology and physiology of the glucocorticoid receptor. *Endocrine Reviews*, 8 : 185-234.
- Hall, M.N., Hereford, L. and Herskowitz, I. (1984).
Targeting of E.Coli β -galactosidase to the nucleus in yeast. *Cell*, 36: 1057-1065.
- Hermann, R. Rudolph, R. and Jaenicke, R. (1979).
Kinetics of the *in vitro* reconstitution of oligomeric enzymes by cross-linking. *Nature*, 277 : 243-245.
- Higgins, J.J., Rousseau, G.G., Baxter, J.D. and Tomkins, G.M. (1973)
Early events in glucocorticoid action. Activation of the steroid receptor and its subsequent specific nuclear binding studied in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* 248 : 5866-5872.
- Holbrook, N.J., Bodwell, J.E., Jeffries, M. and Munck, A. (1983)
Characterization of non-activated glucocorticoid receptor complexes from intact rat thymus cells. *J. Biol. Chem.*, 258 : 6477-6485.
- Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G. and Evans, R.M. (1985)
Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*, 318 : 635-641.
- Hollenberg, S.M., Giguere, V., Segui, P. and Evans, R.M. (1987)
Colocalisation of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor. *Cell*, 49: 39-46.
- Horwitz, K.B. and Alexander, P.S. (1983)
In situ photolinked nuclear progesterone receptors of human cancer cells. Subunit molecular weights after transformation and translocation. *Endocrinology*, 113 : 2195-2202.

- Horz, Q. and Zachau, H.G. (1973)**
Complexes of aminoacyl-tRNA synthetases with tRNA as studied by partial nuclease digestion. *Eur. J. Biochem.* 32 : 1-14.
- Housley, P.R., Pratt, W.B. (1983)**
Direct demonstration of glucocorticoid receptor phosphorylation in intact L-cells. *J. Biol. Chem.*, 158 : 4630-4635.
- Housley, P.R. and Pratt, W.B. (1984)**
Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 43, Abst. 908.
- 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. and 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.
- Hutchens, T.W., Markland, F.S. and Hawkins, E.F. (1982)**
RNA induced reversal of glucocorticoid receptor activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 105 : 20-27.
- Idziorek, T. (1985)**
Caractérisation du récepteur à hormones glucocorticoïdes du foie de rat purifié sous forme non transformée. Thèse de Doctorat en Biochimie, Université des Sciences et Techniques de Lille.
- Idziorek, T., Formstecher, P., Danzé, P.M., Sablonnière, B., Lustenberger, P., Richard, C., Dumur, V. and Dautrevaux, M. (1985)**
Characterization of the purified molybdate-stabilized glucocorticoid receptor from rat liver. An *in vitro* transformable complex. *Eur. J. Biochem.*, 153 : 65-74.
- Jensen, E.V., Suzuki, T., Kawashima, T., Strumpf, W.E., Jungblut, P.W. and De Sombre, E.R. (1968)**
Two-step mechanism for the interaction of oestradiol with rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 59 : 632-637.
- Joab, I., Radanyi, 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.
- Kahn, A. (1987)**
ADN, protéines et transcription. *Med.Sciences*, 3 : 487-489.

- Kalimi, M. Beato, M. and Feigelson, P. (1973)**
Interaction of glucocorticoids with rat liver nuclei. I. role of the cytosol proteins. *Biochemistry*, 12 : 3365-3371.
- Kalimi, M., Colman, P., Feigelson, P. (1975)**
The "activated" hepatic glucocorticoid-receptor complex. *J. Biol. Chem.* 250 : 1080-1086.
- Kasambalides, E.J. and Lanks, K.W. (1981)**
Effects of low molecular weight nutrients of the pattern of protein synthesized by non proliferating murine L-cells. *Exp. Cell. Res.* 132 : 31-39.
- Katzenellenbogen, J.A., Carlson, K.E., Heiman, D.F., Robertson, D.W., Wei, L.L. and Katzenellenbogen, B.S. (1983)**
Efficient and highly selective covalent labeling of the estrogen receptor with ³H Tamoxifen aziridine. *J. Biol. Chem.* 258 : 3487-3495.
- Karin, M., Haslinger, A., Holtgreve, H., Richards, R.I., Kranter, P., Westphal, H.M., Beato, M. (1984)**
Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-IIA gene. *Nature*, 308 : 513-519.
- Kelley, P.M., Schlesinger, M.J. (1978)**
The effect of amino acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts. *Cell*, 15 : 1277-1286.
- King, W.J. and Greene, G.L. (1984)**
Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature*, 307 : 745-747.
- Koblinski, M., Beato, M., Kalimi, M. and Feigelson, P. (1972)**
Glucocorticoid-binding proteins of rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.* 247 : 7897-7904.
- Kovacic-Milivojevic, B., La Pointe, M.C., Reker, C.E., Vedeckis, W.V. (1985)**
Ribonucleic acid is a component of the oligomeric, transformed mouse At T-20 cell glucocorticoid receptor. *Biochemistry*, 24 : 7357-7366.
- Kovacic-Milivojevic, B., Vedeckis, W.V. (1986)**
Absence of detectable RNA in the purified untransformed mouse glucocorticoid receptor. *Biochemistry*, 25 : 8266-8273.
- Koyasu, S., Nishida, E., Kadowaki, T., Matsuzaki, F., Iida, K., Harada, F., Kasuga, M., Sakai, H., Yahara, I. (1986)**
Two mammalian heat shock proteins, hsp 90 and hsp 100 are actin binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83 : 8054-8058.

Kuhn, R.W., Schrader, W.T., Coty, W.A., Conn, P.M., O'Malley, B.W. (1977)

Progesterone-binding components of chick oviduct. Biochemical characterization of purified oviduct progesterone receptor B subunit. *J. Biol. Chem.*, 252 : 308-317.

Laemmli, U.K. (1970)

Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680-687.

La Pointe, M.C., Chang, C.H., Vedeckis, W.V. (1986)

Structure of the mouse glucocorticoid receptor rapid analysis by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Biochemistry*, 25 : 2094-2101.

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 : 12884-12890.

Lee, H.J., Bradlow, H.L., Moran, A.C. and Sherman, M.R. (1981)

Binding of glucocorticoid 21-oic acids and esters to molybdate-stabilized hepatic receptors. *J. Steroid. Biochem.*, 14 : 1325-1335.

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 mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85 : 1204-1208.

Lefebvre, P., Formstecher, 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., Danzé, P.M., Sablonnière, B., Richard, C., Formstecher, P. and Dautrevaux, M. (1988b)

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 press.

Liang, T. and Liao, S. (1974)

Association of the uterine 17 β -estradiol-receptor complex with ribonucleoprotein *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 249 : 4671-4678.

Liao, S., Liang, T. and Tymoczko, J.L. (1973)

Ribonucleoprotein binding of "steroid-receptor" complexes. *Nature (New Biol.)* 241 : 211-213.

- Liao, S., Smythe, S., Tymoczko, J.L., Rossini, G.P., Chen, C., and Hiipakka, R.A. (1980)**
RNA-dependent release of androgen and other steroid receptor complexes from DNA. *J. Biol. Chem.*, 255 : 5545-5551.
- Liautard, J.P., Sri-Widada, J., Brunel, C. and Jeanteur, P. (1982)**
Structural organization of ribonucleoprotein containing small nuclear RNAs from HeLa Cells. *J. Mol. Biol.* 162 : 623-643.
- Lippman, M. and Thompson, E.B. (1974)**
Steroid receptors and the mechanism of glucocorticoid responsiveness of somatic hybrid cells between hepatoma tissue culture cells and mouse fibroblasts. *J. Steroid Biochem.* 5 : 461-465.
- Lockard, R.E. and Kumar, A. (1981)**
Mapping tRNA structure in solution using double-strand-specific ribonuclease V₁ from cobra venom. *Nucl. Acid Res.* 9 : 5125-5140.
- Lustenberger, P., Blanchardie, D., Formstecher, P., Orsonneau, J.L. and Bernard, S. (1985)**
Non-transformed rabbit liver glucocorticoid receptor : purification, characterization and transformation. *Biochimie*, 67 : 1267-1278.
- Luttge, W.G., Gray, H.E. and Densmore, C.L. (1984)**
Hydrodynamic and biochemical correlates of the activation of the glucocorticoid-receptor complex; *J. Steroid Biochem.* 20 : 543-554.
- Marshall, T. (1984)**
Detection of protein in polyacrylamide gels using an improved silver stain. *Anal. Biochem.* 136 : 340-346.
- Mattaj, I.W. and De Robertis, E.M. (1985)**
Nuclear segregation of U₂ snRNA requires binding of specific snRNP proteins. *Cell* 40 : 111-118.
- Mattaj, I.W., Habets, W. and Van Venrooij, J. (1986)**
Monospecific antibodies reveals details of U₂ snRNP structure and interaction between U₁ and U₂ snRNPs. *EMBO J.*, 5 : 997: 1002
- Mc Blain, W.A. and Shyamala, G. (1980)**
Inactivation of mammary cytoplasmic glucocorticoid receptors under cell-free conditions. *J. Biol. Chem.* 255 : 3884-3891.
- Mc Ewen, B.S., Weiss, J.M., Schwartz, L. (1979)**
Uptake of corticosterone by rat brain and its concentration by certain limbic structures. *Brain Res.* 16 : 227-234.
- Mc Intyre, W.R. and Samuels, H.H. (1985)**
Triamcinolone acetonide regulates glucocorticoid-receptor levels by decreasing the half-life of the activated nuclear receptor form. *J. Biol. Chem.* 260 : 418-427.

- Mc Knight, G.S. and Palmiter, R.D. (1979)**
Transcriptional regulation of the ovalbumin and conalbumin genes by steroid hormones in chick oviduct. *J. Biol. Chem.* 254 : 9050-9058.
- Mendel, D.B., Bodwell, J.E., Gametchu, B., Harrison, R.W. (1986)**
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.
- Melander, W.R., Corradini, D. and Horvath, C.S. (1984)**
Salt-mediated retention of proteins in hydrophobic interaction chromatography. Application of solvophobic theory. *J. Chromatogr.* 317 : 67-85.
- Mendel, D.B., Bodwell, J.E. and 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.
- Mendel, D.B. and Orti, E. (1988)**
Isoform composition and stoichiometry of the 90 Kda heat shock protein associated with glucocorticoid receptors. *J. Biol. Chem.* 263 : 6695-6702.
- Middlebrook, J.L. and Aronow, L. (1977)**
Physicochemical properties of glucocorticoid receptors from mouse fibroblasts. *Endocrinology* 100 : 271-282.
- Miesfeld, R., Rusconi, S., Godowski, P.J., Maler, B.M., Okret, S., Wikstrom, A.C., Gustafsson, J.A., Yamamoto, K.R. (1986)**
Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA. *Cell* 46 : 389.
- Miesfeld, R., Godowski, P.J., Maler B.A. and Yamamoto, K.R. (1987)**
Glucocorticoid receptor mutants that define a small region sufficient for enhancer activation. *Science*, 236 : 423-427.
- Milgrom, E., Atger, M., Baulieu E.E. (1973)**
Acidophilic activation of steroid hormone receptors. *Biochemistry*, 12 : 5198-5205.
- Miller, L.K., Tuazon, F.B., Niu, E.M. and Sherman, M.R. (1981)**
Human breast tumor estrogen receptor : effect of molybdate and electrophoretic analysis. *Endocrinology*, 108 : 1369-1379.
- 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 : 1609-1612.
- Modigliani, E., Gattegno, L. (1987)**
Le lymphocyte est une cellule endocrine. *Med. Sciences.* 3 : 275-281.

- Moore, D.D., Marks, A.R., Buckley, D.I., Kapler, G., Payvar, F., Goodman, H.M. (1985)**
The first intron of human growth hormone gene contains a binding site for glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* 82 : 699-702.
- Moore, S.K., Kozak, C., Robinson, E.A., Ullrich, S.J. and Appela, E. (1987)**
Cloning and nucleotide sequence of the murine hsp 84 cDNA and chromosome assignment of related sequences. *Gene*, 56 : 29-40.
- Munck, A., Leung, K. (1976)**
Glucocorticoids and mechanism of action. in :*Receptors and Mechanisms of action of steroid hormones (II)* J.R. Pasqualini Ed., Walter de Gruyter : 312-367.
- Munck, A., Mc Guyre, P.M., Holbrook, N.J. (1984)**
Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacology. *Endocrine Rev.* 5 : 25-42.
- Munck, A., Holbrook, N.J. (1984)**
Glucocorticoid receptor in rat thymus cells : rapid kinetics behavior and a cyclic model. *J. Biol. Chem.* 259, 820-831.
- Murayama, A., Fukai, F., Harato, T. and Yamamoto, T. (1980)**
Estrogen receptor of cow uterus. *J. Biochem.* 88 : 955-961.
- Munck, A., Holbrook, N.T. (1987)**
Steroid hormone antagonism and a cyclic model of receptor kinetics. *J. Steroid Biochem.* 26 : 173-179.
- Nevins, J.R. (1983)**
The pathway of eukaryotic mRNA formation. *Ann. Rev. Biochem.* 52 : 441-466.
- Nielsen, G.J., Sando, J.J., Vogel, W.M., Pratt, W.B. (1977)**
Glucocorticoid receptor inactivation under cell-free conditions. *J. Biol. Chem.* 252 : 7568-7578.
- Nishigori, M. and Toft, D. (1980)**
Inhibition of progesterone receptor activation by sodium molybdate. *Biochemistry* 19 : 77-83.
- Niu, E.M., Neal, R.M., Pierce, V.K. and Sherman, M.R. (1981)**
Structural similarity of molybdate-stabilized steroid receptor in human breast tumors, uteri and leukocytes. *J. Steroid Biochem.* 15 : 1-11.
- Norris, J.S. and Kohler, P.O. (1976)**
Characterization of the androgen receptor from a Syrian hamster *Ductus deferens* tumor cell line (DDT₁). *Science* 192 : 898-900.

Norris, J.S., Kohler, P.O. (1981)

Separation of glucocorticoid receptors by phosphocellulose chromatography at pH 6.8. *J. Steroid Biochem.* 15 : 237-341.

Norris, J.S. and Kohler, P. (1983)

Syrian hamster glucocorticoid receptors. Characteristics of binding of partially purified receptor to DNA. *J. Biol. Chem.* 258 : 2350-2356.

Okret, S., Carlstedt-Duke, J., Wrangé, O., Carlstrom, K., Gustafsson J.A. (1981)

Characterization of an antiserum against the glucocorticoid receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 677 : 209.

Okret, S., Wikstrom, A.C., Gustafsson, J.A. (1985)

Molybdate-stabilized glucocorticoid receptor : evidence for a receptor heteromer. *Biochemistry* 24 : 6581-6586.

Paine, P.L., Moore, L.C. and Horowitz, S.B. (1975)

Nuclear envelope permeability. *Nature* 254 : 109-114.

Parchmann, L.G. and Litwack, G. (1977)

Resolution of activated and unactivated forms of the glucocorticoid receptor from rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 183 : 374- 382.

Payvar, F., Firestone, G.L., Ross, S.R., Chandler, V.L., Gustafsson, J.A., Yamamoto, K.R. (1982)

Multiple specific binding sites for purified glucocorticoid receptors on mammary tumor virus DNA. *J. Cell Biochem.* 19 : 241-249.

Payvar, F., De Franco, D., Firestone, G.L., Edgar, B., Wrangé, O., Okret, S., Gustafsson, J.A., Yamamoto, K.R. (1983)

Sequence specific binding of glucocorticoid receptor to MTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region. *Cell* 35 : 381-392.

Peterson, D.O. (1985)

Alterations in chromatin structure associated with glucocorticoid-induced expression of endogenous mouse mammary tumor virus genes. *Mol. Cell. Biol.* 5 : 1104-1110.

Porath, J. (1963)

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

Pratt, W.B. (1987)

Transformation of glucocorticoid and progesterone receptors to the DNA binding state. *J. Cell Biochem.* 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.

Puca, C.A., Nola, E., Sica, V. and Bresciani, F. (1971)

Estrogen-binding protein of calf uterus. Partial purification and preliminary characterization of two cytoplasmic protein. *Biochemistry* 10 : 3769-3780.

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

The glucocorticoid receptor in GH₁ cells. Evidence from dense aminoacid labeling and whole cell studies for an equilibrium model explaining the influence of hormone on the intracellular distribution of receptor. *J. Biol. Chem.* 258 : 417-425.

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

Effect of molybdate on glucocorticoid receptor of GH₃ cells. *J. Biol. Chem.* 260 : 14009-14015.

Radanyi, 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.

Rao, G.R. (1981)

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

Read, S.M., Northcote, D.H. (1981)

Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 116 : 53-64.

Redeuilh, G., Socco, C., Baulieu, E.E., Richard-Foy, H. (1981)

Calf uterine estradiol receptor . Effects of molybdate on salt-induced transformation process and characterization of a non-transformed receptor state. *J. Biol. Chem.* 256 : 11496-11502.

Reker, C.E., Kovacic-Milivojevic, B., Eastman-Reks, S.B. and Vedeckis, W. (1985)

Transformed mouse glucocorticoid receptor. Generation and interconversion of the 7.8S and 5.2S oligomeric. *Biochemistry* 24 : 196-204.

Reker, C.E., La Pointe, M.C., Kovacic-Milivojevic, B., Chiou, W.J.H., Vedeckis, W.V. (1987)

A possible role for dephosphorylation in glucocorticoid receptor transformation. *J. Steroid Biochem.* 26 : 653-665.

Renkawitz, R., Schutz, G., Von der Ahe, O., Beato, M. (1984)

Sequences in the promoter region of the chicken lysozyme gene required for steroid regulation and receptor binding. *Cell* 37 : 503-510.

Renoir, J.M., Yang, C.F., Formstecher, P., Lustenberger, P., Mester, J., Richard-Foy, H., Baulieu, E.E. (1982)

Progesterone receptor from chick oviduct. Purification of molybdate-stabilized and preliminary characterization. *Eur. J. Biochem.* 127 : 71-79.

Renoir, J.M., Buchou, T., Mester, J., Radanyi, C., Baulieu, E.E. (1984)

Oligomeric structure of molybdate stabilized, non-transformed 8S progesterone receptor from chicken oviduct cytosol. *Biochemistry*, 23 : 6016-6023.

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

Involvement of a non-hormone binding 90 Kda protein in the non-transformed 8S form of the rabbit uterus progesterone receptor. *Biochemistry* 25 : 6405-6413.

Rexin, M., Busch, W., Gehring, U. (1988)

Chemical cross-linking of heteromeric glucocorticoid receptors. *Biochemistry* 27 : 5593-5601.

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

Sequence-specific positioning of nucleosomes over the steroid inducible MMTV promoter. *EMBO J.* 6 : 2321-2338.

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 receptor exist in a wide range of tissue and species. *Biochemistry* 24 : 6584-6591.

Ringold, G.M. (1984)

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

Roberts, J.L., Budarf, M.L., Baxter, J.D., Herbert, E. (1979)

Selective reduction of proadrenocorticotropin/endorphin proteins and messenger ribonucleic acid activity in mouse pituitary tumor cells by glucocorticoids. *Biochemistry* 18 : 4907-4915.

Rossini, G.P. and Barbiroli, B. (1983)

RNase-sensitive glucocorticoid-receptor complexes from Hela cell nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113 : 870-882.

Rossini, G.P. (1984)

RNA-containing nuclear binding sites for glucocorticoid-receptor complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123 : 78-83.

Rossini, G.P. (1985)

RNase A effects on sedimentation and DNA binding properties of dexamethasone-receptor complexes from Hela cell cytosol. *J. Steroid Biochem.* 22 : 47-56.

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. and Tomkins, G.M. (1973)

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

Rousseau, G.G., Baxter, J.D. (1979)

in : *Glucocorticoid hormone action* - Eds : JD Baxter and G.G.Rousseau-Springer Verlag, Heidelberg, pp. 49-77.

Rowley, D.R., Chang, C.H. and Tindall, D.J. (1984)

Effects of sodium molybdate on the androgen receptor from the R3327 prostatic tumor. *Endocrinology* 114 : 1776-1784.

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

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

Sablonniere, B. (1987).

Etude des caractéristiques hydrodynamiques du récepteur des glucocorticoides. Apport de la chromatographie liquide à haute performance. Mémoire de D.E.R.B.H., Université de Lille 2.

Sablonniere, B., Danze, P.M., Formstecher, P., Lefebvre, P. and Dautrevaux, M. (1986).

Physical characterisation of the activated and non-activated forms of the glucocorticoid-receptor complex bound to the steroid antagonist ³H RU 486. *J. Steroid Biochem.*, 25 : 604-614.

Sablonniere, B., Lefebvre, P., Formstecher, P. and Dautrevaux, M. (1987).

Improved Stokes radius measurement of the glucocorticoid receptor using TSK G4000 SW and TSK G3000 SW high-performance size-exclusion columns. *J. Chromatogr.*, 403 : 183-196.

Sablonniere, B., Economidis, I.V., Lefebvre, P., Place, M., Richard, C., Formstecher, P., Rousseau, G.G. and Dautrevaux, M. (1988). RNA binding to the untransformed glucocorticoid receptor. Sensitivity to substrate-specific ribonucleases and characterization of a ribonucleic acid associated with the purified receptor. Eur. J. Biochem., In Press.

Sakaue, Y. and Thompson, E.B. (1977). Characterization of two forms of glucocorticoid hormone-receptor complexes separated by DEAE-cellulose column chromatography. Biochem. Biophys. Res. Commun., 77 : 533-541.

Sanchez, E.R., Toft, D.O., Schlesinger, M.J. and Pratt, W.B. (1985) Evidence that the 90 Kda phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine Heat Shock protein. J. Biol. Chem., 260 : 12398-12401.

Sanchez, E.R., Meshinhi, S., Tienrungroj, W., Schlesinger, M.J., Toft, D.O. and 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.

Scheidereit, C. and Beato, M. (1984). Contacts between hormone receptor and DNA double helix within a glucocorticoid regulatory element of mouse mammary tumor virus. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 81 : 3029-3033.

Schlesinger, M.J., Ashburner, M. and Tissieres, A. (eds) (1982) Heat Shock from bacteria to man. Cold Spring Harbor, NY , Cold Spring Harbor Laboratory.

Schmidt, T.J. and Litwack, G. (1982) Activation of the glucocorticoid receptor complex. Physiol. Rev. 62 : 1132-1184.

Schmidt, T.J., Harmon, J.M. and Thompson, E.B. (1980) Activation-labile glucocorticoid-receptor complexes of a steroid-resistant variant of CEM-C7 human lymphoid cells. Nature, 286 : 507-510.

Schmidt, T.J., Diehl, E.E., Davidson, C.J., Puk, M., Webb, M.L. and Litwack, G. (1986). Effects of bovine pancreatic RNase A, S protein and S peptide on activation of rat hepatic glucocorticoid-receptor complexes. Biochemistry, 25 : 5955-5961.

Schrader, W.T., Kuhn, R.W. and O'Malley, B.W. (1977). Progesterone-binding components of chick oviduct. Receptor B subunit protein purified to apparent homogeneity from laying hen oviducts. J. Biol. Chem., 252 : 299-307.

Schuh, S., Yonemoto, W., Brugge, J., Bauer, V.J., Riehl, R.M., Sullivan, W.P. and Toft, D.O. (1985).

A 90,000 Dalton binding protein common to both steroid receptors and the Rous Sarcoma virus transforming protein pp 60^{v-src}. J. Biol. Chem., 260 : 14292-14296.

Seeley, D.H. and Costas, P.D. (1983).

Transformation of a rabbit progesterone receptor from an 8 S form to 5.5 S and 4 S forms. Mol. Cell. Endocrinol., 30 : 161-178.

Sherman, M.R. (1975).

Physicochemical analysis of steroid hormone receptors. In "Methods in Enzymology". 36 : 211-222.

Sherman, M.R., Tuazon, F.B., Diaz, S.C. and Miller, L.K. (1976).

Multiple forms of oviduct progesterone receptors analyzed by ion-exchange filtration and gel electrophoresis. Biochemistry, 15 : 980-988.

Sherman, M.R., Pickering, L.A., Rollwagen, F.M. and Miller, L.K. (1978)

Mero-receptors : proteolytic fragments of receptor containing the steroid binding site. Fed. Proc. , 37 : 167-173.

Sherman, M.R., Tuazon, F.B., Miller, L.K. (1980)

Estrogen receptor cleavage and plasminogen activation by enzymes in human breast tumor cytosol. Endocrinology 106 : 1715-1727.

Sherman, M.R., Moran, M.C., Neal, R.M., Niu, E.M., Tuazon, F.B. (1982)

Characterization of molybdate stabilized glucocorticoid receptor in healthy and malignant tissues in "Progress in research and clinical applications of corticosteroids". Philadelphia, Heyden.

Sherman, M.R., Moran, M.C., Tuazon, F.B. and 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 weight and fractional ratio of proteins in impure systems by use of gel-filtration and density gradient centrifugation. Biochim. Biophys. Acta 112 : 346-362.

Simons, S.S., Thompson, E.B. (1981)

Dexamethasone 21-mesylate : an affinity label of glucocorticoid receptors from rat hepatoma tissue culture cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 3541-3545.

Simons, S.S., Schleenbaker, R.E., Eisen, H.J. (1983)

Activation of covalent affinity labeled glucocorticoid receptor-steroid complexes. J. Biol. Chem. 258 : 2229-2238.

Starzyk, R.M. (1988)

A site-specific mRNA-cytoplasmic protein complex *in vitro*. TIBS, 13 : 119-120.

Stevens, J., Stevens, Y.W., Rosenthal, R.L. (1979)

Characterization of cytosolic and nuclear glucocorticoid-binding components in human leukemic lymphocytes. Cancer Res. 39 : 4939-4948.

Swansson, M.S., Nakagawa, T.Y., Le Van, K., Dreyfuss, G. (1987)

Primary-structure of human ribonucleoprotein particle C protein : conservation of sequence and domain structures in hnRNA, mRNA and Pre-rRNA binding proteins. Mol. Cell. Biol. 7 : 1731-1739.

Tai, P.K.K., Maeda, Y., Nakao, K., Wakim, N.G., Duhring, J.L., Faber, L.E. (1986)

A 59 Kda protein associated with progestin, estrogen, androgen and glucocorticoid receptors. Biochemistry, 25 : 5269-5275.

Tanford, C. (1963)

in "Physical Chemistry of macromolecules". Wiley, New-York.

Thomas, T., Kiang, D.T. (1985)

Effects of ribonuclease on the physicochemical properties of oestrogen receptor. J. Steroid. Biochem. 23 : 19-25.

Thomas, T., Kiang, D.T. (1986)

Ribonuclease-induced transformation of progesterone receptor from rabbit uterus. J. Steroid Biochem. 24 : 505-511.

Tienrungroj, W., Meshinhi, S. Sanchez, E.R. Pratt, S.E., Grippo, J.F., Holmgren, A, and Pratt, W.B. (1987a)

The role of sulfhydryl groups in permitting transformation and DNA binding of the glucocorticoid receptor. J. Biol. Chem. 262 : 6992-7000.

Tienrungroj, W., Sanchez, E.R., Housley, P.R., Harrisson, R.W., Pratt, W.B. (1987b)

Glucocorticoid receptor phosphorylation, transformation and DNA binding. J. Biol. Chem., 262 : 17342-17349.

Toots, I., Metspalu, A., Villems, R. and Saarma, M. (1981)

Location of single-stranded and double-stranded regions in rat liver ribosomal 5S RNA and 5.8S RNA. Nucl. Acids Res. 9 : 5331-5343.

Tora, L., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Gaub, M.P., Chambon, P. (1988)

The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. Nature, 333 : 185-188.

Towbin, T., Staehelin, T., Gordon, J. (1979)
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitro-cellulose sheets procedure and applications. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76 : 4350-4353.

Tymoczko, J.L., Phillips, M.M. (1983)
The effects of ribonuclease on rat liver dexamethasone receptor : increased affinity for deoxyribonucleic acid and altered sedimentation profile. Endocrinology, 112 : 143-149.

Tymoczko, J.L., Phillips, M.M., Vernon, S.M. (1984)
Binding of the rat liver 7-8 S dexamethasone receptor to deoxyribonucleic acid. Arch. Biochem. Biophys. 230 : 345-354.

Tymoczko, J.L., Lee, J.H. (1985)
Biochim. Biophys. Acta 846 : 193-199.

Vedeckis, W.V. (1981)
Activation and chromatographic properties of the At T20 mouse pituitary tumor cell line glucocorticoid receptor. Biochemistry, 20 : 7237-7245.

Vedeckis, W.V. (1983a)
Limited proteolysis of the mouse liver glucocorticoid receptor. Biochemistry 22 : 1975-1983.

Vedeckis, W.V. (1983b)
Subunit dissociation as a possible mechanism of glucocorticoid receptor activation. Biochemistry, 22 : 1983-1989.

Vedeckis, W.V. (1985)
Steroid receptor structure in "Hormonally responsive tumors" (Hollander V.P., Eds) pp. 3-61, Acad. Press, N.Y.

Vedeckis, W.V., Kovacic-Milivojevic, B., La Pointe, M.C., Reker, C.E. (1985)
in "Molecular Mechanism of Steroid Hormone Action". Eds V.K. Moudgil, W. De Gruyter, Berlin, pp. 85-110.

Von der Ahe, D., Janich, S., Scheidereit, C., Renkawitz, R., Schutz, G., Beato, M. (1985)
Glucocorticoid and progesterone receptors bind to the same sites in two hormonally regulated promoters. Nature, 313 : 706-709.

Von Hippel, P.H., Bear, D.G., Morgan, W.D., McSwiggen, J.A. (1984)
Protein-nucleic acid interactions in transcription : a molecular analysis. Ann. Rev. Biochem. 53 : 389-404.

Walter, P., Blobel, G. (1982)
Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. Nature, 299 : 631-638.

- Weatherill, P.J., Bell, P.A. (1982)**
Characterization of the molybdate-stabilized receptor from rat thymus. *Biochem. J.* 206 : 633-640.
- Weatherill, P.J., Bell, P.A. (1984)**
Comparison of the physical characteristics of the molybdate-stabilized glucocorticoid receptor from rat, pig and human tissues. *J. Steroid Biochem.* 20 : 287-291.
- Weatherill, P.J., Bell, P.A. (1987)**
Identification of two forms of molybdate stabilized, non-transformed glucocorticoid hormone-receptor complex by gel-filtration chromatography. *J. Steroid Biochem.* 26 : 463-466.
- Webb, M.L., Schmidt, T.J., Robertson, N.M. and Litwack, G. (1986)**
Evidence for an association of a RNA with the purified unactivated glucocorticoid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140 : 204-211.
- Wecksler, W.R., Norman, A.W. (1980)**
J. Steroid Biochem. 13 : 977.
- Welshons, W.V., Lieberman, M.E., Gorski, J. (1984)**
Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature* 307 : 747-749.
- Westphal, H.M., Moldenhauer, G., Beato, M. (1982)**
Monoclonal antibodies against the rat liver glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 1 : 1467.
- Wickens, M.P., Dahlberg, J.E. (1987)**
RNA-protein interactions. *Cell* 51 : 339-342.
- Wilson, E.M., French, F.S. (1979)**
Effects of proteases and protease inhibitors on the 4.8 S and 8 S androgen receptors. *J. Biol. Chem.* 254 : 6310-6319.
- Wolff, B., Hanover, J.A. (1987)**
Sorting sequences for nuclear uptake : studies using synthetic peptides. *Fed. Proc.* 46 : 2108.
- Wrange, O., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.A. (1979)**
Purification of the glucocorticoid receptor from rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.* 254 : 9284-9290.
- Wrange, O., Okret, S., Radojic, M., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.A. (1984)**
Characterization of the purified activated glucocorticoid receptor from rat liver cytosol. *J. Biol. Chem.* 259 : 4534-4541.

- Wrange, O., Carlstedt-Duke, J., Gustafsson, J.A. (1980)**
Stoichiometric analysis of the specific interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *J. Biol. Chem.* 261 : 11770-11778.
- Yamamoto, K.R. (1985)**
Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene network. *Amer. Rev. Genet.* 19 : 209-252.
- Yamamoto, K.R., Alberts, B.M. (1976)**
Steroid receptors : elements for modulation of eukaryotic transcription. *Ann. Rev. Biochem.* 45 : 721-746.
- Yamamoto, K.R., Gehring, M.R., Stampfer, C., Sibley, H. (1976)**
Genetic approaches to steroid hormone action. *Recent Prog. Horm. Res.* 32 : 3-32.
- Zaret, K.S., Yamamoto, K.R. (1984)**
Reversible and persistent changes in chromatin structure accompany activation of a glucocorticoid dependent enhancer element. *Cell* 38 : 29-38.
- Zeller, R., Nyffenegger, T., De Robertis, E.M. (1983)**
Nucleocytoplasmic distribution of snRNPs and stockpiled snRNA-binding proteins during oogenesis and early development in *Xenopus laevis*. *Cell* 32 : 425-434.
- Zieve, G.W. (1981)**
Two groups of small stable RNAs. *Cell.*, 25 : 296-297.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

A) FIGURES	Pages
1ère PARTIE	
Figure 1 - Représentation schématique de l'action des glucocorticoïdes sur le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines.	9
Figure 2 - Effets possibles des glucocorticoïdes au niveau du système nerveux central	11
Figure 3 - Modèles proposés pour l'activation de la transcription par le récepteur des glucocorticoïdes	18
Figure 4 - Mécanisme d'action des glucocorticoïdes au niveau des cellules cibles	21
Figure 5 - Modèle hypothétique de la distribution intracellulaire du récepteur des glucocorticoïdes	29
Figure 6 - Visualisation du récepteur de la progestérone et des glucocorticoïdes, en microscopie électronique	36
Figure 7 - Modèles d'organisation en domaines du récepteur des glucocorticoïdes	39
Figure 8 - Comparaison schématique de la séquence en acides aminés des membres de la superfamille des récepteurs stéroïdiens	42
Figure 9 - Principales constructions des mutants de délétion du récepteur des glucocorticoïdes humains	43
Figure 10- Structure hypothétique du domaine de liaison à l'ADN du récepteur des glucocorticoïdes	46
Figure 11- Schéma de la structure de différents ARN où sont précisées les zones d'interaction avec les protéines	72
2ème PARTIE	
Figure 12- Mesure du coefficient de sédimentation des formes non transformées et transformées du récepteur des glucocorticoïdes	78
Figure 13- Analyse du récepteur non transformé par chromatographie d'exclusion de taille	80

Figure 14-	Mesure du coefficient de sédimentation des deux formes du récepteur caractérisées en chromatographie d'exclusion de taille	83
Figure 15-	Mesure du rayon de Stokes du récepteur non transformé obtenu après ultracentrifugation en gradient de saccharose	85
Figure 16-	Principe du pontage intermoléculaire d'une protéine oligomérique	89
Figure 17-	Electrophorèse en gel de polyacrylamide du récepteur non transformé, après pontage au glutaraldéhyde	90
Figure 18-	Electrophorèse en gel de polyacrylamide du récepteur non transformé après pontage au glutaraldéhyde (analyse des formes 8,3 nm et 7,1 nm)	92
Figure 19-	Propriétés ioniques des deux formes 8,3 nm et 7,1 nm du récepteur non transformé	94
Figure 20-	Analyse des propriétés hydrophobes du récepteur non transformé	96
Figure 21-	Caractérisation du récepteur et de la protéine HSP90 après élution de la colonne d'interaction hydrophobes	98
Figure 22-	Electrophorèse en gel de polyacrylamide du récepteur purifié non transformé	101
Figure 23-	(A) Electrophorèse en gel de polyacrylamide du récepteur purifié par chromatographie d'affinité et marqué au réactif de BOILTON et HUNTER. (B) Autoradiographie d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide d'un échantillon de récepteur purifié marqué à l' ¹²⁵ Iode.	103
Figure 24-	Analyse électrophorétique d'un échantillon de récepteur purifié marqué au 21-mésylate de dexaméthasone tritié	105
Figure 25-	Electrophorèse en gel de polyacrylamide des deux formes 8,3 nm et 7,1 nm du récepteur séparées par chromatographie d'exclusion de taille	106

Figure 26-	(A) Révélation du récepteur et de la protéine HSP90 dans les deux formes du récepteur non transformé. (B) Analyse par Western-blot d'un échantillon d'extrait sulfate de protamine ou d'un éluat de chromatographie d'affinité fractionnés sur TSK G4000 SW	108
Figure 27-	Chromatographie d'exclusion de taille du récepteur non transformé en absence et en présence d'anticorps anti-récepteur et anti-HSP90	111
Figure 28-	Principe de l'utilisation des stéroïdes bifonctionnels	113
Figure 29-	Mesure du rayon de Stokes du récepteur non transformé après incubation en présence d'un stéroïde bifonctionnel	115
Figure 30-	Effet de la RNase A sur le rayon de Stokes du récepteur non transformé, en présence de molybdate de sodium	122
Figure 31-	Effet de diverses ribonucléases sur le rayon de Stokes du récepteur non transformé, en présence de molybdate de sodium.	124
Figure 32-	Effet des ribonucléases sur la taille du récepteur non transformé en l'absence de molybdate de sodium	126
Figure 33-	Structure secondaire de l'ARN 5,8 S de foie de rat où sont précisées les sites de coupure par la nucléase S ₁ et la nucléase CVE.	127
Figure 34-	Insensibilité d'action de l'inhibiteur de RNase A sur la réduction de taille du récepteur non transformé soumis à une élévation thermique.	129
Figure 35-	Analyse électrophorétique des molécules d'ARN co-purifiées avec le récepteur non transformé	132
Figure 36-	Analyse électrophorétique des molécules d'ARN co-éluées avec le récepteur non transformé	133
Figure 37-	Caractérisation du récepteur purifié transformé	136
Figure 38-	Analyse électrophorétique des molécules d'ARN co-éluées avec le récepteur transformé purifié	138

Figure 39- Schéma hypothétique de l'organisation oligomérique du récepteur des glucocorticoides (forme non transformée)

B) TABLEAUX
1ère PARTIE

Tableau I - Caractéristiques hydrodynamiques du récepteur des glucocorticoides (forme non transformée) stabilisée par le molybdate de sodium	25
Tableau II- Caractéristiques hydrodynamiques des récepteurs stéroïdiens (forme non transformée)	26
Tableau III- Caractéristiques hydrodynamiques des récepteurs stéroïdiens (forme transformée)	32
Tableau IV- Caractéristiques physicochimiques comparées des formes transformées et non transformées des récepteurs stéroïdiens	35
Tableau V - Principales caractéristiques de la prévision de structure secondaire du récepteur des glucocorticoides du rat	50
Tableau VI- Principales caractéristiques de la prévision de structure secondaire de la protéine HSP84 de souris	58
Tableau VII- Principales hypothèses concernant la signification biologique d'une association récepteur-ARN	68

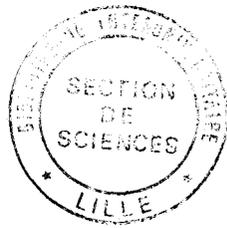
2ème PARTIE

Tableau VIII- Caractéristiques hydrodynamiques des différentes formes moléculaires du récepteur des glucocorticoides. Comparaison avec les caractéristiques de la protéine HSP90	86
Tableau IX- Labilité de la forme 8,3 nm du récepteur	119

TABLE DES MATIERES

	Pages
1ère PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	6
INTRODUCTION	7
I - L'HORMONE GLUCOCORTICOIDE : messenger hormonal plurifonctionnel	8
II - LE RECEPTEUR : véritable transducteur du message hormonal	14
III - LES DIFFERENTES FORMES MOLECULAIRES DU RECEPTEUR	20
1. Propriétés du récepteur non transformé	22
a) Charge	23
b) Taille moléculaire	24
c) Réalité de la forme non transformée du récepteur des glucocorticoides	
2. Propriétés du récepteur transformé	28
a) Charge	30
b) Taille moléculaire	31
3. Propriétés des autres formes moléculaires du récepteur	34
a) Récepteurs intermédiaires transformés	
b) Formes de protéolyse	37
IV - STRUCTURE PRIMAIRE ET DOMAINES DE STRUCTURE DU RECEPTEUR DES GLUCOCORTICOIDES	41
1. La région immunogène (région A/B)	44
2. La région C ou domaine de liaison à l'ADN	
3. Région D (518-558)	47
4. Région E ou domaine de liaison au stéroïde	
5. Relation Structure-fonction	49
V - STRUCTURE QUATERNAIRE DU RECEPTEUR	53
1. Interaction avec la protéine HSP90	
2. Interaction avec d'autres protéines	60
3. Interaction avec les acides ribonucléiques	
a) Mise en évidence	62
b) Caractérisation d'une molécule d'ARN associée	65
c) Signification physiologique	66
d) Mécanismes des interactions ARN-protéines	70
2ème PARTIE : RESULTATS EXPERIMENTAUX	75
I - ETUDE DES CARACTERISTIQUES PHYSICOCHEMIQUES DU RECEPTEUR	
1. Caractéristiques hydrodynamiques	77

a) Coefficient de sédimentation	79
b) Mesure du rayon de Stokes	87
2. Masse moléculaire	87
3. Caractéristiques ioniques du récepteur non transformé	93
4. Propriétés hydrophobes	95
II - COMPOSITION MOLECULAIRE DU RECEPTEUR NON TRANSFORME	100
1. Analyse du récepteur purifié par chromatographie d'affinité	
2. Identification du récepteur par marquage d'affinité	102
3. Caractérisation immunologique	107
a) Analyse par Western-blot	
b) Interaction des anticorps avec le récepteur natif	110
4. Mesure du nombre de sites de liaison à l'hormone dans le récepteur non transformé	112
5. Signification de l'hétérogénéité du récepteur natif non transformé	117
III - SENSIBILITE DU RECEPTEUR NON TRANSFORME A L'ACTION DES RIBONUCLEASES	121
1. Action de la ribonucléase A sur les caractéristiques hydrodynamiques du récepteur non transformé, en présence de molybdate de sodium	
2. Action de diverses ribonucléases en présence de molybdate de sodium	123
3. Sensibilité du récepteur non transformé à l'action de diverses ribonucléases, en l'absence de molybdate de sodium	125
IV - CARACTERISATION D'UNE MOLECULE D'ARN ASSOCIEE AU RECEPTEUR	131
1. Recherche d'une molécule d'ARN associée à la forme 8,3 nm du récepteur cytosolique	
2. Recherche d'une molécule d'ARN associée au récepteur non transformé, purifié par chromatographie d'affinité	134
3. Recherche d'une molécule d'ARN associée au récepteur transformé, purifié par chromatographie d'affinité	135



V - MODELE D'ORGANISATION DU RECEPTEUR NON TRANSFORME	139
CONCLUSION	
3ème PARTIE : APPENDICE TECHNIQUE	145
4ème PARTIE : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	167

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX	192
TABLE DES MATIERES	196